

Aus der Klinik für Innere Medizin und Poliklinik I mit Schwerpunkt
Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Arrhythmogene Effekte induziert durch die koronare
Konversion von pulmonalem Big Endothelin zu Endothelin-
Wirkungsverstärkung bei Hypercholesterinämie“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Oliver Simsch
aus Brandenburg an der Havel

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Dschietzig

2. Prof. Dr. med. F. Berger

3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
2 Endothelin	8
3 Material und Methoden	11
3.1 Präparation	
3.2 Lungen - Herz - Modell	
3.2.1. Apparativer Aufbau zur druckkonstanten Perfusion des isolierten Herzens	
3.2.2. Apparativer Aufbau zur volumenkonstanten Perfusion der isolierten Lunge	
4 Versuchsprotokoll	16
4.1 Das isolierte Herz	
4.2 Die isolierte Lunge	
4.3 Serielle Perfusion	
4.4 Applikation von exogenem Big ET und ET	
4.5 Mechanische Flussreduktion	
4.6 Pharmakologische Intervention	
4.7 Reagenzien	
4.8 Bestimmung von Endothelin und Big Endothelin	
4.9 Klassifizierung der Arrhythmien	
4.10 Datenanalyse	
5 Ergebnisse	22
5.1 Koronarfluss und mechanische Eigenschaften unter separater und serieller Perfusion	
5.2 Ventrikuläre Rhythmusstörungen unter separater und serieller Perfusion	
5.3 Applikation von exogenem humanen Big ET und ET	
5.4 Mechanische Flussreduktion	
5.5 Pharmakologische Intervention	
5.6 Endothelin - und Big Endothelin - Bestimmung	
6 Diskussion	32
6.1 Big Endothelin - induzierte Arrhythmien: Direkter versus ischämischer/ flussabhängiger Effekt	
6.2 ECE - abhängige proarrhythmische Effekte von endogenem pulmonalen Big ET	
6.3 Rolle der ET - Rezeptor - Subtypen bei der Entstehung von Arrhythmien	
6.4 Inzidenz und Schweregrad von Arrhythmien bei familiärer Hypercholesterinämie - Rolle der endothelialen Dysfunktion	
6.5 Studienlimitierung und klinische Schlussfolgerungen	

7 Zusammenfassung39

8 Literaturverzeichnis41

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung an Eides Statt

Abkürzungsverzeichnis

- NZW = „New Zealand White“ - Kaninchen
- WHHL = Watanabe Heritable Hyperlipidemic - Kaninchen
- ET = Endothelin
- big ET = big Endothelin
- $ET_{A/B}$ = Endothelin - A/B - Rezeptor
- ECE = „endothelin - converting - enzyme“
- ACE = „angiotensin - converting - enzyme“
- PEEP = positiver endexpiratorischer Druck
- LVP = linksventrikulärer Druck
- RVP = rechtsventrikulärer Druck
- $dp/dt_{max/min}$ = Druckerhöhungs- bzw. abfallgeschwindigkeit
- NO = Stickstoffmonoxid
- NTG = Nitroglycerin
- NPN = Nitroprussid - Natrium
- Ach = Acetylcholin
- SP = Substanz P
- MW = Mittelwert
- STABW = Standardabweichung
- VES = ventrikuläre Extrasystolen
- VT = ventrikuläre Tachykardie
- EKG = Elektrokardiogramm

1 Einleitung

Herzrhythmusstörungen können bradykard oder tachykard in Erscheinung treten. Sie sind atrialen oder ventrikulären Ursprungs und werden durch kardiale und extrakardiale Ursachen ausgelöst. Kardiale Ursachen sind unter anderem die Koronare Herzkrankheit, der Myokardinfarkt, Kardiomyopathien sowie angeborene oder erworbene Herzklappenfehler und das Cor pulmonale.

Extrakardiale Ursachen können unter anderem Elektrolytstörungen, Medikamente (z.B. Betasympathomimetika, Theophyllin), eine Hypoxie oder ein Volumenmangel sein.

Bei den ventrikulären Rhythmusstörungen liegt eine heterotope bzw. ektopische Reizbildung aufgrund einer gesteigerten fokalen Autonomie oder ein Reentry - Mechanismus vor. Pathophysiologisch ist sowohl ein erhöhter Einstrom von Natrium- und Calciumionen als auch ein verminderter Ausstrom von Kalium- und Chloridionen sowie eine Membranstörung der Zellen verantwortlich. Die Folge ist eine vorzeitige Kontraktion von Teilen des Myokards.

Extrasystolen erscheinen in langen Intervallen einzeln, gehäuft oder in Salven, in regelmäßiger oder unregelmäßiger Folge und sind manchmal Vorläufer einer paroxysmalen ventrikulären Tachykardie oder eines Kammerflimmerns. Beim Kammerflimmern handelt es sich um unregelmäßige und unkoordinierte Erregungen bis etwa 400 Schlägen pro Minute. Das Herz bringt keine nennenswerte Blutförderung mehr zustande und dies hat einen sofortigen Blutdruckabfall mit nachfolgendem Kreislaufstillstand zur Folge.

Im anatomischen Kreislauf ist dem linken Herzen und damit dem Koronarsystem die Lunge in Serie vorgeschaltet. Durch den Gasaustausch in der Lunge wird ein direkter Einfluss auf die Herzfunktion ausgeübt. Daneben erfüllt die Lunge eine Reihe von metabolischen Aufgaben wie den Abbau, die Synthese und die Freisetzung verschiedener Mediatoren.

Durch das Pulmonalendothel ist sie in der Lage Mediatoren wie zum Beispiel Arachidonsäuremetaboliten¹, den endothelabhängigen relaxierenden Faktor², Zytokine³⁻⁵, das atriale natriuretische Peptid⁶ und Endothelin⁷⁻¹⁰ freizusetzen.

Über eine spezifische pulmonale, mediatorvermittelte Beeinflussung der Tonisierung der Koronararterien, der kardialen Pumpfunktion sowie der Rhythmisierung des Herzens war in der Literatur wenig bekannt.

Alle Untersuchungen zu diesen Themen waren limitiert, da es nicht gelang die möglichen kardialen Effekte pulmonaler Mediatoren von Änderungen der systemischen Hämodynamik, des Gasaustausches und der neuroregulatorischen Aktivierung zu isolieren¹¹⁻¹³.

Aus diesem Grund wurde ein Modell zur seriellen Perfusion eines isolierten Herzens durch eine isolierte Lunge entwickelt. Dieses Modell ermöglicht es erstmalig, hämodynamische, respiratorische und neuroregulatorische Einflussgrößen auszuschalten und somit gezielt mediatorvermittelte Interaktionen zwischen Lunge und Herz zu untersuchen. An diesem Modell der seriellen Lungen - Herz - Perfusion konnte demonstriert werden, dass die basale pulmonale Freisetzung von big ET eine ET_A-Rezeptor vermittelte Erhöhung des Koronartonus bewirkte und dass dieser Effekt bei endothelialer Dysfunktion durch angeborene Hypercholesterinämie verstärkt war.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen inwieweit pulmonales big ET über eigene proarrhythmische Eigenschaften verfügt. Schließlich sollte ein Vergleich der Befunde an gesunden Tieren, den „New Zealand White“ – Kaninchen und den „Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits“, die auf Grund eines erblichen LDL - Rezeptordefektes eine frühzeitige Atherosklerose entwickeln¹⁴⁻¹⁵, ein möglicher Einfluss der frühen endothelialen Dysfunktion auf die Inzidenz und Stärke der Rhythmusstörungen herausgearbeitet werden.

2 Endothelin (ET)

Endothelin wurde 1987 erstmals von Yanagisawa und Mitarbeitern¹⁶ aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen der Schweineaorta isoliert. Es handelt sich um ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid mit zwei Disulfidbrücken und bildet in seiner Tertiärstruktur eine Helix. Es gibt zur Zeit mindestens drei bekannte Varianten des Endothelins, die alle dieselbe Anzahl an Aminosäuren besitzen, sich jedoch in der Primärstruktur in zwei (ET-2) bzw. in sechs Aminosäuren (ET-3) vom ET-1 unterscheiden. Diese drei Unterformen werden jeweils von eigenständigen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genen kodiert¹⁶⁻¹⁷.

Unterschiede zwischen den Isoformen bestehen in der Anzahl der Aminosäurereste der primären Syntheseprodukte. Aus dem Vorläuferhormon prä-pro-ET entsteht durch Proteolyse das big ET, bestehend aus 39 Aminosäuren. Durch erneute proteolytische Spaltung mittels eines „endothelin - converting - enzymes“ (ECE) wird im letzten Schritt big ET in das fertige vasoaktive ET umgewandelt¹⁶.

Zur Synthese und Freisetzung von ET sind nicht nur Endothelzellen in der Lage. Alle drei Isoformen werden von unterschiedlichsten Geweben in verschiedenen Verteilungsmustern exprimiert. ET-1 wurde als einziger Vertreter in Endothelzellen nachgewiesen¹⁶. Es kommt aber auch in anderen, nichtvaskulären Geweben vor¹⁸. ET-2 und ET-3 wurden nicht in Endothelzellen, dafür in verschiedenen anderen Geweben wie den Nieren, der Leber und des Gehirns gefunden¹⁹. Sowohl glatte Muskelzellen als auch Mesangialzellen der Nierenglomeruli können ET produzieren²⁰⁻²². Auch die Stimulation durch Ischämien, Hypoxien oder „shear stress“ kann die Synthese und Freisetzung von ET-1 durch Transkription von „messenger RNA“ induzieren.

Die Halbwertszeit von mRNA beträgt 15-20 min²², die von ET-1 beträgt 4 bis 7 min. Bei der Erstpassage durch die Lunge werden ca. 50 bis 90% des Plasma - ET-1 abgebaut^{10,23}. Die Konzentration von ET im menschlichen Plasma liegt unter physiologischen Bedingungen bei etwa 2 pg / ml²⁴.

ET ist nach dem Urotensin-II die stärkste bisher bekannte endogene vasokonstriktorische Substanz^{16,24} und maßgeblich als einer der „endothelium derived contracting factors“ (EDCF) im Zusammenspiel mit den „endothelium derived relaxing factors“ an der Regulation des Vasotonus beteiligt. Die durch ET-1 ausgelöste Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur ist konzentrationsabhängig.

Durch eine frühe ET - assoziierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen, welches vasorelaxierend wirkt, kommt es zu einer initialen Hypotonie²⁵ mit nachfolgendem langanhaltendem Blutdruckanstieg²⁶.

Die zellulären Wirkungen von ET werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Dabei gibt es gewebespezifische Unterschiede in Affinität und Rezeptordichte.

Endothelin bindet nahezu irreversibel an seinen Rezeptor²⁷. Man unterscheidet heute zwei Gruppen von ET - Rezeptoren. Zum einen den ET_A - Rezeptor, der speziell ET-1 bindet, zum anderen den ET_B - Rezeptor, der ET-1, -2 und -3 mit gleicher Affinität bindet. ET_A - Rezeptoren findet man in Herz, Lunge, Gehirn und Gefäßsystem, während ET_B - Rezeptoren vorwiegend in Niere, Gehirn und Lunge nachgewiesen wurden²⁸.

ET_A - Rezeptoren sind vor allem auf Herzmuskelzellen und vaskulären Muskelzellen verbreitet. ET_B - Rezeptoren befinden sich vornehmlich auf Endothelzellen und weniger auf vaskulären Muskelzellen. Beide Rezeptoren vermitteln ihre Effekte über die Stimulation der Phospholipase C. Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, was eine Vasokonstriktion zur Folge hat²⁹. Der ET_B - Rezeptor kann dagegen auch an inhibitorischen G- Proteinen binden³⁰⁻³¹.

ET kommt ubiquitär in nahezu allen Geweben vor³². Es spielt in einer Vielzahl von Erkrankungen, insbesondere des Herz - Kreislaufsystems, eine pathophysiologische Rolle. In der Lunge kann ET-1 in Endothel⁷, Tracheoepithel⁸, Bronchoepithelzellen⁹ und Gewebsmakrophagen³³ gebildet werden. Die Sekretion führt dann zu einer Pulmonalarterienkonstriktion³⁴, Bronchokonstriktion³⁵, Aktivierung von Alveolarmakrophagen und zur Freisetzung von Eikosanoiden³⁶. Erhöhte Plasmakonzentrationen wurden unter anderem bei einer Vielzahl von Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale und weiteren entzündlichen Prozessen sowie bei einer Reihe von Herzerkrankungen wie der Koronaren Herzkrankheit (KHK), der Herzinsuffizienz und bei der Pulmonalen Hypertonie gefunden³⁷⁻⁴². Erhöhte Plasmakonzentrationen von ET und seiner Vorstufe big ET wurden auch beim akuten Myokardinfarkt beschrieben⁴³.

In verschiedenen Tiermodellen wurden diese relevanten Erkenntnisse bereits ausführlich untersucht. Studien haben gezeigt, dass exogenes Endothelin einen vasokonstriktorischen Effekt auf die Koronargefäße und in höherer Dosierung auch ventrikuläre Rhythmusstörungen bis hin zu Kammerflimmern hervorrufen kann⁴⁴.

Auf Grund der enormen vasokonstriktorischen Potenz von ET wurden arrhythmogene Eigenschaften oft auf eine myokardiale Ischämie, hervorgerufen durch eine ET-vermittelte Koronargefäßkonstriktion, zurückgeführt.

Andere elektrophysiologische Untersuchungen und Experimente mit Herzgewebeproben legten jedoch die Vermutung nahe, dass Endothelin direkte arrhythmogene Eigenschaften besitzt⁴⁵⁻⁴⁶.

Es ist jedoch wenig darüber bekannt, inwieweit die Vorstufe des ET, das big ET, einen Anteil an diesen proarrhythmischen Eigenschaften hat.

Durch die Verwendung eines neuen Lungen - Herz - Modells konnte bereits eine basale luminale Freisetzung von pulmonalem big ET in isoliert perfundierten Kaninchenlungen nachgewiesen werden, welches durch die lokale koronare Konversion in ET zu einem relevanten Flussabfall führte. Dieser Abfall war in der Watanabe (WHHL) - Gruppe signifikant stärker⁴⁷.

Aus diesem Grund ist es interessant zu prüfen, ob am selben Modell nachgewiesen werden kann, ob endogenes, pulmonal freigesetztes big ET eine eigene direkte arrhythmogene Wirkung besitzt und ob diese bei familiärer angeborener Hypercholesterinämie verstärkt sein wird.

3 Material und Methoden

3.1 Präparation

Männliche NZW- sowie WHHL - Kaninchen (Charles River, Kisslegg, Deutschland) gleichen Alters (14 Wochen) und gleicher Gewichtsklasse (Gewicht 2,0 - 2,3 kg) wurden für diese Studie verwendet. Herz und Lunge wurden vom selben Tier gewonnen. Zur Narkotisierung wurde den Tieren Thiopental - Natrium intraperitoneal appliziert (40 - 80 mg/kg KG). Zuvor wurden sie mit unfraktioniertem Heparin antikoaguliert (1500 IE/kg KG). Nachdem der Atemstillstand eintrat, wurde ein Tracheostoma angelegt. Die Tiere wurden über eine Trachealkanüle mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) an einem Respirator (SERVO 910, Siemens - Elema, Solna, Schweden) mittels Überdruck beatmet [Tidalvolumen 10 - 12 ml/kg KG, Atemfrequenz 50 / min, positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) 1 mm Hg]. Nach einer mediosternalen Thorakotomie konnte das Herz über die Aorta kanüliert und in situ über die Langendorff - Apparatur perfundiert werden. Danach wurde das Herz aus dem Thorax herausgelöst und an der Langendorff - Anlage angebracht. Die Pulmonalarterie, welche zuvor geklemmt worden war, wurde ebenfalls mit einer Kanüle versorgt und mit eiskalter modifizierter Krebs - Henseleit - Pufferlösung (Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 127; KCl 3,7; CaCl 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 24,9; Glukose 10; Pyruvat 1,8; HEPES 5,9) perfundiert. Der pH-Wert lag zwischen 7,35 und 7,40. Die herausgelöste Lunge wurde sodann, freihängend in einer feuchten, beheizbaren Lungenkammer, an einen Gewichtsmesser angeschlossen. Der pulsatile pulmonale Ausgangsfluss von 15 - 20 ml / min wurde in einem Zeitraum von 20 min auf 100 ml / min erhöht und die Nährlösung sowie die Kammer gleichzeitig auf 37,5°C erwärmt; auch um biochemische Reaktionen durch den Wechsel des Perfusionsfluids so gering wie möglich zu halten. Es wurden kontinuierlich der pulmonalarterielle Druck (PAP), die Atemwegsdrücke und das Gewicht gemessen. Durch Ablösung des Herzens während der Präparation resultierte ein konstanter pulmonalvenöser Druck (PVP) von 0 mm Hg. Das Herz wurde druckkonstant (60 mm Hg) durch Langendorff - Perfusion mit derselben Perfusionslösung wie die Lunge ernährt (Zusammensetzung, pH, Temperatur, 95 % O₂ / 5 % CO₂). In diesem Fall handelt es sich um eine retrograde Perfusion der Herzkranzgefäße.

Der Perfusionsfluss ist retrograd gerichtet und somit schließt, wie beim Herzen in situ, die Aortenklappe während der Diastole und das Perfusat durchfließt dann die Koronargefäße. Über die leicht geöffneten Vorhöfe wurde in beide Ventrikel jeweils ein Ballonkatheter geschoben, mit denen die links- und rechtsventrikulären Drücke registriert werden konnten. Die Ballonkatheter wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, bis ein enddiastolischer rechts- und linksventrikulärer Druck von 1 - 3 mm Hg erreicht wurde. Zusätzlich wurde jeweils eine unipolare EKG-Elektrode am rechten Vorhof sowie am linken Ventrikel (Herzspitze) angebracht. Mittels dieser Elektroden konnte man die Ableitung eines konventionellen Elektrokardiogramms erhalten und das Herz elektrisch stimulieren. Wir waren somit in der Lage kontinuierlich die Herzfrequenz, den Perfusionsdruck, den Koronarfluss (Ultraschalldurchflusssonde von Transonic System, Ithaca, NY, USA), die Ventrikeldrücke (LVP, RVP), die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (dp/dt_{max} und dp/dt_{min}) abzutasten bzw. zu errechnen. Alle oben aufgeführten Parameter wurden mit einer Abtastfrequenz von 500 Hz unter Nutzung einer kommerziellen Software (Labwin, National Instruments) aufgezeichnet.

3.2 Lungen - Herz - Modell

Die Apparaturen für das isolierte Herz und die isolierte Lunge (Abb.1) wurden von der Firma Hugo Sachs Elektronik (March - Hugstetten, Deutschland) hergestellt. Verschiedene Modifikationen an der Anlage erlaubten uns ein schnelles Umschalten von einer separaten in eine serielle Perfusion der Organe. Im seriellen Modus wird das isolierte Herz durch das zuvor oxygenierte Lungeneffluat gespeist. Die Überleitung von der Lunge auf das Herz erfolgt innerhalb von zwei Sekunden. Somit bleiben die Bedingungen für das Herz in den verschiedenen Modi konstant (konstanter Perfusionsdruck, konstanter O_2 -Gehalt der Perfusionslösung, konstante Temperatur etc.).

3.2.1 Apparativer Aufbau zur druckkonstanten Perfusion des isolierten Herzens

Die von uns verwendete Apparatur zur retrograden Perfusion des Herzens nach Langendorff unter konstanten Druckbedingungen besteht aus einem Oxygenator, einem thermokonstant gehaltenen Vorratsgefäß für die Perfusionslösung, einem Überdruckventil, einem Wärmeaustauscher und einer Wärmekammer, die das isolierte Herz aufnimmt.

Der Oxygenator ist ein temperierbares, doppelwandiges Glasgefäß, dessen Innenteil kugelförmig ausgebuchtet ist, um dadurch eine große Oberfläche zu erhalten. Das Gasgemisch wird im unteren Bereich des Oxygenators eingeleitet und verlässt ihn durch ein Röhrchen im Schleuderscheiben - Modul auf der Oberseite über ein Gottliebsches Ventil (Überdruckventil - Tauchrohr). Mit diesem System erfolgt die Oxygenierung der Perfusionslösung nicht wie üblich durch Gasdurchperlung, sondern ähnlich dem bekannten Scheibenoxygenator einer Herz - Lungen - Maschine über einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf einer großen Oberfläche. Der Flüssigkeitspegel und damit die Menge des Perfusats im Oxygenator (ca. 5 ml) wurde mittels einer Niveauelektrode und eines elektronischen Reglers in Verbindung mit einer Pumpe auf konstantem Niveau gehalten. Nach Durchlaufen des Oxygenators hat die Perfusionslösung in dieser Apparatur einen Sauerstoff - Partialdruck von ca. 660 mm Hg.

Der Oxygenator ist ein geschlossenes System. Der Druck im Inneren repräsentiert den Perfusionsdruck für das Herz. Der tatsächlich am Herzen wirksame Druck ist jedoch etwas höher. Dies ergibt sich aus der Addition des hydrostatischen Druckes über dem Herzen und dem Gasdruck, welcher im Oxygenator herrscht. Auf Grund der automatischen Flüssigkeits - Niveauregulierung bleibt der hydrostatische Druck weitestgehend konstant um 10 mm Hg. Der Gasdruck im Oxygenator wird durch das Gottliebsche Ventil manuell eingestellt.

Das Perfusat wird über den Haupthahn und die Aorten - Kanüle dem Herzen zugeführt. Eine Blasenfalle, welche direkt vor dieser Kanüle platziert wurde, fängt die eventuell im Perfusat vorhandenen Gasbläschen ab, bevor diese in die Koronargefäße gelangen können. Hier befindet sich auch der Anschluss für einen Druckaufnehmer zur Messung des tatsächlichen Perfusionsdruckes.

Der Koronarfluss wird vor der aortalen Kanüle mit einer Ultraschalldurchflusssonde erfasst.

Die Herzkammer besteht aus einem temperierten doppelwandigen Glasgefäß. Sie ist so angebracht, dass sie nach Aufhängen des Herzens an die Apparatur auf einfache Weise von unten über das Herz geschoben werden kann.

3.2.2 Apparativer Aufbau zur volumenkonstanten Perfusion der isolierten Lunge

Die Apparatur zur isoliert perfundierten Lunge setzt sich aus einem thermokonstant gehaltenen Vorratsgefäß für die Perfusionslösung, einem Wärmeaustauscher, einer Rollerpumpe, einer Wärmekammer und einer Beatmungsmaschine zusammen (siehe Abb.1).

Die Perfusion der Lunge erfolgt volumenkonstant. Die Rollerpumpe fördert aus einem Vorratsgefäß die Nährlösung und hält somit die Flussrate konstant. Die Perfusionslösung wird der Lunge über eine in die Pulmonalarterie eingebundene Kanüle zugeführt. Vor der Pulmonalarterien - Kanüle ist eine Blasenfalle angebracht, um eventuell im Perfusat vorhandene Bläschen abzufangen. Nach der Lungenpassage fließt das sauerstoffreiche Perfusat passiv in die beheizbare Lungenkammer ab und wird entweder verworfen oder in die Herzapparatur weitergeleitet. Die Ventilation der Lunge erfolgt mit Überdruck anhand eines Respirators.

4 Versuchsprotokoll

4.1 Das isolierte Herz

Innerhalb einer 40-minütigen Einschlagphase wurde nach 20 Minuten die endothelabhängige Relaxation der Koronararterien unter Verwendung von Ach, (2×10^{-6} mol/l)⁴⁸ und SP (2×10^{-10} mol/l) getestet. Um den negativ chronotropen Effekt des Ach zu maskieren, wurde die Substanz unter konstanter elektrischer Stimulation (30 Schläge über der basalen Herzfrequenz) verabreicht. Zusätzlich wurden den Herzen auch der endothelunabhängige Vasodilatator NTG (4×10^{-6} mol/l) und der NO - Donator NPN (4×10^{-6} mol/l) verabreicht. Jede Substanz wurde den Herzen über einen Zeitraum von 90 Sekunden infundiert. Diese Testungen erfolgten, um eine spezifische Schwächung des endothelabhängigen und -unabhängigen Relaxationsmechanismus zu demonstrieren oder auszuschließen.

Es galten für alle Gruppen folgende Ausschlusskriterien:

- LVP \leq 70 mm Hg,
- $dp/dt_{\max} \leq$ 1000 mm Hg/s,
- morphologische Abnormitäten

4.2 Die isolierte Lunge

Nach einer 40-minütigen „steady state“ - Kontrolle mussten die Lungen einen konstanten pulmonalarteriellen Druck von 5 - 9 mm Hg bei einem pulmonalvenösen Druck von 0 mm Hg (Hilus = 0-Referenz) sowie einen inspiratorischen Spitzendruck von 7 - 10 mm Hg bei einem endexpiratorischen Druck von 1 mm Hg haben.

Es wurden nur solche Lungen in die Studie mit aufgenommen, welche die folgenden Kriterien erfüllten:

1. eine homogene weiße Lungenfarbe ohne Zeichen eines Ödems, einer Einblutung oder einer Atelektase
2. pulmonalarterielle sowie ventilatorische Drücke im Normalbereich (siehe oben).
3. isogravimetrische Lungen innerhalb der „steady state“ Phase (Lungengewichtszunahme < 0,5 g/h).

Nach Spülung mit mindestens 1,5 Liter Perfusionslösung erfolgte an fünf Lungen eine lichtmikroskopische Untersuchung bei der es keine Anzeichen für ein interstitielles oder alveoläres Ödem gab. Bis auf vereinzelte Leukozyten lagen keine Zellen im Gefäßbett vor.

4.3 Serielle Perfusion

Nach einer 45-minütigen Stabilisationsphase, in der die Organe separat perfundiert wurden, erfolgte das zügige Umschalten auf die serielle Perfusion, welche über einen Zeitraum von 40 Minuten für die NZW - Kaninchen (Kontrollgruppe; n = 12) sowie die WHHL - Kaninchen (n = 8) beobachtet wurde.

Pulmonale und koronare Effluatproben wurden jeweils am Ende der separaten Perfusionsperiode sowie bei 50 s, 500 s und 1500 s serieller Perfusion entnommen. Unter Beimischung von 0,2 Vol/% bovinem Albumin erfolgte die umgehende Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und die Aufbewahrung der Proben bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung bzw. Bestimmung der Konzentration von big ET und ET.

4.4 Applikation von exogenem big ET und ET

Um die Resultate der seriellen Lungen - Herz - Perfusion reproduzieren zu können, wurde jeweils die gleiche Anzahl isolierter Herzen beider Gruppen (n = 6) einer 40-minütigen koronaren Infusion von humanem ET-1 (5 pmol/l) und humanem big ET (5 pmol/l) unterzogen.

4.5 Mechanische Flussreduktion

Um reine flussabhängige von mediatorvermittelten Veränderungen der Herzparameter unterscheiden zu können und um festzustellen, ob das Auftreten von Arrhythmien den Veränderungen des Koronarflusses zuzuschreiben ist, wurden zusätzlich jeweils 6 Kontroll- sowie 6 Watanabe - Herzen isoliert und volumenkonstant perfundiert und dann einer mechanischen Flussreduktion unterzogen, wobei die durchschnittlichen koronaren Flussveränderungen bei serieller Perfusion simuliert wurden.

4.6 Pharmakologische Intervention

Mit verschiedenen Antagonisten versuchten wir, die vermuteten Mediatoren und deren Effekte zu unterdrücken, um somit den oder die Mediatoren benennen und im Weiteren bestimmen zu können. Alle Antagonisten wurden zuvor an Einzelherzen auf ihre Eigeneffekte hinsichtlich der Herzparameter geprüft.

Alle Reagenzien wurden jeweils beiden Gruppen (n = 6, für ET - Antagonisten und den ECE - Hemmer Phosphoramidon⁴⁹; n = 4 für alle anderen Antagonisten) verabreicht. Die Gabe der Pharmaka erfolgte jeweils vor dem Wechsel der separaten in die serielle Perfusion.

4.7 Reagenzien

Acetylcholin, Substanz P, Nitroglycerin, Nitroprussid - Natrium, Meclofenamat (Zylooxygenaseinhibitor)⁵⁰, Captopril (angiotensin - converting - enzyme - inhibitor)⁵¹, des-Arg⁹-[Leu⁸]-Bradykinin (Bradykinin - 1 - Rezeptor - Antagonist)⁵², BQ-123 (ET_A - Rezeptor - Antagonist)⁵³, humanes ET-1, humanes big ET-1 und Phosphoramidon stammten von Sigma Chemical (München, Deutschland).

Der nichtselektive ET - Antagonist PD-145065⁵⁴ und der ET_A - selektive Antagonist A-127722⁵⁵ wurden von den Firmen Parke Davis (Ann Arbor, MI, USA) und Abbot (Abbot Park, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

Ciba International Research Laboratories (Takarazuka, Japan) überließ uns die ET_B-Antagonisten IRL-1038⁵⁶ sowie IRL-1025⁵⁶.

Den Bradykinin - 2 - Rezeptor - Antagonisten Hoe-140⁵² erhielten wir von der Firma Hoechst (Frankfurt / Main, Deutschland).

4.8 Bestimmung von Endothelin und big Endothelin

ET- und big ET - Konzentrationen im pulmonalen sowie im koronaren Effluat konnten anhand zweier modifizierter „enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) kits“ (Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) bestimmt werden.

Das big ET - Kit war selektiv für alle 3 Isoformen des big ET (1-38) bei einer Kreuzreaktivität für big ET (22-38) und für alle ET - Isoformen von ≤ 1 %. Die Kreuzreaktivität des ET - Kits betrug für ET-1 und ET-2 100 %; die Kreuzreaktivität für ET-3 (< 5 %) und big ET (< 1 %) war gering.

Die big ET - Messung erfolgte direkt im Perfusat. Die Eichkurve wurde durch Titration von exogenem humanen big ET (1-38) im Leerperfusat erstellt. Der Messbereich lag zwischen 0,2 - 16 pmol/l.

Für die ET - Messung wurden die Proben zunächst über vorbehandelten (3 ml Methanol, 5 ml Wasser) Sep-Pak C₁₈-Säulen (Waters, Milford, MA, USA) aufkonzentriert, um die Nachweisgrenze des Verfahrens auf kleiner als 0,1 pmol/l zu senken. Mit 2 ml 60 % Azetonitril (in 0,1 % Trifluoressigsäure) wurde das ET anschließend eluiert.

Die Eluate wurden gefriergetrocknet und die Trockensubstanz bei -20°C gelagert. Für die Messungen wurden die Trockenproben in 0,7 ml Assay - Puffer (Boratpuffer, pH = 8,5; 0,15 % bovines Serumalbumin) gegeben. Da das ursprüngliche Volumen 3,5 ml betrug, resultierte daraus eine fünffach erhöhte Konzentration der Effluatproben. Die Eichkurve für ET wurde durch Gabe von 0,02 bis 3 pmol/l humanem ET im Leerperfusat vor der Extraktion erstellt.

4.9 Klassifizierung der Arrhythmien

Im Rahmen des Experiments wurden auftretende arrhythmische Ereignisse nach folgenden morphologischen Kriterien klassifiziert:

- Isolierte ventrikuläre Extrasystolen wurden als diskrete, identifizierbare, vorzeitige QRS-Komplexe, einem verkürzten Schlagintervall folgend, definiert.
- Ventrikuläre Tachykardien wurden als eine Reihe von mindestens vier aufeinander folgenden, morphologisch identischen, isolierten Kammerkomplexen definiert.
- Als Kammerflimmern bezeichneten wir ein Signal, bei dem keine individuellen Kammerkomplexe (QRS-Komplexe) voneinander abzugrenzen waren und während dessen keine eindeutige Herzfrequenz mehr messbar war⁵⁷.

Inzidenz und Morphologie der Arrhythmien wurden für den gesamten Zeitraum von 40 Minuten isolierter und 40 Minuten serieller Perfusion bestimmt und aufgezeichnet.

4.10 Datenanalyse

Die Daten werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (STABW) angegeben. Die Untersuchung auf signifikante Gruppenunterschiede erfolgte mit Hilfe einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen⁵⁸.

Nach dem globalen Test wurde ein multipler Vergleich durchgeführt (Adjustierung von p nach Bonferoni-Holm)⁵⁹.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Geringere Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden gesondert angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Koronarfluss und mechanische Eigenschaften unter separater und serieller Perfusion

Der mittlere pulmonalarterielle Druck (7,0 - 7,4 mm Hg), die basale Koronarflussrate (30,6 - 32,9 ml/min), die Herzkontraktilität (LVP_{max} , 83 - 90 mm Hg) sowie die basale Herzfrequenz (179 - 189 Schläge/min) waren in der NZW- und Watanabe - Gruppe nahezu identisch.

In der NZW - Gruppe ergab die Infusion von Acetylcholin bzw. Substanz P einen Flussanstieg von $48,2 \pm 4,0$ % bzw. $52,5 \pm 5,3$ % im Vergleich zum Basalfluss. Im Gegensatz dazu führte bei den Watanabe - Herzen die Infusion von Acetylcholin zu einem Flussabfall ($-11,2 \pm 2,0$ %). Substanz P zeigte hingegen eine geringe Flusssteigerung in den Koronarien ($19,4 \pm 2,3$ %).

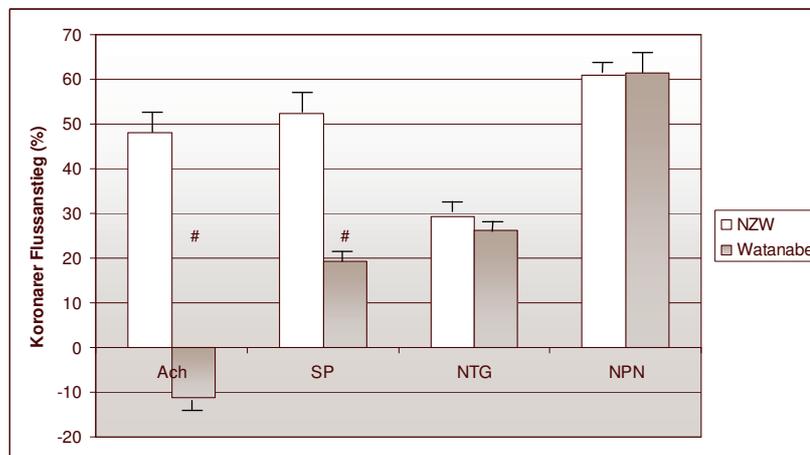


Abb.2 Endothelunabhängige- und abhängige koronare Vasodilatation bei isolierten Herzen von NZW- (Kontrollgruppe) (n = 12) und Watanabe - Kaninchen (n = 8). Bei den WWHL - Herzen imponierte eine Vasokonstriktion auf Ach sowie eine signifikant geringere Vasodilatation auf SP bei erhaltener endothelunabhängiger Vasodilatation durch NTG und NPN. Ach, Acetylcholin (2×10^{-6} mol/l); SP, Substanz P (2×10^{-10} mol/l); NTG, Nitroglycerin (4×10^{-6} mol/l); NPN, Nitrop-russid-Natrium (4×10^{-6} mol/l). #, $p < 0,01$, Kontrolle vs. Watanabe.

Der endothelunabhängige Vasodilatator Nitroglycerin und der NO - Donator Nitroprussid - Natrium ergaben keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Flussratensteigerung ($29,4 \pm 3,0$ % bzw. $61,0 \pm 3,8$ % in der Kontrollgruppe und $26,1 \pm 3,0$ % bzw. $61,5 \pm 5,9$ % in der Watanabe - Gruppe) (Abb.2).

Nach Umschalten des Perfusionsmodus von separater auf serielle Perfusion war in beiden Gruppen ein Abfall des Koronarflusses zu beobachten. In der NZW - Gruppe sank der Fluss auf 89 ± 3 % im Vergleich zum Basalwert. Der Flussabfall begann nach ungefähr 50 s serieller Perfusion, erreichte nach 300 - 400 s ein Plateau und blieb für die restliche Zeit von 40 min konstant.

Derselbe Vorgang führte bei den Watanabe - Herzen zu einem deutlich stärkeren Abfall des Koronarflusses auf Werte von 75 ± 6 % des Basalflusses (Abb.3).

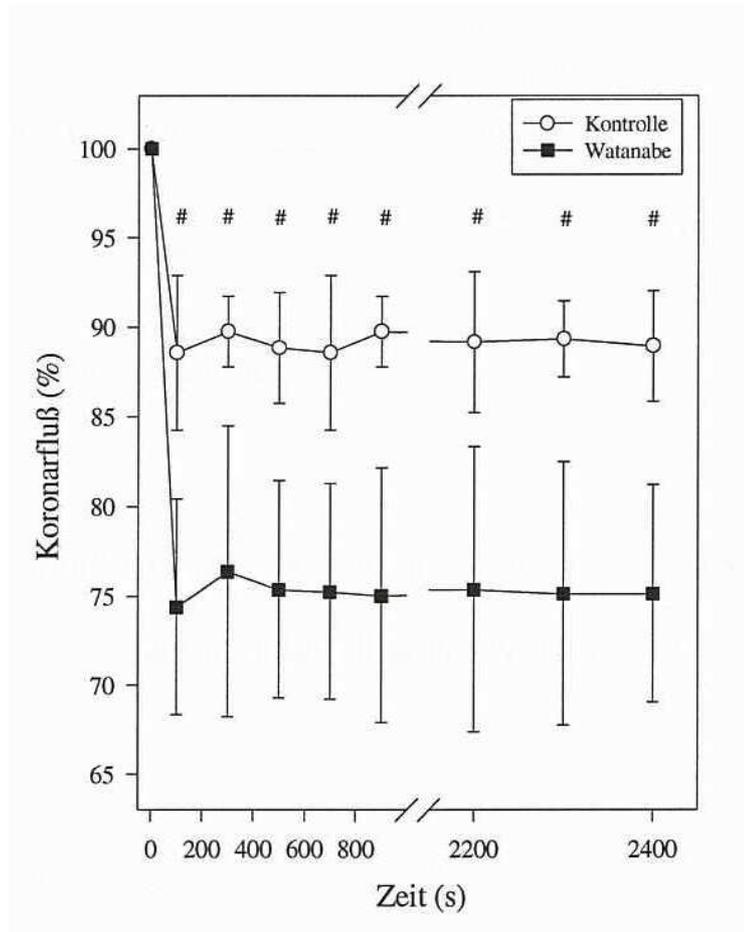


Abb.3 Koronarfluss der isolierten Kontroll- und Watanabe - Herzen nach Umschalten des Perfusionsmodus von separater zu serieller Perfusion. Zeitpunkt $t = 0$ Beginn der seriellen Perfusion. Beide Gruppen zeigten einen deutlichen Abfall des Koronarflusses im Vergleich zum Basalfluss. Erkennbar ist eine signifikant stärkere Flussreduktion in der Watanabe - Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Werte in Prozent (%) des Basalflusses. #, $p < 0,01$, Kontrolle vs. Watanabe.

Durch den Koronarflussabfall kam es in der Watanabe-Gruppe, sowohl bei serieller Perfusion als auch bei mechanischer Flussreduktion durch volumenkonstante Perfusion, zu einem Abfall der mechanischen Funktion. Die Veränderungen der mechanischen Funktion korrespondierten mit dem Schweregrad des Abfalls des Koronarflusses (Tab.1). Dies ist daran erkennbar, dass es weder in der Kontroll- noch in der Watanabe-Gruppe einen Unterschied zwischen serieller Perfusion und mechanischer Flussreduktion gab.

	Herzfrequenz (%)		LVP _{max} (%)		dp/dt _{max} (%)		dp/dt _{min} (%)	
	<i>seriell</i>	<i>mech.</i>	<i>seriell</i>	<i>mech.</i>	<i>seriell</i>	<i>mech.</i>	<i>seriell</i>	<i>mech.</i>
Kontrolle								
0	100(7)	100(5)	100(8)	100(6)	100(4)	100(5)	100(7)	100(7)
50s	100(4)	98(5)	96(8)	94(6)	98(9)	96(6)	93(4)	95(3)
500s	99(5)	99(4)	92(6)	93(4)	96(5)	95(6)	95(4)	96(7)
1500s	99(6)	98(5)	93(5)	93(5)	95(7)	94(5)	95(6)	96(4)
Watanabe								
0	100(6)	100(6)	100(4)	100(8)	100(6)	100(4)	100(5)	100(7)
50s	99(4)	98(6)	90(5)	92(5)	90(4)	89(6)	87(3)*	85(4)*
500s	98(6)	98(5)	82(3)*	84(4)*	85(7)*	86(4)*	80(6)#*	83(6)#*
1500s	100(5)	99(3)	83(6)*	84(3)*	83(5)*	82(4)*	79(4)#*	77(3)#*

Tabelle1: Kontraktilitätsparameter und Herzfrequenz – Vergleich von serieller Perfusion und mechanischer Flussreduktion. Werte in Prozent (%) angegeben und bezogen auf die Parameter am Ende der separaten Perfusion. Mechanische Flussreduktion (n = 6 je Gruppe). Kontrollgruppe (n = 12). Watanabe-Gruppe (n = 8). Standardabweichung in Klammern angegeben. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den korrespondierenden seriellen und mechanischen Werten festgestellt werden. *, p < 0,05, vs. Zeitpunkt 0; #, p < 0,05, Kontrolle vs. Watanabe.

5.2 Ventrikuläre Rhythmusstörungen unter separater und serieller Perfusion

Während der Phase separaten Organperfusion fanden wir sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der WHHL - Gruppe ausschließlich vereinzelte ventrikuläre Extrasystolen. Die Inzidenz und Anzahl von VES war in beiden Gruppen vergleichbar.

Nach dem Umschalten von separater auf serielle Perfusion kam es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl von VES in der Kontroll- und Watanabe - Gruppe (Abb.4).

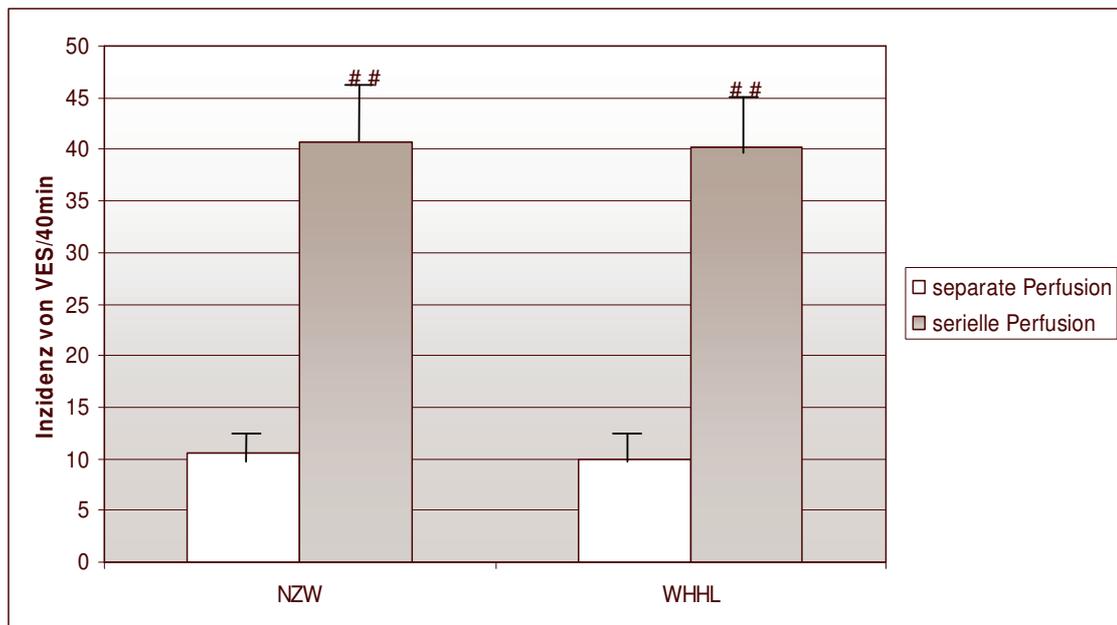


Abb.4 Inzidenz von VES während 40-minütiger separater Perfusion und während zusätzlicher 40-minütiger serieller Perfusion von NZW- (n = 12) und WHHL - Herzen (n = 8). Bei der seriellen Perfusion wird das isolierte Herz vom Effluat der isolierten Lunge desselben Tieres perfundiert. ##, p < 0,01 vs. separate Perfusion.

Jedoch war im Vergleich die Inzidenz von monomorphen, nichtanhaltenden ventrikulären Tachykardien in der Watanabe - Gruppe wesentlich größer als in der NZW-Gruppe ($1,38 \pm 1,06$ versus $0,33 \pm 0,49$ VT/40 min, $p < 0,05$). Während separater Perfusion traten in beiden Gruppen keine VTs auf.

Bei serieller Perfusion konnten VTs in der Watanabe - Gruppe bei 6 von 8 Herzen beobachtet werden (Frequenz 250 ± 12 Schläge/min), wohingegen nur bei 4 von 12 Herzen der NZW-Gruppe eine VT auftrat (Frequenz 240 ± 10 Schläge/min).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Länge der VTs in der Watanabe-Gruppe deutlich ausgeprägter war, als die in der Kontrollgruppe ($14,36 \pm 3,07$ versus $7,25 \pm 1,50$ Schläge/VT, $p < 0,05$). Die Inzidenz von VES und VTs war während der gesamten Phase im seriellen Perfusionsmodus nicht zeitabhängig.

5.3 Applikation von exogenem humanen big ET und ET

In der Gruppe der NZW - Herzen hatte die koronare Infusion von ET-1 mit einer Konzentration von 5 pmol/l einen Abfall des Koronarflusses von $14 \pm 2 \%$ (Basalwert, $32,2 \pm 2,5$ ml/min; ET, $27,7 \pm 2,1$ ml/min) zur Folge. Der Infusion von humanem big ET mit gleicher Konzentration folgte ein Absinken des Koronarflusses von $9 \pm 4 \%$ (Basalwert, $31,5 \pm 2,9$ ml/min; big ET, $28,7 \pm 1,9$ ml/min). Der gemessene koronare Flussabfall in der Watanabe - Gruppe war mit $-29 \pm 5 \%$ für ET-1 (Basalwert, $30,9 \pm 3$ ml/min; ET, $21,9 \pm 1,5$ ml/min) und $-23 \pm 4 \%$ für big ET (Basalwert, $31,0 \pm 2,2$ ml/min; big ET, $23,9 \pm 1,8$ ml/min) signifikant stärker als in der Kontrollgruppe.

Die arrhythmogenen Effekte von exogenem ET und big ET, im Sinne von ventrikulären Tachykardien, waren vergleichbar zu denen, welche während der seriellen Perfusion beider Gruppen beobachtet wurden (Tab.2).

	VES / 40min	Inzidenz von VT / 40 min	Dauer der VT
Exogenes big ET und NZW (n = 6)	$34,83 \pm 6,91$	$0,33 \pm 0,52$	$5,50 \pm 0,71$
Exogenes ET und NZW (n = 6)	$37,83 \pm 7,03$	$0,33 \pm 0,82$	$6,50 \pm 0,71$
Exogenes big ET und WHHL (n = 6)	$42,63 \pm 7,07$	$1,33 \pm 0,82^*$	$15,00 \pm 2,45^*$
Exogenes ET und WHHL (n = 6)	$41,86 \pm 12,56$	$1,17 \pm 0,75^*$	$12,29 \pm 2,06^*$

Tabelle 2: VES und VT während der Infusion von exogenem humanen ET und big ET. Daten beziehen sich auf die 40-minütige serielle Perfusion von NZW- und WHHL - Gruppe und der 40-minütigen Infusion von exogenem ET / big ET. Dauer der VT ist angegeben als Schläge/ VT. *, $p < 0,05$, WHHL vs. NZW.

5.4 Mechanische Flussreduktion

Eine mechanische Flussreduktion in 6 isolierten Herzen beider Gruppen durch volumenkontrollierte Perfusion auf Koronarflusswerte, vergleichbar mit denen während serieller Perfusion, wies zwar einen ähnlichen Abfall der kontraktile Funktionen auf (siehe Tab.1, Seite 19), hatte aber keine gehäuften arrhythmischen Ereignisse zur Folge. Ventrikuläre Tachykardien traten nicht auf (Abb.5).

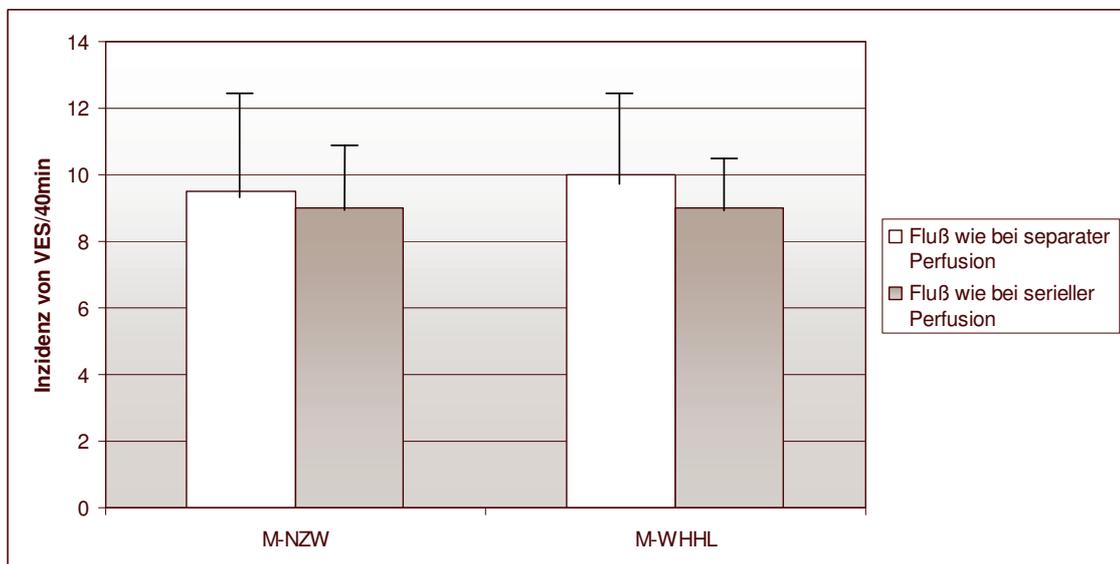


Abb.5 Zum Ausschluss flussabhängiger arrhythmischer Ereignisse wurde eine mechanische Flussreduktion i. S. einer volumenkontrollierten Perfusion bei isolierten NZW - und WHHL - Herzen durchgeführt, welche mit den Effekten während serieller Perfusion vergleichbar sind (M-NZW, mechanische Flussreduktion New Zealand Gruppe; M-WHHL, mechanische Flussreduktion Watanabe - Gruppe, n = 6 für beide Gruppen).

5.5 Pharmakologische Intervention

ET - Antagonisten sowie ECE – Inhibitoren lieferten identische Resultate sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Watanabe - Gruppe. Der Abfall des koronaren Flusses, die Zunahme von ventrikulären Extrasystolen (Abb.6) als auch die Inzidenz von ventrikulären Tachykardien konnten durch die koronare Infusion von Phosphoramidon (5×10^{-5} mol/l), einem ECE - Inhibitor, vollständig antagonisiert werden. Die Applikation des nichtselektiven ET - Antagonisten PD-145065 (1×10^{-5} mol/l) als auch die der ET_A - Rezeptor - Antagonisten BQ-123 (2×10^{-6} mol/l) und A-127722 (2×10^{-5} mol/l) führten zu einer signifikanten, jedoch nicht vollständigen Suppression der VES (Abb.6). VTs wurden in beiden Gruppen komplett eliminiert, ebenso der Abfall des Koronarflusses. Die ET_B - Rezeptor - Antagonisten IRL-1038 (4×10^{-6} mol/l) und IRL-1025 (5×10^{-6} mol/l) hatten keinen Effekt auf den Koronarfluss und das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien (Daten nicht gezeigt).

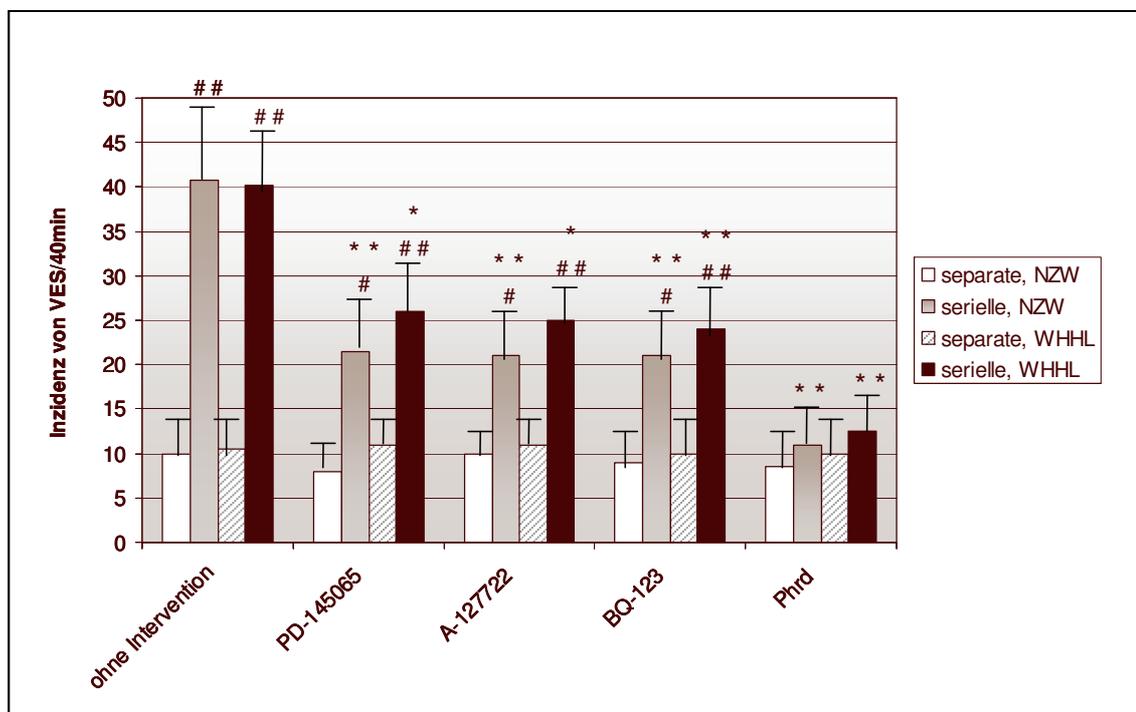


Abb.6: Inzidenz von VES in der NZW - und WHHL - Gruppe bei serieller Perfusion unter Infusion von PD -145065 (nichtselektiver ET - Antagonist, 1×10^{-5} mol/l), A-127722 (ET_A- Antagonist, 2×10^{-5} mol/l), BQ-123 (ET_A - Antagonist, 2×10^{-6} mol/l) und Phosphoramidon (Phrd, ECE - Inhibitor, 5×10^{-5} mol/l) (n = 6 pro Gruppe).#, p < 0,05; ##, p < 0,01 vs. separate Perfusion; *, p < 0,05;** , p < 0,01 vs. serielle Perfusion ohne Intervention.

Die koronare Infusion folgender Reagenzien hatte sowohl in der Kontroll- als auch in der WHHL - Gruppe keinen Einfluss auf ventrikuläre Herzrhythmusstörungen während der seriellen Perfusion:

Captopril (5×10^{-6} mol/l), ein ACE - Hemmer; desArg⁹-[Leu⁸]-Bradykinin (5×10^{-6} mol/l), ein Bradykinin - 1 - Rezeptor - Antagonist und Hoe-140 (1×10^{-6} mol/l), ein Bradykinin - 2 - Rezeptor - Antagonist.

Die intrapulmonale Infusion des Cyclooxygenasehemmers Meclofenamat (1×10^{-5} mol/l) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den Koronarfluss und die Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien in beiden Gruppen.

5.6 Endothelin- und big Endothelin - Bestimmung

In der Kontroll- und Watanabe - Gruppe lagen die ET - Konzentrationen des Pulmonaleffluates unter 0,1 pmol/l. Diese Werte blieben während der gesamten Phase des Versuches stabil.

50 Sekunden nach Umschaltung auf die serielle Perfusion blieb die ET - Konzentration des koronaren Effluates in beiden Gruppen unter 0,1 pmol/l. Ein Anstieg der ET - Konzentration konnte nach 500 s sowie nach 1500 s serieller Perfusion gemessen werden:

NZW - Gruppe: $k_{500} = 0,19 \pm 0,01$ pmol/l und $k_{1500} = 0,21 \pm 0,01$ pmol/l

WHHL - Gruppe: $w_{500} = 0,21 \pm 0,02$ pmol/l und $w_{1500} = 0,20 \pm 0,01$ pmol/l

Die basale big ET - Konzentration des Lungeneffluates lag bei 5,51 – 5,82 pmol/l und wies nur geringe Schwankungen und Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf.

Im Koronareffluat war während der separaten Perfusion der Organe kein big ET nachweisbar, wohingegen bei der seriellen Perfusion in beiden Gruppen die big ET - Konzentration im Bereich von 0,92 - 1,23 pmol/l lag. Somit waren diese Konzentrationen deutlich niedriger als die Werte der pulmonalvenösen Proben (Abb.7).

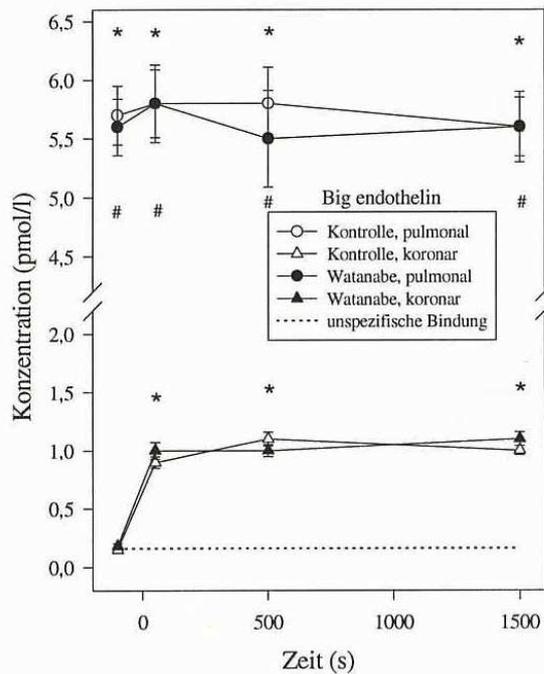
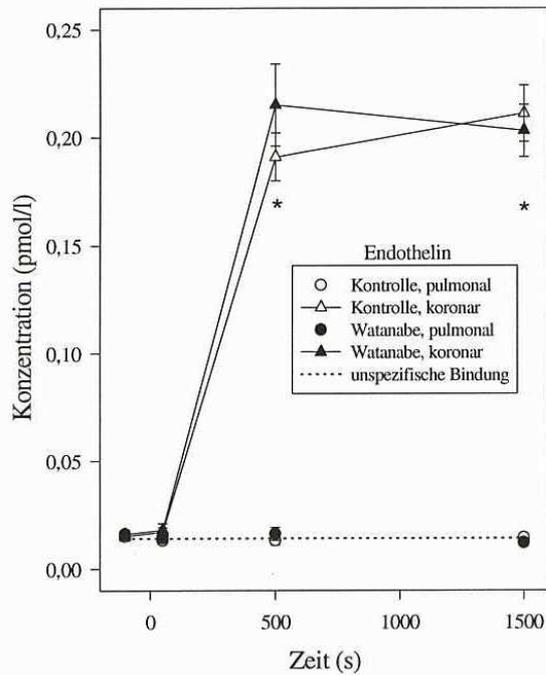


Abb.7 ET- und big ET - Konzentrationen im Pulmonal- und Koronareffluat (NZW, n = 12; WHHL, n = 8). Die Messungen (ELISA) der ET- und big ET - Konzentrationen im Lungen- und Herzeffluat zeigten, dass beide Organe unter separaten Perfusionsbedingungen keine relevanten ET - Mengen freisetzen. Unter serieller Perfusion aber ließ sich ein signifikanter Konzentrationsanstieg von ET im Koronareffluat verzeichnen. Das pulmonal freigesetzte big ET konnte in beiden Gruppen nur zu einem geringen Teil im Herzeffluat wiedergefunden werden. Serielle Perfusion beginnt mit Zeitwert 0 s. Konzentration in pmol/l. *, $p < 0,01$, verglichen mit dem Ende der separaten Perfusion; #, $p < 0,01$ Pulmonal- vs. Koronareffluat.

6 Diskussion

6.1 Big Endothelin - induzierte Arrhythmien: Direkter versus ischämischer/ flussabhängiger Effekt

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob pulmonal freigesetztes big ET direkte arrhythmogene Eigenschaften besitzt und wenn ja, ob dies mit der koronaren Konversion zu Endothelin zusammenhängt. Nach wie vor gibt es gegensätzliche Ansichten und Resultate bezüglich der Arrhythmogenität von ET und der zu Grunde liegenden Mechanismen. Vorliegende Studien, welche mit Schweinen⁴⁴, Kaninchen⁶⁰, Ratten⁶¹ und Hunden⁶²⁻⁶³ durchgeführt wurden legen den Schluss nahe, dass die proarrhythmischen Effekte ischämischen Ursprungs sind.

Auf der anderen Seite wird die Annahme, dass ET als direkter Mediator für arrhythmogene Ereignisse fungiert, durch verschiedene andere Studien unterstützt. So konnte ET im Vergleich zu einem kompletten Koronararterienverschluss eine höhere arrhythmogene Potenz zugeordnet werden⁶⁴. Die Unabhängigkeit bereits bestehender endothelininduzierter ventrikulärer Rhythmusstörungen von der Wiederherstellung des Koronarflusses nach ischämischer Flussreduktion und das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien in Abhängigkeit von intrakoronarem Endothelin konnten nachgewiesen werden⁶⁵.

In einer weiteren Studie von Szabo et al. traten endothelin-assoziierte ventrikuläre Rhythmusstörungen noch vor den Zeichen einer myokardialen Ischämie in Erscheinung. Die Autoren beobachteten mono- und polymorphe, anhaltende und nichtanhaltende ventrikuläre Tachykardien während einer intrakoronaren, niedrig dosierten Infusion (30-60 pmol/min) von ET in vivo. Diese mündeten oft in Kammerflimmern. Während der Phasen von nichtanhaltenden VTs kam es zu einem Abfall des koronaren Blutflusses von ca. 30 Prozent ohne Zeichen einer Ischämie im EKG und ohne signifikante Lac-taterhöhung im Koronarsinus⁶⁶.

Der Vergleich einer LAD - Ligatur mit der intrakoronaren Gabe von ET - 1 mittels dreidimensionalem EKG - Mapping ergab den Nachweis unterschiedlicher Mechanismen bei der Entstehung ventrikulärer Rhythmusstörungen, unabhängig von der ischämisch bedingten Komponente und unterstützt somit die Hypothese eines intrinsischen arrhythmogenen Potentials von ET⁶⁷. Diese Ergebnisse konnten durch weitere Studien bestätigt werden⁶⁸⁻⁷⁰.

Yorikane et al. berichteten erstmals darüber, dass exogenes ET - 1 eigenes proarrhythmisches Potential besitzt, welches sich durch eine Verlängerung des Aktionspotentials mit nachfolgender früher Repolarisation (Early Afterdepolarisation) pathophysiologisch darstellt^{45,46,71}.

Jegliche Einschätzungen über direkte elektrophysiologische Eigenschaften und Effekte von ET waren jedoch durch den Fakt limitiert, dass in sämtlichen, auch hier zitierten Studien, sehr hohe Dosen von ET eingesetzt wurden.

Endothelin kann im Blutplasma gesunder Menschen mit einer Konzentration von 0,5 bis 5 pmol/l nachgewiesen werden. In Kaninchenherzen wurde der Koronartonus bei einer ET - Konzentration von 1 bis 10 pmol/l nachweislich beeinflusst⁷².

Zusammenfassend war es nach wie vor unklar, ob endogenes ET oder big ET eine Rolle bei der physiologischen Modulation der myokardialen Rhythmogenese spielt.

6.2 ECE - abhängige proarrhythmische Effekte von endogenem pulmonalen big ET

Unsere Resultate zeigen, dass die basale pulmonale Freisetzung von big ET, gemessen in Konzentrationen um 5,5 bis 5,7 pmol/l in beiden Gruppen, ventrikuläre Rhythmusstörungen und koronare Vasokonstriktion auslösen kann. Obwohl der Koronarfluss in der Kontrollgruppe um 11 ± 3 % und in der Watanabe - Gruppe um 25 ± 6 % abfiel, gab es während der Phasen von ventrikulären Tachykardien keine Ischämiezeichen im EKG. Zusätzlich erfolgte eine mechanische, volumenkontrollierte koronare Flussreduktion, welche mit der big ET-induzierten Vasokonstriktion vergleichbar ist. Hierbei kam es zu keiner Beeinflussung von Häufigkeit und Schwere der ventrikulären Arrhythmien.

Aus diesem Grund ist ein flussabhängiger, ischämisch-bedingter Mechanismus als Effekt zur Auslösung von ventrikulären Rhythmusstörungen durch big ET in unserem Versuch als Ursache auszuschliessen. Die Daten, welche wir in unserer Studie ermittelten, führen eher zu der Annahme, dass bei unserem Modell direkte arrhythmogene Eigenschaften von big ET oder ET vorliegen.

Um festzustellen, ob die Arrhythmogenität eine Folge der koronaren Konversion von big ET zu ET ist oder ob big ET selbst dieses Potenzial besitzt, applizierten wir intrakoronar Phosphoramidon, einen Hemmstoff des ECE. Als Folge davon kam es zu einer kompletten Elimination aller Arrhythmien. Big ET hat im Vergleich zum ET eine etwa 140fach geringere Affinität zum ET – Rezeptor⁷³. Man kann somit davon ausgehen, dass die beobachteten Rhythmusstörungen aus einer erheblichen Umwandlung des Präkursors big ET zu ET während der Koronarpassage resultierten⁷⁴. Dies lässt schlussfolgern, dass die proarrhythmischen Eigenschaften von big ET in unserem Versuchsaufbau ausschließlich durch die lokale koronare Konversion zu ET hervorgerufen werden.

Studien von Brunner et. al^{51,75} haben proarrhythmische Effekte von endogenem kardialem ET während der Reperfusionphase nach Ischämie in isolierten Rattenherzen gezeigt. In unserer Studie konnten wir jedoch nur einen geringen Flussabfall durch endogenes pulmonales big ET nachweisen. Wir können eine relative Mangelperfusion bestimmter Myokardareale durch Flussumverteilung nicht völlig ausschließen, da wir uns in unserem Experiment nicht auf die Untersuchung der myokardialen Ischämie fokussierten.

Die Tatsache, dass es in unserem Modell nicht zu Ischämien kam, kann auch erklären, warum wir nicht in der Lage waren die Arrhythmien durch die intrakoronare Applikation vom ACE - Hemmer Captopril zu unterdrücken, was den Aussagen von Brunner et al. widersprechen würde. Diese demonstrierten eine proarrhythmische Angiotensin - Endothelin - Achse bei Ischämie und Reperfusion in Rattenherzen.

6.3 Rolle der ET - Rezeptor - Subtypen bei der Entstehung von Arrhythmien

In experimentellen und frühen klinischen Studien wurde der ET - Rezeptor - Blockade eine wichtige therapeutische Rolle bei Erkrankungen wie z. B. der arteriellen Hypertonie, der Atherosklerose, der Herzinsuffizienz, pulmonaler Erkrankungen und des Nierenversagens beigemessen. ET_A - Stimulation führt zu Kontraktion, Proliferation und Migration, ET_B - Rezeptoren fördern die Freisetzung von NO und damit die Relaxation⁷⁶⁻⁸⁰.

Die Beobachtungen und Ergebnisse im Rahmen verschiedener aktueller tierexperimenteller Versuche in Bezug auf die direkte arrhythmische Wirkung von ET - 1 führten zu einem gesteigerten Interesse, die verantwortlichen ET - Rezeptor - Subtypen zu identifizieren und deren antiarrhythmisches Potential zu untersuchen.

Bei bis dato zwei bekannten ET - Rezeptor - Subtypen stellt sich nun die Frage, welcher Subtyp für die oben beschriebenen proarrhythmischen Effekte verantwortlich ist. ET - induzierte ventrikuläre Arrhythmien bei Ratten⁸¹, Schweinen⁸²⁻⁸³ und Hunden⁸⁴⁻⁸⁵ waren sensitiv gegenüber einer Blockade des ET_A - Rezeptors, wohingegen eine Beteiligung des ET_B - Rezeptors weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Xu et al. beschrieben eine effektive Reduzierung von ventrikulären Arrhythmien und eine verbesserte mechanische Funktion während der akuten Ischämiephase in isolierten Rattenherzen, welche ausschliesslich ET_A -Rezeptor vermittelt und ET_B - Rezeptor unabhängig war⁸⁶.

Bei Baltogiannis et al. konnte eine akute ET_A - Rezeptorblockade während der ersten 24 Stunden postinfarziell die Inzidenz von VTs und Kammerflimmern in Rattenherzen deutlich reduzieren. Dies war physiologisch gekennzeichnet durch eine Verminderung von frühen Repolarisationen⁸⁷. Die Rolle des ET_B - Rezeptors bei der Entstehung von Arrhythmien wird kontrovers diskutiert, da es in der Vergangenheit ebenfalls gelang mittels nichtselektiver ET - Rezeptoren ventrikuläre Arrhythmien zu unterdrücken⁸⁸. Sharif et al. demonstrierten dagegen eine Reduzierung von ektopten ventrikulären Extrasystolen sowie eine Inzidenzminderung ventrikulärer Arrhythmien in Rattenherzen verbunden mit verringerter Mortalität durch Blockade des ET_B - Rezeptors mittels PD-161721 bei akutem Koronararterienverschluss⁸⁹.

In der vorliegenden Studie wurden sowohl durch die Gabe des nichtselektiven ET - Antagonisten PD-145065, als auch durch die Applikation der selektiven ET_A - Rezeptor - Antagonisten BQ-123 und A-127722 Inzidenz und Schwere der ventrikulären Rhythmusstörungen signifikant, aber nicht vollständig vermindert, obwohl gleichzeitig eine Koronarkonstriktion komplett verhindert werden konnte. Die ET_B - Rezeptor - Antagonisten IRL-1038 und IRL-1025 hatten diesbezüglich keinen Effekt. Dies lässt den Schluss zu, dass die proarrhythmischen Eigenschaften von ET in unserer Studie ET_B – Rezeptor-unabhängig und nur zum Teil ET_A – Rezeptor-vermittelt sind.

Ein weiterer noch nicht identifizierter Subtyp scheint wahrscheinlich. Dieser ist, wie von Kasai et al.⁹⁰ publiziert, unter anderem für ET - vermittelte positiv inotrope Effekte am Kaninchen - Herzen verantwortlich.

Die arrhythmogenen Eigenschaften von ET-1 sind scheinbar nicht auf die Ventrikel beschränkt, sondern äußern sich auch auf atrialer Ebene. So konnten Burrell et al. ET-1 induzierte arrhythmische Kontraktionen in menschlichen Gewebeproben des rechten Atriums beobachten, die durch einen nichtselektiven ET - Rezeptor Antagonisten verhindert werden konnten. Der ET_A-selektive Antagonist BQ-123 war in diesem Fall unwirksam⁹¹. Unterschiede in der elektrophysiologischen Wirkweise im Ventrikel und Vorhof werden ebenfalls diskutiert.

6.4 Arrhythmien bei familiärer Hypercholesterinämie – Rolle der endothelialen Dysfunktion

Ein weiteres wichtiges Ergebnis unserer Studie war die Tatsache, dass es in der Watanabe - Gruppe mit angeborener familiärer Hypercholesterinämie zu deutlich stärker ausgeprägten ventrikulären Rhythmusstörungen als in der Kontrollgruppe kam. Dies machte sich durch eine signifikant höhere Inzidenz und Länge von nichtanhaltenden ventrikulären Tachykardien bemerkbar. Trotz des nachgewiesenen zweieinhalbfach stärkeren vasokonstriktorisches Effektes von pulmonalem big ET in dieser Gruppe gab es keine Hinweise auf eine ischämische Ursache der induzierten ventrikulären Arrhythmien, da eine vergleichbare mechanische Reduktion des Koronarflusses keinen Einfluss auf Inzidenz und Stärke der Rhythmusstörungen hatte und auch im EKG keine Ischämiezeichen vorlagen.

Die Watanabe - Kaninchen, die während unseres Experiments zum Einsatz kamen, litten an einer frühen Dysfunktion des Koronarendothels auf Grund einer familiären Hypercholesterinämie. Einschränkungen oder Störungen der endothelialen Funktionen zeigen sich bereits vor dem histologischen Nachweis einer manifesten Atherosklerose⁹²⁻⁹⁵. Watanabe - Kaninchen entwickeln frühestens ab einem Alter von 4 Monaten eine morphologisch fassbare Veränderung an den Gefäßen^{14,92}. An unseren Tieren liessen sich makroskopisch keine pathologischen Befunde an der Aorta feststellen. Durch die endotheliale Dysfunktion werden sowohl die NO⁹⁶ - als auch die Prostacyclinsynthese⁹⁷ beeinflusst. Untersuchungen an Hunden⁹⁸ und Ratten⁹⁹ hatten ergeben, dass NO als endogener Mediator zur Präkonditionierung bei schweren ventrikulären Rhythmusstörungen fungiert. Gleichzeitig wurde vermutet, dass Prostacyclin als Substanz antiarrhythmische Eigenschaften besitzt¹⁰⁰⁻¹⁰¹.

Im Stadium der frühen endothelialen Dysfunktion zeigten sich die pulmonale Freisetzung von big ET und die koronare Kapazität zur Konversion in reifes ET unverändert.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine insuffiziente Endothelfunktion vermutlich zu einer erhöhten Anfälligkeit für arrhythmische Ereignisse führt, was auch den Unterschied zwischen der Kontroll- und der Watanabe - Gruppe in unserem Versuch erklären würde. Man sollte jedoch hinzufügen, dass unsere Studie keinen direkten Beweis darüber erbracht hat, dass die bei den hypercholesterämischen Watanabe - Kaninchen ausgelösten Arrhythmien den vorbeschriebenen Mechanismen unterlagen.

Obwohl diese Erklärung durchaus begründet scheint, da verschiedene Studien antiarrhythmische Eigenschaften von NO und Prostacyclin darlegten, können wir zusätzliche pathophysiologische Ursachen und Wege bei der Entstehung von Rhythmusstörungen in isolierten WHHL - Herzen nicht komplett ausschließen.

6.5 Studienlimitierung und klinische Schlussfolgerungen

In Bezug auf die von uns gemessene und dokumentierte Freisetzung von big ET könnte die Frage aufkommen, ob die Zusammensetzung der verwendeten Perfusionslösung, speziell die Abwesenheit von Blutzellen und Plasmaproteinen, unsere Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Brunner und Mitarbeiter¹⁰² haben diesbezüglich herausgefunden, dass die Bindung von ET an Plasmaalbumin keinen Einfluss auf die Vasoaktivität von ET ausübt. Des Weiteren wurde zirkulierendes Blut als Hauptfaktor bei der Konversion¹⁰³ und Elimination¹⁰⁴ von big ET ausgeschlossen. Folglich sind die Freisetzung und der damit verbundene Nachweis von big ET während unserer Versuchsreihe unabhängig von den experimentell geschaffenen Bedingungen zu sehen.

Bezugnehmend auf das klinische Potenzial unserer Ergebnisse sollte besonderes Augenmerk auf schwere ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, wie sie bei der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz charakteristisch sind, gelegt werden. Sowohl erhöhte Plasmakonzentrationen von big ET¹⁰⁵ als auch eine vermehrte pulmonale Synthese von ET¹⁰⁶ wurden bei schwerer Herzinsuffizienz beobachtet. Des Weiteren konnten bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung, Herzklappenvitien und dilatativer Kardiomyopathie erhöhte Serumkonzentrationen von big ET und ET-1 innerhalb der Phasen von ventrikulären Tachykardien und beim Kammerflimmern nachgewiesen werden¹⁰⁷. Dies könnte die Ätiologie multipler rezidivierender Arrhythmien erklären. Die Zunahme der Synthese und Freisetzung von ET im Organismus ist parallel von einer vermehrten Expression von ET - Rezeptoren begleitet¹⁰⁸.

Weiterhin sollte beachtet werden, dass sich bei der chronischen Herzinsuffizienz ein hoher prozentualer Anteil ursächlich auf dem Boden einer ischämischen koronaren Herzerkrankung entwickelt, welche mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht.

In Anbetracht dieser klinischen Erkenntnisse und dem Nachweis von vermehrten Big ET - assoziierten ventrikulären Arrhythmien bei familiärer Hypercholesterinämie in unserem Experiment, vertreten wir die Hypothese, dass ET generell und pulmonales Big ET im speziellen Fall als wichtiger Mediator bei der Entstehung von Arrhythmien bei chronischer Herzinsuffizienz fungiert.

7 Zusammenfassung

Am Modell der seriellen Lungen - Herz - Perfusion wurde bereits demonstriert, dass die basale pulmonale Freisetzung von big ET eine ET_A - vermittelte Erhöhung des Koronartonus bewirkt⁴⁷. ET wird als eine der stärksten vasokonstriktorisches Substanzen aber auch für die direkte oder indirekte Induktion von Herzrhythmusstörungen verantwortlich gemacht. Es war jedoch unklar, inwieweit die Vorstufe des ET, das big ET, an diesen proarrhythmischen Eigenschaften beteiligt ist.

Ziel unserer Untersuchung an gesunden New - Zealand - (NZW) und hypercholesterämischen Watanabe - Kaninchen (WHHL) war es zu zeigen, ob pulmonales big ET über eine eigene proarrhythmische Wirkung verfügt und ob diese Wirkung bei früher endothelialer Dysfunktion verstärkt ist.

Als Versuchsaufbau diente ein Lungen - Herz - Modell, bei der ein isoliertes Langendorff - Herz durch das Effluat einer isolierten Lunge desselben Tieres perfundiert wurde. Anschliessend wurden die Inzidenz und Schwere der daraus resultierenden Arrhythmien beider Gruppen aufgezeichnet. Die serielle Perfusion von Lunge und Herz führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der Inzidenz von ventrikulären monomorphen Extrasystolen im Vergleich zur vorhergehenden separaten Perfusion.

Isolierte Watanabe - Herzen, die bei familiärer Hypercholesterinämie im Gegensatz zu den Kontrollherzen eine pharmakologisch gesicherte frühe endotheliale Dysfunktion aufwiesen, zeigten einen stärkeren Schweregrad der Arrhythmien. Es traten bei 75 % der WHHL im Vergleich zu 33 % der NZW nichtanhaltende ventrikuläre Tachykardien auf. Sowohl die Inzidenz als auch die Länge der VTs waren signifikant höher. Um eine ischämische Komponente bei der Entstehung der Arrhythmien ausschließen zu können, führten wir an jeweils 6 isolierten Herzen jeder Gruppe eine mechanische Flussreduktion durch, welche mit dem Abfall des Koronarflusses bei serieller Perfusion vergleichbar war. Diese wies keine vermehrten arrhythmogenen Effekte auf und wir konnten somit eine ischämische bzw. flussbedingte Ursache für das Auftreten von Arrhythmien weitestgehend ausschließen. Ischämiezeichen im abgeleiteten EKG lagen ebenfalls nicht vor.

Die arrhythmischen Ereignisse konnten durch die Gabe des unselektiven ET - Antagonisten PD-145065 und der selektiven ET_A - Antagonisten A-127722 und BQ-123 fast komplett, jedoch nicht vollständig supprimiert werden. Im Gegensatz dazu konnte die Koronarkonstriktion vollständig verhindert werden.

Die ET_B - Rezeptor - Antagonisten IRL-1038 und IRL-1025 waren nicht in der Lage Koronarkonstriktion und Arrhythmien zu beeinflussen.

Im Gegensatz dazu war Phosphoramidon, ein Inhibitor des ECE, in der Lage, sämtliche Arrhythmien zu antagonisieren.

Wir schlussfolgern somit, dass die basale pulmonale Freisetzung von big ET einen konstanten proarrhythmischen Effekt ausübt, der auf der lokalen Konversion von big ET zu ET während der Koronarpassage basiert. Diese Wirkung ist unabhängig vom ET_B - Rezeptor und teilweise ET_A – Rezeptor-vermittelt.

Unsere Ergebnisse weisen daher auf einen bisher unbekanntem arrhythmogenen Effekt von big ET hin. Den deutlich höheren Schweregrad von Arrhythmien in der WHHL - Gruppe führen wir auf die koronare endotheliale Dysfunktion zurück.

8 Literaturverzeichnis

1. Seeger W, Wolf H, Stahler G, Neuhof H, Roka L. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins*. 1982;23:157-173.
2. Sprague RS, Thiemermann C, Vane JR. Endogenous endothelium-derived relaxing factor opposes hypoxic pulmonary vasoconstriction and supports blood flow to hypoxic alveoli in anesthetized rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:8711-8715.
3. Ghofrani HA, Rosseau S, Walmrath D, Kaddus W, Kramer A, Grimminger F, Lohmeyer J, Seeger W. Compartmentalized lung cytokine release in response to intravascular and alveolar endotoxine challenge. *Am J Physiol*. 1996;270:L62-L68.
4. Paegelow I, Werner H, Vietinghoff G, Wartner U. Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. *Inflamm Res*. 1995;44:306-311.
5. Palace GP, Del Vecchio PJ, Horgan MJ, Malik AB. Release of tumor necrosis factor after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:143-147.
6. Perreault T, Gutkowska J. Role of atrial natriuretic factor in lung physiology and pathology. *AM J Respir Crit Care Med*. 1995;151:226-242.
7. Kohan DE, Padilla E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest*. 1993;91:1235-1240.
8. Endo T, Uchida Y, Matsumoto H, Suzuki N, Nomura A, Hirata F, Hasegawa S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186:1594-1599.
9. Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am Resp Cell Mol Biol*. 1990;3:145-151.
10. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*. 1996;94:1578-1584.

11. Delcroix M, Melot C, Vachiere JL, Lejeune P, Leeman M, Vanderhoeft P, Naeije R. Effects of embolus size on hemodynamics and gas exchange in canine embolic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol*. 1990;69:2254-2261.
12. Manier G, Castaing Y. Influence of cardiac output on oxygen exchange in acute pulmonary embolism. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:130-136.
13. Utsunomiya T, Krausz MK, Dunham B, Levine L, Shepro D, Hechtman HB. Circulating negative inotropic agent following pulmonary embolism. *Surgery*. 1982;91:402-408.
14. Watanabe Y, Ito T, Shiomi M. The effect of selective breeding on the development of coronary atherosclerosis in WHHL rabbits. An animal model for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1985;56:71-79.
15. Kondo T, Watanabe Y. A heritable hyperlipidemic rabbit. *Exp Anim*. 1975;24:89-94.
16. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415.
17. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2863-2867.
18. Nunez DJR, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wye RK. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest*. 1990;85:1537-1541.
19. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J Biol Chem*. 1989;264:18156-18161.
20. Bakris GL, Fairbanks R, Traish M. Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin. *J Clin Invest*. 1991;87:1158-1164.
21. Takeda Y, Itoh Y, Yoneda T, Miyamori I, Takeda R. Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1993;233:299-301.
22. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide and regulation of expression. *J Biol Chem*. 1989;264:14954-14959.

23. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9797-9800.
24. Highsmith RF, Blackburn K, Schmidt DJ. Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Ann Rev Physiol*. 1992;54:257-277.
25. Ushio-Fukai M, Nishimura J, Aoki H, Kobayashi S, Kanaide H. Endothelin-1 inhibits and enhances contraction of porcine coronary arterial strips with an intact endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;184:518-524.
26. Cocks TM, Broughton A, Dib M, Sudhir K, Angus JA. Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and regional blood flow in the conscious rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1989;16:243-246.
27. Bolger GT, Liard F, Krogsrud R, Thibeault D, Jaramillo J. Tissue specificity of endothelin binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16:367-375.
28. Nord EP. Renal actions of endothelin. *Kidney Int*. 1993;44:451-463.
29. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*. 1990;4:2989-3000.
30. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1992;267:12468-12474.
31. Koh E, Morimoto S, Kim S, Nabata T, Miyashita Y, Ogihara T. Endothelin stimulates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int*. 1990;20:375-380.
32. Whittle BJ, Moncada S. The endothelin explosion. A pathophysiological reality or a biological curiosity? *Circulation*. 1990;81:2022-2025.
33. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffmann GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med*. 1990;172:1741-1748.
34. Mann J, Farrukh IS, Michael JR. Mechanisms by which endothelin-1 induces pulmonary vasoconstriction in the rabbit. *J Appl Physiol*. 1991;71:410-416.

35. Candenas ML, Naline E, Sarria B, Advenier C. Effects of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur J Pharmacol.* 1992;210:291-297.
36. Millul V, Lagente V, Gillardeaux O, Boichot E, Dugas B, Mencia-Heurta JH, Berezat G, Braquet P, Masliah J. Activation of guinea pig alveolar macrophages by endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17 (Suppl. 7):S233-S235.
37. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet.* 1993;341:1550-1554.
38. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib L, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993;328:1732-1739.
39. Vittori E, Marini M, Fasoli A, De Franchis R, Mattoli S. Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:1320-1325.
40. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333:356-363.
41. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1992;85:504-509.
42. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1994;89:1580-1586.
43. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1989;2:53-54.
44. Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, Feuerstein GZ. Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol.* 1989;257:H339-H343.
45. Yorikane R, Shiga H, Miyake S, Koike H. Evidence for direct arrhythmogenic action of endothelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173:457-462.
46. Yorikane R, Koike H, Miyake S. Electrophysiological effects of endothelin-1 on canine myocardial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17 (Suppl. 17):159-162.
47. Stangl K, Dschietzig T, Laula M, Alexiou K, Wernecke KD, Baumann G. Pulmonary big endothelin affects coronary tone and leads to enhanced, ET_A-mediated coronary constriction in early endothelial dysfunction. *Circulation.* 1997;96:3192-3200.

48. Amezcua JL, Dusting GJ, Palmer RM, Moncada S. Acetylcholin induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br J Pharmacol.* 1988;95:830-834.
49. Hisaki K, Matsumura Y, Maekawa H, Fujita K, Takaoka M, Morimoto S. Conversion of big ET-1 in the rat lung: role of phosphoramidon-sensitive endothelin-1-converting enzyme. *Am J Physiol.* 1994;266:H422-428.
50. Mayeux PR, Kadowitz PJ, McNamara DB. Differential effects of ibuprofen, indomethacin and meclofenamate on prostaglandin endoperoxide H₂ metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1989;87:41-46.
51. Brunner F, Kukovetz WR. Postischemic antiarrhythmic effects of endogenous endothelin secretion. *Circulation.* 1996;94:1752-1761.
52. Wirth K, Breitpohl G, Stechl J, Knolle J, Henke S, Schoelkens B. DesArg^{9-D}-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-7Tic, Oic⁸]bradykinin (desArg¹⁰-[Hoe 140]) is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1991;205:217-218.
53. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1994;113:336-338.
54. Doherty AM, Cody WL, He JX et al. In vitro and in vivo studies with a series of hexapeptide endothelin antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(Suppl 8):S98-102.
55. Wu-Wong JR, Dixon DB, Chiou WJ, Opgenorth TJ. Endothelin receptor antagonists: effect of serum albumin on potency and comparison of pharmacological characteristics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281:791-798.
56. Karaki H, Sudjarwo SA, Hori M, et al. ET_B receptor antagonist, IRL-1038, selectively inhibits the endothelin-induced endothelium-dependent vascular relaxation. *Eur J Pharmacol.* 1993;231:371-374.
57. Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988;22:447-455.
58. Bortz J, Lienert GA, Boehnke K. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. *Springer, Berlin.* 1990.
59. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statistics.* 1979;6:65-70.
60. McCabe C, Hicks MN, Kane KA, Wainwright CL. Electrophysiological and haemodynamic effects of endothelin ETA and ETB receptors in normal and ischaemic working rabbit hearts. *Br J Pharmacol.* 2005;146:118-128.

61. Raschack M, Unger L, Riechers H, Klinge D. Receptor selectivity of endothelial antagonists and prevention of vasoconstriction and endothelin-induced sudden death. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 (Suppl 3):397-399.
62. Larkin SW, Clarke JG, Keogh BE, et al. Intracoronary endothelin induces myocardial ischaemia by small vessel constriction in the dog. *Am J Cardiol.* 1989;64:956-958.
63. Clozel JP, Clozel M. Effects of endothelin on the coronary vascular bed in open-chest dogs. *Circ Res.* 1989;65:1193-1200.
64. Nichols AJ, Koster PF, Ohlstein EH. The effects of diltiazem on the coronary haemodynamic and cardiac functional effects produced by intracoronary administration of endothelin-1 in anaesthetized dog. *Br J Pharmacol.* 1990;99:597-601.
65. Salvati P, Chierchia S, Dho L, et al. Proarrhythmic activity of intracoronary endothelin in dogs: relation to the site of administration and to changes in regional flow. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17:1007-1014.
66. Szabo T, Geller L, Merkely B, Selmecei L, Juhasz-Nagy A, Solti F. Investigating the dual nature of endothelin-1: ischemia or direct arrhythmogenic effect? *Life Sci.* 2000;66:2527-2541.
67. Becker R, Merkely B, Bauer A, Geller L, Fazekas L, Freigang KD, Voss F, Senges JC, Kuebler W, Schoels W. Ventricular arrhythmias induced by endothelin-1 or by acute ischemia: a comparative analysis using three-dimensional mapping. *Cardiovasc Res.* 2000;45:310-320.
68. Toth M, Solti F, Merkely B, Kekesi V, Horkay F, Szokodi I, Juhasz-Nagy A. Ventricular tachycardias induced by intracoronary administration of endothelin-1 in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 (Suppl 3):S153-155.
69. Geller L, Szabo T, Kiss O, Solti F, Juhasz-Nagy A, Merkely B. Fundamental electrophysiological differences between low-dose intracoronary endothelin-1 infusion and myocardial ischemia revealed by multiple monophasic action potential recording. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36 (Suppl 1):S167-171.
70. Merkely B, Vago H, Kiss O, Zima E, Szücs G, Geller L, Juhasz-Nagy A. Expressed monophasic action potential alternans before the onset of ventricular arrhythmias induced by intracoronary bolus administration of endothelin-1 in dogs. *Clin Sci.* 2002;103 (Suppl 48):219S-222S.
71. Yorikane R, Koike H. The arrhythmogenic action of endothelin in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1990;53:259-263.

72. Kusumoto K, Awane Y, Fujiwara S, Watanabe T. Role of endogenous endothelin in extension of rabbit myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 (Suppl 8):339-342.
73. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugite Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationship of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5):S5-S7.
74. Corder R, Vane JR. Radioimmunoassay evidence that the pressor effect of big endothelin-1 is due to local conversion to endothelin-1. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:375-380.
75. Brunner F, Opie LH. Role of endothelin-A receptors in ischemic contracture and reperfusion injury. *Circulation.* 1998;97:391-398.
76. Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ET_B receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994;269:21778-21785.
77. Karet FE, Kuc RE, Davenport AP. Novel ligands BQ-123 and BQ-3020 characterize endothelin receptor subtypes ET_A and ET_B in human kidney. *Kidney Int.* 1993;44:36-42.
78. Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowsky HR, Brodde OE. Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation.* 1998;97:744-751.
79. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, et al. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation.* 1999;99:1802-1809.
80. Barton M, Lüscher TF. Endothelin antagonists for hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1999;8:549-555.
81. Garjani A, Wainwright CL, Zeitlin IJ, Wilson C, Slee SJ. Effects of endothelin-1 and the ET_A-receptor antagonist, BQ-123, on ischemic arrhythmias in anaesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25:634-642.
82. Ercan ZS, Ilhan M, Kilinc M, Kilinc M, Türker RK. Arrhythmogenic action of endothelin peptides in isolated perfused whole hearts from guinea pig and rats. *Pharmacology.* 1996;53:234-240.

83. Raschack M, Juchelka F, Rozek-Schaefer G. The endothelin-A antagonist LU 135 252 suppresses ischemic ventricular extrasystoles and fibrillation in pigs and prevents hypoxic cellular decoupling. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:145-148.
84. Horkay F, Geller L, Kiss O, et al. Bosentan, the mixed A/B receptor antagonist suppresses intrapericardial endothelin-1 induced ventricular arrhythmias. In: *Sixth international conference of endothelin.* Montreal, Canada, 1999, p.195.
85. Douglas SA, Nichols AJ, Feuerstein GZ, Elliot JD, Ohlstein EH. SB 209670 inhibits the arrhythmogenic actions of endothelin-1 in the anaesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:99-102.
86. Xu H, Lin L, Yuan WJ. Antiarrhythmic effect of endothelin-A receptor antagonist on acute ischemic arrhythmia in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:37-44.
87. Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, Mitsi AC, Hatzistergos KE, Elaiopoulos D, Fotiadis DI, Kyriakides ZS, Kolletis TM. Endothelin receptor - a blockade decreases ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 2005;67:647-654.
88. Geshi E, Nomizo A, Arata Y, Nakatani M, Katagiri T. Effect of non-selective endothelin blockade, TAK-04, on the ischemic cellular injury of rat heart. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:94-1001.
89. Sharif I, Kane KA, Wainwright CL. Endothelin and ischaemic arrhythmias - antiarrhythmic or arrhythmogenic? *Cardiovasc Res.* 1998;39:625-632.
90. Kasai H, Takanashi M, Takasaki C, Endoh M. Pharmacological properties of endothelin receptor subtypes mediating positive inotropic effects in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1994;266:H2220-2228.
91. Burrell KM, Molenaar P, Dawson PJ, Kaumann AJ. Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: blockade with SB 209670. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:449-459.
92. Braesen JH, Beisiegel U, Niendorf A. Probucol inhibits not only the progression of atherosclerotic disease, but causes a different composition of atherosclerotic lesions in WHHL-rabbits. *Virchows Arch.* 1995;426:179-188.
93. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23:833-843.

94. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1991;83:391-401.
95. McLenachan JM, Williams JK, Fish RD, Ganz P, Selwyn AP. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation*. 1991;84:1273-1278.
96. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
97. Dembinska-Kiec A, Rücker W, Schönhöfer PS. Atherosclerosis decreased prostacyclin formation in rabbit lungs and kidneys. *Prostaglandins*. 1979;17:831-839.
98. Vegh A, Szekeres L, Parratt J. Preconditioning of the ischaemic myocardium; involvement of the L-arginine nitric oxide pathway. *Br J Pharmacol*. 1992;107:648-652.
99. Pabla R, Curtis MJ. Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ Res*. 1995;77:984-992.
100. Parratt JR. Eicosanoids and arrhythmogenesis. In: Vaughan Williams EM, editor. *Antiarrhythmic Drugs*. Berlin: Springer-Verlag, 1989:569-589.
101. Mest HJ, Schneider S, Riedel A. Relevance of eicosanoids for biochemical regulation of cardiac rhythm disturbances. *Biomed Biochim Acta*. 1987;46:534-538.
102. Brunner F, Stessel H, Watzinger N, Löffler BM, Opie LH. Binding of endothelin to plasma proteins and tissue receptors: effects on endothelin determination, vasoactivity, and tissue kinetics. *FEBS Lett*. 1995;373:97-101.
103. Watanabe Y, Naruse M, Monzen C, Naruse K, Ohsumi K, Horiuchi J, Yoshihara I, Kato Y, Nakamura N, Kato M, et al. Is big endothelin converted to endothelin-1 in circulating blood? *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17 (Suppl 7):503-505.
104. Hensen A, Ahlborg G, Ottoson-Seeberger A, Lundberg JM. Metabolism of big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin (1-21). *Regul Pept*. 1995;55:287-297.
105. Kiowski W, Sütsch G, Hunziker P, Müller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*. 1995;346:732-736.
106. Tsutamoto T, Wada A, Maeda Y, Adachi T, Kinoshita M. Relation between endothelin-1 spillover in the lungs and pulmonary vascular resistance in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1427-1433.

107. Szuzs A, Roka A, Soos P, Szilagyi S, Vago H, Keltai K, Csaba Dezsi A, Geller L, Merkely B. Effect of incessant ventricular tachyarrhythmias on serum endothelin and big endothelin levels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:S402-S406.
108. Miyauchi T, Sakai S, Ihara M, Kasuya Y, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Increased endothelin-1 binding sites in the cardiac membranes in rats with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 (Suppl 3):448-451.

Danksagung

Diese Arbeit wurde im kardiologischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. G. Baumann (Direktor) danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit im kardiologischen Forschungslabor.

Herrn Priv.-Dozent Dr. med. Th. Dschietzig danke ich für seine interessante Aufgabengstellung, seine Anregungen, sein förderndes Interesse sowie für seine unermüdliche praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Simsch, Oliver, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Arrhythmogene Effekte induziert durch die koronare Konversion von pulmonalem Big Endothelin zu Endothelin - Wirkungsverstärkung bei Hypercholesterinämie“ 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.“

Oliver Simsch

Potsdam, den 05.05.2008