

Kardiovaskuläre Rezeptorsysteme in der chronischen Urämie- Untersuchungen am Modell der subtotal nephrektomierten Ratte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Herrn Peter Röhnert

geb. am: 21.05.1974 in Riesa

Gutachterin bzw. Gutachter:

- 1. Prof. Dr. H. Schröder**
- 2. Prof. Dr. O.-E. Brodde**
- 3. Prof. Dr. M.C. Michel**

verteidigt am 28.11.2000 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Kardiovaskuläre Rezeptorsysteme, Funktion und Bedeutung	2
1.2. Aufgabenstellung	6
2. Methoden	9
2.1. Urämische Ratte	9
2.1.1. Operationstechnik	9
2.1.2. Tierbetreuung, Futter	10
2.1.3. Töten, Organentnahme	11
2.1.4. Messung des Blutdrucks	11
2.1.5. Gewinnung von Plasma	12
2.1.6. Bestimmung der Plasmakatecholaminkonzentration mittels HPLC	12
2.2. Die Herzarbeit unter dem Einfluß β-adrenerger und M-cholinriger Stimulation	13
2.2.1. Physiologische Kontraktionsmessungen an Ventrikelpräparaten mit Isoprenalin	13
2.2.2. Biochemische Untersuchungen zur β-adrenergen Signaltransduktion	15
2.2.2.1. Radioligand-Bindungsstudien am β-Adrenozeptor	15
2.2.2.2. Bestimmung der Aktivität der Adenylylzyklase unter dem Einfluß von Isoprenalin	22
2.2.3. Kontraktionsmessungen an Ventrikelpräparaten mit SNAP	24
2.2.4. Kontraktionsmessung an Ventrikelpräparaten mit 8-Bromo-c-GMP	24
2.2.5. Physiologische Kontraktionsmessungen mit Carbachol an mit Forskolin vorstimulierten Ventrikelstreifen	24
2.2.6. Untersuchungen zur M-cholinergen Signaltransduktion (Radioligand-	25

Bindungsstudien, Messung der Aktivität der Adenylylzyklase

2.3. Der Einfluß von Endothelinrezeptoren und α_1-Adrenozeptoren auf kardiovaskuläre Funktionen	26
2.3.1. Kardiale Wirkungen von Noradrenalin	26
2.3.1.1. Messung der positiv inotropen Wirkung von Noradrenalin	26
2.3.1.2. Untersuchungen zur Signaltransduktion am α_1 -Adrenozeptor (Radioligand-Bindungsstudien, Bestimmung der Inositolphosphatbildung)	27
2.3.2. Die Wirkung von Noradrenalin an der Aorta thoracica	29
2.3.2.1. Kumulative Kontraktionsmessungen mit Noradrenalin an Aortenpräparaten	29
2.3.2.2. Akkumulation von Inositolphosphaten nach Stimulation des α_1 -Adrenozeptors	30
2.3.3. Kardiale Wirkungen von Endothelin	31
2.3.3.1. Messung der positiv inotropen Wirkung von Endothelin	31
2.3.3.2. Untersuchungen zur Signaltransduktion am Endothelinrezeptor (Radioligand-Bindungsstudien, Bestimmung der Inositolphosphatbildung)	31
2.3.4. Die Wirkung von Endothelin an der Aorta thoracica	33
2.3.4.1. Kumulative Kontraktionsmessungen mit Endothelin an Aortenpräparaten	33
2.3.4.2 Akkumulation von Inositolphosphaten nach Stimulation des Endothelinrezeptors	33
2.4. Statistische Analysen	33
2.5. Verwendete Substanzen	34

3. Ergebnisse	37
3.1. Beschreibung des Tiermodells	37
3.1.1. Harnpflichtige Substanzen im Plasma	37
3.1.2. Alter, Körpergewicht, Herzgewichte	37
3.1.3. Blutdruck	39
3.1.4. Bestimmung der Katecholamine im Plasma	39
3.2. Charakterisierung der Herzarbeit nach subtotaler Nephrektomie	41
3.2.1. Die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin	41
3.2.2. Biochemische Untersuchungen zur β -adrenergen Signaltransduktion	43
3.2.2.1. Bindungseigenschaften der β -Adrenozeptoren	42
3.2.2.2. Einflüsse auf die Aktivität der Adenylylzyklase	47
3.2.3. Der Einfluß von SNAP auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels	49
3.2.4. Die Wirkung von 8-Bromo-c-GMP auf den Herzmuskel	51
3.2.5. Der Einfluß von M-Cholinozeptoren auf die Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen	56
3.2.6. Zelluläre Signaltransduktion nach M-cholinriger Stimulation	56
3.2.7. Zusammenfassung	60
3.3. Die Rolle von Endothelinrezeptoren und α_1-Adrenozeptoren in der Urämie	61
3.3.1. Die Wirkung von Noradrenalin am Herzen	61
3.3.1.1. Die positiv inotrope Wirkung von Noradrenalin am Ventrikelstreifen	61
3.3.1.2. Biochemische Untersuchungen am α_1 -Adrenozeptor und an der nachfolgenden Signaltransduktion	63
3.3.2. Die Wirkung von Noradrenalin an der Aorta thoracica	67
3.3.2.1. Die Wirkung von Noradrenalin auf die glatte Muskulatur der Aorta thoracica	67

3.3.2.2. Biochemische Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade des α_1 -Adrenozeptors an der Aorta thoracica	68
3.3.3. Die Wirkung von Endothelin am Herzen	70
3.3.3.1. Positiv inotrope Wirkung von Endothelin am Ventrikelstreifen	70
3.3.3.2. Biochemische Untersuchungen am kardialen Endothelinrezeptor und dessen Signaltransduktion	71
3.3.4. Die Wirkung von Endothelin an der Aorta thoracica	76
3.3.4.1. Die Wirkung von Endothelin auf die glatte Muskulatur der Aorta thoracica	77
3.3.4.2. Biochemische Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade am Endothelinrezeptor der Aorta thoracica	79
4. Auswertung, Diskussion, weiterführende Gedanken	81
4.1. Tiermodell	81
4.2. β-adrenerge Rezeptoren am Herzen von SNX-Ratten	83
4.3. M-Cholinozeptoren am Herzen von SNX-Ratten	85
4.4. α_1-Adrenozeptoren am Herzen von SNX-Ratten	86
4.5. Endothelinrezeptoren am Herzen von SNX-Ratten	87
4.6. α_1-Adrenozeptoren und Endothelinrezeptoren an der Aorta	89
4.7. Die kardiale Wirkung von SNAP und 8-Bromo-c-GMP nach SNX	90
4.8. Weiterführende Gedanken	92
5. Zusammenfassung	93
Literaturverzeichnis	94
Anhang Publikationsliste	115
Danksagung	116

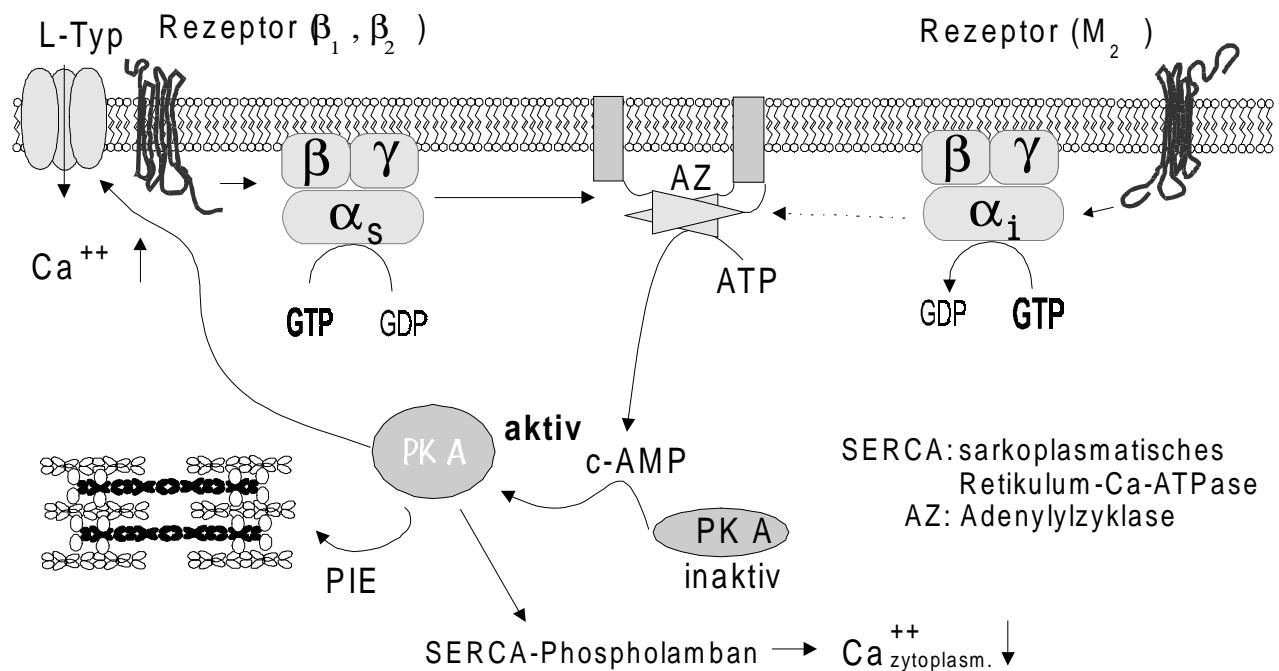
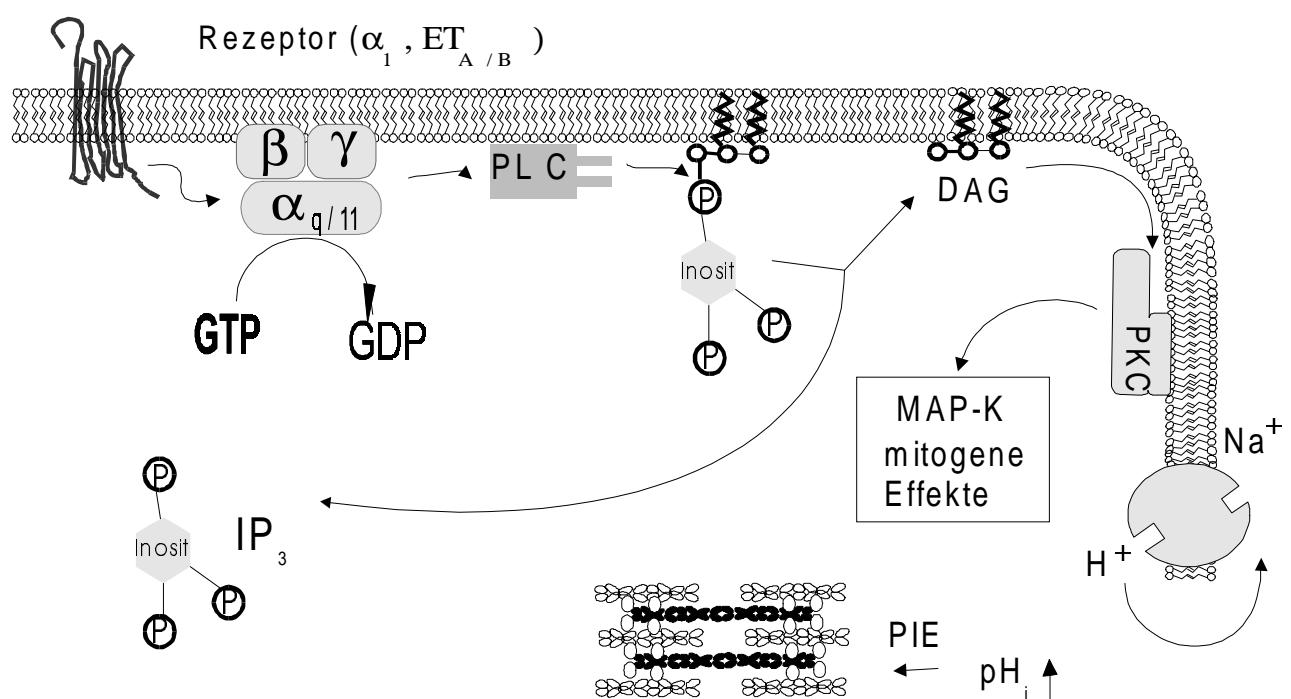
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

8-Br-c-GMP	8-Bromo-c-GMP
$\alpha_{(1,2)}$ -AR	$\alpha_{(1,2)}$ -Adrenozeptor(en)
ATP	Adenosintrisphosphat
AT _(1, 2) -R	Angiotensin-II _(1, 2) -Rezeptor(en)
AZ	Adenylylzyklase
$\beta_{(1,2)}$ -AR	$\beta_{(1,2)}$ -Adrenozeptor(en)
Ca ⁺⁺	Calciumionen
CI	Confidenz-Intervall
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-GMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Endothelin
ET _(A, B) -R	Endothelin _(A, B) -Rezeptor(en)
GTP	Guanosintrisphosphat
³ H-NMS	[³ H]-N-Methyl-scopolamin
IP	Inositolphosphat(e)
¹²⁵ J-CYP	[¹²⁵ J]-Cyano-pindolol
M ₍₂₎ -Ch	M ₍₂₎ -Cholinozeptor(en)
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
OP	Operation(en)
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SNX	subtotale Nephrektomie
SNX-Ratte(n)	subtotal nephrektomierte Ratte(n)
SOP-Ratte(n)	scheinoperierte Ratte(n)

1. Einleitung

 Agonist (Noradrenalin & Endothelin)

DAG: Diazylglyzerin
 PLC: Phospholipase C
 PKC: Proteinkinase C
 PIE: positiv inotroper Effekt
 MAP-K: mitogen activated kinase



1.1. Kardiovaskuläre Rezeptoren

Die Niere spielt als regulatorisches Organ des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie als sekretorisches Organ eine entscheidende Rolle für das Herz-Kreislauf-System. Es verwundert daher nicht, daß bei chronisch niereninsuffizienten Patienten pathologische kardiovaskuläre Veränderungen, die sich meist in einer Links-Herzinsuffizienz [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9] äußern, den größten Anteil (50-60 %) unter den auftretenden Todesfällen einnehmen.

Bisher ist wenig über die Rolle, die kardiovaskuläre Rezeptorsysteme dabei spielen, bekannt. Diese Arbeit soll Einblicke in die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Ausbildung einer Links-Herzinsuffizienz und Links-Herzhypertrophie in der Urämie geben.

β -Adrenozeptoren (β -AR) sind die Hauptregulatoren der Herzarbeit. Sie besitzen das größte Potential, die Kontraktionskraft des Herzmuskels zu erhöhen. Am Menschen [10, 11, 12] und an der Ratte [13] konnte gezeigt werden, daß die Funktionsfähigkeit des Herzmuskels bei fort dauernder chronischer Niereninsuffizienz eingeschränkt ist (verschlechterte diastolische Funktion und mangelnde Ventrikelfüllung [10]). Darüber hinaus wurde im Tierversuch festgestellt, daß der positiv chronotrope Effekt von Isoprenalin abgeschwächt ist [14].

Zur Symptomatik der Erkrankung gehören folgende klinisch manifesten Veränderungen:

- Gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23] mit erhöhten Konzentrationen von Katecholaminen im Plasma [24, 25, 26, 27, 28],
- Geschwächte neuronale Wiederaufnahme sowie Defekte bei der Synthese und beim Metabolismus der Katecholamine [24, 17, 22],
- Dysfunktion des autonomen Nervensystems [18, 29, 30],
- Eingeschränkte Funktion der Schweißdrüsen [31, 32],
- Einschränkung der Regulation des Blutdrucks durch den Barorezeptorreflex [18, 19, 33],
- Gesteigerter bzw. bei fortgeschrittener Erkrankung erniedriger systemischer Blutdruck,
- Ausbleiben der Senkung des systemischen Blutdrucks während der Nacht [34],
- Entwicklung einer Links-Herzinsuffizienz und Ausbildung einer Links-Herzhypertrophie [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 35].

Die Ursache für die gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems scheint direkt mit der Einschränkung der Nierentätigkeit verbunden zu sein. Es wurde z.B. beschrieben, daß von der

verbleibenden Niere verstärkt afferente Impulse ins Zentralnervensystem gehen, die zur Aktivierung des Sympathikus führen [36]. Wie bei anderen Erkrankungen, bei denen erhöhte Katecholaminkonzentrationen im Plasma auftreten, könnte auch bei der chronischen Niereninsuffizienz die β -adrenerge Wirkung abgeschwächt sein.

Biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Funktionalität und Regulation von β -AR [37] erhärten diese These.

An lymphozytären β_2 -AR konnte gezeigt werden, dss die chronische Stimulation mit Agonisten zu einer Abschwchtung der Funktion dieser Rezeptoren führt [38]. Chronische Hämodialysepatienten, bei denen ein Anstieg der Plasmakatecholaminkonzentration diagnostiziert wurde, wiesen weniger α_2 -Adrenozeptoren (α_2 -AR) an thrombozytären Zellen auf [39, 40]. Die Anzahl β_2 -AR war unverändert. Allerdings war bei dieser Patientengruppe die Bildung von c-AMP nach β_2 -AR-Stimulation signifikant erniedrigt, was auf eine Desensibilisierung dieser Rezeptoren hindeutet [40]. Die Rezeptor-*down-regulation* kann subtypspezifisch sein. So ist bei einer Medikation mit selektiven β_1 - und β_2 -AR-Agonisten die Funktion von β_1 - bzw. β_2 -AR spezifisch abgeschwächt. Die Gabe von Procaterol und Terbutalin führt zu einer selektiven Desensibilisierung von β_2 -AR (ohne Einfluß auf β_1 -AR), während Xamoterol zur selektiven Desensibilisierung der β_1 -AR-Wirkung führt [41, 42].

Andererseits zeigten Versuche bei Patienten mit einer asympathikotonen Hypotonie ein umgekehrtes Bild auf. Die Anzahl von α_2 - sowie β_2 -AR war hier erhöht [43, 44], was vielleicht auf die erniedrigten Plasmakatecholaminspiegel zurückzuführen ist.

Versuche an verschiedenen Spezies belegen jedoch, dss die Rezeptorregulation auch auf einen Subtyp beschränkt sein kann. So führte in verschiedenen Tiermodellen die chronische Stimulation mit β -AR-Agonisten {Isoprenalin [45, 46, 47, 48, 49], Adrenalin [50] und Noradrenalin (NA)[50]} zu einer Desensibilisierung und *down-regulation* von β_2 -AR, wohingegen der β_1 -AR kaum einer *down-regulation* unterlag.

Bei anderen Erkrankungen, die durch erhöhte Plasmakatecholaminkonzentrationen gekennzeichnet sind, war ebenfalls eine Rezeptor-*down-regulation* festzustellen, zum Beispiel beim Phäochromozytom die verminderte Funktion der thrombozytären α_2 -AR beim Menschen [51] und die *down-regulation* der β_1 -AR bei der Ratte [52, 53]. Darüber hinaus findet man bei der Herzinsuffizienz eine *down-regulation* von β_1 -AR [54] auf m-RNS-Ebene [55] sowie eine Desensibilisierung von β_2 -AR [54], wobei kontroverse Daten uber eine *down-regulation* auch von β_2 -AR existieren [56, 54, 57].

Schließlich gelang es Bree et al. [58] zu zeigen, daß mit urämischem Plasma inkubierte Präparationen der Lunge weniger freie Bindungsstellen für Radioliganden am β -AR aufweisen. Nimmt man all diese Befunde zusammen, so zeigen sich Ähnlichkeiten zu anderen Erkrankungen (Herzinsuffizienz, Phäochromozytom) und es erhärtet sich die Hypothese, daß bei der chronischen Niereninsuffizienz das β -adrenerge System entscheidenden Veränderungen unterliegt. Ob diese auch biochemisch am Herzen nachweisbar sind und in welcher Form es Veränderungen bei der chronischen Niereninsuffizienz gibt, ist bisher unklar. Ebenfalls unklar ist, welche Ebene der Signaltransduktion beeinflußt wird. Auch ist bisher noch nichts darüber bekannt, ob die M-Cholinozeptoren (M-Ch) in irgendeiner Weise verändert sind.

Eine weitere Rezeptorenklasse, die eine große Bedeutung für die Betrachtung des kardiovaskulären Systems hat, bilden Rezeptoren, die an $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt sind. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe zählen die α_1 -AR, die Endothelinrezeptoren (ET-R) sowie die Angiotensin-II-Rezeptoren (AT-R). An diesen Rezeptoren entfalten Transmitter bzw. Mediatoren ihre physiologischen Wirkungen: NA stimuliert die α_1 -AR, Endotheline (ET) die ET-R und Angiotensin II wirkt spezifisch an AT-R.

Angiotensin II bindet an zwei Rezeptoren, den AT₁- und den AT₂-R. Der AT₁-R scheint der Typ zu sein, mittels welchem Angiotensin II vasokonstriktorisch wirkt, denn AT₁-R-Antagonisten besitzen das gleiche Potential wie ACE-Hemmer bei der Senkung des Blutdrucks [59]. Über die physiologische sowie pathologische Bedeutung des AT₂-R ist bisher wenig bekannt. Dieser Rezeptorsubtyp führt zu entgegengesetzten Wirkungen, wie der AT₁-R [60] und ist der Subtyp, der im menschlichen Ventrikel zahlenmäßig überwiegt [61].

AT₁-R-vermittelte Wirkungen auf die Kontraktionskraft konnten am menschlichen Ventrikel nicht nachgewiesen werden [62, 63, 64]. Diese sind ausschließlich für das Atrium bekannt [65, 62, 66, 63]. Untersuchungen an der Ratte und am Menschen belegen allerdings das Vorhandensein des AT₁-R-Subtyps am Ventrikel [67, 61]. Die Stimulation dieses Rezeptors hatte keinen Einfluß auf die Kontraktionseigenschaften dieses Gewebes. Im Atrium hingegen wurde nach AT₁-R-Stimulation eine positiv inotrope Wirkung nachgewiesen [66, 67].

ET wurde erstmals aus Endothelzellen der Aorta vom Schwein isoliert und ist einer der potentesten Vasokonstriktoren [68]. In der Gruppe der ET sind drei Verbindungen zu unterscheiden, die jeweils aus 21 Aminosäuren bestehen. Es handelt sich um ET-1, ET-2 und ET-3. Sie werden aus dem Präproendothelin gebildet, welches Spaltprodukt eines großen *precursors* ist (203 Aminosäuren)

[69, 70, 71]. Zu den ET-R werden zwei Subtypen gezählt [72], ET_A-R und ET_B-R. Die einzelnen ET besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Rezeptoren. ET-1 und ET-2 binden jeweils hochaffin an den ET_A-R. ET-3 hingegen besitzt eine etwa 100fach niedrigere Affinität zum ET_A-R [73, 74, 75]. An den ET_B-R binden die 3 Isoformen hingegen in ähnlicher Art und Weise [74]. ET-3 kann also zwischen ET_A- und ET_B-R unterscheiden.

Neben ihrem Vorkommen an der glatten Muskulatur der Gefäße findet man die beschriebenen Rezeptoren auch auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie im Herzgewebe [73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82]. Als Bildungsort der ET-1-Isoform sind vaskuläre Endothelzellen beschrieben [69, 83]. Daneben wird ET-1 auch in Muskelzellen der Gefäße, Muskelzellen des Herzens und in Fibroblasten des Herzens synthetisiert [69, 83, 84, 85]. Verschiedene Reize können ein schnelles Transkribieren des ET-1 bewirken (z. B. Thrombin, Angiotensin II, Hypoxie, Ischämie und Scherkräfte [69, 86, 68]).

Beim Menschen [87, 88] und bei verschiedenen Spezies [89, 90, 91, 92] konnten α_1 -AR im Ventrikel nachgewiesen werden. Man unterscheidet bei diesem Rezeptortyp drei Subtypen, die als α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren bezeichnet werden [93]. Welche physiologischen Wirkungen diesen Rezeptorsubtypen im Herzen zukommen, ist noch nicht geklärt. Die intrazelluläre Signaltransduktion ist bei allen drei Subtypen gleich, scheint sich hingegen in der quantitativen Bildung von *second messenger*-Molekülen zu unterscheiden [94].

All diesen Rezeptoren (AT-R, α_1 -AR und ET-R) liegt dieselbe Signaltransduktion zugrunde. Die transmembranären Rezeptoren sind an ein G-Protein gekoppelt ($G_{q/11}$), welches nach Rezeptorstimulation in der Lage ist, die Aktivität eines membranständigen Enzyms zu erhöhen. Dieses (Phospholipase C - PLC) besitzt Spaltungsaktivität für Phosphatidylinositidphosphat. Als Reaktionsprodukte der Spaltung entstehen zwei Stoffe, Diazylglyzerin und Inositolphosphat (IP). Sie fungieren als *second messenger* und führen zur Aktivierung zweier Signalkaskaden. IP mobilisiert Ca^{++} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Öffnung eines Ca^{++} -Kanals [95, 96], während Diazylglyzerin die Aktivität einer Proteinkinase erhöht (Proteinkinase C - PKC). Zielproteine der Phosphorylierung durch die PKC sind der Na^+-Ca^{++} -Austauscher, Phospholamban und Proteine, die die Sensitivität des kontraktilen Apparates gegenüber Ca^{++} erhöhen. Nach der Stimulation des Rezeptors erhöht sich, abhängig von der PKC, die Aktivität des Na^+-H^+ -Antiporters, was zur Alkalisierung des Zytosplasmas führt [97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111]. Die Bedeutung dieser Steigerung des zytosolischen pH-Wertes ist

noch nicht endgültig geklärt, sie ist jedoch wesentlich an der positiv inotropen Wirkung von G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren am Ventrikel beteiligt [112]. Bei dieser Wirkung spielt die Steigerung der Sensitivität des kontraktilen Apparates gegenüber Ca⁺⁺ [113, 114] ebenfalls eine wichtige Rolle. Sowohl NA [89, 87] als auch ET [115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122] werden positiv inotrope Eigenschaften zugeschrieben.

Letztlich besitzen Angiotensin II [123], NA [124, 125, 126] und ET [127] noch eine mitogene Wirkkomponente. Diese Eigenschaft könnte von Bedeutung bei der Ausbildung einer Links-Herzhypertrophie sein, die bei chronisch niereninsuffizienten Patienten beobachtet wird. Als Reize, die zur Hypertrophie von Kardiomyozyten führen, sind die Anämie sowie eine Überdehnung des Ventrikels [128, 129, 130] zu nennen, zwei Faktoren, die zum klinischen Bild der chronischen Niereninsuffizienz gehören (Mangel an Erythropoietin und Hypervolämie).

Bei der Hypertrophie kommt es zu einer Vergrößerung der Zellen des Herzens (Kardiomyozyten) und damit auch zur Vergrößerung der Ventrikelwände. Diese histologischen Veränderungen bedingen eine schlechtere Versorgung der funktionellen Zellen des Herzens mit Sauerstoff, da sich die Diffusionswege verlängern. Eine Hypertrophie des Herzens stellt somit eine Vorstufe für eine sich ausbildende Herzinsuffizienz dar.

Bei chronisch niereninsuffizienten Patienten konnte des Weiteren eine intrakardiozytäre Fibrose beobachtet werden, wobei die Urämie per se (unabhängig von Faktoren wie z.B.: Hypertonie, Anämie, Diabetes mellitus, Herzgewicht und Dialysetyp [131]) zu diesen histochemischen Veränderungen führt. Neben Veränderungen des Gewebes und damit der Muskelarbeit wirkt sich diese Einlagerung von Kollagen auch auf die elektrischen Eigenschaften des Herzens (Reizleitung) aus. Auch unter diesen Gesichtspunkten ist es von besonderem Interesse, die Funktionalität kardiovaskulärer Rezeptorsysteme am Herzen und an den Gefäßen zu untersuchen.

1.2. Aufgabenstellung

Zur Untersuchung kardiovaskulärer Rezeptoren in der Urämie wurde das Tiermodell der subtotal nephrektomierten Ratte (SNX-Ratte) [132] verwendet. Zur Charakterisierung des Modells sollten sowohl die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Kreatinin, NA und Adrenalin als auch die Gewichte der Herzen und der Ventrikel bestimmt werden.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits auf noch ungeklärte Sachverhalte hingewiesen. Eine zentrale Rolle für die durchzuführenden Untersuchungen nimmt die Frage ein:

Bedingt die subtotale Nephrektomie (SNX) physiologische Veränderungen in der β -adrenerg-vermittelten Änderung der Kontraktionskraft am Herzmuskel und unterscheidet sich die M-Ch-vermittelte Beeinflussung der Kontraktionskraft zwischen SNX- und scheinoperierten (SOP-) Ratten?

Dazu sollte die physiologische Wirkung nach β -adrenerger Stimulation bestimmt werden. Als Agonist am β -AR wurde Isoprenalin eingesetzt. Die durch diese Substanz vermittelte positiv inotrope Wirkung sollte unter isometrischen Bedingungen an Herzmuskelpräparationen bestimmt werden. Auf ähnliche Weise wurde der Einfluß von M-Ch auf die Kontraktionskraft des Herzens ermittelt.

Gibt es Unterschiede bei der Signaltransduktion zwischen SNX- und SOP-Ratten? Reagiert der Herzmuskel möglicherweise mit einer *down-regulation* von Rezeptoren auf die Einschränkung der Nierenfunktion oder sind andere Schritte des Signalweges beeinflußt?

Zielstellung war es, die einzelnen Komponenten der β -adrenergen und der muskarinergen Signalkaskade zu charakterisieren. Über die Bestimmung der Aktivität der Adenylylzyklase (AZ) hinaus, sollten die erwähnten membranständigen Rezeptoren und deren Subtypen näher beschrieben werden. Von Interesse war deren zahlenmäßiges Auftreten, der Anteil der einzelnen Subtypen an der Gesamtrezeptorzahl sowie deren Affinität zu Liganden.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit wurde auf die Wirkung von NA und ET an α_1 -AR bzw. ET-R gelegt. Die Tatsache, daß verschiedene Autoren bei der chronischen Niereninsuffizienz eine erhöhte Konzentration bzw. Produktion der Substanzen im Blut feststellten, wirft die Frage auf:

Wirken NA und/oder ET möglicherweise kompensatorisch auf eine Einschränkung der Kontraktionskraft des Herzmuskels?

Um diesen Sachverhalt diskutieren zu können, erfolgte die Bestimmung der physiologischen Wirkung (Änderung der Kontraktionskraft) dieser Substanzen an Ventrikelstreifen.

Welche Aussagen können zum intrazellulären Signalweg und zur Präsenz der α_1 -AR bzw. ET-R am Herzen getroffen werden? Beeinflußt die chronische Niereninsuffizienz die Funktionalität dieser Systeme?

Bei diesen Versuchen wurde die Anzahl der freien Bindungsstellen für α_1 -AR-Liganden sowie ET_A- und ET_B-R-Liganden bestimmt. Darüber hinaus wurde das Verhältnis der beiden Subtypen (ET_A- und ET_B-R) sowie die Affinität der Liganden zu den Rezeptoren quantifiziert. Beide Rezeptoren bewirken die Bildung der gleichen intrazellulären Botenstoffe. Mit Hilfe der mengenmäßigen

Bestimmung dieses Stoffes nach Stimulation des Rezeptors kann eine Aussage über die Funktion des beteiligten Enzyms PLC getroffen werden.

Mit Hinblick auf die Beobachtung, daß es bei SNX-Ratten zur Wandverdickung großer Gefäße kommt [133, 134, 135, 136], werden weitere Fragen interessant:

Wie äußern sich die vasokonstriktorischen Eigenschaften von NA und ET unter dem Einfluß der Urämie? Existieren Hinweise auf eine veränderte biochemische Funktion der Rezeptoren, die die physiologischen Funktionen des Gewebes beeinflussen?

Ziel der Versuche war es, durch Kontraktionsmessungen an Streifenpräparaten der Aorta thoracica deren Kraftentwicklung unter isometrischen Bedingungen zu erfassen und die Bildung von *second messenger*-Molekülen zu quantifizieren.

Zu guter letzt stellte sich noch die Frage: Sind eventuell andere Systeme an einer möglichen Veränderung der Ventrikelfunktion beteiligt? Untersuchungen [137] von urämischem Plasma identifizierten eine kumulierende Substanz, die in der Lage ist, die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) im Gewebe kompetitiv zu hemmen.

Welchen Einfluß besitzen NO und das c-GMP-Analogon 8-Bromo-c-GMP (8-Br-c-GMP) auf die Kraftentwicklung am Ventrikel bei SNX- und SOP-Ratten?

Zu diesem Punkt wurde der Einfluß von NO und 8-Br-c-GMP auf die positiv inotrope Wirkung von β -AR-Agonisten durch isometrische Kontraktionsmessung an Ventrikelstreifen untersucht.

2. Methoden

2.1. Urämische Ratte

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde das Modell der SNX-Ratte ($\frac{5}{6}$ -Nephrektomie) [132] verwendet, bei dem durch einen operativen Eingriff funktionsfähiges Nierengewebe entfernt wurde. Es kommt zur Ausbildung einer chronischen Niereninsuffizienz. Plasmawerte von Harnstoff und Kreatinin, zwei typische Stoffe, die bei Absinken der glomerulären Filtrationsrate unter einen Grenzwert im Plasma kumulieren, dienen zur Charakterisierung der Urämie. Bei stark fortgeschrittener Erkrankung erhöht sich die Plasmakaliumkonzentration. Das typische EKG-Bild wird dahingehend abgewandelt, daß sich die T-Welle verstärkt (Auftreten von Arrhythmien). Es ist daher erforderlich, diesen Wert durch Gabe von kaliumarmen Futter zu normalisieren.

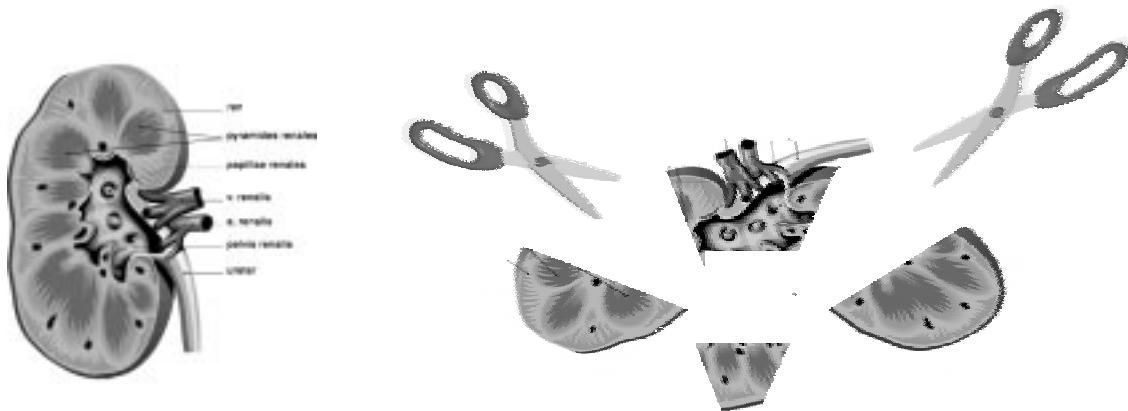
Das Modell der SNX-Ratte wird auch als *low-renin*-Modell bezeichnet [132], im Gegensatz zu einem anderen Modell, bei dem eine Funktionseinschränkung durch Ligatur von $\frac{2}{3}$ der die Niere mit Blut versorgenden Gefäße erreicht wird. Ein weiteres Charakteristikum des verwendeten Modells ist das Verbleiben der Nebenniere im Organismus als intaktes Organ, d.h. unter Beibehaltung seiner sekretorischen Fähigkeit, vor allem für Katecholamine, Aldosteron und Glukokortikoide.

2.1.1. Operationstechnik

Sechs Wochen alte, männliche Wistar-Ratten wurden nach Amann et al. [132] in zwei Stufen operiert. Eine Kombination von Xylazin (5 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) diente jeweils als Narkosemittel zur intraperitonealen Applikation. Die erste Operation (OP) hatte das Entfernen der gesamten rechten Niere zum Ziel. Dazu wurde im Rückenbereich rechts, kurz unter dem Rippenbogen, das Organ ertastet und die Stelle des Einschnittes festgelegt. Nach einer Rasur und äußerlichen Desinfektion wurden die Haut-, Fett- und Muskelschicht durchtrennt. Die Niere wurde nun vorsichtig aus der Öffnung herausgedrückt und dekapsuliert, wobei besonderes Augenmerk darauf gelegt wurde, die Nebenniere nicht zu verletzen. Alle zu- und abführenden Gefäße (Blutgefäße und Urether) wurden abgebunden und oberhalb der Ligatur durchtrennt. Anschließend konnte die Niere entfernt werden. Die Muskelschicht wurde mit einer durchgehenden Naht und die äußere Hautschicht mit einer Punktnaht von drei bis vier Stichen geschlossen. Als Nahtmaterial kam

resorbierbarer, geflochtener, chirurgischer Faden zur Anwendung. Die Desinfektion der Wunde beendete die OP.

Die zweite OP fand eine Woche später statt. Ziel dieses Eingriffs war die SNX. Dabei sollte vom Nierenkortex soviel entfernt werden, daß die Masse der verbliebenen Niere etwa $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ ihrer ursprünglichen Masse betrug. Die Durchführung der zweiten OP glich der ersten, wobei nach der Dekapsulation Rindengewebe der Niere mit zwei bis drei Schnitten in oben beschriebenem Umfang entfernt wurde. Schematisch sieht dies wie folgt aus:



Zeitgleich wurden Tiere gleichen Alters, Geschlechts und Gewichts unter den gleichen Bedingungen in zwei OP scheinoperiert. Es erfolgte eine Narkose und im Anschluß daran ein Durchtrennen der desinfizierten Haut (ebenso der darunterliegenden Fett- und Muskelschicht). Nach Herausdrücken der Niere nahm sie unversehrt ihre ursprüngliche Lage wieder ein. Den Abschluß des Eingriffs bildete das Schließen der geöffneten Schichten, wobei die Muskelschicht durchgehend und die Haut punktförmig mit drei bis vier Stichen genäht wurde.

2.1.2. Tierbetreuung, Futter

Die Vergleichbarkeit der Daten von SNX- und SOP-Ratten setzt ein gleiches Körpergewicht voraus. Da SNX-Ratten weniger Futter zu sich nehmen als SOP-Ratten, ist eine Angleichung des Futters nötig. Dazu wurde täglich der Futterverbrauch der SNX-Ratten bestimmt. Die ermittelte Menge an verbrauchtem Futter diente als Grundlage für die Futtergabe an SOP-Ratten für den kommenden Tag.

Die Nahrung der Tiere bestand aus einer Standarddiät für Ratten. Die Pellets setzten sich aus 22,5% Rohprotein, 5,0% Rohfett, 4,5% Rohfaser, 6,5% Rohasche, 0,2% Na, 1 % K, 0,9 % P, 0,9 % Ca und Vitaminen (15000IE Vitamin A, 600IE Vitamin D₃ und 75 mg Vitamin E/kg Futter) zusammen. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurde die Standarddiät durch kaliumarmes Futter ausgetauscht.

Diese Maßnahme diente zur Normalisierung von erhöhten Plasmakaliumspiegeln. Alle Ratten hatten freien Zugang zu Trinkwasser.

2.1.3. Töten, Organentnahme

Am Versuchstag wurden die Ratten mit Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Eine Blutentnahme zur Bestimmung verschiedener Parameter erfolgte aus dem retroorbitalen Augenplexus mittels Kapillare. Im Anschluß daran wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nachdem der Brust- und Bauchraum geöffnet wurde, schloß sich eine schnelle Organentnahme an. Es wurde das Herz, die beiden Nieren (bzw. das verbliebene hypertrophierte Nierengewebe) und die Aorta thoracica herauspräpariert und unverzüglich in entsprechenden eiskalten Präparationspuffer (die Zusammensetzung ist bei den einzelnen Versuchen näher erläutert) befördert. Herz und Nieren wurden trocken getupft und dann gewogen.

2.1.4. Messung des Blutdrucks

Stichprobenartig erfolgte die unblutige Bestimmung des Blutdrucks mit einem Sphygmomanometer. Aus drei Messungen, durchgeführt an drei aufeinanderfolgenden Tagen, wurde der Mittelwert gebildet. An jedem Meßtag fanden fünf Einzelmessungen statt. Durch die Art und Weise der Durchführung gewöhnten sich die Tiere an die Technik, was Abweichungen infolge Streß und Tagesform minimierte.

Die Druckmessung wurde an der Schwanzarterie durchgeführt. Ein Piezokristall wandelte die Druckunterschiede in elektrische Impulse um. Diese Impulse wurden verstärkt und über einen Oszillographen sichtbar gemacht.

Die Messung wurde in einem geschlossenen, ruhigen Raum durchgeführt. Nach einer ca. 30-minütigen Anpassungsphase wurden die zu vermessenden Tiere in Kunststoffröhren gesperrt, deren Verschluß an dem einen Ende eine Öffnung für den Schwanz der Tiere hatte. Waren die Tiere in dieser Röhre, konnten sie sich in einer Aufwärmphase (30 min, 34 °C) an diese Umgebung anpassen. Die Regulation und Messung des Drucks, der auf den Schwanz wirkte, erfolgte über ein Sphygmomanometer (Hugo Sachs Electronics, March, Deutschland). Dieses war durch einen dünnen Schlauch mit der Druckmanschette verbunden. Der Pulsnehmer wurde unmittelbar hinter dieser Manschette plaziert. Der Meßwert war der Wert, bei dem der erste Puls wieder sichtbar wurde.

2.1.5. Gewinnung von Plasma

Die Entnahme von Blut erfolgte aus dem retroorbitalen Augenplexus der narkotisierten Ratte. Als Narkosemittel kam Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) zur Anwendung. Nach 15-20 min Ruhepause wurden mit einer Steigkapillare ca. 1,5-2 ml Blut entnommen und in eine EDTA-haltige, eisgekühlte Monovette überführt. Der Zusatz von 20 µl 0,3 M Glutathion-Lösung (9,2 g reduziertes Gluthathion in 100 ml bidest. Wasser, eingestellt mit 10 N Natronlauge auf pH=7,0) verlängerte die Haltbarkeit der Blutproben, die bis zur Zentrifugation (1700 g, 4 °C, 10 min) auf Eis gelagert wurden. Nach Zentrifugation konnte mit einer Pipette der Überstand vom Sediment getrennt werden. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur Bestimmung bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.6. Bestimmung der Plasmakatecholaminkonzentration mittels HPLC

Die Bestimmung der Konzentration der Katecholamine erfolgte mittels *High Performance Liquid Chromatography*. Ausgangspunkt war das glutathionhaltige tiefgefrorene Plasma, dessen Gewinnung der Abschnitt 2.1.5. beschreibt.

Plasma stellt ein Gemisch verschiedener Substanzen (Eiweise, Proteine, Salze) dar, die in einem vorgelagerten Reinigungsschritt abgetrennt wurden. Die Katecholamine (und andere aromatische 1, 2-Diol-Verbindungen) wurden dazu auf einer Vorsäule (Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure; Merck, Darmstadt) in Gegenwart von Phosphatpuffer (mM) $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (200), EDTA (10), NaN_3 (1,71), NH_4OH auf pH=8,7 eingestellt] durch Esterbildung retiniert. Dabei erfolgte auf Grund eines sterischen Ausschlußmechanismus die quantitative Abtrennung und Elution der biologischen Matrix. Nach 12 min wurde mittels eines elektronischen Säulenschaltventils das Laufmittel {89 Teile Phosphatpuffer (mM) $[\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1000), Oktansulfonsäure (5), NaN_3 (1,71) bei pH=3,0] und 11 Teile Methanol} gewechselt. Dabei wurden die Phenylboronsäureester der Katecholamine hydrolysiert, die Katecholamine von der Vorsäule eluiert und auf der nun zugänglichen analytischen Säule (12,5 cm LiChrosphor 100, RP 18ec, Merck, Darmstadt) aufgetrennt.

Anschließend erfolgte bei 40 °C eine dreistufige Nachsäulenderivatisierung zu den fluoreszierenden Trihydroxyindolderivaten (1. Oxidation der Katecholamine mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu Adrenochinon bzw. Noradrenochinon, 2. oxidative Zyklisierung zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom, 3. intramolekulare Umlagerung zu 3, 5, 6-Trihydroxy-1-methyl-indol bzw. 3, 5, 6-Trihydroxy-indol).

Die Detektion der Trihydroxyindol-Derivate erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emmissionswellenlänge von 520 nm. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Standardisierung unter Verwendung von „ClinRep-Standardlösung für Katecholamine im Plasma“ (Recipe, München).

2.2. Die Herzarbeit unter dem Einfluß β-adrenerger und M-cholinriger Stimulation

2.2.1. Physiologische Kontraktionsmessungen an Ventrikelpräparaten mit Isoprenalin

a) Allgemeines zur Durchführung

Bei diesen Versuchen wurde die Kontraktion von Gewebepräparationen als physiologische Antwort auf die Stimulation von Rezeptoren gemessen [66, 138]. Auf elektrisch vorgereizte Präparate wirkten entsprechende Rezeptoragonisten. Die daraus resultierende Änderung der Kontraktionskraft wurde unter isometrischen Bedingungen bestimmt. Dabei wurde mit einem rechteckigen Reiz (Frequenz 1 Hz) gereizt, der eine Breite von 5 ms hatte (Stimulator II: Hugo Sachs Elektronics, March, Deutschland). Die Amplitude des Reizes betrug im Mittel 2,5 V (1-4 V). Die entwickelte Kontraktion der Präparate (unter einer Vorlast von 9,81 mN) wurde über einen Kraftaufnehmer auf einem Hellige-Rekorder (Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland) registriert. Die Kontraktion wurde als Ausschlag quantifiziert und ausgewertet.

b) Präparation von Ventrikelstreifen und Versuchsvorbereitung

Frisches Gewebe wurde, wie unter 2.1.3. beschrieben, gewonnen. Die Präparation fand in mit Karbogen gesättigter modifizierter Tyrode-Lösung (mM) [NaCl (136,9), KCl (5,4), CaCl₂ (2,5), MgCl₂ (1,05), NaH₂PO₄ (0,42), NaHCO₃ (25), D-Glucose (9,7), PH=7,4] statt. Das Herz wurde am Septum zur Herzspitze aufgeschnitten und der linke Ventrikel freipräpariert. Die Papillarmuskeln wurden entfernt. Aus dem linken Ventrikel konnten 3-4 Streifen mit 6-8 mm Länge, 1-2 mm Dicke und 1-2 mm Breite präpariert werden. Die Präparation der Streifen erfolgte in Faserrichtung, wobei das Gewebe auf einer Wachsplatte fixiert wurde. Mit jeweils einem Faden wurden die beiden Enden der Streifen so umbunden, daß Schlaufen entstanden, mit der die Streifen an den Haken der Apparatur befestigt werden konnten. Die eingehangenen Streifen befanden sich in einem Organbad, das genau 10 ml oxygenierte, auf 37 °C temperierte Tyrodelösung enthielt. Zur Ermittlung der Reizspannung [Rechteckkreis: Breite 5ms, Frequenz 1 Hz; s.auch a)] wurden die präparierten Muskelstreifen mit einer steigenden Spannung gereizt. Die Spannung bei der ein Ausschlag sichtbar

wurde, war der Schwellenwert. Die Spannung, mit der der Muskel während des Versuches gereizt wurde, betrug das 1,5fache dieses Schwellenwertes und lag bei 2,4 V (1-4 V).

c) Erstellen der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve mit Isoprenalin

Die unter 2.2.1. b) erhaltenen Präparate wurden zur Equilibration über einen Zeitraum von ca. einer Stunde in 10 ml Tyrode-Lösung belassen. Das Organbad wurde mittels Thermostat auf einer konstanten Temperatur, bei 37 °C gehalten und mit Karbogen begast. Nach einer halben Stunde erfolgte die Erneuerung der Pufferlösung. Mit einer Kraft von 9,81 mN wurden die Ventrikelstreifen vorgedehnt. Vor der Versuchsdurchführung wurde der Kraftabnehmer mit einer Kraft von 9,81 mN belastet. Mit Hilfe des daraus resultierenden Ausschlags der Aufzeichnungseinheit konnte die Vordehnung der Präparate auf genau diesen Wert eingestellt werden. Hatte die Konzentration ein Plateau erreicht, wurde die kumulative Konzentrations-Wirkungskurve erstellt [139].

Zur Stimulation von β-AR fand Isoprenalin Anwendung. Als Startkonzentration wurde 0,1 nM Isoprenalin (im Organbad) verwendet. Bei der Herstellung der entsprechenden Konzentration wurden 100 µl der gelösten Substanz ins Organbad injiziert, so daß sich mit jeder Dosis die Isoprenalinkonzentration um 0,5 logarithmische Einheiten erhöhte. Erreichte die Kontraktion, die über einen Schreiber beobachtet wurde, ein Plateau, so erfolgte die Zugabe der nächsten Dosis (nach ca. 1-2 min). Die höchste der zehn eingesetzten Konzentrationen von Isoprenalin betrug 1 µM. Bei der Auswertung erfolgte die Ermittlung der Änderung der Kontraktionskraft durch Abzug der Basalwerte. Aus den erhaltenen Werten wurde mit der folgenden Gleichung die Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt [140]:

$$Y = [Basal] + \frac{[Maximum] - [Basal]}{1 + 10^{\log(EC50)-X}}$$

Y ...abhängige Größe (Kontraktion in mN)

X ...dekadischer Logarithmus der Konzentration (Parameter)

[Maximum]...maximal erreichbare Wirkung (oberes Plateau)

[Basal] ...Wirkung unter basalen Bedingungen (unteres Plateau)

EC50 ...Konzentration, bei der 50% der maximalen Wirkung ([Maximum]-[Basal]) erzielt wird

Die Gleichung gilt nur, wenn der Anstieg in einem Bereich von 10-90% der maximalen Wirkung ($[Maximum]-[Basal]$) konstant ist (=1) und wenn sich in diesem Bereich die Konzentration um ca. zwei logarithmische Einheiten ändert. Ist dies nicht der Fall, so muß eine Gleichung unter Berücksichtigung eines veränderlichen Anstiegs (*Hillslope*) herangezogen werden [140]:

$$Y = [Basal] + \frac{[Maximum] - [Basal]}{1 + 10^{[\log(EC50)-X] \times Hillslope}}$$

d) Wirkung von Calciumionen an den Ventrikelstreifen

Nach Erstellen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Isoprenalin wurden die Präparate ausgewaschen (dreimal aller 10 min und 1-2mal aller 15 min bis das Ausgangsniveau der Kontraktion erreicht war), um die Funktionalität des Muskels durch Bestimmung der Kontraktion nach Gabe von Ca^{++} zu ermitteln. Die Konzentrationen von Ca^{++} umspannten einen Bereich von 2,5-13,12 mM. Es wurde von sieben Konzentrationen markiert.

2.2.2. Biochemische Untersuchungen zur β -adrenergen Signaltransduktion

2.2.2.1. Radioligand-Bindungsstudien am β -Adrenozeptor

a) Allgemeines zu Radioligand-Bindungsstudien

Bindungsstudien werden durchgeführt, um die Anzahl von Rezeptoren, deren Subtypverteilung und deren Bindungsverhalten gegenüber Liganden zu bestimmen [141]. Der Rezeptor kann in Rohmembranfraktionen oder auf der Oberfläche von intakten Zellen gemessen werden. Als Liganden werden radioaktiv markierte Antagonisten verwendet, die spezifisch an einen Typ von Rezeptor binden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Bindungsstudien an Rohmembranfraktionen durchgeführt. Es werden zwei Arten von Bindungsstudien unterschieden: Sättigungs- und Kompetitionsbindungsstudien.

Sättigungsbindungsstudien dienen überwiegend zur Bestimmung von Rezeptorkonzentrationen. Dabei wird in einem Reaktionsansatz eine bestimmte Menge der Rohmembranfraktionen (gemessen als mg Protein pro Ansatz) unterschiedlichen Konzentrationen an Liganden ausgesetzt. Nach einer Inkubationszeit wird die Reaktion durch schnelles Filtrieren gestoppt und nicht

gebundener Ligand ausgewaschen. Der gebundene Ligand verbleibt auf dem Filter und kann mittels Counter gemessen werden.

Kompetitionsbindungsstudien werden überwiegend zur Klassifizierung von Rezeptorsubtypen eingesetzt. Zu diesem Zweck wird eine bestimmte Menge an Rohmembranfraktion mit einer konstanten Menge an radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Der gebundene Ligand wird im selben Reaktionsansatz durch unterschiedliche Konzentrationen von nicht markiertem Liganden verdrängt. Schnelles Filtrieren und Waschen entfernt nicht gebundene Anteile, so daß gebundener Ligand im Counter vermessen werden kann.

Die **Sättigungsbindungsstudien** leiten sich von dem Massenwirkungsgesetz ab. Dabei gilt das einfache Modell der Reaktion:



$$\frac{[\text{Ligand}][\text{Rezeptor}]}{[\text{Ligand Rezeptor}]} = K_d$$

Nach Umstellen und Berücksichtigung der Beziehung der einzelnen Konzentrationen zueinander erhält man eine Gleichung, die die Abhängigkeit der Menge an spezifisch gebundenen Liganden von der Ligandenkonzentration beschreibt:

$$\text{spezifische Bindung} = \frac{[\text{Ligand}]}{[\text{Ligand}] + K_D} * B_{\max}$$

Die Menge an spezifisch gebundenem Liganden ist neben der Variablen $[\text{Ligand}]$ von der Gewebe- und der Rezeptorkonstanten B_{\max} und K_D abhängig. B_{\max} stellt dabei die maximale Rezeptorzah und K_D die Konzentration, bei der 50% der Rezeptoren durch den Liganden besetzt sind, dar.

Die Gültigkeit dieser Formel ist an einige Voraussetzungen gebunden [s.a. 140]:

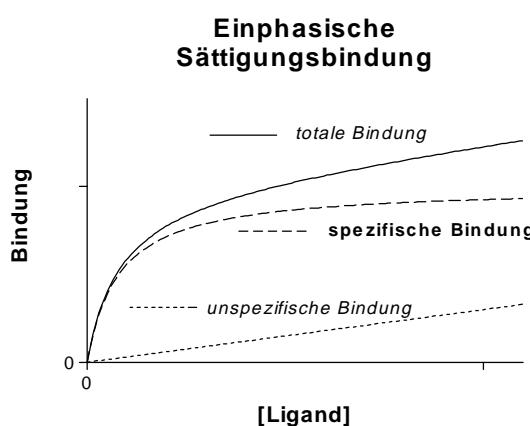
- Die Bindung folgt den Gesetzen des Massenwirkungsgesetzes, d.h., daß die Bindung reversibel ist, durch die Bindung keine Veränderung in den Eigenschaften von Rezeptor und Ligand auftreten (bevorzugter Einsatz von Antagonisten, da Agonisten zu einer Aktivierung und damit zur Strukturveränderung des Rezeptors führen), nur zwei Zustände des Rezeptors auftreten (freie

Form und gebundene Form) und alle Rezeptoren gleich gut für den Liganden zugänglich sind (einheitliche Membranfraktion durch starke Homogenität).

- Das Gleichgewicht der Reaktion ist erreicht (Wahl von Inkubationszeit und -temperatur) und wird nicht beeinflußt (schnelles Waschen der abfiltrierten Membranen durch Vakuumfiltration mit eiskaltem Puffer).
- Die Bindung des Liganden erfolgt an einem Rezeptortyp (spezifische Liganden bzw. Einsatz von spez. Blockern).
- Die Menge an gebundenem Liganden ist gering, so daß die Näherung $[Ligand]=[Ligand_0]$ zutrifft (nicht mehr als 10% des Liganden sollen gebunden vorliegen, d.h. u.a. möglichst niedrige unspez. Bindung durch Einsatz von hydrophilen Liganden).
- Es besteht keine Beeinflussung der Bindung des Liganden an den Rezeptor durch schon vorher gebundenen Liganden. Ligandbindungsstellen kooperieren nicht untereinander.

Neben der spezifischen Bindung an den Rezeptor existiert noch die unspezifische Bindung. Dabei bindet der Ligand außerhalb der spezifischen Bindungsstelle an unspezifische Membranstrukturen. Die unspezifische Bindung folgt einem linearen Verlauf. Zusammen mit der spezifischen Bindung stellt sie die gemessene Bindung als totale Bindung dar:

$$\text{totale Bindung} = \text{spezifische Bindung} + \text{unspezifische Bindung}$$



An einem konstruierten Beispiel veranschaulicht die obige Kurve die einzelnen Bindungen. Die unspezifische Bindung ist dafür verantwortlich, daß die totale Bindung keine Sättigung erreicht. Den Berechnungen liegt jeweils die spezifische Bindung zu Grunde, was die experimentelle Bestimmung der unspezifischen Bindung voraussetzt. Zu diesem Zweck wird ein nicht markierter möglichst hydrophiler Kompetitor in einer Konzentration eingesetzt, die zu einer vollständigen

2. Methoden

Besetzung des Rezeptors führt. Die auf diese Weise gemessene Bindung entspricht der unspezifischen Bindung.

Ein anderes Verfahren zur Bestimmung von B_{max} und K_D ist die **Kompetitionsanalyse**. Das Prinzip dieser Bestimmung ist die Verdrängung von markiertem Liganden einer konstanten Konzentration durch steigende Konzentrationen an nicht markiertem Verdränger. Es finden die folgenden Reaktionen statt:



Durch die Näherung, daß sowohl ein vernachlässigbarer Teil von Ligand als auch Kompetitor gebunden vorliegen, vereinfacht sich das Gleichungssystem zu:

$$\text{spezifische Bindung} = \frac{B_{max} * [\text{Ligand}]}{[\text{Ligand}] + K_D * \left(1 + \frac{[\text{Kompetitor}]}{K_i}\right)}$$

K_D...Dissoziationskonst.[Ligand]
K_i...Hemmkonst.[Kompetitor]

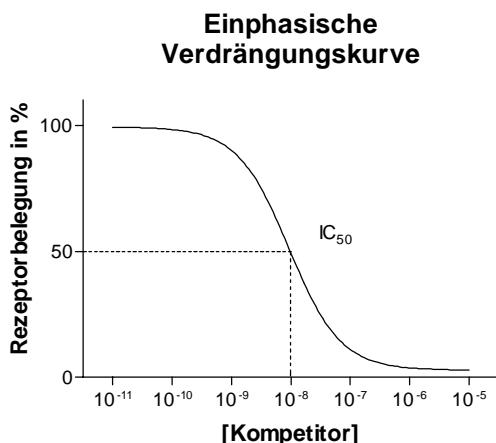
Nach Einführung der Größe IC₅₀ (Konzentration, bei der 50% eines an den Rezeptor gebundenen Liganden durch den Kompetitor verdrängt wird) erhält man die Gleichung nach Cheng-Prusoff [140, 142]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\frac{[\text{Ligand}]}{1 + \frac{IC_{50}}{K_D}}}$$

ist der Kompetitor die gleiche Substanz wie der Ligand ($K_D = K_i$), so gilt:

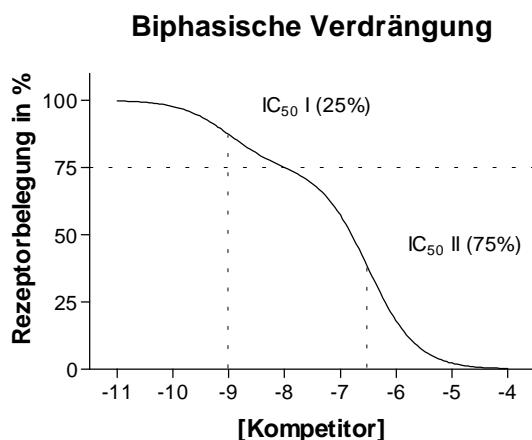
$$K_D + [\text{Ligand}] = IC_{50}$$

Einphasische Verdrängungskurven sehen wie folgt aus:



Ähnliche Betrachtungen, sowohl Sättigungsanalysen als auch Verdrängungsstudien, können angestellt werden, wenn das Gewebe verschiedene Rezeptorsubtypen aufweist. Der Verlauf der Kurven wird biphasisch. Mit dem F-Test kann geprüft werden, welches mathematische Modell den Kurvenverlauf besser beschreibt. Voraussetzung für die Unterscheidung zweier Subtypen ist eine ausreichende Spezifität des verwendeten Kompetitors. Die IC_{50} -Werte des Kompetitors bzw. K_D -Werte des Liganden für die einzelnen Subtypen müssen ausreichend weit auseinander liegen.

Nachfolgend ist an einem fiktiv konstruierten Beispiel eine biphasische Kompetitionsbindungsstudie graphisch dargestellt. Es gelten folgende Annahmen: $\log[IC_{50}I] = -9$, $\log[IC_{50}II] = -6,5$, Anteil des hochaffinen Subtypes 25%.



Aus Meßgrößen der Radioaktivität sind die Mengen- bzw. Konzentrationsangaben erreichbar. Die spezifische Radioaktivität (A_s) radioaktiver Stoffe wird meist in Ci/mmol angegeben. Einem Curie entsprechen $2,22 \times 10^{12}$ disintegrations per minute (dpm). Die Zählausbeute (α) gibt den Anteil der vom Meßgerät erfaßten Zerfälle [counts per minute (cpm)] wieder:

$$\frac{A_s}{cpm / mmol} = \frac{1}{\alpha / cpm / dpm} * \frac{2,22 * 10^{12}}{dpm / Ci} * \frac{A_s}{Ci / mmol}$$

b) Präparation der Rohmembranfraktionen

Zur Präparation der Rohmembranfraktionen wurde frisch entnommenes Gewebe verwendet. Die Ausführung aller weiteren Schritte vollzog sich auf Eis. Nach dem Töten der Tiere wurde deren Herz entnommen, gewogen und in eiskaltem Präparationspuffer aufbewahrt. Die beiden Herzventrikel wurden durch Entfernen der Vorhöfe und Gefäßreste vom Herzen gewonnen. Das so erhaltene Gewebe wurde in 10 ml eiskaltem Präparationspuffer (Zusammensetzung s. entsprechende Versuche) aufgenommen und mit Scheren zerkleinert. Eine Homogenisierung des Gewebes mit einem Ultraturrax (Janke & Kunkel Staufen, Germany), 10 s bei voller Geschwindigkeit und zweimal 20 s bei halbmaximaler Geschwindigkeit in 1-Minutenintervallen, schloß sich an. Das erhaltene Homogenat wurde auf 20 ml verdünnt und zentrifugiert (15 min, 4 °C, 700 g). Nach Filtration des Überstandes über vier Lagen Mull fand eine Ultrazentrifugation (20 min, 4 °C, 50000 g) statt (Sorvall® RC-5B-Zentrifuge; Du Pont, Bad Homburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Inkubationspuffer resuspendiert (s. Durchführung).

c) Durchführung der Bindungsstudien am β-AR

SÄTTIGUNGSMETHODEN

Der Präparationspuffer (mM) enthielt KHCO₃ (1). Das bei der Präparation anfallende Pellet wurde in zwei Waschschritten gereinigt, wobei mit 10 ml Inkubationspuffer [Zusammensetzung (mM): NaCl (154), Ascorbinsäure (0,55) und Tris (50) bei pH= 7,4] resuspendiert und anschließend rezentrifugiert (20 min, 4 °C, 50000 g) wurde. Das Sediment wurde in 1 ml Inkubationspuffer aufgenommen, der Proteingehalt der Lösung nach Bradford (als Standard Rinderimmunoglobulin G) [143] bestimmt und soweit verdünnt, daß die Lösung einen Gehalt von etwa 0,1 mg Protein/ml hatte. Ein Magnetrührer sorgte für die Homogenität der Lösung.

Der Reaktionsansatz betrug 250 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 50 µl Inkubationspuffer/1 µM CGP 12177 (zur Definition der unspez. Bindung),
- 50 µl Ligandenlösung unterschiedlicher Konzentration,
- 150 µl Membranlösung.

Es wurden sechs Ligandenkonzentrationen als Doppelbestimmungen für die totale und unspezifische Bindung angewendet. Der radioaktiv markierte Ligand, (-)-[¹²⁵Jod]-Cyanopindolol (¹²⁵J-CYP), wurde im Konzentrationsbereich von 5-200 pM eingesetzt. Bei dieser Substanz handelt

2. Methoden

es sich um einen unspezifischen β -AR-Antagonisten. Zu jeder Ligandenkonzentration erfolgte die Ermittlung der unspezifischen Bindung mit dem nicht selektiven β -AR-Antagonisten CGP 12177 in einer Konzentration von 1 μM . Die Reaktionsgefäße wurden in einem Wasserbad (90 min, 37 °C) inkubiert. In der verbliebenen Membranlösung wurde der Proteingehalt nach Bradford ermittelt. Der erhaltene Wert ging in die Berechnung ein (ca. 15 μg Protein pro Ansatz). Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch Überführung der Proben auf Eis und Zugabe von 2 ml eiskaltem Inkubationspuffer. Danach wurde die Menge an gebundenem Liganden durch Vakuumfiltration mit einem Brandel Harvester (für 48 Proben) über feuchte Whatman GF/C-Filter bestimmt. Die rasche Filtration (5-10 s) beinhaltete vier Waschschrifte mit je 2 ml eiskaltem Inkubationspuffer. Die Radioaktivität der angetrockneten Filterblättchen wurde in einem Gamma Counter (Cobra Autogamma, Packard, Meriden, USA) gemessen. Die Zählausbeute des Counters betrug 80%. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem iterativen Kurvenanpassungsprogramm Prism bzw. Inplot (GraphPad Software, San Diego, CA).

KOMPETITIONSANALYSE

Zur Bestimmung der Subtypverteilung von β_1 - und β_2 -AR wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt. Es fand dieselbe Membranlösung Anwendung, deren Herstellung oben [2.2.2.1. b)] beschrieben wurde. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

50 μl Inkubationslösung/ 1 μM CGP 12177 (zur Definition der unspez. Bindung) /
sechs Konz. CGP 20712A (selektiver β_1 -Antagonist) von 1nM bis 100 μM ,
50 μl Ligandenlösung konstanter Konzentration,
150 μl Membranlösung (\approx 0,1 mg Protein/ml).

Die Konzentration des markierten Liganden (^{125}I -CYP) betrug etwa 100 pM. Es wurden Dreifachwerte bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde ebenfalls CGP 12177 (1 μM) verwendet. Inkubation, Filtration und Messung der Radioaktivität erfolgte genauso, wie bei der Durchführung von Sättigungsexperimenten beschrieben.

2.2.2.2. Bestimmung der Aktivität der Adenylylzyklase unter dem Einfluß von Isoprenalin

a) Allgemeines Prinzip der Bestimmung

Die Bestimmung der Aktivität der AZ wurde nach Salomon [144] mit den Modifikationen von Brown et al. [145] durchgeführt. Die AZ ist ein membranständiges Enzym. Sie besitzt eine katalytische Einheit, die zur Zyklisierung von ATP unter Verbrauch von Energie führt. Das Produkt dieser Reaktion ist c-AMP. Das Prinzip der Bestimmung besteht in der Quantifizierung des Umsatzes von radioaktiv markiertem Substrat. Bei diesem Umsatz bildet sich radioaktiv markiertes Reaktionsprodukt. Um dieses vermessen zu können, muß nicht umgesetzter Ausgangsstoff abgetrennt werden. Die Trennung erfolgt durch Säulenchromatographie und wird in zwei Schritten durchgeführt: Fixieren von anionischen Verbindungen auf Anionenaustauschersäulen und Elution von c-AMP vom neutralen Austauscher.

Präparationsbedingt fehlt dem Enzym das zytoplasmatische Umfeld. Diese Tatsache erfordert Zusätze zum Reaktionsansatz, welche die uneingeschränkte Funktionsfähigkeit des Enzyms gewährleisten. Darunter zählen neben verschiedenen Ionen (Einstellen der richtigen Osmolarität und des pH-Wertes) GTP, Creatinphosphat und Creatinphosphokinase. GTP bindet an die α -Untereinheit des G-Proteins und stellt einen Energiefieberanten für das Abdissoziieren dar. Creatinphosphokinase und Creatinphosphat fungieren im Reaktionsansatz als Phosphatgruppenüberträger bzw. -fänger.

In der Stopplösung enthaltenes tritiummarkiertes c-AMP dient der Bestimmung der Wiederfindungsrate an c-AMP, welches die Chromatographiesäulen passiert. Um störende Einflüsse von hydrolysiertem ATP in Form von Adenosin, welches hemmend auf die Bildung von c-AMP wirkt, auszuschließen, wird Adenosindeaminase eingesetzt.

b) Präparation der Rohmembranfraktion für die Bestimmung der Adenylylzyklaseaktivität

Die Präparation der Membranen wurde mit frischem Gewebe durchgeführt (s. 2.1.3.). In 20 ml Homogenisationspuffer (mM) [Tris (5), MgCl₂ (1) und Saccharose (250) pH=7,4] aufgenommen, wurde das Gewebe mit einer Schere grob zerkleinert. Ein Ultraturrax (Janke & Kunkel Staufen, Germany) diente dazu, ein Homogenat des Gewebes herzustellen (10 s bei voller Geschwindigkeit und zweimal 20 s bei halbmaximaler Geschwindigkeit in Einminutenintervallen). Nachdem die Lösung vier Lagen Mull passierte, wurde das erhaltene Homogenat zentrifugiert (30 min, 4 °C,

1500 g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit Homogenisationspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert (30 min, 4 °C, 1500 g). Aufgenommen wurde das Pellet in T.E.N.-Puffer (mM) [Tris (20), EDTA-Na₄ (1), NaCl (25) pH=7,4] und auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt.

c) Beeinflussung der Adenylylzyklaseaktivität durch Isoprenalin

Als nicht selektiver β-AR-Agonist fand Isoprenalin Anwendung. Der Versuchsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

10 µl Aqua dest.,
10 µl Adenosindeaminase,
10 µl GTP/Basalwert: Aqua dest.
16,5 µl Reaktionsgemisch,
10 µl Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen (Isoprenalin)/Basalwert und
 nur GTP (10 µM): Aqua dest.
20 µl Membranen,
23,5 µl [α]-[³²P]-ATP (1.000.000 cpm).

Vor Zugabe der radioaktiv markierten ATP-Lösung wurde der Reaktionsansatz vorinkubiert (10 min, bei 37 °C). Zur Testung der Stimulation der Aktivität der AZ kam Isoprenalin in vier unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM-10 µM) zum Einsatz. Für jede Konzentration wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Darüber hinaus wurde die AZ-Aktivität als Basalwert (keine Stimulatoren) und mit GTP (10 µM) alleine bestimmt. Alle Proben hatten dasselbe Endvolumen von 100 µl. Getestet wurde ebenfalls die Aktivität der AZ unter dem Einfluß von NaF (wirkt an G_s-Protein), Forskolin (wirkt an der katalytischen Untereinheit und schließt G_s-Protein ein) und Mn⁺⁺ (wirkt an der katalytischen Untereinheit) [146, 147, 148, 149, 150, 151]. Bei NaF, Forskolin und Mn⁺⁺ wurden nicht 10 µl GTP zugegeben. Für Mn⁺⁺ erfolgte darüber hinaus die Bestimmung des Basalwertes ohne Mg⁺⁺ im Reaktionsgemisch. Die Zusammensetzung (mM) des Reaktionsgemisches wurde so gewählt, daß 100 µl Ansatz HEPES (40), MgCl₂ (5), EDTA-Na₄ (1), GTP (0,01), ATP (0,5), c-AMP (0,1), Creatinphosphat (5) und Creatinphosphokinase (50U/ml) sowie 1.000.000 cpm [α-³²P]-ATP enthielten. Jede Probe wurde exakt 10 min inkubiert (Stoppuhr).

Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Gabe von 100 µl Stopplösung (mM) [SDS (70), ATP (40), c-AMP (1,4), Tris (50), [³H]-c-AMP (\approx 8500 cpm/100 µl)] und 800 µl Aqua dest.. Die Isolation des gebildeten markierten c-AMP von markiertem ATP erfolgte durch Säulenchromatographie. Dabei

wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von Wasser und Stopplösung vollständig auf Dowex-Säulen (1g Dowex AG 50W-X4 pro Säule) gegeben. Die Proben wurden nun zweimal mit 1 ml Aqua dest. gewaschen und über Alumina-Säulen (580 mg/Säule Alumina für Chromatographie pro Säule) gestellt. Nach einem erneuten Waschschritt (4 ml Aqua dest.) wurde das gebildete c-AMP mit 5 ml einer Lösung von 0,1 M Imidazol von den Säulen gewaschen und konnte nach Zugabe von 14 ml Szintillator im Beta-Counter (Tri-Carb® liquid scintillation analyser 2250 CA, Packard) vermessen werden.

Bei der Auswertung erfolgte nach Abzug des Basalwertes eine Umrechnung des umgesetzten markierten ATP von cpm in fmol unter Einbeziehung der Wiederfindungsrate. Die Aktivität der AZ wurde als gebildetes c-AMP/min/mg Protein ausgewertet.

2.2.3. Kontraktionsmessungen an Ventrikelpräparaten mit S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin

Bei diesen Versuchen erfolgte das Erstellen einer Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin. Die Durchführung wurde bereits detailliert unter 2.2.1.a-d) beschrieben. Die mit S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) durchgeführten Versuche unterscheiden sich nur in dem Punkt, daß während des gesamten Experimentes SNAP im Organbad in einer Konzentration von 10 µM vorhanden war. Die erste Konzentration von Isoprenalin wurde 60 min nach dem Zusatz von SNAP im Organbad getestet.

2.2.4. Kontraktionsmessungen an Ventrikelpräparaten mit 8-Bromo-c-GMP

Die Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin an Ventrikelpräparaten unter dem Einfluß von 8-Br-c-GMP wurde nach der Vorschrift von 2.2.1.a-d) erstellt. Dem Organbad wurde über den gesamten Versuchszeitraum 8-Br-c-GMP in einer Konzentration von 10 µM bzw. 100µM zugefügt.

2.2.5. Physiologische Kontraktionsmessungen mit Carbachol an mit Forskolin vorstimulierten Ventrikelpräparaten

Bei diesen Versuchen erfolgte die Bestimmung des negativ inotropen Effektes von Carbachol [152]. Diese Substanz bindet als Agonist an M-Ch und senkt die Kontraktionskraft durch Hemmung der Aktivität der AZ.

Die Präparation der Ventrikelstreifen ist identisch mit der unter 2.2.1. b) beschriebenen. Auch bei der Kontraktilitätsmessung wurden die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt, wie es die Anleitung unter 2.2.1.c, d) beschreibt. Im Vergleich zur Bestimmung des positiv inotropen Effektes von Isoprenalin weicht die Kontraktionsmessung mit Carbachol geringfügig ab. So erfolgte die Vorstimulation mit 3 μM Forskolin. Erst nachdem sich diese Vorstimulation auf einen konstanten Wert eingestellt hatte, wurde mit der Zugabe von Carbachol begonnen. Zum Einsatz kamen neun Konzentrationen von Carbachol in der Schrittweite von 0,5 logarithmischen Einheiten (1 nM-1 mM). Anzumerken sei noch, daß die Präparate von SNX-Ratten nach Vorstimulation mit Forskolin gehäuft mit Arrhythmien antworteten, was dann zum Abbruch des Experiments führte.

2.2.6. Untersuchungen zur M-cholinergen Signaltransduktion

a) Radioligand-Bindungsstudien

Alles unter 2.2.2.1.a-c) beschriebene gilt auch für Radioligand-Bindungsstudien, die am M-Ch durchgeführt wurden. Die Versuche wurden nach Deighton et al. [152] durchgeführt. Abweichungen von den Bindungsstudien am β -AR sind im folgenden aufgeführt.

Der Präparationspuffer (mM) enthielt: KHCO_3 (1) und der Inkubationspuffer (mM): Na_2HPO_4 (10) und NaH_2PO_4 (10) bei $\text{pH}=7,4$. Das Sediment wurde mit Inkubationspuffer aufgenommen und soweit verdünnt, daß pro ml Suspension etwa 1,5 mg Protein enthalten waren.

Der Reaktionsansatz war wie folgt:

- 50 μl Inkubationspuffer/1 μM Atropin (Definition der unspez. Bindung),
- 50 μl Ligandenlösung unterschiedlicher Konzentration,
- 150 μl Membranlösung.

Als radioaktiv markierter Ligand kam [^3H]-N-Methylscopolamin (^3H -NMS) in sechs Konzentrationen von 0,5-10 nM zum Einsatz. Die Ermittlung der unspezifischen Bindung erfolgte mit dem M-Ch-Antagonisten Atropin (1 μM). Alle Konzentrationen wurden als Doppelwerte bestimmt. Die Inkubation dauerte 60 min und die Inkubationstemperatur lag bei Zimmertemperatur. Das Ende der Reaktion wurde durch Überführung der Proben auf Eis und Zugabe von 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer eingeleitet. Danach erfolgte die Trennung von gebundenem und nicht gebundenem Liganden durch Vakuumfiltration mit einem Whatman Filtertopf (12 Proben) über feuchte Whatman GF/C-Filter. Ca. eine halbe Stunde vor der Filtration wurden die Filter mit Inkubationspuffer eingeweicht, der 1 mM nicht markiertes NMS enthielt. Die

Filtration beinhaltete einen Waschschritt mit 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer. Die Radioaktivität der angetrockneten Filterblättchen wurde nach Zugabe von 4 ml Szintillator und 10 min Schütteln (Promax 1020, Heidolph, Germany) in einem Beta-Counter (Tri-Carb® liquid scintillation analyser 2250 CA, Packard) gemessen.

b) Messung der Aktivität der Adenylylzyklase

Bei der Methode handelt es sich um dieselbe, die unter 2.2.2.2.a-c) bereits beschrieben wurde, mit dem Unterschied, daß hier die AZ mit 10 µM Forskolin und 10 µM GTP vorstimuliert wurde. Carbachol wurde in maximaler Konzentration (0,1 mM) getestet [153].

2.3. Der Einfluß von Endothelinrezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren auf kardiovaskuläre Funktionen

2.3.1. Kardiale Wirkungen von Noradrenalin

2.3.1.1. Messung der positiv inotropen Wirkung von Noradrenalin

Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Messung der Kontraktionskraft, ausgelöst durch eine Stimulation von α_1 -AR, wurde, wie unter 2.2.1.a-d) beschrieben, durchgeführt. Als Agonist an α_1 -AR kam NA zum Einsatz [154]. Die eingesetzten Konzentrationen von NA umfaßten den Bereich von 1 nM-1 mM (13 Konzentrationen im Abstand von 0,5 logarithmischen Einheiten). Aus der Anwendung von NA als Agonist ergaben sich leichte Abwandlungen zur Beschreibung unter 2.2.1. Im Organbad waren zwei Substanzen vorhanden, die zum einen die Interaktion von NA mit β_1 -AR unterbinden (0,1 µM Propranolol) und zum anderen der Wirkungsabschwächung durch eine Wiederaufnahme des Transmitters aus dem synaptischen Spalt entgegenwirken (30 µM Kokain). Die Konzentration von NA wurde erhöht, wenn die Kontraktion ihr jeweiliges Maximum nach ca. 5-10 min erreicht hatte.

2.3.1.2. Untersuchungen zur Signaltransduktion am α_1 -Adrenozeptor (Radioligand-Bindungsstudien, Bestimmung der Inositolphosphatbildung)

a) Radioligand-Bindungsstudien

Für die Radioligand-Bindungsstudien am α_1 -AR [modifiziert nach 155] gilt das bereits unter 2.2.2.1. Erwähnte. Die Abweichungen in der Durchführung sind im folgenden aufgeführt. Der Präparationspuffer (mM) enthielt: NaHCO₃ (20), der Inkubationspuffers (mM): Tris (50), EDTA (0,5) bei pH 7,5. Nach Resuspension des letzten Pellets mit Inkubationspuffer wurde soweit verdünnt, daß die Membransuspension einen Proteingehalt von etwa 2 mg/ml hatte. Als radioaktiv markierter Ligand kam der selektive α_1 -AR-Antagonist [³H]-Prazosin in sechs Konzentrationen (0,05-1,5 nM) zum Einsatz. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Phentolamin (10 μ M) eingesetzt. Alle Konzentrationen wurden als Doppelwerte bestimmt.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 500 μ l Inkubationspuffer,
- 200 μ l Inkubationspuffer/nicht selektiver Kompetitor,
- 200 μ l Ligandenkonzentration unterschiedlicher Konzentrationen,
- 100 μ l Membranlösung.

Die Inkubation erfolgte in einem Wasserschüttelbad (45 min, 25 °C). Nach der Vakuumfiltration wurden die angetrockneten Filterstücke nach Zugabe von 4 ml Szintillatorlösung für 10 min mit einem Schüttler (Promax 1020, Heidolph Germany) geschüttelt. Im Beta-Counter (Tri-Carb® liquid scintillation analyser 2250 CA, Packard) konnte nun die Radioaktivität der Proben vermessen werden.

b) Bestimmung der Inositolphosphatbildung

Ziel dieser Versuche war es, den Einfluß von Rezeptoragonisten auf die Aktivität des Enzyms PLC zu bestimmen. Dabei wandelt die PLC radioaktiv markiertes Substrat ([³H]-myo-Inositol) in radioaktiv markiertes Reaktionsprodukt (IP) um [155, 156]. Nachdem dieses extrahiert wurde, konnte es vermessen werden.

Die Versuche wurden mit Gewebeslices durchgeführt. Dabei handelt es sich um zerkleinertes Gewebe mit definierten Abmaßen. Diese Gewebestücke stellen einen Zellverband aus intakten Zellen dar, die in der Lage sind, [³H]-myo-Inositol in ihre Zellmembranen einzubauen. Unter Zusatz von Adenosindeaminase werden die slices zweimal gewaschen. Das in die Zellmembran eingebaute

2. Methoden

[³H]-myo-Inositol wird durch die PLC freigesetzt. Es liegt nun als Inositol in verschiedenen Phosphorylierungsstufen vor. Lithium im Puffer ist dafür verantwortlich, daß sich kein IP infolge Hydrolyse der analytischen Bestimmung entzieht. Die IP werden durch Chloroform/Methanol-Extraktion und Säulenchromatographie mit Anionenaustauschern isoliert. Mit dieser Methode werden alle IP (Mono-, Di- u. Triphosphat) erfaßt.

PRÄPARATION DER *SLICES*

Zur Durchführung der Bestimmung der Agonist-induzierten IP-Bildung ist es erforderlich frisches Gewebe zu verwenden. Das Organ wurde, wie unter 2.1.3. beschrieben, gewonnen, in eiskaltem, mit 95% O₂ und 5% CO₂ gesättigtem Krebs-Henseleit-Puffer aufbewahrt und von fremdem Gewebe getrennt. Der Puffer (mM) bestand aus: NaCl (108), KCl (4,7), CaCl₂ (1,3), MgSO₄ (1,2), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (4,9), Glucose (11), EDTA (0,001), Ascorbinsäure (0,057) und LiCl (10). Die Präparation der *slices* erfolgte auf Eis. Nach einer groben Zerkleinerung des Gewebes mit einer Schere wurden *slices* der Größe 250µmx250µm mit Hilfe eines tissue choppers (Bachhofer GmbH, Reutlingen Deutschland) gewonnen. Dabei wurde das zerkleinerte Gewebe zweimal (mit Schnittweiten von 1000µm und von 250µm) in Scheiben, jeweils um 90° versetzt, geschnitten. Diese Gewebeslices wurden daraufhin zweimal in 10 ml begastem Puffer, der 2U/ml Adenosindeaminase enthielt, gewaschen (Wasserschüttelbad, 15 min, 37°C). Der Einbau von [³H]-myo-Inositol (1 µM) erfolgte unter Schütteln während einer Inkubationsphase (60 min, 37 °C) in 10 ml begastem Puffer. Vor der Zugabe des radioaktiv markierten Substrates wurde es von Verunreinigungen und Zerfallsprodukten gereinigt (Anionenaustauschersäule, mit 200 mg Dowex AG 1-X8 gefüllt). Die Elution von nicht gebundenem [³H]-myo-Inositol erfolgte durch 1 ml Aqua dest.. Ein regelmäßiges Aufschütteln der sedimentierten *slices* (aller 15 min) gewährleistete einen gleichmäßigen Einbau der Verbindung. Nach Beendigung der Inkubation wurde das nicht eingebaute radioaktiv markierte [³H]-myo-Inositol in drei Waschvorgängen ausgewaschen (Austausch von ca. 8 ml der überstehenden Lösung durch frischen, 37 °C warmen, begasten Krebs-Henseleit-Puffer). Die Dispersion enthielt etwa 800 mg *slices* in 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer.

REAKTIONSANSATZ

Um einen Wirkungsverlust durch eine schnelle Wiederaufnahme des Neurotransmitters in die Zelle zu verhindern, enthielt der Ansatz Kokain in einer Konzentration von 30 µM:

300 µl *slices*,
10 µl Krebs-Henseleit-Puffer,
10 µl Propranolol,
10 µl Verdünnung.

Jede Konzentration wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt. Mit vier Konzentrationen von NA in einem Bereich von 0,1 µM-0,1 mM wurde die Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt. Der Zusatz von (\pm)-Propranolol (10 µM) hatte die Aufgabe β -AR zu blockieren. Die luftdicht verschlossenen, mit Karbogen begasten Reaktionsgefäße wurden nun für 45 min ins Wasserschüttelbad (37 °C) gestellt.

Die Extraktion der IP erfolgte durch Zugabe von 330 µl eiskaltem Methanol und 660 µl eiskaltem Chloroform. Nach Zentrifugation (10 min, 4 °C, 820 g) trennten sich beide Phasen vollständig. Ein aliquoter Teil der wässrigen Phase (400 µl) wurde abgehoben und auf Anionenaustauschersäulen, gefüllt mit 200 mg Dowex AG 1-X8, gegeben. Die IP wurden nach zweimaligem Waschen mit je 5 ml Aqua dest. und Ammoniumformiat (60 mM) durch zweimal 1 ml Elutionslösung [Ammoniumformiat (1 M) und Ameisensäure (0,1 M)] von den Säulen eluiert. Mit jeweils 8 ml Szintillator versetzt, fand die Vermessung der Proben in einem Beta-Counter (Tri-Carb® liquid scintillation analyser 2250 CA, Packard) statt.

2.3.2. Die Wirkung von Noradrenalin an der Aorta thoracica

2.3.2.1. Kumulative Kontraktionsexperimente mit Noradrenalin an Aortenpräparaten

a) Präparation, Vorbereitung

Die Aorten wurden frisch entnommen (s. 2.1.3.). Dabei wurde der herznahen Teil, die Aorta thoracica, für die Experimente verwendet. Die Durchführung aller Präparationsschritte vollzog sich in mit Karbogen gesättigtem, modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (mM) [NaCl (119), KCl (4,75), CaCl₂ (2,25), MgSO₄ (1,19), KH₂PO₄ (1,19), NaHCO₃ (25), Glucose (10), EDTA (0,0228), Ascorbinsäure (0,117), pH=7,4]. Bei der gesamten Präparation wurde besondere Sorgfalt darauf verwendet, daß die Aorta keinen unnötigen Streck- und Dehnkräften ausgesetzt war und das Gefäßendothel nicht verletzt wurde. Der erste Schritt der Präparation war die Säuberung des Gefäßes von anhaftendem Gewebe. Die gereinigte Aorta wurde mit einer Schere spiralförmig in

Streifen geschnitten (5-7 mm lang, 2 mm breit, 8-12 mg schwer). Die Streifen wurden mit kleinen Häkchen aufgenommen und in der Apparatur befestigt. Die eingehangenen Streifen befanden sich in einem Organbad, daß genau 10 ml oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer enthielt. Die Spannung, mit der das Präparat gereizt werden sollte, wurde als der 1,5fache Wert der Schwellenspannung ermittelt. Über einen Kraftaufnehmer und Verstärker wurde die Kontraktionskraft auf einem Schreiber (Fohr Medical Instruments GmbH, Deutschland) registriert. Die Einstellung der Vorlast erfolgte auf 9,81 mN.

b) Kontraktionsmessung

Die Durchführung der Experimente gleicht denen, deren Durchführung bereits unter 2.3.1.1. beschrieben wurde. Als Puffer wurde Krebs-Henseleit-Puffer verwendet. Vor der Equilibrationsphase wurde die Funktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen durch 50 mM KCl und 1 μ M Phenylephrin überprüft. War ein Plateau erreicht, wurde 10 μ M Carbachol zugegeben, um den Funktionsstatus des Endothels zu bestimmen. In der nachfolgenden Equilibrationsphase wurde der Krebs-Henseleit-Puffer im Organbad mehrmals erneuert, bis die Präparate ihr Ausgangsniveau erreichten. Bei diesen Versuchen wurden die Präparate nicht elektrisch gereizt, sondern die Kontraktionskraft ermittelt, die durch NA hervorgerufen wurde. Das Organbad enthielt Kokain (30 μ M) und Propranolol (0,1 μ M). Getestet wurde der α_1 -AR-Agonist NA in einem Konzentrationsbereich von 1 nM-1 mM in Schritten von 0,5 logarithmischen Einheiten. Die kumulative Erhöhung der Konzentration erfolgte nachdem die Kontraktion ihr Maximum erreichte (nach ca. 5-10 min).

2.3.2.2. Akkumulation von Inositolphosphaten nach Stimulation des α_1 -Adrenozeptors

a) Präparation der Aorta für die Bestimmung der Noradrenalin-induzierten Inositolphosphatbildung

Wenn nicht anders vermerkt, vollzogen sich alle Schritte auf Eis. Als Puffer fand mit Karbogen gesättigter Krebs-Henseleit-Puffer (mM) [NaCl (108), KCl (4,7), CaCl₂ (1,3), MgSO₄ (1,2), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (4,9), Glucose (11), EDTA (0,001), Ascorbinsäure (0,057) und LiCl (10)] Anwendung. Von der frisch entnommenen Aorta (s. 2.1.3.) wurde für diese Versuche der herznahen Abschnitt (Aorta thoracica) verwendet. Nach schonender Reinigung wurden mit einem tissue chopper (Bachhofer, Reutlingen Germany) 1 mm breite Aortenringe gewonnen, die in 10 ml Puffer

überführt wurden. Zum Equilibrieren und Waschen der Aortenringe wurden diese dreimal vorinkubiert (15 min, 37 °C, Wasserschüttelbad). Der Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-myo-Inositol, gereinigt durch Gabe über Anionenaustauscher und Elution mit 1 ml Aqua dest., fand während der Inkubationsphase (60 min, 37 °C, 10 ml Puffer) statt. Vor Zugabe der Aortenringe zum Ansatz wurde die nicht eingebaute Menge [³H]-myo-Inositol in drei Waschschriften entfernt.

b) Durchführung der Bestimmung

Der weitere Verlauf der Bestimmung ist identisch mit dem, der unter 2.3.1.2. b) beschrieben wurde. Das gilt sowohl für die Inkubation als auch für die Trennung und Reinigung sowie für die Auswertung. Der Ansatz (Vierfachbestimmung) hatte folgende Zusammensetzung:

- 300 µl Präparatedispersion (enthält drei Aortenringe),
- 10 µl Krebs-Henseleit-Puffer,
- 10 µl Propranolol,
- 10 µl verschiedene NA-Konzentrationen.

2.3.3. Kardiale Wirkungen von Endothelin

2.3.3.1. Messung der positiv inotropen Wirkung von Endothelin

Bei der Messung [66] des postiv inotropen Effektes von ET wurden die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt, wie sie im Abschnitt 2.2.1. bereits beschrieben sind. Als Agonist wurde ET in einem Konzentrationsbereich von 10 pM-0,1 µM eingesetzt (in 0,5 logarithmischen Einheiten).

2.3.3.2. Untersuchungen zur Signaltransduktion am Endothelinrezeptor (Radioligand-Bindungsstudien, Bestimmung der Inositolphosphatbildung)

a) Bestimmung von B_{max} und K_D

Die Charakterisierung des ET-R erfolgte mittels Kompetitionsanalysen [157, 158] (s. 2.2.2.1. b-c). Da ET ein endogenes Peptid ist, das leicht an Oberflächen adsorbiert wird, gelten einige Besonderheiten bei der Durchführung der Versuche. Der Präparationspuffer (mM) setzte sich folgendermaßen zusammen: Tris (50), EDTA (1) sowie Aprotinin (10 µg/ml). Der Zusatz von Aprotinin inhibierte Proteininasen, die im Gewebe enthalten sind und ET inaktivieren können. Die

gleiche Funktion erfüllte der Sojabohnen-Trypsininhibitor (Hemmung von Trypsin) im Inkubationsspuffer (mM) [MgCl₂ (10), Tris (50), 0,1% Rinderserumalbumin und Sojabohnen-Trypsininhibitor (1 mg/ml) bei pH=7,4]. Zusätzlich war im Inkubationspuffer Rinderserumalbumin enthalten. Dieses verhinderte kompetitiv die Adsorbtion von ET an die Oberfläche der Reaktionsgefäße während der Inkubation. Das letzte Pellet wurde in Inkubationspuffer resuspendiert und soweit verdünnt, daß die Lösung einen Gehalt von etwa 0,04 mg Protein/ml enthielt (Proteingehalt nach Bradford ermittelt, Leerwert wurde mit Puffer bestimmt, der Rinderserumalbumin enthielt).

Der Reaktionsansatz betrug 1000 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 500 µl Inkubationspuffer/Verdünnungen des Kompetitors ET,
- 100 µl Ligandenlösung fester Konzentration,
- 400 µl Membranlösung.

ET kam in 15 unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz (von 1 µM-0,1 pM). Jede Bestimmung erfolgte als Doppelbestimmung. Um bei der Herstellung der verschiedenen ET-Konzentrationen eine Wechselwirkung von ET mit der Oberfläche der Gefäße zu vermeiden, wurden Glasgefäße verwendet, deren Oberfläche silikonisiert wurde. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [¹²⁵Jod]-Endothelin (¹²⁵J-ET) eingesetzt. Dessen Konzentration betrug 3-4 pM. Die unspezifische Bindung wurde mit dem nicht selektiven ET-R-Antagonisten Bosentan (1 µM) bestimmt. Die Reaktionsgefäße wurden 60 min bei 37 °C in einem Wasserschüttelbad inkubiert. Ca. 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die Filter in Inkubationspuffer gelegt, der 4 % Rinderserumalbumin enthielt (Verhinderung der Adsorbtion von ungebundenem radioaktiv markiertem ET am Filtermaterial). Der rezeptorgebundene Anteil von ¹²⁵J-ET wurde durch Vakuumfiltration mit einem Brandel Harvester (für 48 Proben) bestimmt. Die Filtration erfolgte rasch (5-10 s) und beinhaltete vier Waschschrifte mit je 2 ml eiskaltem Inkubationspuffer. Die Radioaktivität der angetrockneten Filterblättchen wurde in einem Gamma Counter (Cobra Autogamma, Packard, Meriden, USA) gemessen. Die Zählausbeute des Counters betrug 80%.

b) Subtypverteilung von ET_A/ET_B-Rezeptoren

Der Ansatz ist dem obigen gleich, mit dem Unterschied, daß anstelle von 15 ET-Konzentrationen, 13 Konzentrationen des selektiven ET_A-R-Antagonisten BQ 123 verwendet wurden (1 nM-10 µM).

c) Bestimmung der Inositolphosphatakkumulation durch Endothelin am Herzen

Die Durchführung der Bestimmung [66, 157, 158] erfolgte wie unter 2.3.1.2. b) beschrieben. Im Unterschied dazu wurde jedoch als Agonist ET in vier Konzentrationen von 0,1 nM-1 µM eingesetzt. Es war kein Kokain im Inkubationsgemisch enthalten. Jede ET-Konzentration wurde als Doppelwert bestimmt.

Der Reaktionsansatz war folgender:

- 300 µl *slices*,
- 10 µl Krebs-Henseleit-Puffer,
- 10 µl Propranolol,
- 10 µl Verdünnung von ET.

2.3.4. Die Wirkung von Endothelin an der Aorta thoracica

2.3.4.1. Kumulative Kontraktionsmessungen mit Endothelin an Aortenpräparaten

Die Präparation der Aortenringe ist identisch mit der, die unter 2.3.2.1.a) aufgeführt ist. Die Messung selbst entspricht der von 2.3.2.1.b). Als Agonist am ET-R wirkte ET in einer Konzentrationsspanne von 0,1 pM-0,1 µM (neun Konzentrationen in der Schrittweite 0,5 logarithmischer Einheiten). Das Organbad enthielt kein Kokain. Die Erhöhung der Konzentration erfolgte, nachdem die Kontraktion ihr Maximum erreichte (nach ca. 5-10 min).

2.3.4.2. Akkumulation von Inositolphosphaten in Ringen der Aorta nach Stimulation des Endothelinrezeptors

Die Herstellung der Aortenringe gleicht der Präparation, die bereits unter 2.3.2.2. a) beschrieben wurde. Die Bestimmung der Akkumulation von IP nach Stimulation des ET-R erfolgte nach der Vorschrift von 2.3.2.2. b). Dabei wirkte ET in vier Konzentrationen (1 nM-1 µM) als Agonist.

2.4. Statistische Analysen

Für die Versuche wurden insgesamt 220 Wistar-Ratten ausgewählt, von denen die eine Hälfte subtotal nephrektomiert und die andere scheinoperiert wurde. Mit 80 Tieren erfolgten Versuche zur Messung der Kontraktionskraft des Herzmuskels nach Stimulation verschiedener Rezeptoren. Für

die Bestimmung der Aktivität der AZ und die Quantifizierung der Akkumulation von IP wurden 80 Tiere untersucht. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Eigenschaften der einzelnen Rezeptoren mittels Radioligand-Bindungsstudien an insgesamt 60 Wistar-Ratten.

Aus einem Herzen konnten 1-3 Ventrikelstreifen präpariert werden. Erfolgte aus einem Herzen die Präparation von mehreren Ventrikelstreifen, so wurden nach Möglichkeit an diesen Streifen die Wirkung verschiedener Substanzen bestimmt. Für jede Versuchsreihe und Gruppe wurden mindestens sechs Einzelexperimente angesetzt. Darüber hinaus erfolgten je nach Gegebenheit noch weitere Versuche zu den verschiedenen Substanzen und Gruppen.

Ähnliches gilt für die Durchführung der Radioligand-Bindungsstudien. Aus den Herzen wurden Rohmembranfraktionen präpariert. Je nach Ausbeute der Präparation und Art der Bestimmung war es möglich, Untersuchungen an ein oder zwei Rezeptoren durchzuführen. Da die Streuung der Einzelversuche relativ hoch war, wurde angestrebt für jeden Rezeptor und jede Versuchsgruppe zehn Einzelexperimente durchzuführen.

Für die anderen Versuche (Bestimmung der Aktivität der AZ, Quantifizierung der Bildung von IP) wurden mindestens sieben Einzelversuche durchgeführt, wobei für jeden Einzelversuch ein Herz verwendet wurde. Darüber hinaus erfolgten je nach Gegebenheit noch weitere Versuche zu den verschiedenen Substanzen und Gruppen.

Alle erhaltenen Daten und Ergebnisse wurden mit GraphPad-Software (InPlot, InStat und Prism) analysiert und zusammengefaßt. Diese Software enthält statistische Analysen (Mann-U-Whitney-Test für abhängige und unabhängige Werte), Regressionsanalysen und Werkzeuge zur graphischen Darstellung. Mehrfachbestimmungen von Einzelwerten sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Bei der Analyse von Mittelwertunterschieden galten diese als signifikant, wenn $p<0,05$ war (Mann-U-Whitney-Test).

2.5. Verwendete Substanzen

[α - ³² P]ATP (N)	Alumina (S)
Ameisensäure (M)	Ammoniumformiat (M)
Aprotinin (S)	Ascorbinsäure (M)
Atropin-sulfat (S)	Bosentan (*)
BQ 123 (Cyclo[D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp]) (A)	Calciumchlorid (M)
c-AMP (Bö)	Carbachol (S)

2. Methoden

CGP 12177 (C)	CGP 20712A (C)
ClinRep Standardlösung für Katecholamine in Plasma	Chloroform (M)
Creatinphosphat (S)	Creatinphosphokinase (S)
Dowex AG 1-X8 (B)	EDTA-dinatrium-dihydrat(M)
ET-1 (A)	Forskolin (CN)
Glukose (M)	Glutathion (M)
GTP (Bö)	[³ H]-c-AMP (N)
HEPES (R)	[³ H]myo-Inositol (Ah)
[³ H]-N-Methylscopolamin (N)	ICI 118,551 (I)
Imidazol (S)	(-)Isoprenalin-bitartrat (S)
(-)[¹²⁵ I]Iodocyanopindolol (N)	Kaliumchlorid (M)
Kaliumhydrogenkarbonat (M)	Karbogen (AGA)
Kokain (S)	LiChrophor 100
Lithiumchlorid (M)	Magnesiumchlorid (M)
Magnesiumsulfat (M)	Manganchlorid-tetrahydrat (S)
Methanol (M)	Methylenblau (LC)
Natriumchlorid (M)	Natriumdihydrogenphosphat (M)
Natriumfluorid (M)	Natriumhydrogenkarbonat (M)
Natriumhydrogenphosphat (M)	Noradrenalinbitartrat (S)
[³² P]-ATP(N)	Pentobarbital (S)
Phenylephrin (S)	(±)-Propranolol-hydrochlorid (S)
Rinderserumalbumin (S)	SDS (B)
SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) (S)	Sojabohnen-Trypsininhibitor (S)
Szintillatorlösung Lumasafe TM plus (L)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (M)
Xylazin [®]	

(*) bereitgestellt von Dr. M Clozel Hoffmann La Roche Ltd.; Basel, Schweiz

(A) Alexis; Grünberg, Deutschland

(AGA) AGA Gas GmbH; Hamburg, Deutschland

(Ah) Amersham; Braunschweig, Deutschland

(B) Bio-Rad; Hercules, USA

(Bö) Böhringer; Mannheim, Deutschland

- (C) bereitgestellt von Ciba Geigy; Basel, Schweiz
- (CN) Calbiochem Novabiochem Corp; La Jolla, USA
- (I) bereitgestellt von ICI Pharma; Planckstadt, Deutschland
- (L) Lumac LSC BV; Groningen, Niederlande
- (LC) LC Laboratories; Woburn, MA, USA
- (M) Merck; Darmstadt, Deutschland
- (N) New England Nuclear; Dreieich, Deutschland
- (R) Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- (S) SIGMA; Deisenhofen, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Beschreibung des Tiermodells

3.1.1. Harnpflichtige Substanzen im Plasma

Die Entnahme von Blut erfolgte bei insgesamt 100 SNX-Ratten und bei 85 SOP-Ratten. Bei der Untersuchung der Blutproben wurde bei den SNX-Ratten ein signifikanter Anstieg der Konzentration harnpflichtiger Substanzen im Plasma festgestellt. Die Plasmakreatinininkonzentration war bei den SNX-Ratten im Vergleich zu den SOP-Ratten um 50,1% erhöht. Nach der SNX stieg auch die Plasmakonzentration von Harnstoff. Es wurde eine Erhöhung um 85 % ermittelt.

Meßgröße	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
Konz. v. Harnstoff mmol/l	13,1±0,4 CI=12,2-13,9	100	<0,01	7,1±0,3 CI=6,4-7,7	85
Konz. v. Kreatinin µmol/l	69,6±1,3 CI=67,0-72,2	100	<0,01	46,4±1,0 CI=44,5-48,3	85

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Konzentration zweier harnpflichtiger Substanzen im Plasma von SNX- und SOP-Ratten.

3.1.2. Alter, Körpergewicht, Herzgewicht

Alle Untersuchungen (ausgenommen Tabelle 16 b, c) wurden an Tieren durchgeführt, bei denen die Entnahme von $\frac{5}{6}$ der gesamten Nierenmasse 7±0,5 Wochen zurücklag. Das Lebensalter der Ratten betrug zu diesem Zeitpunkt 14 Wochen. Alle nachfolgenden Daten beziehen sich, wenn nicht anders aufgeführt, auf Tiere in diesem Alter.

Die beiden Vergleichsgruppen (SNX vs. SOP) unterschieden sich zum Zeitpunkt der Organentnahme nicht im Gesamtkörpergewicht. Die Tiere, bei denen eine Nephrektomie durchgeführt wurde, hatten eine Gesamtmasse von 329,6±4,3 g (n=103). SOP-Ratten wogen im Mittel genauso viel: 331,9±3,5g (n=95).

Bei gleichem Körpergewicht wurden jedoch Unterschiede in den Herzgewichten festgestellt. In Tabelle 2 sind alle Einzeldaten zusammengefaßt dargestellt.

3. Ergebnisse

	SNX-Ratten	p-Wert	SOP-Ratten
Gewicht/mg	gesamtes Herz n=97 1222±18 CI=1186-1258	<0,05	gesamtes Herz n=84 1063±17 CI=1029-1096
Herzindex/mg/g (m _{HERZ} /m _{KG})	3,776±0,063 mg/g CI=3,650-3,902 mg/g	<0,05	3,243±0,052 mg/g CI=3,139-3,347 mg/g
Gewicht/mg	Ventrikel n=90 967±16 CI=934-1000	<0,05	Ventrikel n=81 859±25 CI=808-909
Ventr.Index/mg/g (m _{Ventr} /m _{KG})	2,977±0,048 CI=2,881-3,073	<0,05	2,631±0,078 CI=2,476-2,785
Gewicht/mg	linker Ventrikel * n=23	rechter Ventrikel n=23	linker Ventrikel * n=15
LV/RV-Index/mg/g (m _{LV/RV} /m _{KG})	879±42 CI=792-967	199±7 CI=183-214	182±9 CI=162-202
	2,598±0,128 CI=2,333-2,862	0,5867±0,022 CI=0,5421-0,6313	0,5147±0,028 CI=0,4543-0,5752

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Gewichte des Herzens und der Ventrikel (zusammen sowie aufgetrennt in linken und rechten Ventrikel).

Die Masse des gesamten Herzens vergrößerte sich bei den untersuchten Tieren um 15,0%. Zur Beantwortung der Frage, welcher anatomische Teil des Rattenherzens diese Hypertrophie ausmacht, wurden bei fast allen gewogenen Herzen die Vorhöfe sowie einzelne Gefäßreste entfernt,

so daß das Gewicht der beiden Ventrikel zusammen, extra bestimmt werden konnte. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Gewichtes der beiden Ventrikel nach der SNX um 12,6%. Dabei war die Masse des linken Ventrikels bei den SNX-Ratten um 31,8% im Vergleich zu den SOP-Ratten erhöht, während das Gewicht der rechten Ventrikel bei beiden Gruppen vergleichbar war.

3.1.3. Blutdruck

Die stichprobenartige Kontrolle des Blutdrucks wurde bei 28 SNX- und 20 SOP-Ratten durchgeführt. Die SNX hatte keinen wesentlichen Einfluß auf den systolischen Blutdruck. Der Mittelwert des systolischen Blutdrucks betrug bei den SNX-Ratten $130,8 \pm 4,4$ mm Quecksilbersäule und bei den SOP-Ratten $122,2 \pm 1,6$ mm Quecksilbersäule.

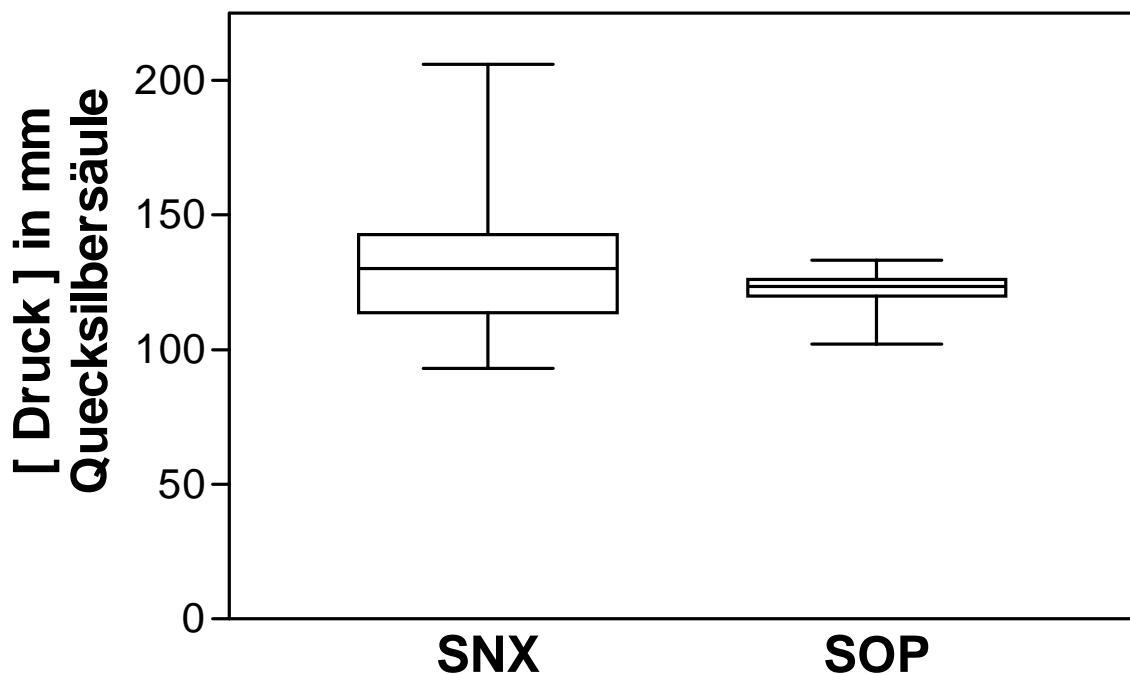


Abbildung 1: Der Einfluß des urämischen Zustandes auf den systolischen Blutdruck sieben Wochen nach der zweiten OP. Als Mittelwerte ergaben sich: Druck $_{SNX}=130,8 \pm 4,4$ mm Hg ($n=28$, CI=121,7-139,9 mm Hg); Druck $_{SOP}=122,2 \pm 1,6$ mm Hg ($n=20$, CI=118,8-125,7 mm Hg). Der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz.

3.1.4. Die Bestimmung der Plasmakatecholamine

Mittels HPLC wurde die Konzentration der Katecholamine im Plasma bestimmt. Zur Quantifizierung der aufgetrennten Katecholamine wurden diese nach einer modifizierten Adrenochromreaktion fluorimetrisch zu einem Standard vermessen.

Eine graphische Darstellung der Meßwerte ist in Abbildung 2 zu sehen:

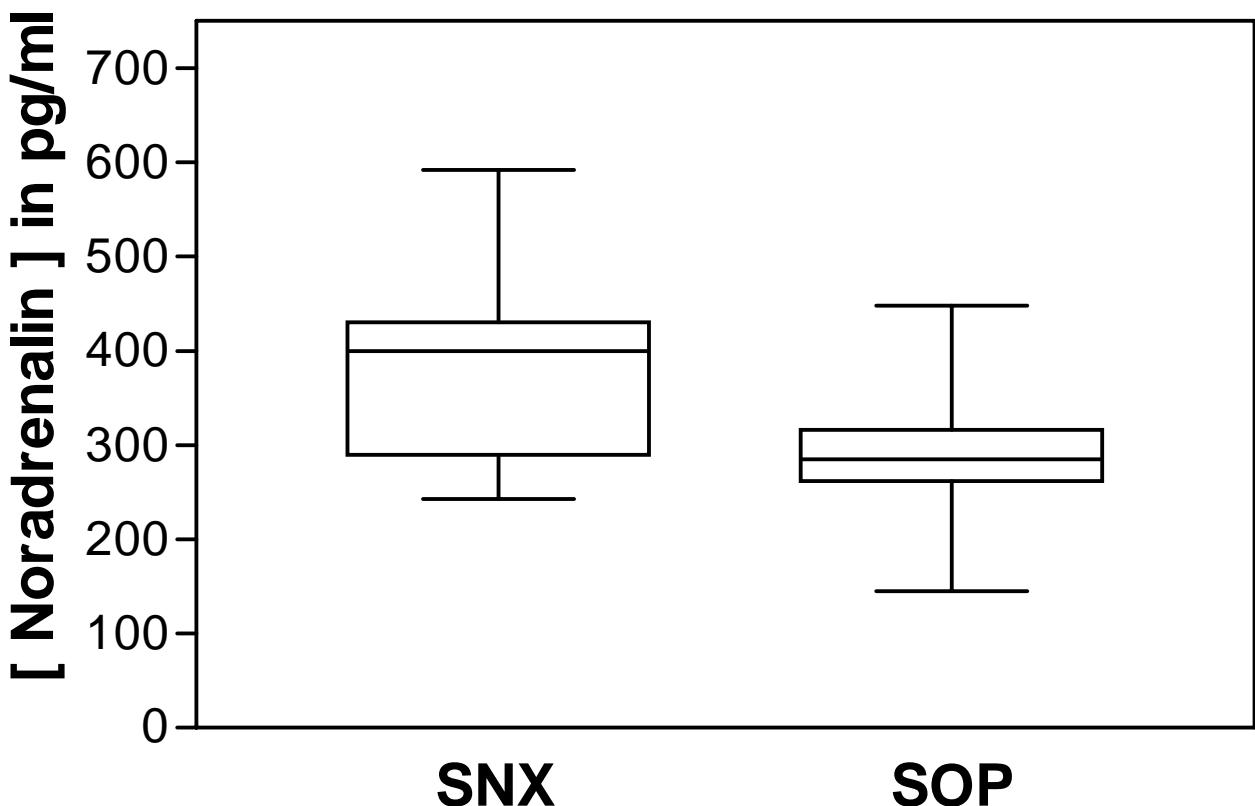


Abbildung 2: Vergleich der Konzentration von NA im Plasma von SNX- und SOP-Ratten. Die statistische Auswertung zeigt, daß der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ist. Als Mittelwert ergibt sich für die SNX-Ratten eine Konzentration von $383,7 \pm 26,7$ pg/ml ($n=17$, CI=327,1-440,3 pg/ml), für SOP-Ratten von $291,3 \pm 18,8$ pg/ml ($n=15$, CI=250,9-331,8 pg/ml).

Bei der Gruppe der SNX-Ratten war die Plasmakonzentration von NA erhöht. Die Konzentration von NA lag um 31,7% höher als bei den SOP-Ratten. Mit $p<0,05$ war dieser Unterschied signifikant.

Die mittlere Adrenalinkonzentration war hingegen nicht verschieden. Bei den SNX-Ratten betrug der Mittelwert $83,5 \pm 24,1$ pg/ml ($n=14$, CI=31,5-135,5 pg/ml), bei SOP-Ratten $99,5 \pm 28,4$ pg/ml ($n=8$, CI=32,3-166,7 pg/ml). Die Zusammenfassung und statistische Auswertung der

3. Ergebnisse

stichprobenartig ermittelten Meßwerte zeigt deutlich, daß die Urämie mit einem signifikanten Anstieg der Plasmanoradrenalin-Konzentration einhergeht, wobei die Plasmaadrenalin-Konzentration unverändert bleibt.

3.2. Charakterisierung der Herzarbeit nach subtotaler Nephrektomie

Bei diesen Versuchen wurden neben den Kontraktionseigenschaften von Ventrikelpräparationen auch biochemische Parameter zur Signaltransduktion von β -AR und M-Ch bei SNX- und SOP-Ratten bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluß von NO und 8-Br-c-GMP auf die Isoprenalin-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft in den beiden Gruppen verglichen.

3.2.1. Die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin

Isoprenalin führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Kontraktionskraft der elektrisch gereizten Herzmuskelstreifen. Die Kontraktion vollzog sich schnell und erreichte in wenigen Sekunden ihr Maximum. Während sich beide Kurven nur unwesentlich in den pD₂-Werten unterschieden [SNX: 8,14±0,06 (n=15, CI=8,02-8,26) und SOP: 7,93±0,05 (n=9, CI=7,81-8,04)], war die durch einen β -adrenergen Reiz hervorgerufene Änderung der Kontraktionskraft bei den SNX-Ratten abgeschwächt. Das Maximum wurde bei einer Isoprenalin-Konzentration von 1 μ M erreicht. Diese Konzentration bewirkte eine Zunahme der Kontraktionskraft um 3,2±0,6 mN (n=15, CI=2,7-3,8 mN) bei den SNX-Ratten und bei den SOP-Ratten um 5,1±0,5 mN (n=9, CI=4,5-5,7 mN). Diese Unterschiede waren signifikant.

Eine vergleichende Darstellung der Zunahme der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Isoprenalin-Konzentration ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

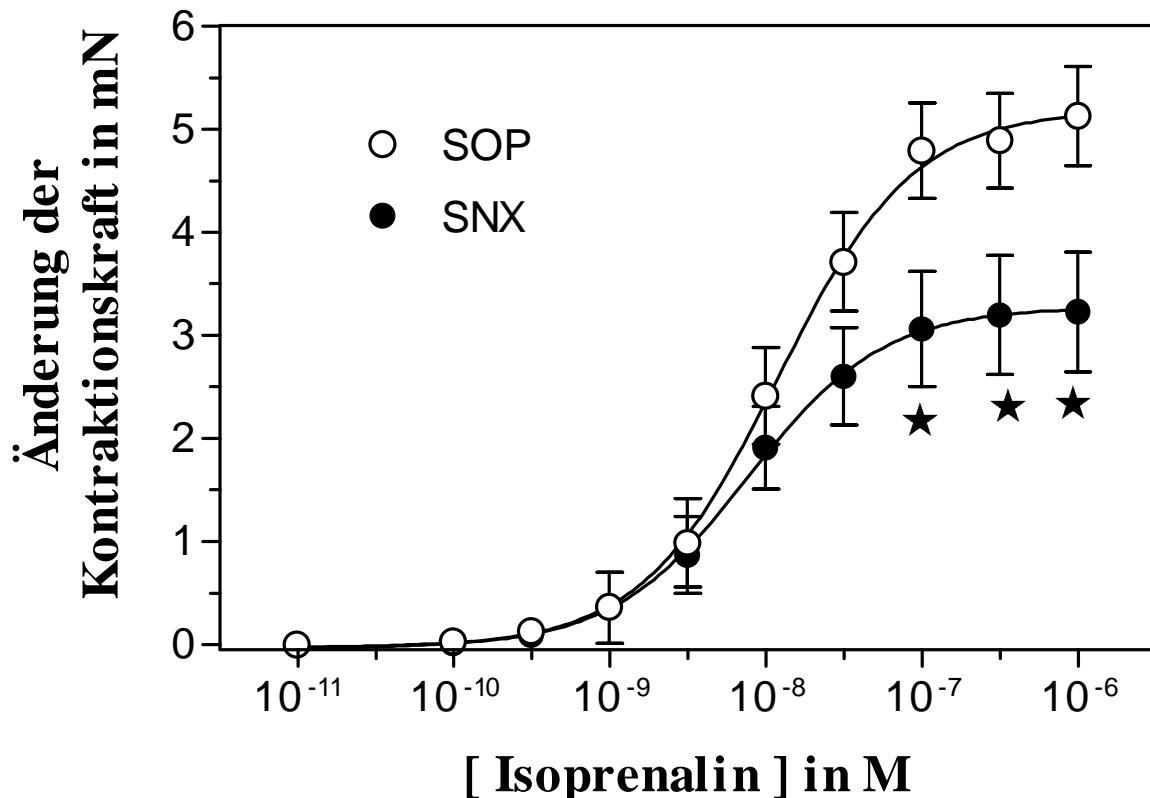


Abbildung 3: Durch Isoprenalin hervorgerufene Steigerung der Kontraktionskraft an elektrisch gereizten Ventrikelstreifen. Dargestellt sind vergleichsweise die Konzentrations-Wirkungskurven von SNX- und SOP-Ratten als Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Isoprenalin-Konzentration. Die dazugehörigen Basalwerte betragen $4,5 \pm 0,3$ mN ($n=15$, CI=4,0-5,1 mN) für die SNX-Gruppe und für die SOP-Gruppe $3,6 \pm 0,2$ mN ($n=9$, CI=3,1-4,0 mN). Die Änderung der Kontraktionskraft nach β -adrenerger Stimulation war bei den SNX-Ratten im Vergleich zu SOP-Ratten erniedrigt. Diese Erniedrigung nahm bei Konzentrationen $> 0,1 \mu\text{M}$ statistische Signifikanz an.

Im Anschluß an die Kontraktionsmessungen nach Isoprenalinstimulation wurde stichprobenartig ($n=5$) eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit Ca^{++} zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der Herzmuskelpräparate aufgenommen. Nach Erneuerung der Lösung des Organbades und Einhalten einer Auswaschphase erfolgte kumulativ die Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt. Die maximal erreichbare Änderung der Kontraktionskraft konnte durch $7,92$ mM Ca^{++} herbeigeführt werden [$7,4 \pm 0,8$ mN ($n=5$, CI=5,1-9,7 mN; SNX), $6,7 \pm 0,5$ mN ($n=5$, CI=5,2-8,2 mN; SOP)-n.s.]. Die resultierende Kurve ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

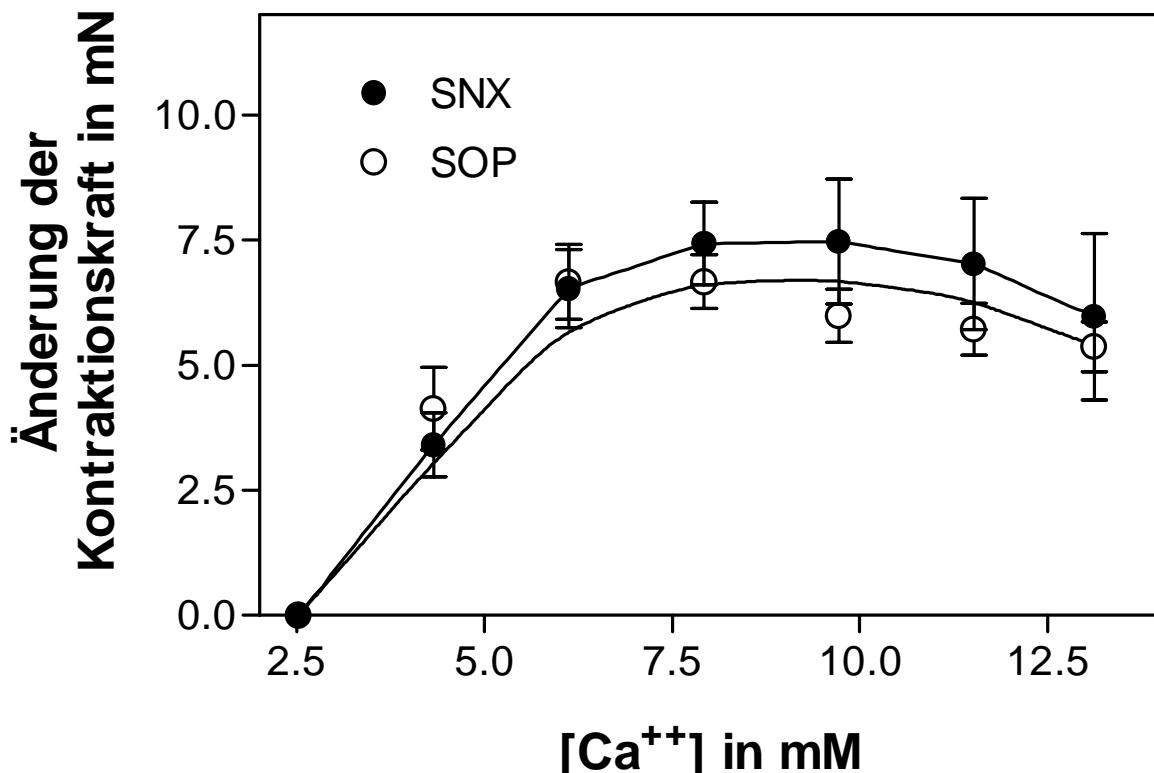


Abbildung 4: Dargestellt ist die kumulative Konzentrations-Wirkungskurve von Ca⁺⁺ an Ventrikelpräparaten des Rattenherzen von SNX- (n=5) und SOP-Ratten (n=5). Die Wirkung von Ca⁺⁺ unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Die maximale Änderung der Kontraktionskraft wurde von 7,92 mM Ca⁺⁺ erzielt: 7,4±0,8 mN (n=5, CI=5,1-9,7 mN; SNX), 6,7±0,5 mN (n=5, CI=5,2-8,2 mN; SOP).

3.2.2. Biochemische Untersuchungen zur β-adrenergen Signaltransduktion

Die Wirkung von Isoprenalin war am Ventrikel von SNX-Ratten abgeschwächt (s. Abschnitt 3.2.1.). Ob diese verminderte Kontraktion auf einen Defekt am β-AR oder möglicherweise auf andere Komponenten der Signaltransduktion zurückzuführen ist, sollten die folgenden biochemischen Untersuchungen zeigen.

3.2.2.1. Bindungseigenschaften der β-Adrenozeptoren

Die Bindung des Liganden an den Rezeptor ließ sich bei allen Einzelexperimenten durch einen monophasischen Verlauf beschreiben (Prüfung mittels F-Test). Als Beispiel seien hier die graphischen Auswertungen der Sättigungsstudie für jeweils eine Membranpräparation einer SNX-Ratte und einer SOP-Ratte aufgeführt:

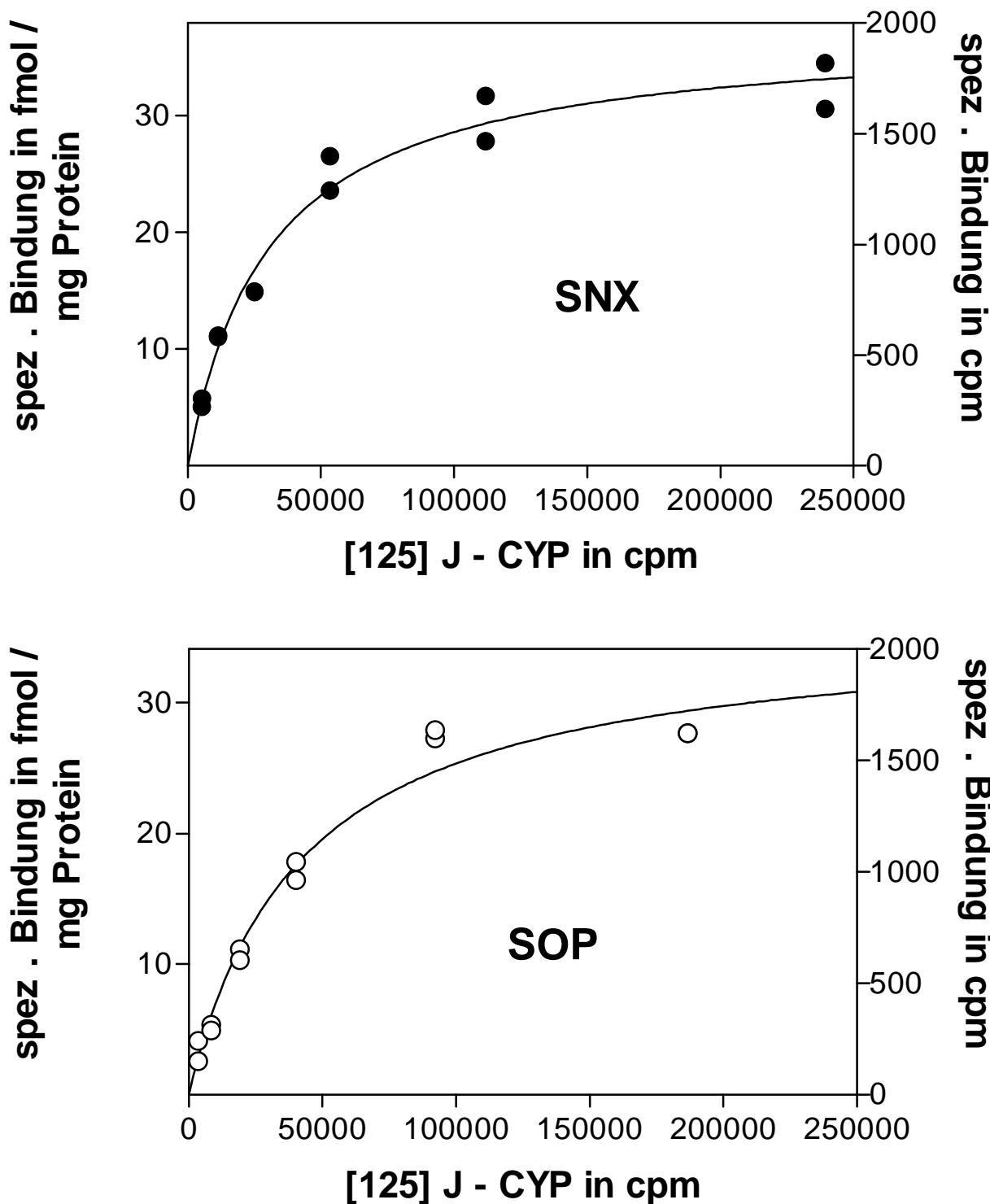


Abbildung 5: Repräsentative Sättigungsbindungskurve von ¹²⁵J-CYP an Membranpräparationen einer SNX-Ratte (13,5 µg Protein/Ansatz; oben) und einer SOP-Ratte (15 µg Protein/Ansatz; unten). Die Mittelwerte von B_{max} und K_D unterschieden sich in beiden Gruppen nicht. Bei diesen Experimenten betrug die unspezifische Bindung bei den SNX-Ratten im Mittel $25,3 \pm 2,7\%$ ($n=11$, CI=19,2-31,4%) der totalen Bindung und $23,3 \pm 2,6\%$ ($n=11$, CI=17,4-29,2%) bei den SOP-Ratten. Dieser Wert bezieht sich auf die totale Bindung bei K_D .

Repräsentative Einzelexperimente der Kompetitionsanalysen zeigt Abbildung 6:

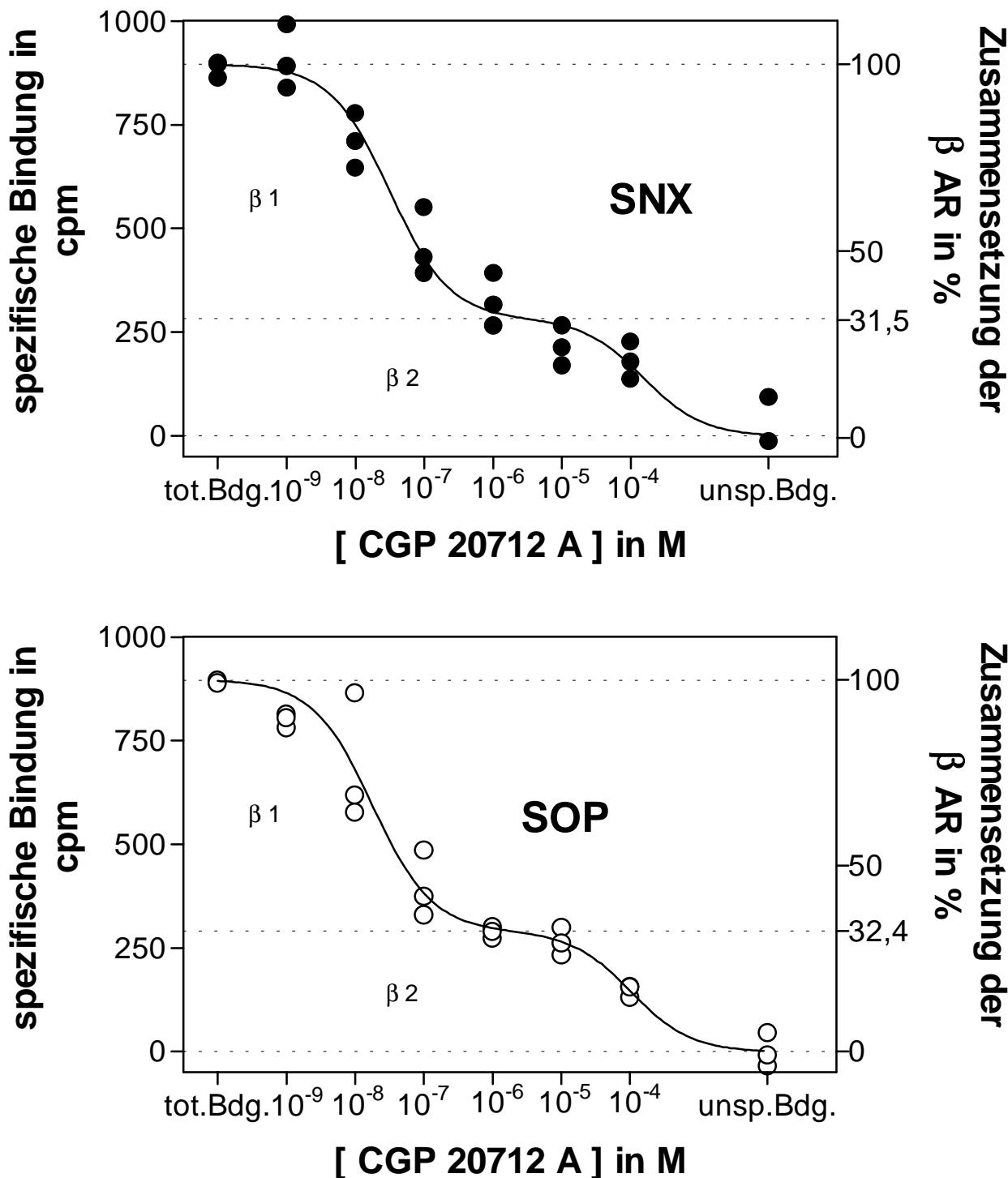


Abbildung 6: Dargestellt sind repräsentative Einzelexperimente zur Subtypbestimmung von β -AR bei SNX-Ratten (oben) und SOP-Ratten (unten). Der Anteil an β_1 -AR war nach der SNX im Vergleich zur Schein-OP unverändert. Gleiches galt auch für die IC_{50} des verwendeten Liganden (CGP 20712A). Für die Ermittlung der Mittelwerte wurden die Daten von elf SNX-Ratten ($n=11$) und zehn SOP-Ratten ($n=10$) herangezogen.

3. Ergebnisse

Bei den durchgeführten Versuchen konnten keine Veränderungen am Rezeptor selbst festgestellt werden. Sowohl die Anzahl der freien Bindungsstellen pro mg eingesetzten Proteins als auch die Dissoziationskonstante des Liganden am Rezeptor waren zahlenmäßig unverändert. Die Verdrängung von ^{125}J -CYP aus seinen Bindungsstellen durch CGP 20712A, einem selektiven β_1 -AR-Antagonisten [159], ergab keinen Unterschied zwischen SNX- und SOP-Ratten bezüglich der Subtypverteilung.

In Tabelle 3 sind alle Daten mit den entsprechenden statistischen Kenngrößen aufgelistet:

Meßgröße	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
B_{\max} / fmol/mg Prot.	$23,1 \pm 3,9$ CI=14,4-31,8	11	n.s.	$21,0 \pm 2,9$ CI=14,58-27,5	11
UB als % TB bei K_D	$25,3 \pm 2,7$ CI=19,2-31,4	11	n.s.	$23,3 \pm 2,6$ CI=17,4-29,2	11
UB als % TB bei $[\text{Ligand}]_{\max}$	$59,2 \pm 2,2$ CI=54,2-64,2	11	n.s.	$56,4 \pm 2,3$ CI=51,3-61,4	11
$K_D(^{125}\text{J-CYP})$ / pM	$22,8 \pm 3,1$ CI=15,8-29,8	11	n.s.	$28,3 \pm 3,6$ CI=20,4-36,2	11
β_1 / %	$68,6 \pm 1,4$ CI=65,5-71,8	11	n.s.	$65,7 \pm 1,7$ CI=62,0-69,4	10
$pK_i(\beta_1)$ (CGP 20712a)	$8,77 \pm 0,16$ CI=8,40-9,14	11	n.s.	$8,36 \pm 0,08$ CI=8,18-8,54	10
$pK_i(\beta_2)$ (CGP 20712a)	$5,34 \pm 0,25$ CI=4,78-5,91	11	<0,05	$4,67 \pm 0,11$ CI=4,42-4,92	10

Tabelle 3: Zusammenstellung aller Kenngrößen der β -AR aus den Radioligand-Bindungsstudien. (Abkürzungen in der Tabelle: UB - unspezifische Bindung; TB - totale Bindung).

3.2.2.2. Einflüsse auf die Aktivität der Adenylylzyklase

Um eine Erklärung für die verminderte Wirkung von Isoprenalin am Ventrikelstreifen zu finden, erfolgte die Untersuchung der Aktivität der AZ. Zu diesem Zweck wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf dieses Enzym bestimmt.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden an sieben Rohmembranpräparationen von SNX-Ratten ($n=7$) und neun von SOP-Ratten ($n=9$) durchgeführt. Bei diesen Versuchen führte Isoprenalin konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Aktivität der AZ. Die maximale Aktivität zeigte sich bei $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin. Die Konzentrations-Wirkungskurve ist in Abbildung 7 dargestellt:

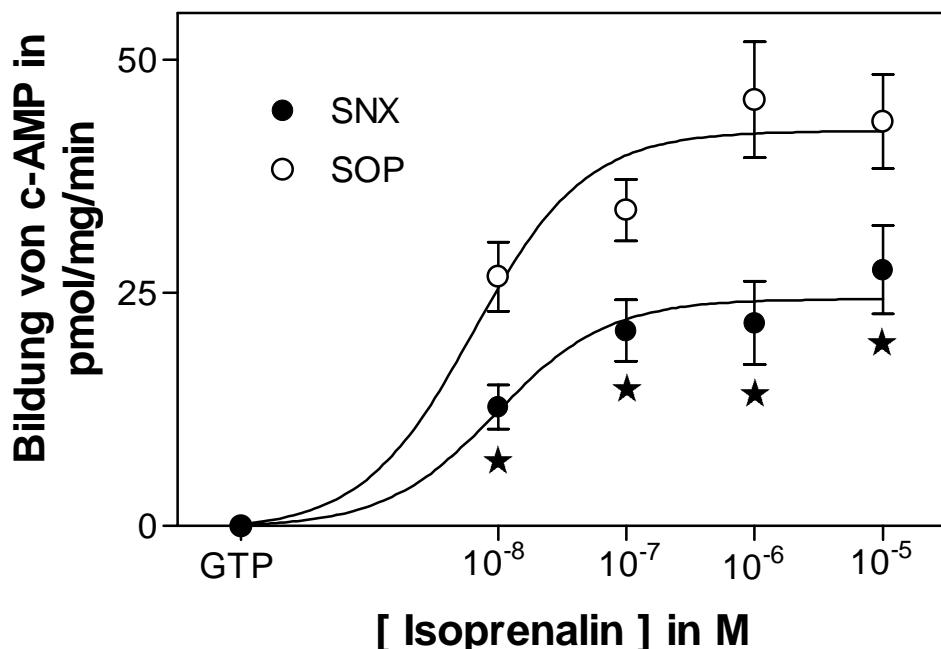


Abbildung 7: Abhängigkeit der Zyklaseaktivität von der Isoprenalkonzentration. Dargestellt ist die pro Minute gebildete Menge c-AMP bezogen auf 1 mg Protein nach Abzug von Basalwert und GTP ($10 \mu\text{M}$). Für die Gruppe der SNX-Ratten betrug die basale Aktivität $18,2 \pm 3,0 \text{ pmol c-AMP/mg Protein/min}$ ($n=7$) und bei den SOP-Ratten $14,7 \pm 1,8 \text{ pmol c-AMP/mg Protein/min}$ ($n=9$). Bei allen Konzentrationen von Isoprenalin ($10 \text{ nM}-10 \mu\text{M}$) war die Aktivität der AZ in der Gruppe der SNX-Ratten signifikant erniedrigt. Der pEC_{50} -Wert der Konzentrations-Wirkungskurve unterschied sich in beiden Gruppen nicht.

Bei allen eingesetzten Konzentrationen war die Wirkung von Isoprenalin ($10 \text{ nM}-10 \mu\text{M}$) bei den SNX-Ratten signifikant erniedrigt. Dabei veränderte sich der pEC_{50} -Wert der Konzentrations-Wirkungskurve nicht: SNX-Gruppe $7,71 \pm 0,16$ ($n=7$, CI=7,32-8,10) und

3. Ergebnisse

SOP-Gruppe: $7,88 \pm 0,20$ (n=9, CI=7,40-8,35). Die abgeschwächte Wirkung von Isoprenalin lässt einen Defekt in der intrazellulären Signaltransduktion vermuten. Zur weiteren Charakterisierung der β -adrenergen Signaltransduktion wurde die Aktivierung der AZ unter dem Einfluß von GTP (aktiviert sowohl G_S - als auch G_i -Protein), NaF (wirkt selektiv auf G_S -Protein), Forskolin (stimuliert die katalytische Untereinheit der AZ und in geringerem Maße auch G_S -Protein) und Mn^{++} (stimuliert die Aktivität der AZ ausschließlich über die katalytische Untereinheit) bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4:

Getestete Substanz	SNX-Ratten AZ-Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min	n	p-Wert	SOP-Ratten AZ-Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min	n
Basalwert	$18,2 \pm 3,0$ CI=9,5-26,4	7	n.s.	$14,7 \pm 1,8$ CI=11,1-18,8	9
GTP (10 μ M)	$5,9 \pm 2,5$ CI=1,1-13,4	7	n.s.	$6,9 \pm 1,9$ CI=2,6-11,2	9
<i>Isoprenalin</i> (10 μ M)	$27,5 \pm 4,7$ CI=15,9-39,0	7	<0,05	$43,4 \pm 5,0$ CI=31,7-55,0	9
Forskolin (10 μ M)	$284,4 \pm 43,6$ CI=177,6-391,2	7	n.s.	$282,9 \pm 26,1$ CI=222,7-343,1	9
NaF (10 mM)	$68,6 \pm 22,4$ CI=13,6-123,5	7	n.s.	$64,3 \pm 8,4$ CI=44,9-83,6	9
Basal für Mn^{++} (ohne Mg^{++})	$15,2 \pm 1,9$ CI=10,6-19,9	7	n.s.	$12,8 \pm 2,0$ CI=8,2-17,4	9
Mn^{++} (10 mM)	$8,8 \pm 1,7$ CI=4,6-13,1	7	n.s.	$9,8 \pm 1,6$ CI=6,1-13,5	9

Tabelle 4: Aktivität der AZ unter dem Einfluß verschiedener Substanzen. Beim Wert für GTP (10 μ M), NaF und Forskolin wurde nur der Basalwert abgezogen, der Wert für Isoprenalin ist nach Abzug von Basalwert und GTP (10 mM) angegeben. Die Stimulation mit Mn^{++} ergibt sich als Differenz aus der absoluten Stimulation mit Mn^{++} und dem Basalwert ohne Mg^{++} . Die Steigerung der AZ-Aktivität durch Isoprenalin war in der SNX-Gruppe im Vergleich zur SOP-Gruppe signifikant abgeschwächt.

Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß nur bei Isoprenalin eine signifikante Minderung der AZ-Aktivität gefunden wurde.

3.2.3. Der Einfluß von SNAP auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels

Nach Vorinkubation der Ventrikelstreifen mit S-Nitroso-N-Azetyl-D,L-Penizillamin (SNAP) konnte kein qualitativer und quantitativer Unterschied in der Wirkung von Isoprenalin in der Gruppe der SNX-Ratten festgestellt werden. Bei den Ventrikelstreifen der SOP-Ratten hingegen bewirkte SNAP eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve (s. Abbildung 8). Darüber hinaus senkte SNAP die absolute basale Kontraktionskraft, während die maximal mögliche Änderung der Kontraktionskraft gleich blieb.

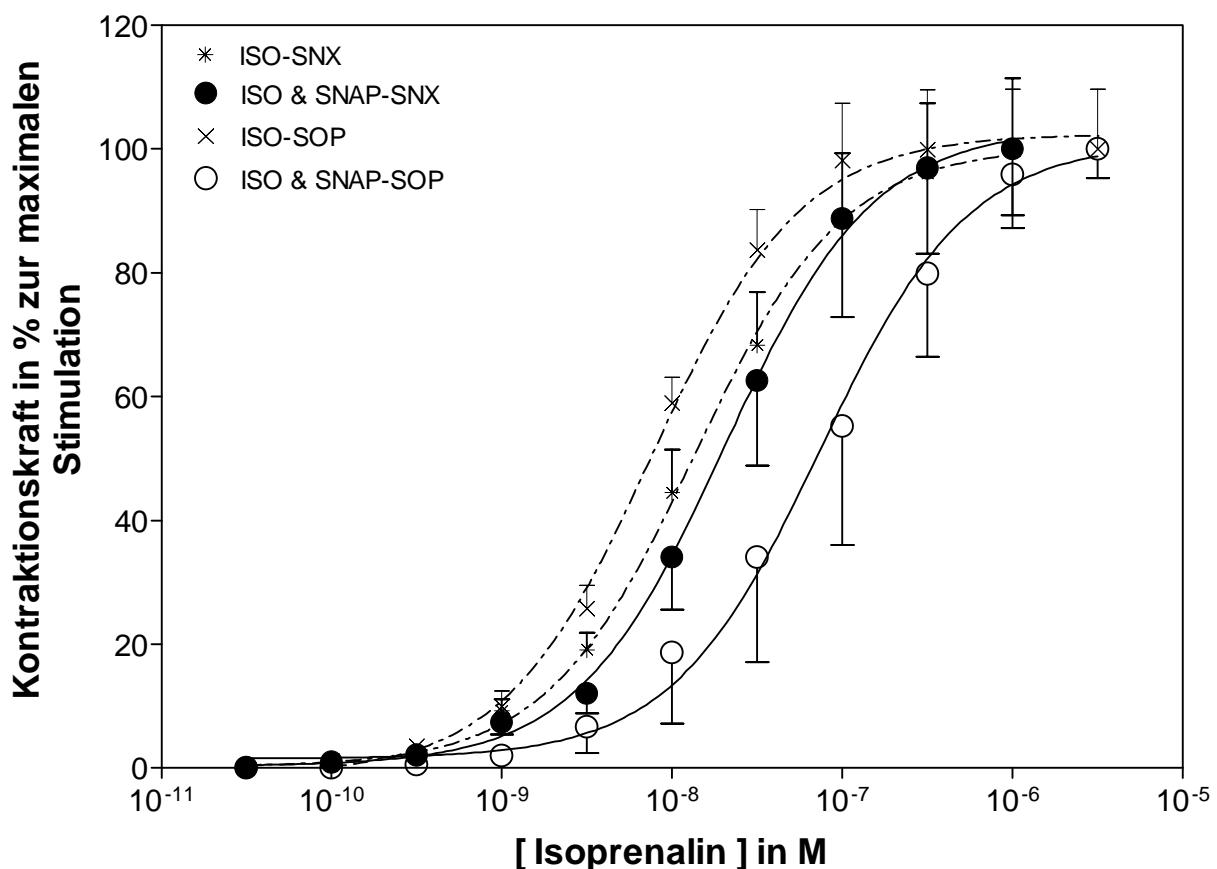


Abbildung 8: Der Einfluß von 10 μ M SNAP auf die Erhöhung der Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen durch Isoprenalin bei SNX-Ratten ($n=6$) und SOP-Ratten ($n=6$). Zum besseren Vergleich der beiden Kurven ist in dieser Abbildung die Änderung als % vom größten Maximum dargestellt. Die beide Kurven (Isoprenalin mit und ohne SNAP) überlagern sich bei den SNX-Ratten, es besteht kein signifikanter Unterschied. Die absolute

3. Ergebnisse

Kontraktion der Präparate betrug unter basalen Bedingungen $3,4 \pm 0,5$ mN (n=6, CI=2,2-4,6 mN; ISO/SNX), sowie $2,8 \pm 0,4$ mN (n=6, CI=1,8-3,8 mN; ISO+SNAP/SNX). Im Gegensatz dazu bewirkte SNAP in den Ventrikelstreifen von SOP-Ratten eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin: pD_2 (ISO/SOP)= $8,15 \pm 0,09$ (n=6, CI=7,92-8,37) und pD_2 (ISO+SNAP/SOP)= $7,06 \pm 0,31$ (n=6; CI=6,27-7,85). Die absoluten basalen Kontraktionskräfte hatten folgende Werte: $4,1 \pm 0,3$ mN (n=6, CI=3,3-4,9 mN; ISO/SOP) und $2,4 \pm 0,3$ mN (n=6, CI=1,7-3,1 mN; ISO+SNAP/SOP).

Parameter	SNX-Ratten		n	p-Wert	SOP-Ratten		n
abs. bas. Kontraktionskraft / mN	$3,4 \pm 0,5$	6		n.s.	$4,1 \pm 0,3$	6	
	$CI=2,2-4,6$				$CI=3,3-4,9$		
p-Wert ♦	n.s.				<0,01		
<i>abs. bas. Kontraktionskraft / mN mit SNAP</i>	$2,8 \pm 0,4$	6		n.s.	$2,4 \pm 0,3$	6	
	$CI=1,8-3,8$				$CI=1,7-3,1$		
p-D₂-Wert	$7,84 \pm 0,10$	6		n.s.	$8,15 \pm 0,09$	6	
	$CI=7,58-8,10$				$CI=7,92-8,37$		
p-Wert ♦	n.s.				<0,05		
<i>pD₂-Wert mit SNAP</i>	$7,61 \pm 0,13$	6		n.s.	$7,06 \pm 0,31$	6	
	$CI=7,26-7,95$				$CI=6,27-7,85$		
max. Änderung der Kontraktionskraft / mN	$3,3 \pm 0,4$	6		<0,05	$5,2 \pm 0,5$	6	
	$CI=2,3-4,3$				$CI=3,9-6,5$		
p-Wert ♦	n.s.				n.s.		
<i>max. Änd. Der Kontraktionskraft / mN mit SNAP</i>	$4,7 \pm 0,6$	6		n.s.	$4,8 \pm 0,3$	6	
	$CI=3,1-6,2$				$CI=4,0-5,6$		

Tabelle 5: Vergleich der Kenngrößen der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin (mit und ohne Vorinkubation mit SNAP) bei SNX- und SOP-Ratten. Bei den Kontrollratten (n=6) veränderte der Einfluß von SNAP die Wirkung von Isoprenalin auf die Ventrikelpräparate. Nach Vorinkubation mit dem NO-Donor SNAP verschob sich die Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin deutlich nach rechts. Außerdem ergab sich

3. Ergebnisse

eine Senkung der absoluten basalen Aktivität. Beide Effekte verschwanden bei den SNX-Ratten (n=6).

Wie Abbildung 4 zeigt, ist die Wirkung von Ca^{++} auf die Ventrikelstreifen von SNX- und SOP-Ratten gleich. SNAP wirkt negativ inotrop bei den SOP-Ratten. Diese Wirkung von SNAP geht im Verlaufe der chronischen Niereninsuffizienz verloren. Alle Daten von SNX- und SOP-Ratten sind in Tabelle 5 gegenübergestellt.

3.2.4. Der Einfluß von 8-Bromo-c-GMP auf die Kontraktionskraft

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, daß der negativ inotope Effekt von NO auf die Kontraktion des Herzmuskels bei der chronischen Niereninsuffizienz verschwindet (NO verliert seine Fähigkeit, die Wirkung von Isoprenalin zu höheren Konzentrationen zu verschieben). Ist dies ein direkter Effekt von NO oder von SNAP alleine? Oder erfordert dies die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase? Zur Untersuchung dieser Fragen wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen (s. 2.2.4.) die Wirkung von 8-Br-c-GMP (ein membrangängiges c-GMP-Analogon) auf die Isoprenalin-vermittelte Steigerung der Kontraktionskraft an Ventrikelpräparationen bestimmt.

Ob die Wirkung von 8-Br-c-GMP konzentrationsabhängig ist, wurde bei SOP-Ratten durch den Einsatz von 10 μM und 100 μM 8-Br-c-GMP ermittelt. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in der Abbildung 9 dargestellt. Wie am Verlauf der Graphen zu sehen ist, verschiebt 8-Br-c-GMP die Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin am elektrisch gereizten Ventrikelstreifen nach rechts. Diese Rechtsverschiebung war bei der höheren Konzentration größer. Daneben senkte 8-Br-c-GMP die absolute basale Kontraktionskraft bei beiden eingesetzten Konzentrationen signifikant gegenüber den Versuchen ohne 8-Br-c-GMP. Die statistischen Daten der Auswertung sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

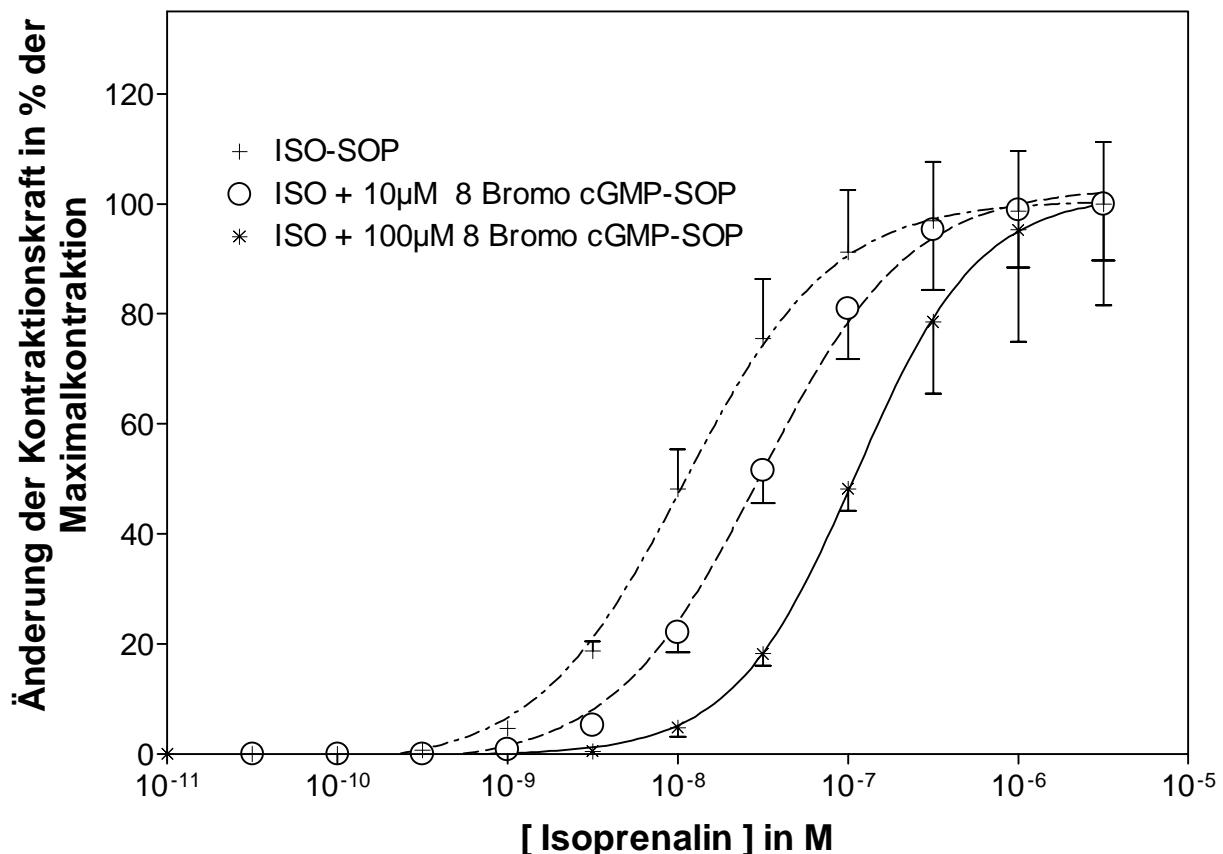


Abbildung 9: Einfluß von 10 μM (n=6) und 100 μM (n=5) 8-Br-c-GMP auf die Erhöhung der Isoprenalin-vermittelten Kontraktionskraft von elektrisch gereizten Ventrikelstreifen bei SOP-Ratten. Auf der Y-Achse ist die Änderung der Kontraktionskraft in % der maximalen Kontraktion angegeben. 10 μM und 100 μM 8-Br-c-GMP verschieben die Wirkung von Isoprenalin signifikant nach rechts: $pD_2(\text{ISO/SOP})=7,94 \pm 0,06$ (n=6, CI=7,79-8,08), $pD_2(\text{ISO}+10\mu\text{M } 8\text{BrcGMP})=7,52 \pm 0,10$ (n=6, CI=7,28-7,77) und $pD_2(\text{ISO}+100\mu\text{M } 8\text{BrcGMP})=7,09 \pm 0,14$ (n=5, CI=6,71-7,48).

Tabelle 6 zeigt alle Kenngrößen der in Abbildung 9 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurven:

Parameter	SOP-Ratten (10 μM 8BrcGMP)		p-Wert	SOP-Ratten (100 μM 8BrcGMP)	
	n			n	
abs. bas. Kontraktionskraft / mN	2,5±0,3	6	n.s.	2,8±0,28	5
	CI=1,8-3,2			CI=2,0-3,6	
p-Wert	&	<0,01			<0,05
abs. bas. Kontraktionskraft / mN o. BrcGMP				3,9±0,2	6
				CI=3,3-4,5	

3. Ergebnisse

pD₂-Wert	7,52±0,10 CI=7,28-7,77	6	<0,05	7,09±0,14 CI=6,71-7,48	5
p-Wert ↴	<0,01			<0,05	
<i>pD₂-Wert</i>			7,94±0,06		6
<i>o. BrGMP</i>			CI=7,79-8,08		
max. Änderung der Kontraktionskraft / mN	6,5±0,7 CI=4,7-8,3	6	n.s.	5,4±1,1 CI=2,3-8,5	5
p-Wert ↴	n.s.			n.s.	
<i>max. Änd. der Kontraktionskraft / mN o. BrGMP</i>			5,6±0,6 CI=4,0-7,2		6

Tabelle 6: Kenngrößen der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin am Ventrikelstreifen der SOP-Ratten ohne und mit 8-Br-c-GMP (10 µM, 100 µM). Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß der Zusatz von 8-Br-c-GMP zu einer Rechtsverschiebung der Isoprenalin-vermittelten Erhöhung der Kontraktionskraft führt. Beide 8-Br-c-GMP-Konzentrationen senkten signifikant die absolute Kontraktionskraft unter basalen Bedingungen.

Im folgenden wurde die Wirkung des c-GMP-Analogons auf die Isoprenalin-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft der Ventrikelstreifen von SNX-Ratten untersucht. Diese Versuche wurden nur mit der niedrigeren Konzentration (10 µM) 8-Br-c-GMP durchgeführt.

Aus sechs Experimenten mit Präparaten von SNX-Ratten und sechs von SOP-Ratten ergaben sich die Konzentrations-Wirkungskurven (s. Abbildung 10) und deren Kurvenparameter. Zur Beurteilung der Wirkung von 8-Br-c-GMP (10 µM) wurde jeweils eine Kontrollkurve mit Isoprenalin in Abwesenheit des zyklischen Nukleotids aufgenommen.

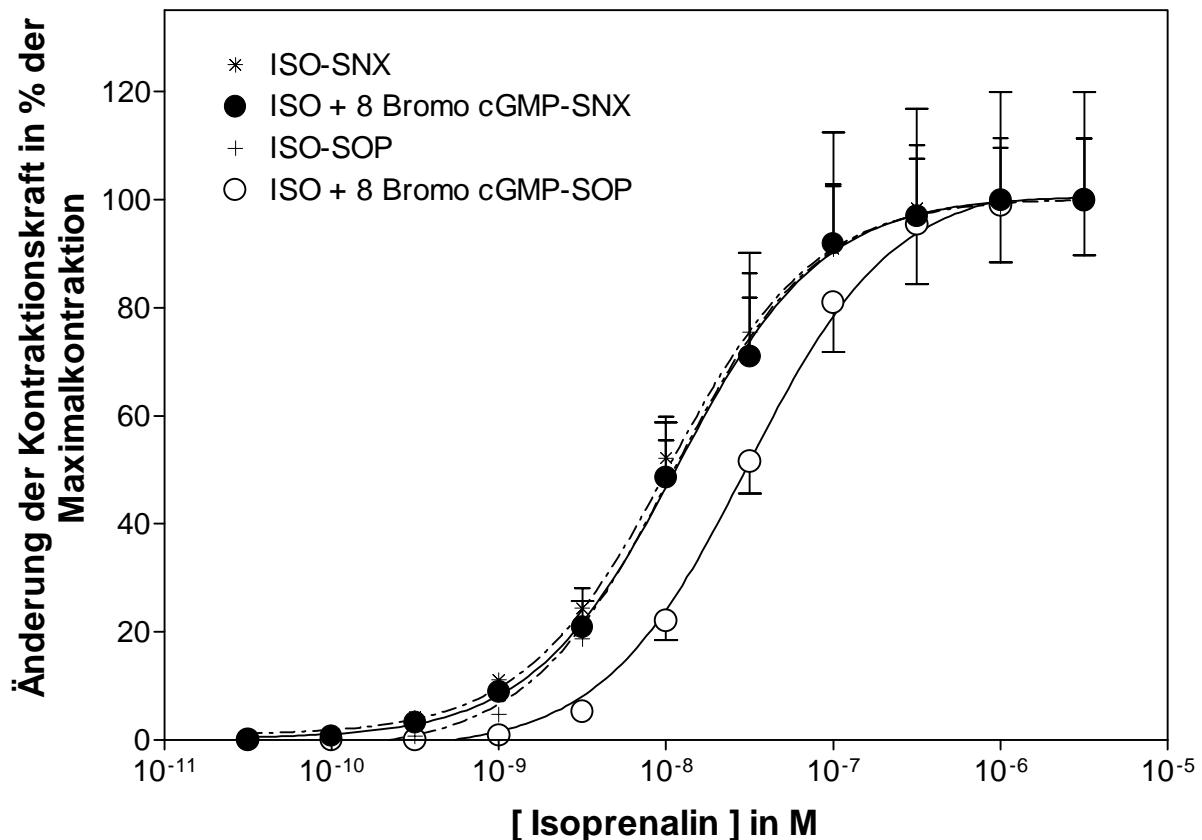


Abbildung 10: Einfluß von 8-Br-c-GMP ($10\mu\text{M}$) auf die Isoprenalin-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft von elektrisch gereizten Ventrikelstreifen bei SNX-Ratten ($n=6$) und SOP-Ratten ($n=6$). Auf der Y-Achse ist die Änderung der Kontraktionskraft in % der maximalen Kontraktion angegeben. Die beiden Kurven der SNX-Ratten überlagern sich. Es gibt keine Unterschiede zwischen den pD_2 -Werten der beiden Kurven. Unter basalen Bedingungen (ohne Isoprenalin und 8-Br-c-GMP) entwickelten die Ventrikelstreifen eine Kontraktionskraft von $3,9 \pm 0,5 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=2,7-5,1 \text{ mN}$). 8-Br-c-GMP bedingte keine Veränderung dieser Reaktion: $3,7 \pm 0,5 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=2,4-5,0 \text{ mN}$). Bei gleichbleibendem basalem Kontraktionsvermögen veränderte 8-Br-c-GMP die maximal mögliche Änderung der Kontraktionskraft bei $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin nicht. Diese betrug ohne Vorinkubation mit 8-Br-c-GMP $3,5 \pm 0,4 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=2,5-4,6 \text{ mN}$) und mit Vorinkubation $3,7 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=1,8-5,6 \text{ mN}$). Bei den SOP-Ratten hingegen kam es durch 8-Br-c-GMP zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin: $\text{pD}_2(\text{ISO/SOP})=7,94 \pm 0,06$ ($n=6$, $\text{CI}=7,79-8,08$), $\text{pD}_2(\text{ISO+8BrcGMP})=7,52 \pm 0,10$ ($n=6$, $\text{CI}=7,28-7,77$). Das zyklische Nukleotid senkte signifikant die absolute basale Kontraktionskraft: Basal ($\text{ISO/SOP})=3,9 \pm 0,2 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=3,3-4,5 \text{ mN}$), Basal ($\text{ISO+8BrcGMP/SOP})=2,5 \pm 0,3 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=1,8-3,2 \text{ mN}$). Demgegenüber blieb die maximale Änderung der Kontraktionskraft (bei $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin) gleich: $5,6 \pm 0,6 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=4,0-7,2 \text{ mN}$) ohne 8-Br-c-GMP und $6,5 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n=6$, $\text{CI}=4,7-8,3 \text{ mN}$) mit 8-Br-c-GMP.

3. Ergebnisse

Tabelle 7 zeigt zusammengefaßt alle Daten der Konzentrations-Wirkungskurven:

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
abs. bas. Kontraktionskraft / mN	3,9±0,5 CI=2,7-5,1	6	n.s.	3,9±0,2 CI=3,3-4,5	6
p-Wert ↴	n.s.			<0,01	
<i>abs. bas. Kontraktionskraft / mN mit BrcGMP</i>	3,7±0,5 CI=2,4-5,0	6	n.s.	2,5±0,3 CI=1,8-3,2	6
pD₂-Wert	7,99±0,15 CI=7,60-8,37	6	n.s.	7,94±0,10 CI=7,70-8,17	6
p-Wert ↴	n.s.			<0,01	
<i>pD₂-Wert mit BrcGMP</i>	7,97±0,14 CI=7,60-8,33	6	n.s.	7,52±0,10 CI=7,28-7,77	6
max. Änderung der Kontraktionskraft / mN	3,5±0,4 CI=2,5-4,6	6	<0,05	5,6±0,6 CI=4,0-7,2	6
p-Wert ↴	n.s.			n.s.	
<i>max. Änd. der Kontraktionskraft / mN mit BrcGMP</i>	3,7±0,7 CI=1,8-5,6	6	<0,05	6,5±0,7 CI=4,7-8,3	6

Tabelle 7: Kenndaten der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin mit bzw. ohne Vorinkubation mit 8-Br-c-GMP (i.d. Tabelle als BrcGMP abgekürzt) bei SNX- und SOP-Ratten. Die Daten zeigen, daß die Wirkung von 8-Br-c-GMP (Rechtsverschiebung) bei den SNX-Ratten verloren geht.

Abbildung 4 zeigt, daß die Wirkung von Ca⁺⁺ auf die Ventrikelstreifen in beiden untersuchten Gruppen gleich war. Zwischen den SNX- und SOP-Ratten besteht, genauso, wie bei den Versuchen mit SNAP, ein deutlicher Unterschied in der Wirkung von 8-Br-c-GMP. Das c-GMP-Analogon hatte bei den SNX-Ratten keinen Einfluß auf die Lage der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin, beide Kurven (mit und ohne 8-Br-c-GMP) decken sich. Bei den SOP-Ratten bewirkt das zyklische Nukleotid eine signifikante Rechtsverschiebung der Isoprenalin-vermittelten

Konzentrations-Wirkungskurve. Gleichzeitig wurde dabei eine Senkung der absoluten basalen Kontraktionskraft bei diesen Tieren festgestellt.

3.2.5. Der Einfluß von M-Cholinozeptoren auf die Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen

Ob M-Ch einer Fehlregulation bei der chronischen Niereninsuffizienz unterliegen und damit zur verminderten Wirkung von Isoprenalin am isolierten Ventrikelstreifen beitragen, sollen die nachfolgenden Untersuchungen klarstellen. Dazu wurde der Einfluß von Carbachol auf vorstimulierte Ventrikelstreifen bestimmt. Die Abbildung 11 zeigt den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve:

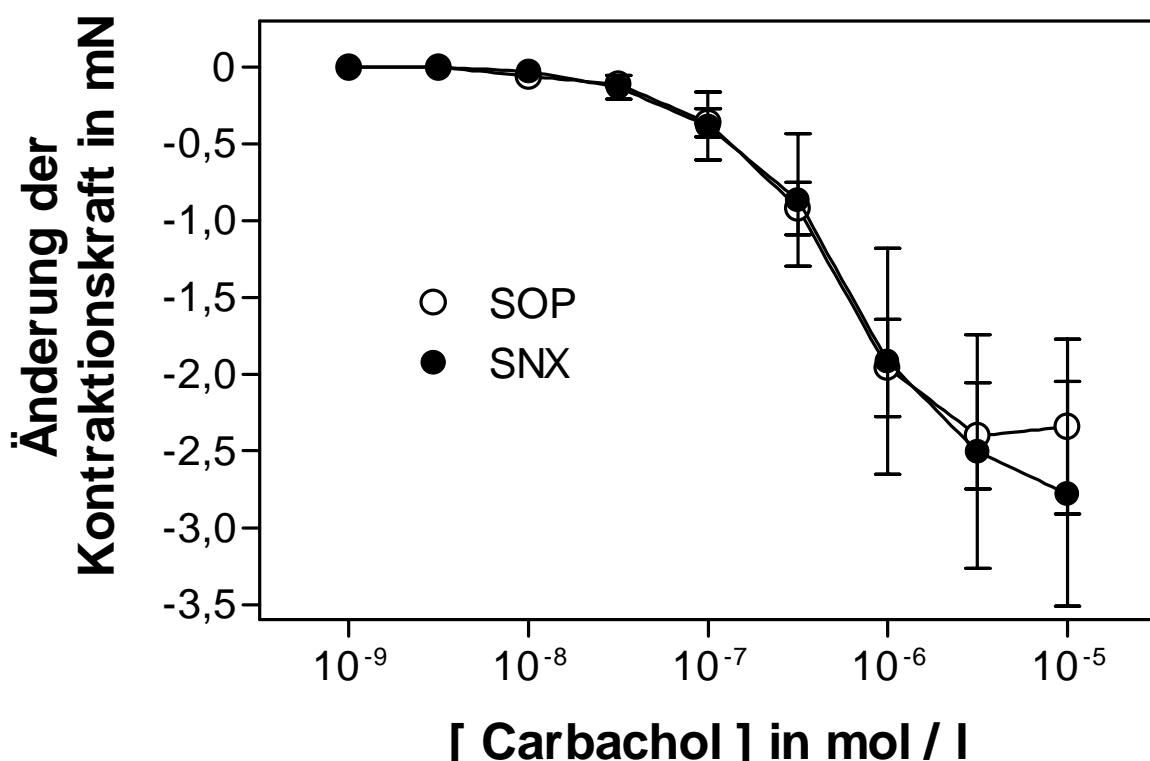


Abbildung 11: Hemmung der positiv inotropen Wirkung von 3 μM Forskolin durch Carbachol in Ventrikelstreifen von SNX- und SOP-Ratten. Der Verlauf der Kurven unterscheidet sich nicht voneinander. Die Basalwerte betrugen in der Gruppe der SNX-Ratten $5,7 \pm 0,7$ mN ($n=5$, CI=3,8-7,6 mN), in der Gruppe der SOP-Ratten $6,5 \pm 0,7$ mN ($n=10$, CI=4,9-8,1 mN).

Die Durchführung dieser Experimente folgt der Beschreibung unter 2.2.5. Dabei wurden fünf Ventrikelstreifen von SNX-Ratten und zehn Ventrikelstreifen von SOP-Ratten präpariert.

3. Ergebnisse

Submaximale Konzentrationen an Forskolin ($3 \mu\text{M}$) erhöhten die Kontraktionskraft elektrisch vorgereizter Ventrikelstreifen unter isometrischen Bedingungen: bei SNX-Ratten auf $5,7 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n=5$, CI=3,8-7,6 mN) und bei SOP-Ratten auf $6,5 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n=10$, CI=4,9-8,1 mN). Die kumulative Erhöhung der Konzentration von Carbachol erniedrigte sukzessive die durch Forskolin herbeigeführte Verstärkung der Kontraktionskraft. Die maximale Senkung wurde durch $10 \mu\text{M}$ Carbachol erreicht: bei den SNX-Ratten um $2,8 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n=5$, CI=0,7-4,8 mN) und bei SOP-Ratten um $2,4 \pm 0,4 \text{ mN}$ ($n=10$, CI=1,0-3,6 mN). Der pD_2 -Wert der Konzentrations-Wirkungskurve lag in der SNX-Gruppe bei $6,17 \pm 0,09$ ($n=5$, CI=5,92-6,42) und bei der SOP-Gruppe bei $6,24 \pm 0,06$ ($n=10$, CI=6,10-6,38). Auch die Wirkung von Ca^{++} auf die Ventrikelstreifen war unverändert. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve ähnelt der in Abbildung 4.

Diese Daten zeigen deutlich, daß die Wirkung von Carbachol an vorstimulierten Ventrikelstreifen bei den SNX-Ratten im Vergleich zu den SOP-Ratten unverändert ist.

3.2.6. Zelluläre Signaltransduktion nach M-cholinriger Stimulation

β -AR und M-Ch beeinflussen sich gegenseitig. So konnte u.a. gezeigt werden, daß eine andauernde Stimulation von β -AR infolge erhöhter Katecholaminkonzentrationen zu einer Überexpression von $G_{i\alpha}$ führen kann [160]. Eine Folge davon ist eine Hemmung der AZ. Abschnitt 3.2.5. zeigte keine Veränderung in der physiologischen Reaktion nach M-Ch-Stimulation. Ob dies auch auf die Signaltransduktion zutrifft, sollen biochemische Untersuchungen zeigen.

M-Ch lassen sich mit Radioligand-Bindungsstudien analysieren [zur Durchführung s. 2.2.6. a)]. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den unter 2.2.2.1. a) aufgeführten Formeln. Auf die Zugabe von radioaktiv markiertem $^3\text{H-NMS}$ reagierten die Rohmembranfraktionen mit einer monophasischen Sättigungsbindung (F-Test). Die graphische Darstellung jeweils einer repräsentativen Sättigungsbindung zeigt die Abbildung 12:

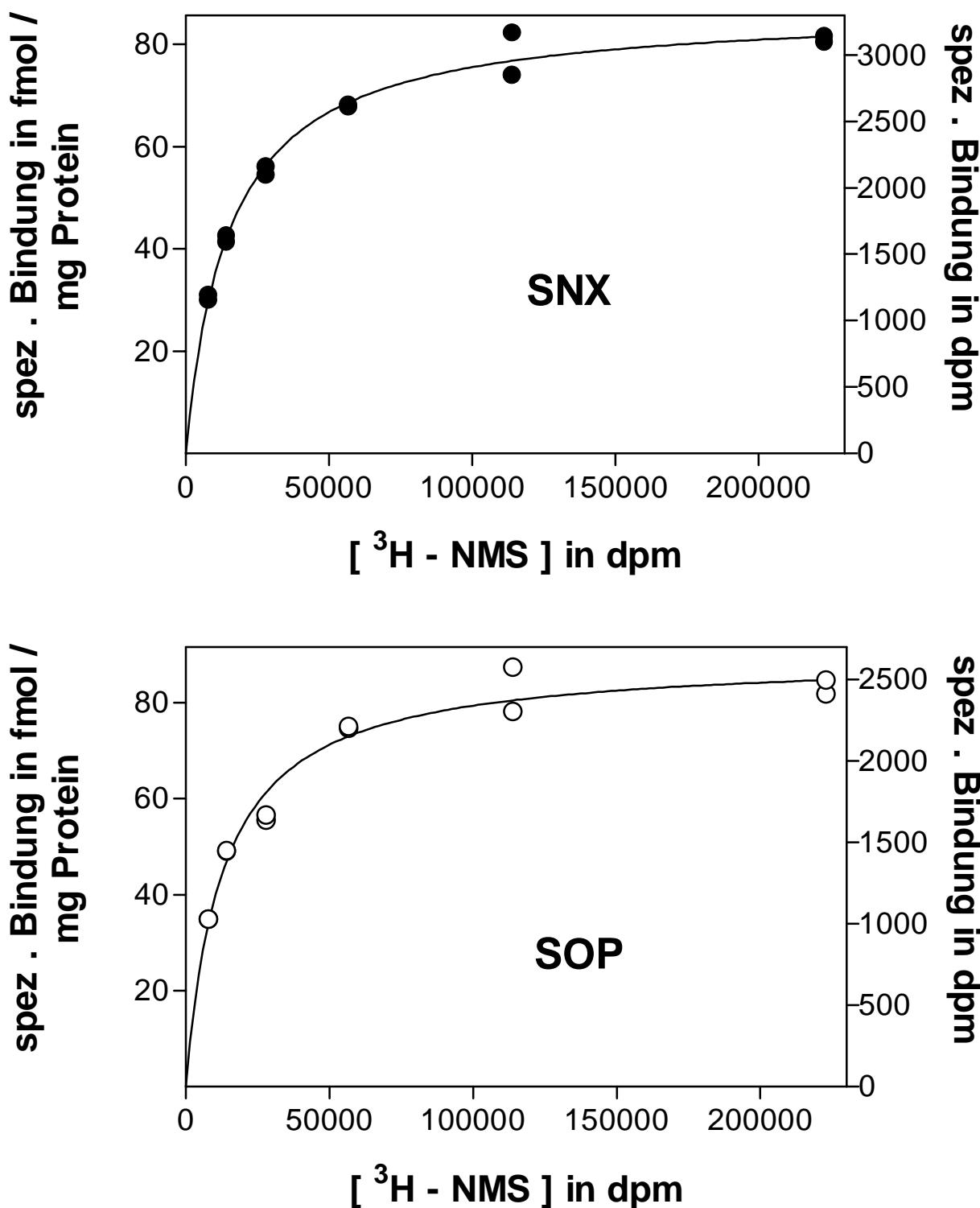


Abbildung 12: Sättigungsbindungskurve von $[^3\text{H}]$ -NMS an Rohmembranfraktionen einer SNX-(0,21 mg Prot./Ansatz) und SOP-Ratte (0,16 mg Prot./Ansatz). Bei den SNX-Ratten lag die unspezifische Bindung (bei K_D) im Durchschnitt bei $22,2 \pm 4,4\%$ ($n=11$, CI=12,5-31,9%) der totalen Bindung und bei den SOP-Ratten bei $19,7 \pm 4,5\%$ ($n=12$, CI=9,8-29,6%). Weder in B_{max} noch in K_D konnten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beziffert werden.

3. Ergebnisse

Die errechneten Daten für die maximale Anzahl freier Bindungsstellen (B_{max}) und die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor sind in der Tabelle 8 aufgelistet:

Meßgröße	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
B_{max} / fmol/mg Prot.	$65,9 \pm 7,0$ CI=50,3-81,5	11	n.s.	$62,6 \pm 8,9$ CI=42,9-82,2	12
$K_D(^3H\text{-NMS})$ / nM	$0,70 \pm 0,15$ CI=0,37-1,03	11	n.s.	$0,64 \pm 0,10$ CI=0,43-0,86	12
UB in % TB bei K_D	$22,2 \pm 4,4$ CI=12,5-31,9	11	n.s.	$19,7 \pm 4,5$ 9,8-29,6	12
UB in % TB bei B_{max}	$59,7 \pm 5,1$ CI=48,2-71,1	11	n.s.	$60,9 \pm 5,0$ CI=49,8-72,0	12

Tabelle 8: Daten aus den Radioligand-Bindungsstudien am M-Ch mit $^3H\text{-NMS}$. Am M-Ch konnten keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen SNX (n=11) und SOP (n=12) aufgedeckt werden. UB bezeichnet in der Tabelle die unspezifische Bindung und TB die totale Bindung.

Neben den Eigenschaften des membranständigen Rezeptors wurde ergänzend der Einfluß von Carbachol auf die Aktivität der AZ getestet. Bei diesen Experimenten [zur Durchführung s. Abschnitt 2.2.6. b)] erfolgte die Stimulation der AZ mit Forskolin (1 μM) unter Anwesenheit von GTP (10 μM). Es sollte die maximale Wirkung von Carbachol bestimmt werden. Dazu wurde eine Konzentration von 0,1 mM getestet. Die Mittelwerte der bestimmten Aktivitäten setzten sich aus sechs Versuchen mit Herzmembranpräparationen von SNX-Ratten (n=6) und sieben Präparationen von SOP-Ratten (n=7) zusammen.

Die SNX hatte bei den vorliegenden Experimenten keinen Einfluß auf Funktionalität des M-Ch am Herzen. Dies bezieht sich sowohl auf die physiologische Funktion (s. 3.2.5.) als auch auf die zelluläre Signaltransduktion.

Tabelle 9 zeigt die Beeinflussung der Aktivität der AZ durch Carbachol nach Vorstimulation mit Forskolin (1 μM) und GTP (10 μM). Dargestellt sind die entsprechenden Daten nach Abzug der Basalwerte:

3. Ergebnisse

Substanz	SNX-Ratten AZ-Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min	n	p-Wert	SOP-Ratten AZ-Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min	n
Basalwert	5,2±0,8 CI=3,6-6,9	6	n.s.	6,4±1,8 CI=2,0-10,9	7
GTP (10 µM)	9,9±2,6 CI=3,2-16,5	6	n.s.	8,4±1,2 CI=5,4-11,5	7
Forskol. (1µM) +GTP (10 µM)	102,9±8,8 CI=80,3-125,5	6	n.s.	112,0±11,7 CI=83,3-140,6	7
Carbachol (0,1 mM)	69,7±4,5 CI=58,1-81,3	6	n.s.	85,2±8,3 CI=64,8-105,6	7

Tabelle 9: Einfluß von Carbachol auf die Aktivität der Forskolin-stimulierten AZ. Die Werte stellen jeweils die Aktivitäten des Enzyms nach Abzug der basalen Aktivität und der Aktivität von GTP (10 µM) dar. Carbachol (0,1 mM) war in der Lage die Aktivität des mit Forskolin+GTP vorstimulierten Enzyms signifikant zu erniedrigen. Zwischen beiden Gruppen bestand kein Unterschied in der Wirkung des M-Ch-Agonisten Carbachol. Die Menge an gebildetem c-AMP pro min und mg Protein verringerte sich bei den SNX-Ratten durch 0,1 mM Carbachol auf 79,2% und bei SOP-Ratten auf 81,2% der nach Vorstimulation mit Forskolin und GTP gebildeten Menge.

3.2.7. Zusammenfassung

Die Analyse der Funktion von β-AR und M-Ch am Herzen von SNX-Ratten ergab eine abgeschwächte Änderung der Kontraktionskraft nach Stimulation von β-AR durch Isoprenalin. SNAP und 8-Br-c-GMP verloren nach SNX ihre Fähigkeit die Wirkung von Isoprenalin zu hemmen. Die eingeschränkte Wirkung von Isoprenalin ließ sich auch biochemisch nachweisen. Unter Isoprenalin verminderte sich die Bildung von c-AMP im Vergleich zu SOP-Ratten. Dies ist ein selektiver Defekt am β-AR, da die Funktion von G_s- und G_i-Protein als auch der AZ von der SNX unbeeinflußt blieben.

Bei der M-cholinergen Signaltransduktion konnten keine Veränderungen gefunden werden. Die Hemmung der Kontraktion von Ventrikelstreifen, der Einfluß auf die Aktivität der AZ und die Eigenschaften des Rezeptors waren in beiden untersuchten Gruppen gleich. M-Ch scheinen daher nicht an der verminderten Wirkung von Isoprenalin am Herzen von SNX-Ratten beteiligt zu sein.

3.3. Die Rolle von Endothelinrezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren in der Urämie

$G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (ET-R und α_1 -AR) vermitteln neben den bisher untersuchten Rezeptoren ebenfalls eine positiv inotrope Wirkung. Weiterhin führt die Stimulation dieses Rezeptorsystems zu mitogenen Prozessen, was auf die Stimulation der PKC zurückzuführen ist [161, 162, 163, 164, 165, 166]. Damit könnten den an $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren neben der Modulation der Herzarbeit auch eine potentielle Rolle bei der Ausbildung der Herzhypertrophie in der chronischen Urämie zukommen.

3.3.1. Die Wirkung von Noradrenalin am Herzen

Die Plasmakonzentration von NA war bei SNX-Ratten im Vergleich zu den SOP-Ratten deutlich erhöht. Gleichzeitig war die β -adrenerge Wirkung abgeschwächt. Ob es unter diesen Voraussetzungen zu einer Veränderung der α -AR-vermittelten Wirkung von NA am Herzen kommt, sollten nachfolgende Untersuchungen zeigen.

3.3.1.1. Die positiv inotrope Wirkung von Noradrenalin am Ventrikelstreifen

Die physiologische Wirkung von NA wurde am isolierten, elektrisch gereizten Ventrikelstreifen getestet (siehe 2.3.1.1.).

NA bewirkte eine Zunahme der Kontraktionskraft. Die Zunahme ist auf eine Stimulation von α_1 -AR zurückzuführen, da die Wirkung an β -AR durch Zusatz von Propranolol ($0,1 \mu M$) unterbunden wurde. Kokain ($30 \mu M$) verhinderte eine Abschwächung der Wirkung durch Hemmung der Wiederaufnahme des Transmitters aus dem synaptischen Spalt.

Eine Erhöhung der Konzentration von NA bewirkte einen langsamen Anstieg der Kontraktionskraft am Ventrikel. Das Maximum der Kontraktion war nach einigen Minuten erreicht. Die Konzentrations-Wirkungskurve von NA unterschied sich nicht signifikant zwischen den SNX- und SOP-Ratten. Bei der abschließend erstellten Konzentrations-Wirkungskurve von Ca^{++} an jeweils fünf stichprobenartig ausgewählten Herzmuskelpräparaten war keine Änderung der Kontraktionseigenschaften zu sehen (s. Tabelle 10).

Die Konzentrations-Wirkungskurve aus den Mittelwerten aller Einzelexperimente ist in der Abbildung 13 dargestellt:

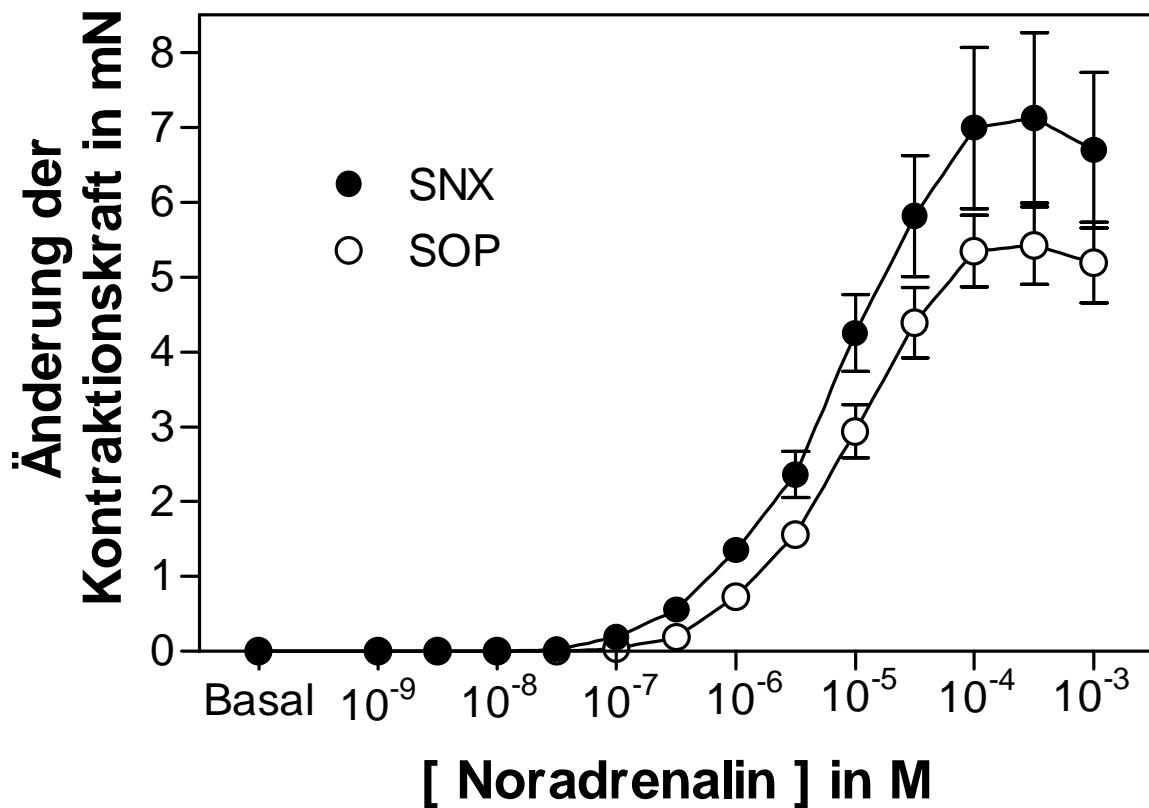


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von NA am isolierten, elektrisch gereizten Ventrikelstreifen von SNX- und SOP-Ratten. Das Organbad enthielt Propranolol ($0,1 \mu\text{M}$) und Kokain ($30 \mu\text{M}$). Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft nach Stimulation mit dem Agonisten NA bei SNX- ($n=6$) und SOP-Ratten ($n=9$). Die Basalwerte als absolute Kontraktion betrugen bei der SNX-Gruppe im Mittelwert $4,0 \pm 0,8 \text{ mN}$ ($n=6$, CI=1,5-6,1 mN). SOP-Ratten hatten eine mittlere basale Kontraktionskraft von $1,8 \pm 0,2 \text{ mN}$ ($n=9$, CI=1,3-2,2 mN). Beide Konzentrations-Wirkungskurven unterschieden sich weder in den pD_2 -Werten noch in den maximal möglichen Änderungen der Kontraktionskraft.

Es ergaben sich keine Unterschiede in der Wirkung von Ca^{++} auf die Kontraktionskraft der Ventrikelstreifen in beiden untersuchten Gruppen. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve gleicht der in Abbildung 4 gezeigten.

Die Eckdaten der zusammengefaßten Konzentrations-Wirkungskurven am Herzen sind in der Tabelle 10 aufgelistet:

3. Ergebnisse

Meßgrößen	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
Basalwert	4,0±0,8 CI=1,5-6,1	6	0,01	1,8±0,2 CI=1,3-2,2	9
pD ₂ -Wert	5,27±0,08 CI=5,06-5,48	6	n.s.	5,10±0,08 CI=4,91-5,29	9
max. Änderung (mN)	7,1±1,1 CI=4,2-10,0	6	n.s.	5,4±0,5 CI=4,2-6,6	9
Ca ⁺⁺ (7,92 mM) / mN	7,6±1,1 CI=4,6-10,7	5	n.s.	5,2±0,9 CI=2,6-7,8	5

Tabelle 10: Kenndaten zur Konzentrations-Wirkungskurve von NA an Ventrikelstreifen von SNX- und SOP-Ratten. Ebenfalls aufgeführt sind die maximalen Änderungen der Kontraktionskräfte, die Ca⁺⁺ in der angegebenen Konzentration verursachte.

3.3.1.2. Biochemische Untersuchungen am kardialen α_1 -Adrenozeptor und an der nachfolgenden Signaltransduktion

Um festzustellen, ob Veränderungen in der Signaltransduktion nach Rezeptorstimulation vorliegen, erfolgte die Bestimmung der α_1 -AR, deren Affinität zum Liganden sowie die Aktivität der PLC.

Die Bestimmung der Anzahl der α_1 -AR in Rohmembranfraktionen erfolgte durch Radioligand-Bindungsstudien [s. 2.3.1.2. a)]. Als markierter Ligand wurde [³H]-Prazosin eingesetzt. Phentolamin (10 μ M) diente bei diesen Versuchen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Zwölf Versuche mit SNX-Ratten und neun mit SOP-Ratten bildeten die Grundlage für die Ermittlung der Mittelwerte für B_{max} und K_D .

Bei steigender Konzentration von radioaktiv markiertem Liganden trat eine Sättigung der freien Bindungsstellen auf. Die einzelnen Meßwerte ließen sich am besten mit der Gleichung für monophasisches Sättigungsverhalten beschreiben (F-Test). Zur Umwandlung der durch Computeriteration erhaltenen Parameter dienten die unter 2.2.2.1. a) beschriebenen Gleichungen. Die statistische Auswertung der Einzelversuche lässt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen erkennen.

Typische Bindungskurven sind in der nachfolgenden Abbildung ersichtlich:

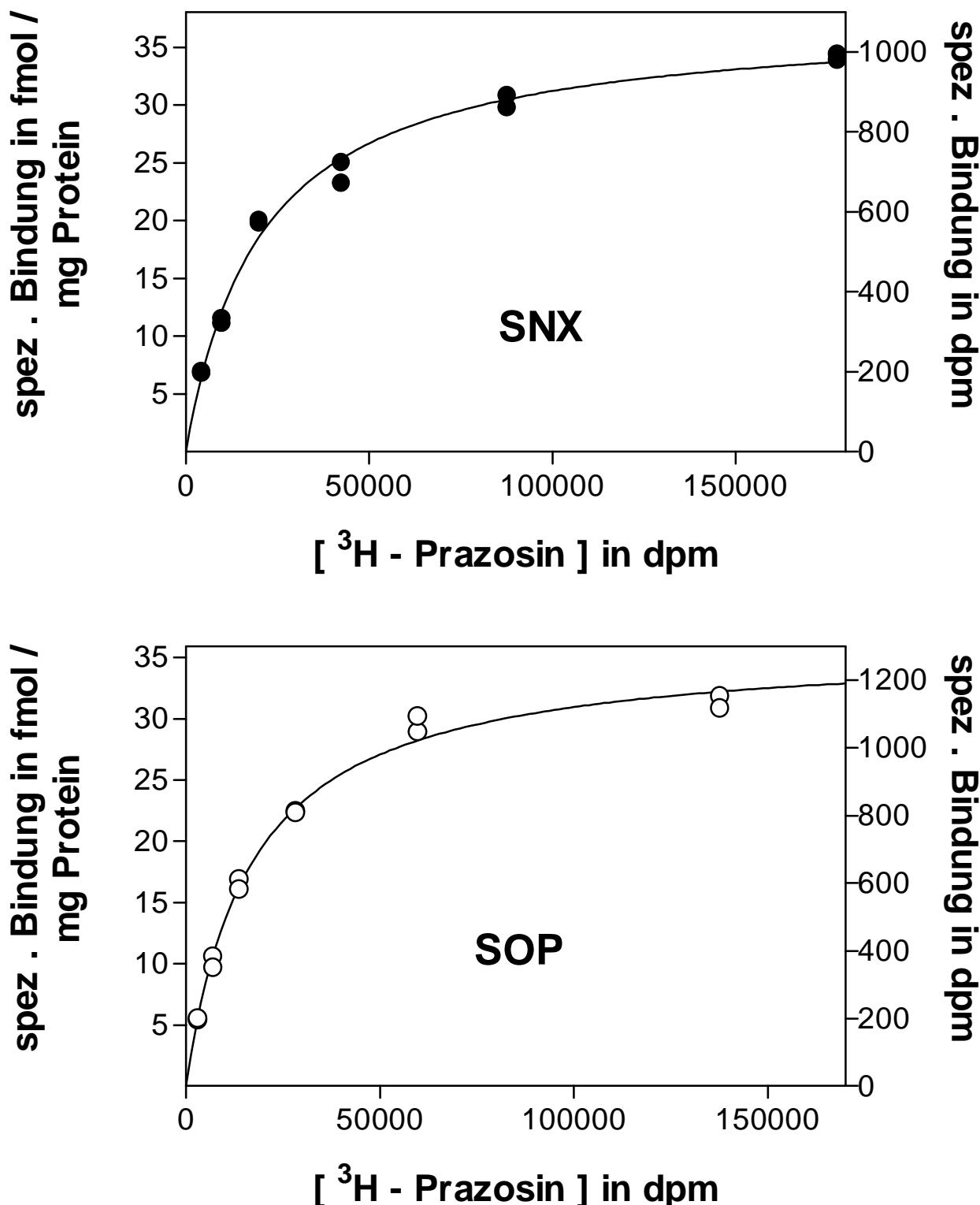


Abbildung 14: Repräsentative Sättigungsbindungskurven von [³H]-Prazosin an Rohmembranfraktionen des Herzens von SNX- und SOP-Ratten. Bei SNX-Ratten konnten keine Unterschiede im Vergleich zu SOP-Ratten in den Bindungseigenschaften des Rezeptors gegenüber [³H]-Prazosin festgestellt werden. Sowohl die Anzahl der maximalen freien Bindungsstellen als auch die Dissoziationskonstante des Liganden-Rezeptor-

3. Ergebnisse

Komplexes waren unverändert. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der totalen Bindung betrug bei den SNX-Ratten im Mittel $38,0 \pm 3,2\%$ ($n=12$, CI=31,1-45,0) und bei den SOP-Ratten $42,5 \pm 4,0\%$ ($n=9$, CI=33,4-51,5).

Meßgröße	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
B_{max} / fmol/mg Prot.	$24,6 \pm 2,8$ CI=18,4-30,7	12	n.s.	$20,8 \pm 2,6$ CI=14,9-26,7	9
$K_D(^3H\text{-Prazo-}sin)$ / pM	$159,7 \pm 16,2$ CI=124,0-195,3	12	n.s.	$176,3 \pm 30,2$ CI=106,6-246,0	9
UB als % TB bei K_D	$38,0 \pm 3,2$ CI=31,1-45,0	12	n.s.	$42,5 \pm 4,0$ CI=33,4-51,5	9
UB als % TB bei B_{max}	$62,5 \pm 4,1$ CI=53,5-71,5	12		$66,0 \pm 5,1$ CI=54,3-77,8	9

Tabelle 11: Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien an Rohmembranfraktionen des Herzens von SNX- und SOP-Ratten mit $[^3H]\text{-Prazosin}$. Die Stichprobengröße beläuft sich bei den SNX-Ratten auf $n=12$, bei den SOP-Ratten auf $n=9$. Die Rezeptorcharakteristik war unverändert nach der SNX. In der Tabelle verwendete Abkürzungen: UB-unspezifische Bindung; TB-totale Bindung.

Der Untersuchung der Eigenschaften des kardialen α -AR schloß sich die Quantifizierung der Aktivität eines Enzyms an, welches durch die Stimulation des Rezeptors aktiviert wird. Dieses Enzym, die PLC, spaltet an Fette gebundenes IP ab, welches im weiteren als *second messenger* fungiert. Durch radioaktive Markierung ist diese Verbindung in der Zelle analytisch meßbar. Die Durchführung der Bestimmung der Akkumulation von IP nach Rezeptorstimulation wurde unter Abschnitt 2.3.1.2. b) beschrieben. Konzentrationsabhängig führte die Zugabe von NA, bei Anwesenheit von Kokain und Propranolol, zu einer schwachen Bildung von IP in Herzslices. Untersucht wurden sieben SNX-Ratten und sieben SOP-Ratten. Die Einzelexperimente sind in Abbildung 15 zusammengefaßt:

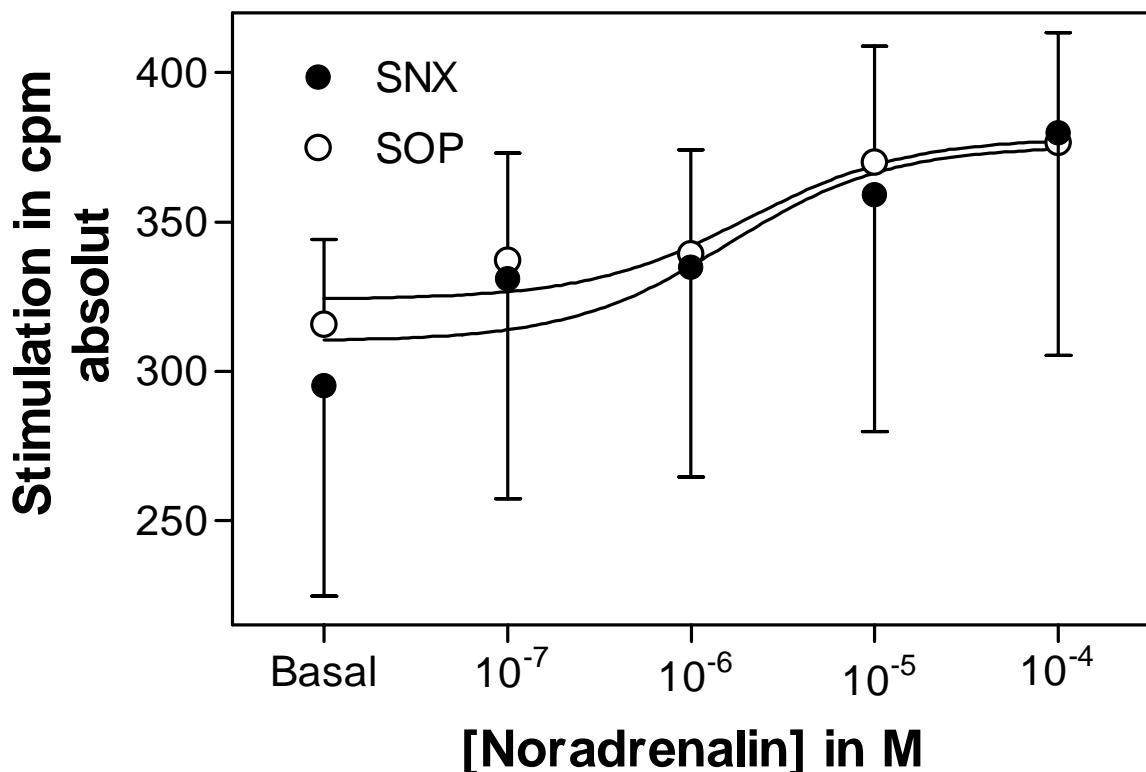


Abbildung 15: Akkumulation der IP in Herzslices von SNX- (n=7) und SOP-Ratten (n=7) nach Stimulation mit NA bezogen auf 1000 mg *slices*. Bei keiner NA-Konzentration unterschied sich die Bildung von IP signifikant. Die absoluten Basalwerte betrugen 295±71 cpm/1000 mg *slices* (n=7, CI=122-468 cpm/1000 mg *slices*) für SNX-Ratten und 316±28 cpm/1000 mg *slices* (n=7, CI=246-385 cpm/1000 mg *slices*) für SOP-Ratten. Ebenfalls gleich waren die pD₂-Werte.

In Tabelle 12 sind alle ermittelten Parameter der NA-induzierten Bildung von IP aufgeführt.

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
Basalwert in cpm/1000 mg <i>slices</i>	295±71 CI=122-468	7	n.s.	316±28 CI=246-385	7
pEC ₅₀ -Wert	5,92±0,73 CI=4,14-7,7	7	n.s.	5,83±0,14 CI=5,5-6,16	7
Max. Stim. in cpm/1000 mg <i>slices</i>	380±74 CI=198-562	7	n.s.	377±37 CI=287-467	7

Tabelle 12: In der Tabelle sind die Kenndaten der NA-induzierten Bildung von IP dargestellt. Beide untersuchten Gruppen stimmen in allen Parametern überein.

3.3.2 Die Wirkung von NA an der Aorta thoracica

3.3.2.1. Die Wirkung von Noradrenalin auf die glatte Muskulatur der Aorta thoracica

In diesen Experimenten wurden die vasokonstriktorischen Eigenschaften von NA an spiralförmig geschnittenen Streifen der Aorta thoracica untersucht. In Kapitel 2.3.2.1.a) sind die einzelnen Schritte der Präparation beschrieben. Die Durchführung der Experimente vollzog sich nach der Beschreibung in Kapitel 2.3.2.1. b). NA entfaltete seine Wirkung selektiv an α_1 -AR, da das Organbad 0,1 μM Propranolol enthielt. 30 μM Kokain garantierten eine konstante Wirkung durch die Hemmung der Wiederaufnahme des Neurotransmitters in die Zelle.

Abbildung 16 zeigt die Abhängigkeit der Änderung der Kontraktionskraft von der NA-Konzentration:

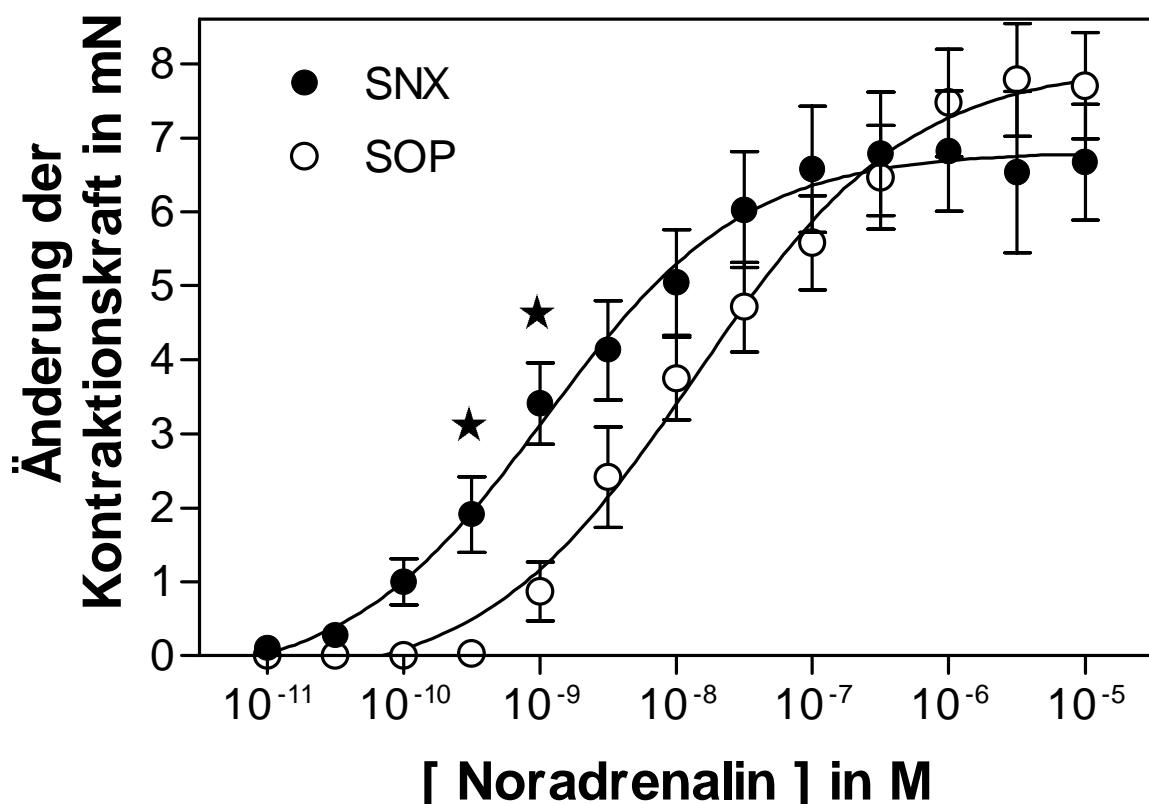


Abbildung 16: Wirkung von NA auf die Kontraktionskraft von spiralförmig geschnittenen Streifen der Aorta thoracica bei SNX- und SOP-Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 14 Einzelversuchen (5 Ratten) der SNX-Gruppe und 16 Einzelversuchen (5 Ratten) der SOP-Gruppe. Die SNX führte zu einer signifikanten Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, wobei die maximale Änderung der Kontraktionskraft unverändert blieb.

3. Ergebnisse

Konzentrationsabhängig führte NA zu einer Zunahme der Kontraktionskraft der Aortenstreifen unter isometrischen Bedingungen. Nach Applikation einer Konzentration erhöhte sich allmählich die Kontraktionskraft und erreichte nach einigen Minuten ihr Maximum. Ab 1 µM NA ließ sich die Kontraktionskraft nicht mehr steigern. Die höchste NA-Konzentration, die zum Einsatz kam, betrug 10 µM. Diese Konzentration steigerte die Kontraktionskraft der Aortenstreifen bei den SNX-Ratten um $6,7 \pm 0,8$ mN [n=14 (5 Ratten), CI=5,0-8,4 mN] und bei den SOP-Ratten um $7,7 \pm 0,7$ mN [n=16 (5 Ratten), CI=6,2-9,2 mN]. Unter basalen Bedingungen betrug die Kontraktionskraft null, da nicht elektrisch vorgereizt wurde. Die SNX resultierte in einer signifikanten Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Für die urämischen Tiere lag der pD₂-Wert bei $8,79 \pm 0,16$ [n=14 (5 Ratten), CI=8,43-9,14]. Bei SOP-Ratten lag er bei $7,84 \pm 0,13$ [n=16 (5 Ratten), CI=6,17-9,23].

3.3.2.2. Biochemische Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade des α_1 -Adrenozeptors an der Aorta thoracica

Bei diesen Versuchen wurde die Akkumulation von IP durch NA in der Aorta thoracica bestimmt. Die Präparation der Gefäße erfolgte nach der Beschreibung, die unter 2.3.2.2. a) angegeben ist und die Durchführung ist detailliert unter 2.3.2.2. b) beschrieben. Im Ansatz waren jeweils 10 µM Propranolol und 30 µM Kokain vorhanden.

Die Aortenringe reagierten mit einer starken Zunahme der Bildung von IP. Diese Zunahme war konzentrationsabhängig. Die maximale Wirkung wurde durch NA-Konzentrationen von 0,1 mM erzielt. In Abbildung 17 ist die Konzentrations-Wirkungskurve von NA in Ringen der Aorta thoracica dargestellt.

Die Mittelwerte der Parameter der einzelnen Experimente sind in Tabelle 12 zusammengefaßt aufgelistet. In der Aorta thoracica konnten keine Veränderungen der Enzymaktivität festgestellt werden. Die maximal mögliche Menge an gebildetem IP unterschied sich statistisch nicht signifikant zwischen den SNX- und SOP-Ratten. Ebenso übte die chronische Niereninsuffizienz keinen Einfluß auf die Lage der Konzentrations-Wirkungskurven aus.

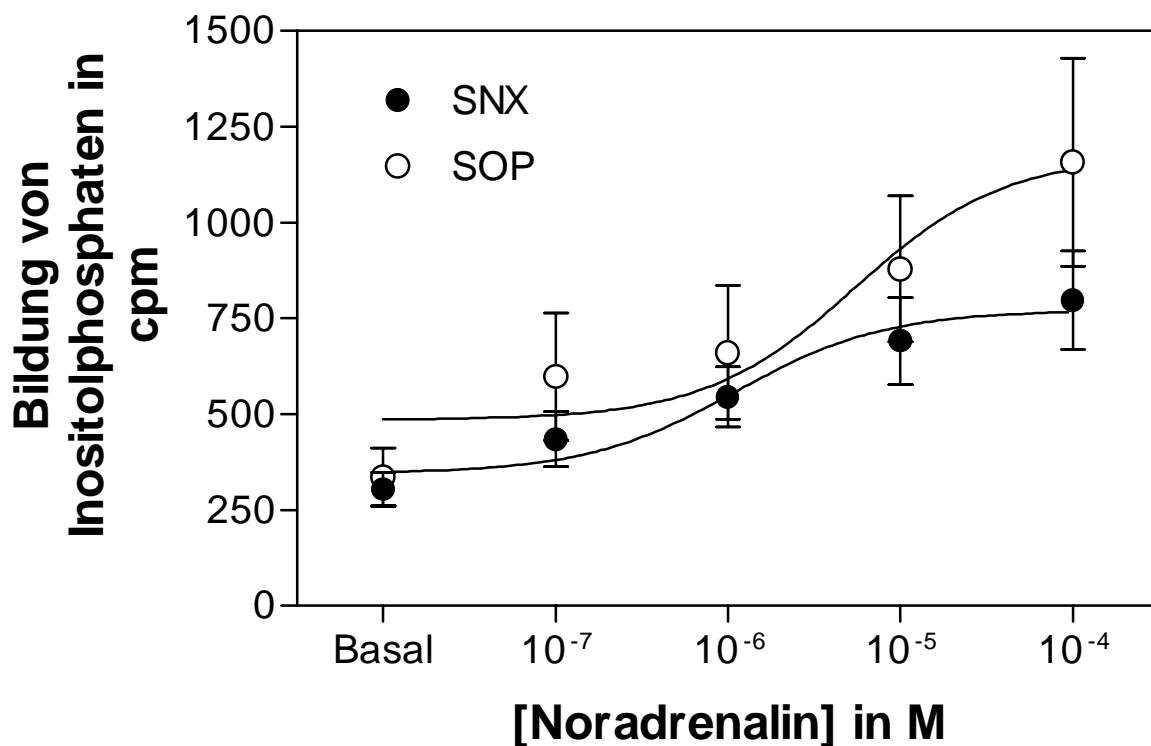


Abbildung 17: NA-induzierte Akkumulation von IP in Ringen der Aorta thoracica von SNX- und SOP-Ratten. Die gezeigten Kurven sind die Mittelwerte aus jeweils neun Einzelversuchen. Die absolute basale Stimulation betrug bei den SNX-Ratten 304 ± 44 cpm ($n=9$, CI=203-405 cpm) und bei den SOP-Ratten 336 ± 75 cpm ($n=9$, CI=163-508 cpm). Die maximale Bildung der IP unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
Basalwert / cpm	304 ± 44 CI=203-405	9	n.s.	336 ± 75 CI=163-508	9
pEC ₅₀ -Wert	$6,03 \pm 0,32$ CI=5,3-6,77	9	n.s.	$5,66 \pm 0,24$ CI=5,11-6,21	9
Max. Stim. / cpm	798 ± 129 CI=500-1095	9	n.s.	1158 ± 271 CI=517-1799	9

Tabelle 13: Akkumulation von IP in Ringen der Aorta thoracica. Vergleich der Parameter der Konzentrations-Wirkungskurve von NA bei den SNX- und SOP-Ratten.

3.3.3. Die Wirkung von Endothelin am Herzen

3.3.3.1. Die positiv inotrope Wirkung von Endothelin am Ventrikelstreifen

ET übt am Herzen eine positiv inotrope Wirkung aus. Ziel dieser Untersuchungen war die Quantifizierung des Einflusses von ET auf die Kontraktilität des Herzmuskels bei SNX- und SOP-Ratten und die Klärung, ob ET möglicherweise kompensatorisch zur abgeschwächten Kontraktilität von Isoprenalin wirkt. Durchgeführt wurden die Untersuchungen an Ventrikelstreifen, die unter isometrischen Bedingungen durch ET zur Kontraktion gebracht wurden (siehe Kapitel 2.3.3.1.).

Neun SNX- und sechs SOP-Ratten wurden untersucht. Die Mittelwerte sind als Konzentrations-Wirkungskurven von ET am Herzen in Abbildung 18 dargestellt. Unter den beschriebenen Bedingungen nahm die Kontraktionskraft der Ventrikelstreifen mit steigender Konzentration von ET zu. Eine Zusammenfassung der gefundenen Parameter gibt die Tabelle 14 wieder:

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
absolute basale Kontr.kraft / mN	4,1±0,6 CI=2,7-5,6	9	n.s.	4,1±0,3 CI=3,3-4,9	6
pD ₂ -Wert	7,40±0,09 CI=7,18-7,62	9	n.s.	7,68±0,07 CI=7,51-7,86	6
maximale Änderung der Kontr.kraft / mN	1,8±0,2 CI=1,3-2,4	9	n.s.	1,4±0,2 CI=0,8-2,0	6
Ca ⁺⁺ (7,92 mM) / mN	6,2±0,8 CI=4,0-8,5	5	n.s.	7,0±1,2 CI=3,8-10,2	5

Tabelle 14: Zusammenfassung der Kenngrößen zur Messung der Änderung der Kontraktionskraft nach Stimulation von Ventrikelstreifen mit ET. Weiterhin aufgelistet sind die durch Ca⁺⁺ hervorgerufenen Änderungen der Kontraktionskraft.

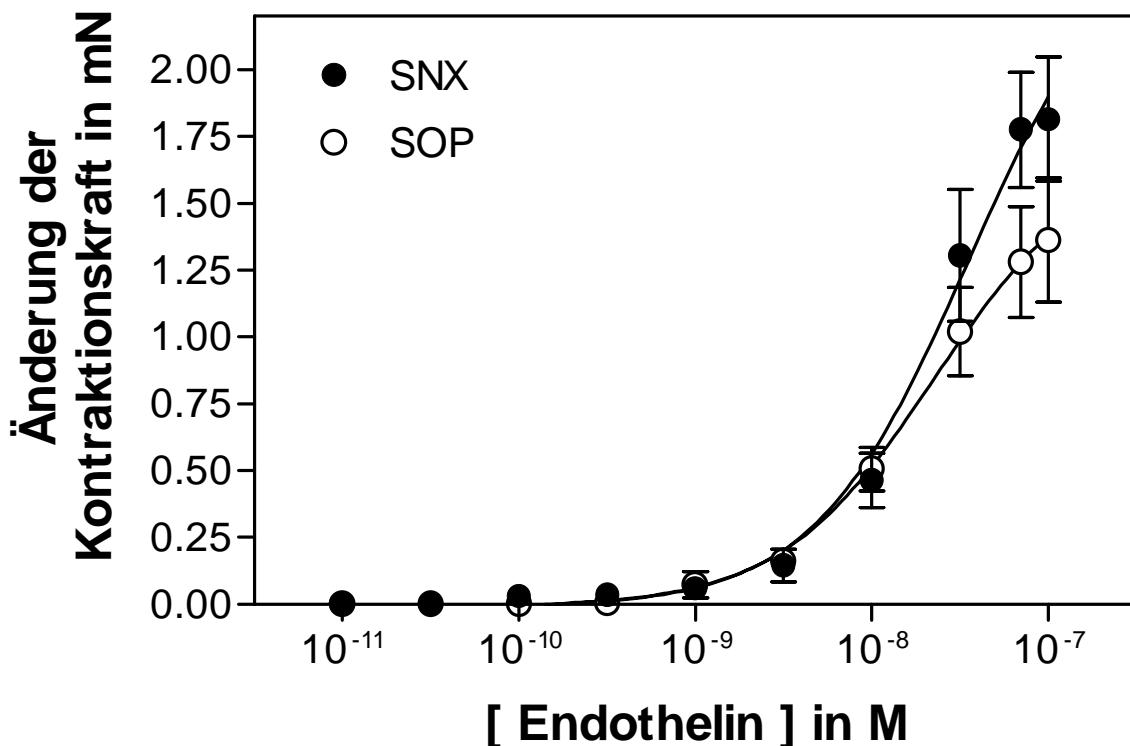


Abbildung 18: ET-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft von elektrisch gereizten Ventrikelstreifen unter isometrischen Bedingungen bei SNX- und SOP-Ratten. In neun Versuchen mit Ventrikelstreifen von SNX-Ratten und sechs von SOP-Ratten konnte kein Unterschied in der Wirkung von ET auf die Kontraktilität erkannt werden. Als absolute Basalwerte wurden bei den SNX-Ratten $4,1 \pm 0,6$ mN ($n=9$, CI=2,7-5,6 mN) und bei den SOP-Ratten $4,1 \pm 0,3$ mN ($n=6$, CI=3,3-4,9 mN) ermittelt.

Nach Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurven mit ET wurde willkürlich bei jeweils fünf Ventrikelpräparaten von SNX- und SOP-Ratten die Reaktion auf Ca^{++} getestet. Da beide untersuchten Gruppen gleich auf Ca^{++} reagierten (Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve ähnelt der in Abbildung 4), ist davon auszugehen, daß keine Fehlfunktionen im kontraktilen Apparat vorhanden sind. Die Maximalwerte der Änderung der Kontraktionskraft sind in Tabelle 14 nachzulesen.

3.3.3.2. Biochemische Untersuchungen am kardialen Endothelinrezeptor und dessen Signaltransduktion

Auf die ET-vermittelte Steigerung der Kontraktionskraft am Herzen hatte die SNX keinen Einfluß. Andererseits war die Erhöhung der Kontraktionskraft im Vergleich zur basalen absoluten

3. Ergebnisse

Kontraktion gering. Ist der Einfluß von ET im Herzgewebe generell gering oder ist die Bedeutung des Peptids eher auf anderen Ebenen zu suchen? Zur Beantwortung dieser Frage erfolgte die Charakterisierung des ET-R (Anzahl freier Bindungsstellen, Ligandenaffinität, Subtypverteilung) sowie dessen intrazelluläre Wirkung (Bildung von *second messenger*-Molekülen).

Zur Beschreibung der ET-R am Herzen wurden Kompetitionsanalysen durchgeführt. Deren Durchführung ist im Abschnitt 2.3.3.2. a, b) beschrieben. ET verdrängte ^{125}J -ET monophasisch aus seinen Bindungsstellen. Zur rechnerischen Auswertung dienten die unter 2.2.2.1.a) beschriebenen Gleichungen. Typische Verdrängungskurven für Herzpräparationen sind nachfolgend für SNX- und SOP-Ratten aufgeführt.

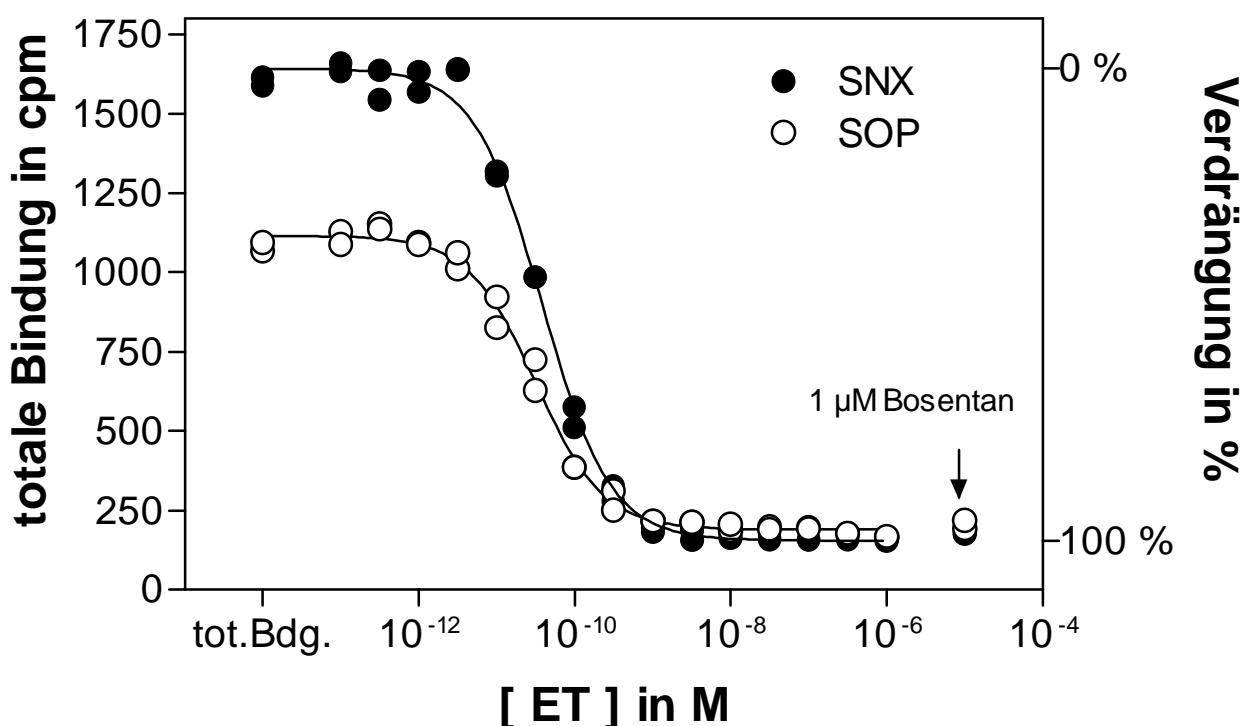


Abbildung 19: Kompetitionsbindungsstudien an Herzrohmembranfraktionen von SNX- und SOP-Ratten. ^{125}J -ET band an freie Bindungsstellen und wurde von nicht markiertem ET verdrängt. Die durchgeführten Versuche machten deutlich, daß Rohmembranfraktionen von SNX-Ratten ($n=8$) mehr freie Bindungsstellen für ET besitzen, als die von SOP-Ratten ($n=10$). Die Ligandenaffinität des Rezeptors unterschied sich hingegen in beiden untersuchten Gruppen nicht. B_{\max} (SNX)= $232,5 \pm 40,5$ fmol/mg Protein ($n=8$, CI=136,6-328,3 fmol/mg Protein); B_{\max} (SOP)= $144,8 \pm 7,6$ fmol/mg Protein ($n=10$, CI=127,5-162,0 fmol/mg Protein).

3. Ergebnisse

Bei diesen Bindungsstudien ergab sich eine signifikante Erhöhung freier Bindungsstellen für ET am Herzen von SNX-Ratten. Unverändert blieb hingegen die Affinität des Rezeptors zum Liganden ET. Alle Mittelwerte der errechneten Parameter sind zusammengefaßt in Tabelle 15 aufgelistet.

Durch Verdrängung von ^{125}J -ET mit dem selektiven ET_A -R-Antagonisten BQ 123 wurde das Verhältnis der Rezeptorsubtypen zueinander bestimmt. Konzentrationen von 10 μM BQ 123 waren nicht in der Lage, ^{125}J -ET vollständig aus seinen Bindungsstellen zu verdrängen. Der Anteil des von BQ 123 verdrängten ^{125}J -ET wurde zu dem von 1 μM Bosentan verdrängten ^{125}J -ET ins Verhältnis gesetzt und bildete den Anteil an ET_A -R an der Gesamtrezeptorpopulation. Die Ergebnisse der Verdrängung weisen darauf hin, daß hauptsächlich ET_A -R im Herzgewebe exprimiert werden. Beim Vergleich der beiden Gruppen SNX- und SOP-Ratten tritt keine Verschiebung der Verteilung der beiden Subtypen auf. Die errechneten Daten zu den Kompetitionsanalysen sind in der Tabelle 15 zu sehen:

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
B_{max} / fmol/mgProtein	232,5±40,5 CI=136,6-328,3	8	<0,01	144,8±7,6 CI=127,5±162,0	10
K_D (ET-1) / pM	31,5±3,3 CI=23,7-39,3	8	n.s.	28,1±1,9 CI=23,8±32,5	10
Anteil an ET_A Rezeptoren / %	83,8±2,2 CI=78,6-89,0	8	n.s.	78,3±1,9 CI=74,1-82,6	10
pK_{D1} (BQ 123)	7,78±0,17 CI=7,37-8,19	8	n.s.	8,01±0,06 CI=7,87-8,15	10

Tabelle 15: Auflistung aller Kenngrößen zu den Bindungsstudien am kardialen ET-R. Im Herzgewebe von SNX-Ratten konnten signifikant mehr freie Bindungsstellen für ET gefunden werden.

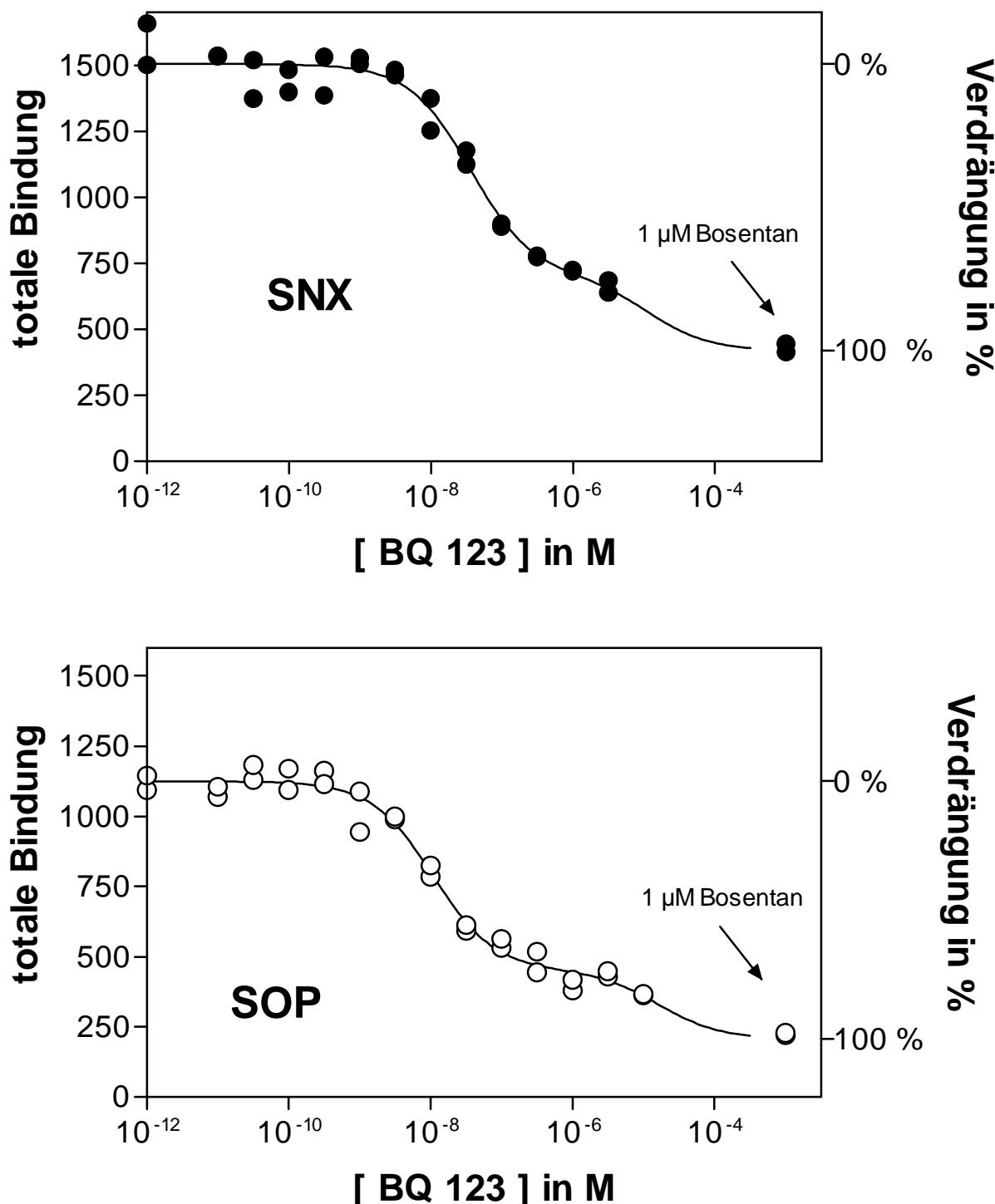


Abbildung 20: Verdrängungskurve von gebundenem ^{125}I -ET durch BQ 123 in Rohmembranfraktionen des Herzens von SNX- (n=8) und SOP-Ratten (n=10). Die Ergebnisse dieser Experimente ergaben keine signifikante Verschiebung des Verhältnisses zwischen ET_{A} - zu ET_{B} -R. Während der Anteil an ET_{A} -R bei den SNX-Ratten $83,8 \pm 2,2\%$ (n=8, CI=78,6-89,0%) betrug, machten $78,3 \pm 1,9\%$ (n=10, CI=74,1-82,6%) der Gesamtzeptorzahl bei den SOP-Ratten den ET_{A} - Subtyp aus. Bosentan kennzeichnet die unspezifische Bindung.

Nach der SNX steigt die Anzahl der freien Bindungsstellen für ET in Herzmembranen. Im Gegensatz dazu wird die positiv inotrope Wirkung von ET durch die chronische Niereninsuffizienz nicht beeinflußt. Beeinflußt die erhöhte Rezeptorzahl die Signaltransduktion, oder ist die Kopplung des Rezeptors an intrazelluläre Zielproteine beeinträchtigt?

Zur Untersuchung des an die Rezeptorstimulation angeschlossenen Signalweges wurde die Bildung von IP in *Herzslices* untersucht. Eine nähere Beschreibung der Durchführung dieser Experimente ist unter 2.3.3.2. c) nachzulesen. Die *Herzslices* reagierten mit einer starken Zunahme freier IP auf die Zugabe von ET. Die Bildung von IP nahm mit steigender Konzentration an ET zu. Sie erreichte ein Maximum bei 1 µM ET.

Die Mittelwerte der einzelnen Parameter wurden in der Gruppe der SNX-Ratten von neun Einzelexperimenten gebildet, bei den SOP-Ratten von sieben. Alle ermittelten Kenngrößen zeigen die Tabelle 16 a). Graphisch dargestellt sind die kardialen Konzentrations-Wirkungskurven von SNX- und SOP-Ratten in der Abbildung 21:

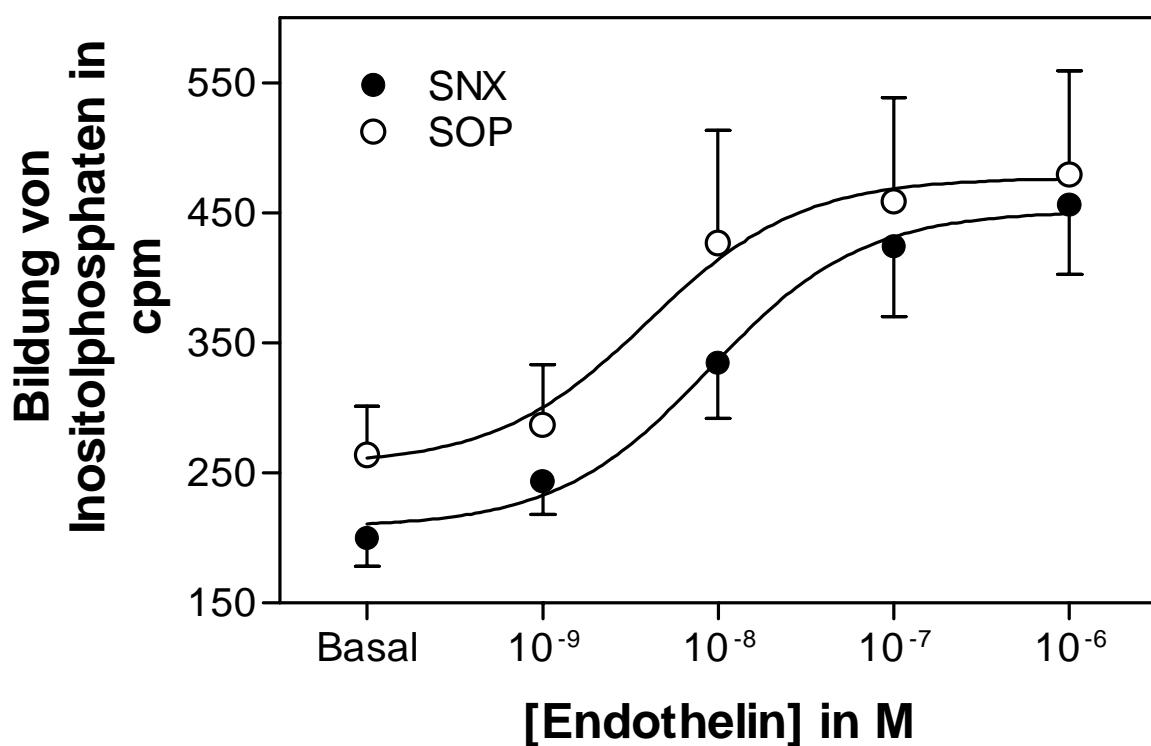


Abbildung 21: ET-induzierte Akkumulation von IP in *Herzslices* von SNX (n=7)- und SOP-Ratten (n=9). Als Basalwerte wurden bei den SNX-Ratten 200 ± 22 cpm/1000 mg *slices* (n=7, CI=150-250 cpm/1000 mg *slices*) und bei SOP-Ratten 264 ± 38 cpm/1000 mg *slices* (n=9, CI=172-355 cpm/1000 mg *slices*) ermittelt. Bei den Kurvenparametern unterschieden sich die beiden untersuchten Gruppen weder in der maximalen Stimulation noch in den pEC₅₀-Werten.

3. Ergebnisse

Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei der basalen Aktivität, bei den pEC₅₀-Werten der Konzentrations-Wirkungskurve und bei der maximalen IP-Bildung nach ET-Stimulation in Herzpräparationen festgestellt. Die Bildung von IP betrug bei den SNX-Ratten (1 µM ET) 456±54 cpm/1000 mg *slices* (n=9, CI=332-674 cpm) und bei den SOP-Ratten: 479±80 cpm/1000 mg *slices* (n=7, CI=284-674 cpm/1000 mg *slices*).

Neben dem Einfluß von ET im chronischen Zustand der Erkrankung sollte auch geklärt werden, ob und inwieweit der intrazelluläre Signalweg in frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz verändert ist. Deshalb erfolgte die Bestimmung der Akkumulation von IP nach ET-Stimulation zusätzlich zwei und vier Wochen nach der 2.OP. In Tabelle 16 b) und c) sind alle ermittelten Daten nachzulesen. Die Durchführung der Versuche ist identisch mit den vorhergehend beschriebenen.

a) Untersuchungen zur IP-Bildung nach ET-Stimulation
bei SNX- und SOP-Ratten, 7-8 Wochen nach der zweiten OP

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
basale Aktivität / cpm/1000 mg <i>slices</i>	200±22 CI=150-250	9	n.s.	264±38 CI=172-355	7
pEC ₅₀ -Wert	7,94±0,29 CI=7,28-8,60	9	n.s.	8,43±0,18 CI=8,0-8,86	7
Maximale Bildung/ cpm/1000 mg <i>slices</i>	456±54 CI=332-674	9	n.s.	479±80 CI=284-674	7

b) Untersuchungen zur IP-Bildung nach ET-Stimulation
bei SNX- und SOP-Ratten, 2 Wochen nach der zweiten OP

basale Aktivität / cpm/1000 mg <i>slices</i>	146±18 CI=100-191	7	n.s.	212±26 CI=150-274	8
pEC ₅₀ -Wert	10,46±0,39 CI=9,52-11,41	7	n.s.	9,74±0,38 CI=8,83-10,65	8
Maximale Bildung/ cpm/1000 mg <i>slices</i>	333±21 CI=282-385	7	n.s.	473±60 CI=331-615	8

c) Untersuchungen zur IP-Bildung nach ET-Stimulation
bei SNX- und SOP-Ratten, 4 Wochen nach der zweiten OP

basale Aktivität / cpm/1000 mg <i>slices</i>	149±12 CI=122-176	10	n.s.	134±7 CI=117-152	8
pEC ₅₀ -Wert	9,94±0,26 CI=9,35-10,50	10	n.s.	9,48±0,19 CI=9,04-9,93	8
Maximale Bildung cpm/1000 mg <i>slices</i>	412±27 CI=352-472	10	n.s.	352±21 CI=303-402	8

Tabelle 16 a-c): Darstellung der Versuche zur Quantifizierung der ET-induzierten Bildung von IP in Herzpräparationen zu verschiedenen Zeitpunkten der chronischen Niereninsuffizienz. Dargestellt sind jeweils die basalen Aktivitäten, die pEC₅₀-Werte sowie die maximale Stimulation.

ET führte zu einer vermehrten Bildung von IP am Herzen. Diese Bildung war abhängig von der eingesetzten Konzentration und erreichte Maximalwerte schon bei 0,1 nM. Im Unterschied zu den älteren Ratten (Tabelle 16 a) waren bei den jüngeren (Tabelle 16 b, c) niedrigere Konzentrationen von ET ausreichend, um halbmaximale Wirkungen zu erzielen. Die pEC₅₀-Werte unterschieden sich signifikant. Dies traf auf SNX- und SOP-Ratten zu.

Innerhalb der gleichalten Gruppen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den SNX- und SOP-Ratten.

3.3.4. Die Wirkung von Endothelin an der Aorta thoracica

3.3.4.1. Die Wirkung von Endothelin auf die glatte Muskulatur der Aorta thoracica

Bei einer kumulativen Konzentrationserhöhung von ET erfolgte die Messung der Kontraktionskraft unter isometrischen Bedingungen bei spiralförmig geschnittenen Streifen der Aorta thoracica (s. 2.3.4.1.). Die Abbildung 22 vergleicht den Einfluß der Urämie auf die Änderung der ET-induzierten Kontraktionskraft in spiralförmig geschnittenen Streifen der Aorta thoracica.

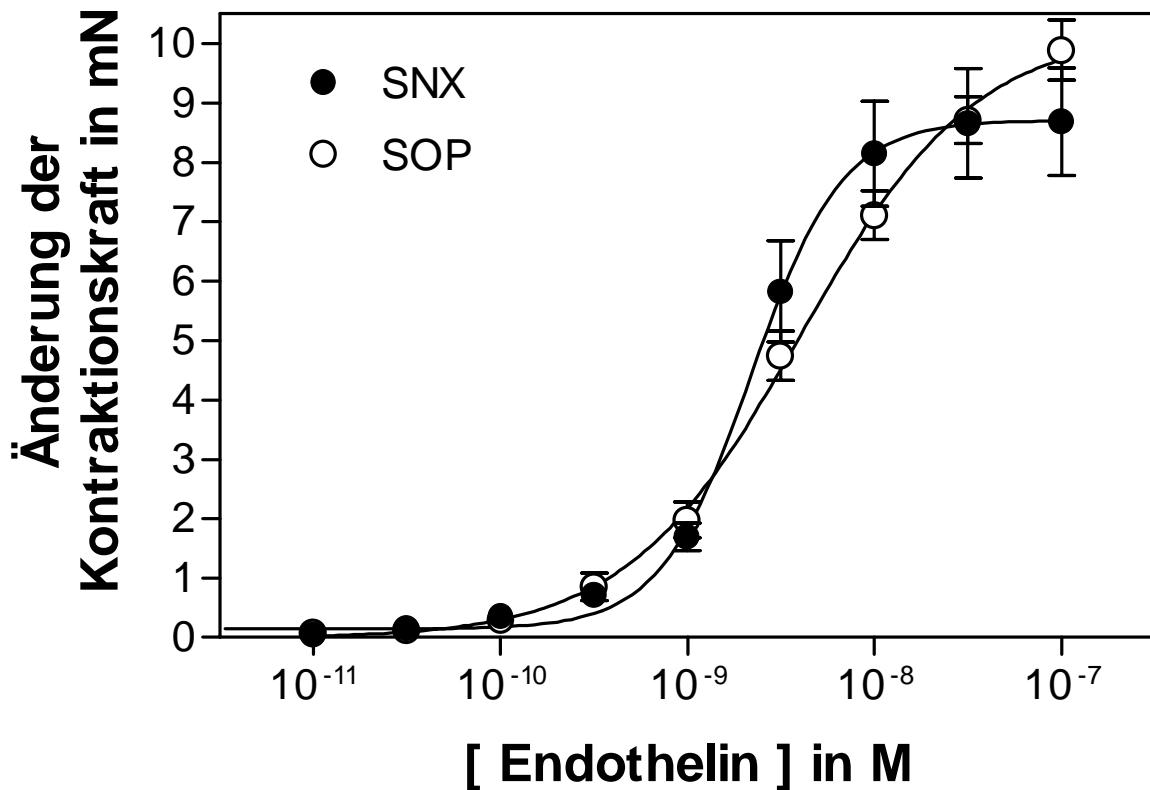


Abbildung 22: ET-induzierte Änderung der Kontraktionskraft an spiralförmig geschnittenen Streifen der Aorta thoracica. Die Daten für die SNX-Ratten wurden aus 16 Einzelversuchen (6 Ratten) und die der SOP-Ratten durch 20 Einzelversuche (8 Ratten) ermittelt. Es konnten keine Unterschiede in den pD₂-Werten und in der maximal möglichen Änderung der Kontraktionskraft bestimmt werden.

Parameter	SNX-Ratten (6)	n	p-Wert	SOP-Ratten (8)	n
pD ₂ -Wert	$8,68 \pm 0,09$ CI=8,46-8,91	16	n.s.	$8,47 \pm 0,09$ CI=8,26-8,68	20
Max. Änderung d. Kontr.-kraft in mN	$8,2 \pm 1,6$ CI=4,2-12,2	16	n.s.	$9,9 \pm 0,6$ CI=8,5-11,2	20

Tabelle 17: Kurvenparameter zu den Konzentrations-Wirkungskurven von ET an Aortenpräparationen von SNX- und SOP-Ratten. Die SNX hatte keinen Einfluß auf die ET-vermittelte Kontraktionskraft an der Aorta thoracica. Basale Kontraktion: 0 mN.

Nach Erhöhung der ET-Konzentration nahm die Kontraktionskraft stetig und langsam zu. Nach einigen Minuten stellte sich zu der entsprechenden Konzentration das Maximum ein. Wie Abbildung 22 zeigt, existiert zwischen SNX- und SOP-Ratten kein Unterschied in der Wirkung von ET auf die

3. Ergebnisse

Kontraktilität der Aorta thoracica. Sowohl die maximal mögliche Änderung der Kontraktionskraft, als auch der pD₂-Wert unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Alle Parameter der Konzentrations-Wirkungskurven von SNX- und SOP-Ratten zeigt Tabelle 17.

3.3.4.2. Biochemische Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade

Bei den Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der Bildung von IP nach ET-Stimulation wurde die Aorta thoracica verwendet (siehe 2.3.4.2.).

Durchgeführt wurden acht Versuche mit SNX- und fünf mit SOP-Ratten. ET verursachte eine sehr starke Zunahme freier IP in beiden untersuchten Gruppen. Diese Bildung war abhängig von der eingesetzten Konzentration. Die nachfolgende Tabelle 18 zeigt alle ermittelten Größen der Konzentrations-Wirkungskurven der Aorta thoracica von SNX- und SOP-Ratten.

Parameter	SNX-Ratten	n	p-Wert	SOP-Ratten	n
Basalwert / cpm	289±72 CI=120-458	8	n.s.	201±43 CI=80-322	5
pEC ₅₀ -Wert	7,36±0,23 CI=6,82-7,90	8	n.s.	7,47±0,30 CI=6,62-8,31	5
Max. Stim. / cpm	1783±438 CI=746-2819	8	n.s.	1282±286 CI=489-2076	5

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Meßgrößen zu den Konzentrations-Wirkungskurven von ET an der Aorta thoracica bei SNX- und SOP-Ratten. Zwischen den beiden Gruppen der SNX- und der SOP-Ratten besteht kein signifikanter Unterschied.

Bei der Aorta thoracica konnte kein Unterschied zwischen den SNX- (n=8) und den SOP-Ratten (n=5) gefunden werden. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven von ET in Bezug auf die Akkumulation von IP gleicht sich in beiden Gruppen. Eine Darstellung der zusammengefaßten Einzelexperimente gibt die Abbildung 23:

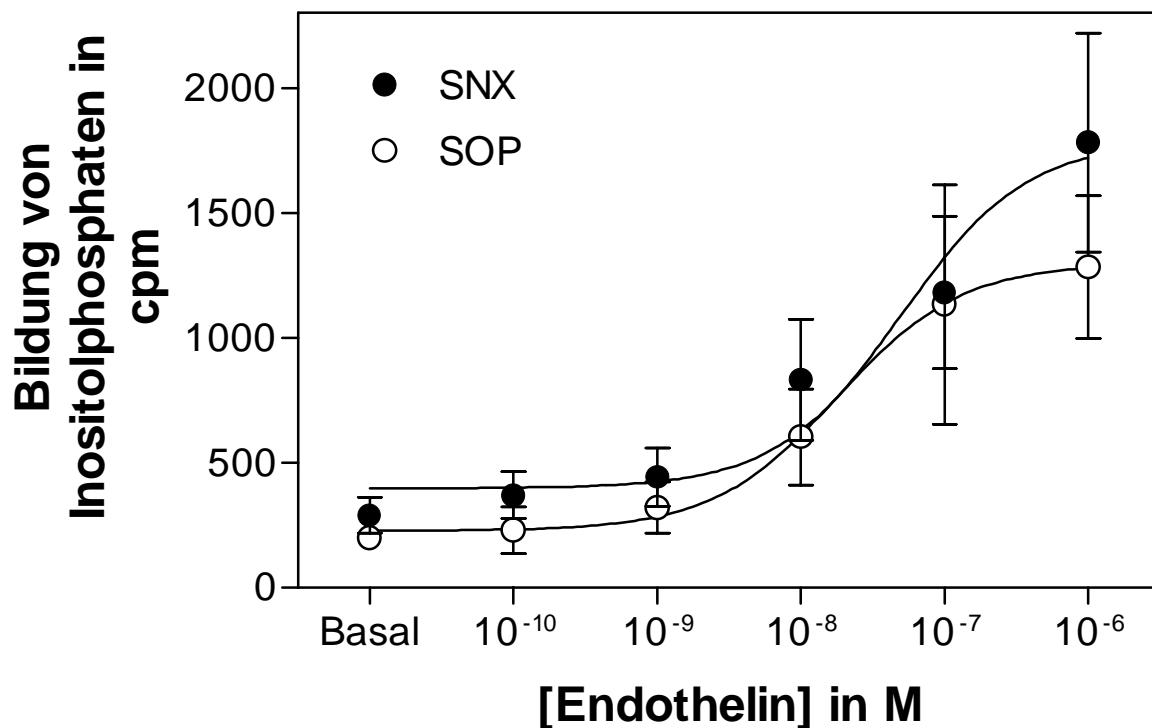


Abbildung 23: Bildung von IP nach Stimulation von Ringen der Aorta thoracica mit ET bei SNX- und SOP-Ratten. Zusammengefaßt sind acht Einzelversuche mit Ringen der Aorta thoracica von SNX-Ratten und fünf Einzelversuche in der SOP-Kontrollgruppe. Unter basalen Bedingungen wurde bei den SNX-Ratten durch ET 289 ± 72 cpm ($n=8$, CI=120-458 cpm) IP, bei den SOP-Ratten 201 ± 43 cpm ($n=5$, CI=80-322 cpm) IP gebildet. Kurvenverlauf und Kurvenparameter sind in beiden Gruppen gleich.

4. Diskussion

4.1. Tiermodell

Diese Arbeit beschäftigte sich mit Veränderungen kardiovaskulärer Rezeptoren bei der chronischen Niereninsuffizienz. Zur Untersuchung der gestellten Fragen wurde ein Tiermodell herangezogen. Dabei erfolgte die experimentelle Induktion der chronischen Niereninsuffizienz an Ratten. Die Wahl der Rasse fiel auf Wistar-Ratten. Bei den Tieren erfolgte eine Selektion nach männlichem Geschlecht mit dem Ziel, mögliche Abweichungen durch hormonelle Schwankungen, wie diese bei weiblichen Tieren vorkommen, von vornherein auszuschließen.

Zwei Methoden haben sich durchgesetzt, um auf experimentellem Weg im Tierversuch eine primäre Niereninsuffizienz herbeizuführen. Beiden Verfahren gemeinsam ist das Entfernen der gesamten rechten Niere. Der Unterschied besteht in der Reduktion des funktionsfähigen Gewebes der verbleibenden linken Niere. Eine Möglichkeit der Durchführung besteht darin, jene Gefäße, die die Niere mit Blut versorgen, durch eine Ligatur abzubinden. Im Hilus verzweigt sich die Arteria renalis in drei Gefäße, von denen zwei durch eine Ligatur verschlossen werden [167, 168, 169, 170]. Dadurch sinkt der Blutdruck in den Glomeruli und die juxtaglomerulären Zellen sezernieren Renin (*high-renin-model*). Bei der anderen Methode wird Nierengewebe operativ entfernt (SNX). Das entfernte Gewebe stammt aus dem Nierenkortex, beinhaltet aber auch Markanteile [132, 171, 172]. Bei beiden Methoden ist es wichtig darauf zu achten, daß die Nebenniere unverletzt bleibt und ihre sekretorischen Eigenschaften beibehält.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Modell der SNX gearbeitet. Dieses Modell bietet einige Vorteile. Mit dem Entfernen von Gewebe des Nierenkortex sinkt auch die Zahl der funktionsfähigen Glomeruli und damit die Anzahl der Zellen, die Renin produzieren (*low-renin-model*). Renin ist der Ausgangspunkt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, dem eine große Bedeutung bei Wachstumsprozessen nachgesagt wird [173]. Des weiteren wurden weniger Entzündungszellen und damit weniger Entzündungsprozesse in der verbleibenden Niere beschrieben [174]. Letztlich sei noch erwähnt, daß SNX-Ratten eher normoton sind [22, 175, 132, 176], bzw. nur ein moderater Anstieg des systemischen Blutdruckes beobachtet wird [174, 177], während das andere beschriebene Modell zur deutlichen Ausprägung einer Hypertonie führt [178]. Diese Tatsache ermöglicht es, beim Modell der SNX den direkten Einfluß der chronischen

Niereninsuffizienz zu diskutieren, ohne sekundäre Erscheinungen (Bluthochdruck) in den Vordergrund stellen zu müssen.

Die SNX-Ratten zeigten eine deutliche Häufung harnpflichtiger Substanzen im Plasma, die Reduktion der Nierenmasse führte zu einer Niereninsuffizienz. Bei Kreatinin war der Anstieg eher moderat, wohingegen die Harnstoffkonzentration deutlich erhöht war. Bei der Entnahme der jeweiligen Organe für die Versuche war deutlich eine Vergrößerung der Restniere zu erkennen. Obwohl rund $\frac{5}{6}$ der gesamten Masse beider Nieren entfernt wurde, machte die Masse der verbleibenden Niere 71% der Masse beider gesunder Nieren der SOP-Ratten aus. Diese hypertrophe Antwort des verbliebenen Nierengewebes gewährleistete eine Restfunktion der Niere (kompensierte Niereninsuffizienz), ein drastischer Anstieg stickstoffhaltiger Stoffwechselendprodukte blieb daher aus.

Zur weiteren Charakterisierung des verwendeten Modells, dienten der systolische Blutdruck und die Konzentrationen von NA und Adrenalin im Plasma nach SNX. In Übereinstimmung mit anderen Autoren [22, 175, 132, 176] konnte keine signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks festgestellt werden. Auch die Plasmakonzentration von Adrenalin war in der Gruppe der SNX-Ratten nicht erhöht. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von NA nach SNX signifikant an (s. 3.1.4.). Eine ähnliche Erhöhung wurde auch durch Rascher et al. gefunden [22].

Durch Angleichung der Futtermenge der SOP-Ratten an die der SNX-Ratten gab es keine Unterschiede zwischen den Körpergewichten der Tiere. Demgegenüber wogen die Herzen der Ratten mit einer kompensierten Niereninsuffizienz signifikant mehr. Diese Gewichtszunahme lässt sich auf eine Vergrößerung des linken Ventrikels zurückführen. Eine Hypertrophie wurde auch von anderen Autoren beschrieben [175, 177], wobei sich diese auch auf den rechten Ventrikel ausweiten kann [177].

Faßt man diese Daten zusammen, so stellt sich das untersuchte Modell einer chronischen Niereninsuffizienz wie folgt dar:

Durch Entfernen von ca. $\frac{5}{6}$ der gesamten Nierenmasse wurde eine Funktionseinschränkung des Organs erreicht, obwohl dieses mit einer sehr starken Hypertrophie antwortete. Die Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff stiegen deutlich gegenüber denen von SOP-Ratten an. Dabei machte sich die Erhöhung der Harnstoffkonzentration stärker bemerkbar. Weiterhin waren 7-8 Wochen nach der Reduktion der Nierenmasse erhöhte Konzentrationen von NA nachweisbar. Die Adrenalkonzentration wurde hingegen nicht beeinflusst. Darüber hinaus

führte die SNX zu einer deutlichen Hypertrophie des linken Ventrikels. Diese Charakteristik entsprach im wesentlichen der anderer Arbeitsgruppen [22, 132, 174] und zeigte gute Übereinstimmung mit humanen Befunden [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 34, 25, 26, 27, 28].

4.2. β -adrenerge Rezeptoren am Herzen von SNX-Ratten

Die SNX führte zu einer klaren Hypertrophie des Herzens, die sich vornehmlich auf den linken Ventrikel beschränkt. Kommt es durch dieses hypertrophierte Gewebe zu Veränderungen der kontraktilen Eigenschaften des Herzmuskels?

Die durch β -AR vermittelte Kontraktion besitzt die größte Bedeutung für die Funktion des Herzmuskels. Am Anfang der Untersuchungen sollte daher die durch β -AR vermittelte positiv inotrope Wirkung bestimmt werden. Ein Maß für die Inotropie stellt die Kontraktionskraft dar. Als geeignete Methode zur Bestimmung der Kontraktionskraft wird die Messung der Kraftentwicklung von Ventrikelpräparaten unter isometrischen Bedingungen angesehen.

Um die Funktion von β -AR isoliert betrachten zu können, wurde der exogene Agonist Isoprenalin eingesetzt. Mit den gewählten Konzentrationen sollte die volle Reaktionsbreite des Präparates erfaßt werden. Die Ventrikelstreifen befanden sich in einem begasten, temperierten Organbad. Isoprenalin gelangte somit auf dem Diffusionsweg an seine Zielzellen. Resultierend aus der Dicke des Gewebes kommt es zur Ausbildung eines Konzentrationsgradienten von Isoprenalin. Die Kontraktionsantwort muß daher als eine mittlere Antwort des gesamten isolierten Gewebes gelten. Die maximal mögliche Änderung der Kontraktionskraft war im hypertrophierten Herzgewebe der SNX-Ratten deutlich abgeschwächt (s.3.2.1.), was auf einen Defekt beim Signalweg von β_1 -AR schließen läßt, da die positiv inotrope Wirkung von β -AR bei der Ratte überwiegend durch diesen Rezeptorsubtyp vermittelt wird [Ergebnisse von Versuchen aus unserem Labor, s. Anhang, Dhein et al.]. Diese am Modell der kompensierten Niereninsuffizienz erhobenen Befunde sind vergleichbar mit denen, die man am Menschen gemacht hat. Auch bei Hämodialysepatienten ist der Effekt von Isoprenalin auf die Schlagfrequenz und auf die Verkürzung der QS_{2c} (Methode zur Bestimmung der Inotropie *in vivo* [179]) abgeschwächt [Ergebnisse von Versuchen aus unserem Labor, s. Anhang, Dhein et al.].

Dieser Befund könnte durch verschiedene Mechanismen zustande kommen:

- 1) Im Verlaufe der kompensierten Niereninsuffizienz kommt es zu einer *down-regulation* des β -AR.

4. Diskussion

- 2) Das an den Rezeptor gekoppelte G_S-Protein ist in seiner Funktion abgeschwächt oder das hemmende G_i-Protein ist in seiner Wirkung verstärkt.
- 3) Die Bildung von c-AMP nach Stimulation von β -AR ist infolge einer gesenkten Aktivität der AZ vermindert.
- 4) Urämische Toxine hemmen die Bindung von Agonisten an den β -AR oder verändern die Proteinstruktur des β -AR, so daß dieser nicht effektiv an das G_S-Protein koppeln kann.

Die Konzentration von NA im Plasma von SNX-Ratten war erhöht, dies könnte zu einer *down-regulation* der β -AR führen [180]. Aufschluß darüber, ob und inwieweit der β -AR am Wirkverlust von Isoprenalin beteiligt ist, können Rezeptorstudien geben.

Ausgangsmaterial für die Radioligand-Bindungsstudien war Ventrikelgewebe, d.h., daß die daraus hergestellten Rohmembranfraktionen neben Kardiomyozyten, die den Hauptanteil ausmachten, weiterhin Fibrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen enthielten. Durch diese nicht-kardiomyozytären Zellen waren in den Rohmembranfraktionen auch Rezeptoren vorhanden, die normalerweise nicht (oder nur zu einem geringen Anteil) auf Kardiomyozyten vorkommen, wie der β_2 -AR [181, 182, 183]. Zur Vergleichbarkeit der gefundenen Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen, wird üblicherweise die Anzahl freier Bindungsstellen auf die Menge eingesetzten Proteins bezogen.

Mittels Radioligand-Bindungsstudien konnte am Herzen gezeigt werden, daß die Anzahl der freien Bindungsstellen für den Radioliganden bei SNX- und SOP-Ratten gleich war. Auch dessen Affinität zum Rezeptor war in beiden Gruppen gleich. Mann et al. [14] fanden ähnliche Werte für B_{max} und K_D . Bei diesen Autoren lagen die Anzahl freier Bindungsstellen und die K_D -Werte etwas höher. Allerdings ist anzumerken, daß die untersuchten Tiere bei diesen Autoren jünger waren und eine andere Membranpräparation durchgeführt wurde. Aus diesen Befunden und der Tatsache, daß das Verhältnis von β_1 - zu β_2 -AR gleich bleibt, läßt sich ableiten, daß es in dem untersuchten Modell zu keiner *down-regulation* der β -AR kam.

Die abgeschwächte kardiale Wirkung von Isoprenalin könnte ihre Ursache in einer verminderten Bildung von *second messenger*-Molekülen bzw. Defekten in der Übertragung des Signals vom Rezeptor auf den Effektor haben. Die Bildung von c-AMP nach Stimulation von β -AR ist an das Enzym AZ gebunden. Zur Bestimmung der Aktivität der AZ gibt es verschiedene Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung an Rohmembranpräparationen durchgeführt. Der Vorteil bei der Verwendung von Rohmembranen liegt in einer besser reproduzierbaren Präparation

sowie in einer genaueren Bestimmung. Diffusionswege durch das Gewebe fallen weg und die Trennung des Reaktionsproduktes vom Ausgangsstoff vereinfacht sich, da Extraktionsschritte nicht nötig sind. Durch einen schonenden Zellaufschluß und Sedimentation bei kleinen g-Zahlen werden große Zellmembranfragmente gewonnen. Diese gewährleisten einen intakten Signalweg, da sich alle Komponenten, die zur Bildung von c-AMP nötig sind, in der Zellmembran befinden.

Es wurde die Bildung von c-AMP durch GTP, NaF, Mn⁺⁺, Forskolin und Isoprenalin bestimmt. Isoprenalin setzt zur Bildung von c-AMP die Funktionsfähigkeit aller Komponenten voraus (Bildung des Ligand-Rezeptor-G_S-Komplexes, das Abdissoziieren der G_{Sα}-Untereinheit sowie die katalytische Fähigkeit der AZ). Forskolin wirkt hauptsächlich auf die katalytische Einheit der AZ [184], involviert aber z.T. auch G_S-Protein. Mn⁺⁺ wirkt an der katalytischen Untereinheit des Enzyms. Im Gegensatz zu Forskolin ist bei der Stimulation der Bildung von c-AMP durch Mn⁺⁺ die G_{Sα}-Untereinheit nicht beteiligt [148, 149, 150, 151]. Deren stimulierende Wirkung kann durch den Einsatz von NaF separat bestimmt werden [146, 147].

Als Ergebnis der Untersuchungen zum intrazellulären Signalweg nach β-AR-Stimulation wurden keine Veränderungen bei der Wirkung von NaF und GTP gefunden. Daraus folgt, daß weder beim G_S- noch beim G_i-Protein die Ursache für die verminderte Wirkung von Isoprenalin am Herzen zu suchen ist. Darüber hinaus liegt auch kein Defekt bei der katalytischen Einheit des Zielenzyms der β-adrenergen Signaltransduktion vor, was aus den Versuchen mit Forskolin und Mn⁺⁺ hervorgeht. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß die Bildung von c-AMP nach Stimulation der β-AR mit Isoprenalin bei allen eingesetzten Konzentrationen signifikant abgeschwächt war, während keine Unterschiede in der basalen Aktivität des Enzyms gefunden wurden. All diese Daten implizieren keine Veränderungen in der Funktion der AZ. Weder die katalytische Einheit noch deren Aktivierung durch das G_S-Protein wird durch die chronische Niereninsuffizienz beeinflußt. Da Isoprenalin bei voller Funktionsfähigkeit aller anderen Komponenten dennoch in seiner biochemischen Wirkung abgeschwächt ist, muß die Ursache in einer veränderten Rezeptorstruktur liegen.

4.3. M-Cholinozeptoren am Herzen von SNX-Ratten

M-Ch stellen den physiologischen Gegenspieler von β-AR dar (G_i-Protein). Möglicherweise ist dadurch dieses Rezeptorsystem mit der verminderten Wirkung von Isoprenalin am Herzen von SNX-Ratten verknüpft.

4. Diskussion

Die Vorgehensweise bei der Untersuchung des muskarinergen Systems am Herzen glich der, mit der das β -adrenerge System charakterisiert wurde. Zur Stimulation von M-Ch am Herzen fand Carbachol Anwendung, da diese Substanz nicht durch Cholinesterasen abgebaut wird und somit stabil ist. Die inhibierende Wirkung von Carbachol auf die Kontraktionskraft kann im Ventrikel nur nachgewiesen werden, wenn die verwendeten Präparate durch geeignete Substanzen, die c-AMP erhöhen, bereits kontrahieren [152]. Dies wird üblicherweise durch die Anwendung von Isoprenalin realisiert. Von dieser Substanz wurde bereits eine abgeschwächte Kontraktionskraft bei Ventrikelpräparaten von SNX-Ratten nachgewiesen. Um eine gleiche Ausgangssituation zu schaffen, wurde bei den mit Carbachol durchgeföhrten Versuchen deshalb anstelle von Isoprenalin Forskolin in einer submaximalen Konzentration angewendet.

Die Untersuchung der Beeinflussung der Kontraktionskraft des Herzmuskels durch Carbachol legte keine Unterschiede zwischen den SNX- und SOP-Ratten offen. Unterlegt wurde dieser Befund durch Radioligand-Bindungsstudien am M-Ch und durch die Aktivitätsbestimmung der AZ. Sowohl die Anzahl freier Bindungsstellen für den radioaktiv markierten Liganden ^3H -NMS als auch die Affinität dieser Verbindung zum Rezeptor war bei den SNX- und SOP-Ratten gleich. Die Zahl der gefundenen freien Bindungsstellen für ^3H -NMS, liegt etwas niedriger als die, die von anderen Autoren am gesunden Rattenherzen beschrieben wurde [185]. Zurückzuföhren ist dies auf die unterschiedlichen Versuchskonzeptionen (Alter, Rasse, Haltung). Aus den durchgeföhrten Versuchen zum muskarinergen System geht deutlich hervor, daß dieses Rezeptorsystem von der SNX unbeeinflußt bleibt. Auch beim Menschen wurden keine Veränderungen am kardialen M-Ch von Hämodialysepatienten gefunden [Ergebnisse von Versuchen aus unserem Labor, s. Anhang, Dhein et al.].

Nimmt man die Ergebnisse der Untersuchungen an β -adrenergen und M-cholinergen Rezeptoren zusammen, erscheint es am wahrscheinlichsten, daß urämische Toxine für die β -adrenerge Fehlfunktion verantwortlich sind. Solche Substanzen könnten die Bindungseigenschaften bzw. die Kopplung des Rezeptors an das G_s-Protein beeinflussen. Verschiedene Autoren beschreiben eine inhibitorische Wirkung von urämischem Plasma auf die Bindung von Liganden am β -AR [186, 58].

4.4. α_1 -Adrenozeptoren am Herzen von SNX-Ratten

Die Untersuchung von α_1 -AR und ET-R, zwei Rezeptoren, die an G_{q/11}-Protein koppeln, wurde auf die Frage fokussiert, ob möglicherweise auch andere Rezeptoren, die eine positiv inotrope Wirkung

vermitteln, in ihrer Funktion verändert sind. Darüber hinaus waren diese Rezeptoren von Interesse, weil deren Stimulation zu einer mitogenen Antwort [124, 125, 126, 127] der Kardiomyozyten führt. Sie könnten zur Ausbildung der Herzhypertrophie und somit zur Verschlechterung der ventrikulären Funktion beitragen.

SNX-Ratten wiesen erhöhte Konzentrationen von NA im Plasma auf. Welche Konsequenzen sich daraus für die α_1 -AR ergeben, sollten Kontraktionsmessungen, Radioligand-Bindungsstudien und Bestimmungen des gebildeten intrazellulären Botenstoffs im Herzen ans Licht bringen.

Die Konzentrations-Wirkungskurve für die Kontraktion von Ventrikelstreifen durch NA unterschied sich weder quantitativ noch qualitativ zwischen den SNX- und SOP-Ratten. Konzentrationsabhängig erhöhte NA die Kontraktionskraft der Ventrikelstreifen in beiden Gruppen langsam und langanhaltend.

Bei den Radioligand-Bindungsstudien am α_1 -AR traten zwischen den beiden untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich B_{max} , K_D und Verlauf der Sättigungskurve auf. Es wurden relativ wenig freie Bindungsstellen für [3 H]-Prazosin gefunden. Da die Kontraktionsversuche keine Unterschiede in der physiologischen Antwort des Herzmuskels auf die Stimulation mit NA zeigten, wurde davon abgesehen eine Klassifizierung der Subtypen des α_1 -AR vorzunehmen. Im Rattenherzen konnten bisher drei Subtypen nachgewiesen werden, die als α_{1A} -, α_{1B} - bzw. α_{1D} -AR bezeichnet werden [91]. Für das Herz ist noch nicht genau geklärt, wie sich diese Subtypen über ihre Bindungseigenschaften hinaus unterscheiden und welche Bedeutung bzw. physiologische Funktion ihnen zukommt.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten *slices* des Herzgewebes von SNX-Ratten im Vergleich zu den SOP-Ratten keinen Unterschied in der Bildung von IP. Es konnte nur eine geringe Bildung von IP nach Stimulation mit NA nachgewiesen werden, wobei allerdings auch nur wenig Rezeptoren gefunden wurden waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß der α_1 -AR keinen Veränderungen in der Urämie unterliegt.

4.5. Endothelinrezeptoren am Herzen von SNX-Ratten

ET-R ist ein weiterer Rezeptor, dessen Wirkung über $G_{q/11}$ -Protein vermittelt wird. ET zeigt eine dem NA ähnliche Wirkqualität, was den gleichen Mechanismus zur Steigerung der Kontraktionskraft vermuten lässt. Die Konzentrations-Wirkungskurve für die Änderung der Kontraktionskraft unterschied sich in keinem Parameter zwischen den SNX- und SOP-Ratten.

4. Diskussion

Die Charakterisierung des ET-R erfolgte durch Radioligand-Bindungsstudien. Dazu wurden ebenfalls Rohmembranfraktionen verwendet. Von Bedeutung für den ET-R ist die Tatsache, daß sequestrierte Rezeptoren bei der Bestimmung ebenfalls erfaßt und als solche nicht erkannt werden. Sieben bis acht Wochen nach SNX erhöhte sich signifikant die Zahl der freien Bindungsstellen (s. 3.3.3.2.). Dabei blieb die Affinität des Rezeptors zum Liganden unverändert. Die Menge an ET-R ist vergleichbar mit der, die von anderen Arbeitsgruppen bei der gesunden Ratte beschrieben wurde [187]. Welche Bedeutung der Erhöhung der Anzahl freier Bindungsstellen für ET zukommt, ist unklar, da sie keine Auswirkung auf die ET-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft am Ventrikelstreifen hat.

Die Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion konnte auch keine näheren Aufschlüsse geben. In Herzslices erfolgte die Bestimmung der Akkumulation von IP bei unterschiedlichen ET-Konzentrationen. Zwischen den beiden untersuchten Kollektiven waren keine Unterschiede feststellbar. Die Frage, welche physiologische Bedeutung der Erhöhung der ET-R-Zahl nach SNX zukommt, bleibt offen. Möglicherweise könnte dies zum Zellwachstum und damit zur Hypertrophie des Herzens beitragen. Über Diazylglyzerin wird nach Rezeptorstimulation die Aktivität der PKC erhöht. Diese Proteinkinase fördert Wachstumsprozesse und könnte zur hypertrophen Antwort des Herzgewebes bei der chronischen Niereninsuffizienz führen. Diese Vermutung muß allerdings durch spezielle Versuche noch bestätigt werden.

Die Plasmakonzentration von ET wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Verschiedene Autoren beschreiben eine erhöhte Produktion des Peptides im Verlauf einer Urämie [168, 178], wobei auch die Bildung durch endogene Stimuli, wie z.B. Thrombin bei SNX-Ratten erhöht ist [168, 178]. Dieser Umstand führt allerdings nicht zum Anstieg der Konzentration im Kreislauf. Zum einen ist die renale Ausscheidung von ET bei chronischer Niereninsuffizienz im Tiermodell erhöht [188, 178] und zum anderen können ET-R (ET_B) durch Bindung die Konzentration von freiem ET im Plasma erniedrigen [189]. Diese Eigenschaft von ET-R könnte eine Erklärung dafür sein, daß in dem untersuchten Modell eine erhöhte Anzahl von ET-R gefunden wurde, was aber keinen Einfluß auf die physiologische Kontraktionswirkung und die Bildung von IP im Herzen hat. Möglicherweise stellt die vermehrte Produktion des Peptides in diesem Modell einen Reiz zur Expression des Rezeptors dar, der dann als ET-Fänger fungiert und die Konzentration der zirkulierenden Verbindung normalisiert. Wenn dieser Rezeptor-Agonist-Komplex dann internalisiert wird, ist die Signalkaskade unterbrochen und damit keine verstärkte physiologische Wirkung sichtbar.

4.6. α_1 -Adrenozeptoren und Endothelinrezeptoren an der Aorta

Nachdem gezeigt werden konnte, daß $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren am Herzen keinen Veränderungen unterliegen, sollte geklärt werden, ob diese Rezeptoren über ihre Vermittlung von Gefäßkontraktionen einen Einfluß auf das kardiovaskuläre System ausüben.

Die Kontraktionsversuche mit NA an Aortenpräparaten zeigten eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von SNX-Ratten, während die maximal mögliche Änderung der Kontraktionskraft in beiden untersuchten Gruppen unverändert ist. Die Bestimmung der durch NA-induzierten Akkumulation von IP brachte keinen Unterschied in den bestimmten Parametern (maximale Bildung der IP, EC₅₀ und basal absolute Bildung von IP) der Konzentrations-Wirkungskurve.

Die Ergebnisse widersprechen z.T. den von Rascher et al. [22] gefundenen. Bei diesen Autoren wurde ein unterschiedliches Verhalten von großen Gefäßen (Aorta) und Widerstandsgefäßen gefunden. Die Kontraktionscharakteristik der Aorta in der vorliegenden Arbeit entspricht der Charakteristik, die von dieser Arbeitsgruppe an Widerstandsgefäßen gefunden wurde. Kritisch sei an dieser Stelle angeführt, daß bei den von Rascher et al. dokumentierten Versuchen anstelle des EC₅₀-Wertes der EC₂₀-Werte angegeben wurde, so daß kein direkter Vergleich vorgenommen werden kann.

Die in den vorliegenden Versuchen gefundene Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von NA an Aortenpräparaten ist unabhängig von der IP-Bildung. Vielmehr sprechen die Ergebnisse für einen Transmitter-selektiven Effekt. Neben α_1 -AR haben auch α_2 -AR eine Wirkung auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. An glatten Gefäßmuskelzellen vermitteln sie eine Vasokonstriktion, an intakten Endothelzellen kann der α_2 -AR die Bildung von NO bewirken, welches zu einer Gefäßdilatation führt. Zirkulierende Urämietoxine könnten einerseits die Funktion des Endothels beeinträchtigen, so daß NA über endotheliale α_2 -AR keine Dilatation bewirkt, sondern direkt die glatte Muskelzelle kontrahiert und andererseits könnte der α_2 -AR durch diese Toxine desensibilisiert und/oder *down-reguliert* sein. Denkbar wäre darüber hinaus, daß der Katecholamingehalt des Gewebes erhöht ist. Im Verlauf der Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurve könnten dann Speicher entleert werden, was die Konzentrations-Wirkungskurve nach links verschieben würde.

Die Untersuchung der vasokonstriktorischen Eigenschaften von ET an der Aorta ergaben keine pathophysiologischen Veränderungen nach Induktion der chronischen Niereninsuffizienz. Streifen der Aorta thoracica reagierten mit einer starken Kontraktionsantwort, was die hohe vasokonstriktorische Potenz der Verbindung belegt. Bei keiner der untersuchten Konzentrationen von ET ergaben sich Unterschiede zwischen SNX- und SOP-Ratten. Zu diesem Ergebnis führten auch die Versuche zur intrazellulären Signaltransduktion.

4.7. Die kardiale Wirkung von SNAP und 8-Bromo-c-GMP nach SNX

Letztlich wurde noch die Wirkung von SNAP und 8-Br-c-GMP auf die Beeinflussung der Kontraktionskraft untersucht. Beide Substanzen greifen in das System NO/lösliche Guanylylzyklase/Proteinkinase G ein. SNAP zerfällt spontan im wäßrigen Millieu und setzt NO frei (NO-Donor). Dieses stimuliert die Guanylylzyklase zur Bildung von c-GMP. Im Organismus kann NO durch die NO-Synthase gebildet werden, es stellt einen endogenen Mediator dar. Das von der Guanylylzyklase gebildete c-GMP fungiert als *second messenger* und aktiviert die Proteinkinase G, die durch Enzymphosphorylierung zelluläre Reaktionen vermittelt.

SNAP war bei den SOP-Ratten in der Lage, die Isoprenalin-vermittelte Konzentrations-Wirkungskurve für die Kontraktion von Ventrikelstreifen signifikant nach rechts zu verschieben. Daß diese Verschiebung konzentrationsabhängig ist, zeigen vorangegangene Versuche aus unserem Labor an Wistar-Ratten [s. Anhang, Kotchi Kotchi et al.], bei denen höhere Konzentrationen von SNAP zu einer stärkeren Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve führten.

Im Gegensatz zu den SOP-Ratten zeigte sich bei den SNX-Ratten keine Verschiebung (s. 3.2.3.). SNAP reduzierte signifikant die basale Kontraktionskraft bei den SOP-Ratten, nicht aber bei den SNX-Ratten. Die Charakteristik der Kontraktionsbeeinflussung unter NO bei SOP-Ratten steht in gutem Einvernehmen zu Angaben in der Literatur, wo ebenfalls von einer Rechtsverschiebung der Isoprenalin-vermittelten Konzentrations-Wirkungskurve und einer Senkung der basalen Kontraktionskraft berichtet wird [190, 191].

Ist die Ursache für das Ausbleiben der Wirkung von NO am Herzmuskel auf den Mediator selbst (schnellerer enzymatischer Abbau, verminderte Freisetzung durch den Donor) oder auf einen defekten Signalweg zurückzuführen? Die Beantwortung dieser Frage sollte der Einsatz einer Substanz bringen, die ein membrangängiges Analogon zum durch NO gebildeten *second messenger* darstellt: 8-Br-c-GMP.

4. Diskussion

8-Br-c-GMP führte bei den SOP-Ratten zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin, bei den SNX-Ratten hingegen nicht (s. 3.4.2.). Außerdem war unter 8-Br-c-GMP nur bei den SOP-Ratten eine Senkung der absoluten basalen Kontraktionskraft festzustellen. Die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve durch 8-Br-c-GMP war nicht so groß, wie bei SNAP. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, daß die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve konzentrationsabhängig ist [Ergebnisse von Versuchen aus unserem Labor, s. Anhang, Kotchi Kotchi et al.].

Aus diesen Versuchen kann abgeleitet werden, daß die Wirkung von NO auf die Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen an die Bildung von c-GMP gebunden ist. Das zyklische Nukleotid ist in der Lage, die Sensibilität für Isoprenalin zu senken. Nach SNX verschwindet dieser Effekt von c-GMP völlig. SNAP und 8-Br-c-GMP verlieren ihre Fähigkeit, die Isoprenalin-vermittelte Erhöhung der Kontraktionskraft zu höheren Konzentrationen zu verschieben.

Der negativ inotope Effekt von NO an Kardiomyozyten ist Proteinkinase G abhängig [192, 193, 194]. Zwei Erklärungen für die negativ inotropen Effekte von NO wurden bisher gefunden. Zum einen kann c-GMP den Ca^{++} -Einstrom hemmen [194, 195, 196] (Phosphorylierung des L-Typs [194]) und zum anderen fand man heraus, daß unter dem Einfluß von NO und c-GMP der intrazelluläre pH-Wert sinkt [192]. Über die Senkung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration liegen kontroverse Befunde vor. So konnten Sumii et al. [194] eine Senkung des basalen und des stimulierten Ca^{++} -Einstroms zeigen, während Ito et al. [192] keine Beeinflussung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration fanden. Diese Autoren machten hingegen die Senkung des intrazellulären pH-Werts und damit die Senkung der Empfindlichkeit des kontraktilen Apparates gegenüber Ca^{++} primär für die negativ inotope Wirkung verantwortlich. Ito et al. [192] fanden heraus, daß die negativ inotope Wirkung von NO an hypertrophierten Kardiomyozyten (hervorgerufen durch Drucküberlastung des Ventrikels nach Verengung der Aorta) verloren geht. Daß dies auch auf das Modell der kompensierten Niereninsuffizienz zutrifft, konnten die durchgeführten Versuche zeigen. Auf der anderen Seite scheint die von Vallance et al. [137] gefundene Akkumulation einer Substanz, die die Bildung von NO hemmt, für diesen Befund nicht von Bedeutung zu sein.

Unter einem anderen Gesichtspunkt sind die gefundenen Ergebnisse zum Verlust der Wirkung von NO am Ventrikel von SNX-Ratten von außerordentlicher Bedeutung. Die NO-vermittelte Signalkaskade beeinflußt auch Prozesse des Zellwachstums. In Versuchen an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, daß der atriale natriuretische Faktor zur zellspezifischen Apoptose führt und daß diese Hemmung des Zellwachstums abhängig war von c-GMP und der Proteinkinase G, zweier Zielenzyme von NO [197]. Für verschiedene Zellen ist ein

direkter Einfluß von NO auf apoptotische Prozesse beschrieben [198]. Dies wurde kürzlich auch für Kardiomyozyten gezeigt [199]. Somit könnte NO eine Rolle bei der Ausbildung einer Links-Herzhypertrophie bei der chronischen Niereninsuffizienz zukommen, indem die Hemmung von Wachstumsprozessen durch NO bei dieser Erkrankung vermindert sein könnte.

4.8. Weiterführende Gedanken

Mit dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Aufklärung von Ursachen der Verschlechterung der Herzfunktion in der Urämie gewonnen werden. Als ein Faktor, der wesentlich zu einer Minderung der Herzfunktion beiträgt, wurde hier eine verminderte Kontraktionsantwort des Herzmuskel auf β -adrenerge Stimulation gefunden. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Defekt bei der Signalkaskade am β -AR liegen muß. Möglicherweise schränken urämische Toxine dessen Funktion ein. Vor diesem Hintergrund müßten weitere Versuche durchgeführt werden, die detaillierte Einblicke in die zugrunde liegenden Ursachen geben. Dadurch könnten Wege zur Prävention gefunden bzw. Therapiestrategien entwickelt werden, die zur Senkung des kardiovaskulären Risikos bei der chronischen Niereninsuffizienz führen.

Andere Rezeptoren, die über G-Proteine (G_i - und $G_{q/11}$ -Protein) Einfluß auf die Kontraktion des Herzmuskels ausüben, werden in ihrer Funktion durch die Urämie nicht beeinflußt. Sie tragen demnach nicht zur Minderung der Herzleistung bei und sind nicht in der Lage, die verminderte β -adrenerge Wirkung zu kompensieren. Der in dieser Arbeit gefundene Anstieg von ET-R im Herzgewebe hatte keinen Einfluß auf die Beeinflussung der Kontraktionskraft durch ET.

Der Verlust der Wirkung von NO auf die Isoprenalin-vermittelte Kontraktion des Herzmuskels in der Urämie könnte von Bedeutung bei der Betrachtung der Herz-Kreislauf-Funktion sein. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zu diesem Sachverhalt gegeben werden.

Eine Frage wird durch diese Arbeit aufgeworfen, deren Untersuchung interessante Aspekte über Mechanismen zur Einschränkung kardialer Funktionen aufweisen könnte. Obwohl bei dem verwendeten Modell keine Erhöhung des systolischen Blutdrucks auftrat, kam es zu einer deutlichen Vergrößerung des Herzens, speziell des linken Ventrikels. Ob die Ursache dafür in einer Volumenbelastung des Herzens oder in der Wirkung von humoralen Faktoren zu suchen ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von kardiovaskulären Rezeptoren in der chronischen Urämie. Als Modell wurde die subtotal ($\frac{5}{6}$) nephrektomierte Ratte (SNX) verwendet, scheinoperierte Ratten (SOP) dienten als Kontrolle. Untersucht wurden kardiale und vaskuläre (Aorta thoracica) Rezeptoren.

Zunächst wurde die β -adrenerge Signaltransduktion charakterisiert. Die Rezeptoranzahl ergab keine Unterschiede zwischen SNX- und SOP-Ratten. Messungen der Kontraktionskraft hingegen zeigten, daß bei SNX-Ratten die β -adrenerge Erhöhung der Kontraktionskraft abgeschwächt war. Dies wurde begleitet von einer verringerten β -adrenergen Stimulation der Adenylylzyklase (AZ), während die katalytische Untereinheit der AZ und die Aktivierung der G-Proteine G_s und G_i bei SNX- und SOP-Ratten unverändert war. Darüber hinaus waren auch die Anzahl, der negativ inotrope Effekt und die Hemmung der AZ durch kardiale M-Cholinozeptoren bei SNX- und SOP-Ratten nicht unterschiedlich. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß es in der chronischen Urämie zu einer selektiven Beeinträchtigung der β -adrenergen Signaltransduktion kommt, was auf im urämischen Plasma kumulierende Toxine zurückzuführen sein könnte, die zu strukturellen Veränderungen des Rezeptors führen.

Untersuchungen über kardiale Endothelinrezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen SNX- und SOP-Ratten, weder für positiv inotrope Effekte, noch für Stimulation von Inositolphosphat, der „*second messenger*“ dieser Rezeptoren. Es kann daher ausgeschlossen werden, daß kardiale α -Adrenozeptoren und Endothelin-Rezeptoren durch „*cross talk*“ auf β -adrenerge Rezeptoren im Herzen wirken.

Auf der anderen Seite war der hemmende Einfluß von Stickstoffmonoxid auf die β -adrenerge Zunahme der Kontraktionskraft bei SNX-Ratten abgeschwächt; dies könnte zur Entwicklung der Links-Herzhypertrophie bei SNX-Ratten beitragen, da Stickstoffmonoxid eine antihypertrophe Wirkung am Herzen hat.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß sich auch für vaskuläre α_1 -Adrenozeptoren und Endothelin-Rezeptoren (gemessen in der Aorta thoracica) keine signifikanten Unterschiede in ihrer funktionellen Ansprechbarkeit zwischen SNX- und SOP-Ratten fanden.

- [1] Parfrey PS, Harnett JD. Clinical aspects of cardiomyopathy in dialysis patients. *Blood Purif* 1994; 12: S. 267-278.
- [2] Foley RN, Parfrey PS. Risk factors for cardiac morbidity and mortality in dialysis patients. *Cur Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: S. 608-614.
- [3] Parfrey PS. Cardiac and cerebrovascular disease in chronic uraemia. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: S. 77-80.
- [4] Parfrey PS, Harnett JD. The management of cardiac disease in chronic uraemia. *Cur Opin Nephrol Hypertens* 1995; 3: S. 145-154.
- [5] Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE. Clinical and echocardiographic cardiovascular disease in end-stage renal disease: prevalence association and prognosis. *Kidney Int* 1995; 47: S. 186-192.
- [6] Harnett JD, Kent KM, Barre PE, Taylor R, Parfrey PS. Risk factors for the development of left ventricular hypertrophy in a prospectively followed cohort of dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: S. 1486-1490.
- [7] Harnett JD, Kent KM, Foley RN, Parfrey PS. Cardiac function and haematocrit level. *Am J Kidney Dis* 1995; 25 (suppl 1): S3-S7.
- [8] Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1989; 36: S. 286-290.
- [9] Bright R. Tabular view of the morbid appearances in 100 cases connected with albominous urine with observations. *Guy´s Hosp Rep* 1846; 1: S. 380-400.
- [10] Ritz E, Rambausek M, Mall G, Ruffmann K, Mandelbaum A. Cardiac changes in uraemia and their possible relationship to cardiovascular instability on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5 (suppl 1): S. 93-97.

- [11] Pehrsson K, Jonasson R, Lins LE. Cardiac performance in various stages of renal failure. Br Heart J 1984; 52: S. 667-673.
- [12] Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: S. 1277-1285.
- [13] Raine AE, Seymour AM, Roberts AF, Radda GK, Ledingham JG. Impairment of cardiac function and energetics in experimental renal failure. J Clin Invest 1993; 92: S. 2934-2940.
- [14] Mann JFE, Jakobs KH, Riedel J und Ritz E. Reduced chronotropic responsiveness of the heart in experimental uremia. Am J Physiol 1986; 250: S. H846-H852.
- [15] Traube L. Concerning the interrelation between cardiac and renal disease In Traube L. ed. Über den Zusammenhang von Herz und Nierenkrankheiten. Gesammelte Beiträge zur Pathologie und Physiologie (Collected contributions to pathology and physiology. Vol. II. Part 1. Clinical investigations. Hirschwald, Berlin ,1871: S. 290-353.
- [16] Horler E, Hennemann A, Heidland A. Intraneuronaler Stoffwechsel von Noradrenalin bei experimenteller Urämie und Hypertonie. Verh Dtsch Ges Inn Med 1974; 80: S. 237-249.
- [17] Hennemann A, Horler E. Sympathicopathie in uremia in Renal Insufficiency, edited By Heidland A, Kult J. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 1976, S. 41-47.
- [18] Lilley JJ, Golden J, Stone RA. Adrenergic regulation of blood pressure in chronic renal failure. J Clin Invest 1976; 57: S. 1190-1200.
- [19] Lazarus JM, Hampers CL, Lowries EG, Merriell JP. Baroreceptor activity in normotensive and hypertensive uremic patients. Circulation 1973; 47: 1015-1021.
- [20] Röckel A, Hennemann H ,Riehwien D, Heidland A. Tyraminstimulierbares Pupillenerweiterungsvermögen-ein Parameter der autonomen Insuffizienz bei Urämie. Klin Wochenschr 1976; 54: S. 479-483.

- [21] Winckler J, Hennemann H, Heidland A, Wiegand ME. Katecholamingehalt adrenerger Nerven in Speicheldrüsen mit gestörter Elektrolytausscheidung bei Urämie. Klein Wochenschr 1973; 51: S. 1115-1123.
- [22] Rascher W, Schömig A, Kreye VA, and Ritz E. Diminished vascular response to noradrenaline in experimental chronic uremia. Kidney Int 1982; 21: S. 20-27.
- [23] Campese VM. Neurogenic factors and hypertension in chronic renal failure. Journal of Nephrology 1997; 10: S. 184-187.
- [24] Atuk NO, Bailey CJ, Turner S, Peach MJ, Westervelt FB, Jr. Red blood cell catecholamine-O-transferase, plasma catecholamines and renin renal failure. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1976; 22: S. 195-200.
- [25] Lake CR, Ziegler MG, Coleman MD, Kopin IJ. Plasma levels of epinephrine and dopamine-beta-hydroxylase in CRF patients treated with dialysis. Cardiovasc Med 1979;1: S. 1099 -1111.
- [26] Heinrich WL, Katz FH, Molinoff PB, Schrier RW. Competitive effects of hypokalemia and volume depletion on plasma renin activity, aldosteron and catecholamine concentrations in haemodialysis patients. Kidney Int 1977; 12: S. 279-284.
- [27] Izzo JL, Izzo MS, Sterns RH, Freeman RB. Sympathetic nervous system hyperactivity in maintenance haemodialysis patients. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1982; 28: S. 604-607.
- [28] Cuch JL, Prinseau J, Selz F, Ruget G, et al.. Plasma free sulfo and glucuroconjugated catecholamines in uremic patients. Kidney Int 1986; 30: S. 566-572.
- [29] Stojeva-Taneva O, Masin G, Polenakovic M et al.. Autonomic nervous dysfunction and volume non-responsive hypotension in haemodialysis patients. Am J Nephrol 1991; 11: S. 123-126.
- [30] Vita G, Messina C, Savica V, Bellinghieri G. Uraemic autonomic neuropathy. J Auton Nerv Syst 1990; 30: Suppl 179-184.

- [31] Hennessy WJ, Siemensen AW. Autonomic neuropathy in chronic renal failure. *Clin Res* 1968; 16: S. 385.
- [32] Goldberger S, Thompson A, Guha A, Kramer N, Parrish A. Autonomic nervous dysfunction in chronic renal failure. *Clin Res* 1971; 19: S. 531.
- [33] Pickering TG, Gribbin B and Oliver DO. Baroreflex sensitivity in patients on long-term haemodialysis. *Clin Sci* 1972; 43: S. 645-647.
- [34] Tucker B, Fabbian F, Giles M, Thuraisingham RC, Raine AEG and Baker LRI. Left ventricular hypertrophy and ambulatory blood pressure monitoring in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: S. 724-728.
- [35] Hüting J, Kramer W, Schütterle G, Wizemann V. Analysis of left ventricular changes associated with chronic haemodialysis. *Nephron* 1988; 49: S. 284-290.
- [36] Campese VM. Neurogenic factors and hypertension in chronic renal failure. *Journal of Nephrology* 1997; 10: S. 184-187.
- [37] Brodde O.-E., Engel G, Hoyer D, Bock D, Weber F. The β -adrenergic receptor in human lymphocytes: subclassification by the use of a new radio-ligand, (\pm) - 125 iodocyanopindolol. *Life Sci* 1981; 29: S. 2189-2198.
- [38] Brodde O.-E., Brinkmann M, Schlemuth R, O'Hara N, Daul A. Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte β_2 -adrenoceptors. *J Clin Invest* 1985; 76: S. 1096-1101.
- [39] Daul AE, Wang XL, Michel MC, Brodde O.-E.. Arterial hypotension in chronic hemodialysed patients. *Kid Int* 1987, 32: S. 728 - 735.
- [40] Brodde O.-E., Daul A. Alpha- and beta-adrenoceptor changes in patients on maintenance hemodialysis. *Contr Nephrol* 1984; 41: S. 99-107.

- [41] Brodde O.-E., Daul A, Michel-Reher M, Boomsma F, Man in't Veld AJ, Schlieper P, Michel MC. Agonist induced desensitization of β -adrenoceptor function in humans. Subtyp-selective reduction in β_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated physiological effects of xamoterol or procaterol. Circulation 1990; 81: S. 914-921.
- [42] Brodde O.-E., Petrasch S, Bauch HJ, Daul A, Gnadt M, Oefler D, Michel MC. Terbutaline-induced desensitization of β_2 -adrenoceptor in vivo function in humans: attenuation by ketotifen. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: S. 434-439.
- [43] Brodde O.-E., Anlauf M, Arroyo J, Wagner R, Weber F, Bock KD. Hypersensitivity of adrenergic receptors and blood pressure response to oral yohimbine in orthostatic hypotension. (Letter to the editor) New Engl J Med 1983; 308: S. 1033-1034.
- [44] Brodde O.-E.. Clinical significance of β -adrenoceptors. Pharmacol Commun 1995; 6: S. 259-267.
- [45] Lu X, Barnett DB. Differential rates of down regulation and recoverie of myocardial β -adrenoceptor subtypes in vivo. Eur J Pharmacol 1990; 182: S. 481-486.
- [46] Ordway GA, Gambarana C, Frazer A. Quantitative autoradiography of central β -adrenoceptor subtypes: comparsion of the effects of chronic treatment with desipramine or centrally administered 1-isoproterenol. J Pharmacol Exp Ther 1988; 247: S. 379-389.
- [47] Nanoff C, Freissmuth M, Tuisl E, Schutz W. A different desentisation patterns of cardiac β -adrenoceptor subtypes by prolonged in vivo infusion of isoprenaline. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13: S. 198-203.
- [48] Molenaar P, Smolich JJ, Russel FD, McMartin LR, Summers RJ. Differential regulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in guinea-pig atrioventricular conducting system after chronic (-) isoproterenol infusion. J Pharmacol Exp Ther 1990; 255: S. 393-400.
- [49] Kompa AR, Molenaar P, Summers RJ. Effects of chemical sympathectomy on (-)

isoprenaline induced changes in cardiac β -adrenoceptor subtypes in the guinea-pig and rat. J Auton Pharmacol 1994; 14: S. 411-423.

[50] Kompa AR, Molenaar P, Summers RJ. Regulation of guinea-pig cardiac β -adrenoceptor subtypes after (-) isoprenaline and (-) noradrenline treatment. Mol Neuropharmacol 1992; 1: S. 203-210.

[51] Brodde O.-E., Bock KD. Changes in platelet α_2 -adrenoceptors in human phaeochromocytoma. Eur J Clin Pharmacol 1984; 26: S.265-267.

[52] Snavely MD, Motulsky HJ, Moustafa E, Mahan LC, Insel PA. β -adrenoceptor subtypes in rat renal cortex. Selective regulation of β_1 -adrenoceptors by pheochromocytoma. Circ Res 1982; 51: S. 504-513.

[53] Tsujimoto G, Manger WM, Hoffmann BB. Desensitization of β -adrenoceptors by pheochromocytoma. Endocrinology 1984; 114: S. 1272-1278.

[54] Brodde O.-E.. β 1 and β 2 adrenoceptors in the human heart: properties function and alterations in chronic heart failure. Pharmacol Rev 1991; 43: S. 203-243.

[55] Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al.. Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic density in failing human hearts. N Engl J Med 1982; 307: S. 205-211.

[56] Jones CR, Molenaar P, Summer RJ. New views of human cardiac β -adrenoceptors. J Mol Cell Cardiol. 1989; 21: S. 519-535.

[57] Harding SE, Brown LA, Wynne DG, Davies CH, Poole-Wilson PA. Mechanisms of β -adrenoceptor desensitisation in the failing human heart. Cardiovasc Res; 1994: 28: S. 1451-1460.

[58] Bree F,Souchet T, Baatard R, FontenailleC, Lhoste F, Tillement JP. Inhibition of (-)[¹²⁵I]-iodocyanopindolol binding to rat lung beta adrenoceptors by uremic plasma ultrafiltrates. Biochem Pharmacol 1987; 36: S. 3121-3125.

- [59] Nelson E, Merril D, Sweet C, et al.. Efficacy and safety of oral MK-954 (Du 753) an angiotensin receptor antagonist in essential hypertension. *J Hypertens* 1991; 9 (suppl. 6) S468-S469.
- [60] Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. Review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: S. 544-549.
- [61] Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, et al.. Regulation, chamber localisation and subtype distribution of angiotensin II receptors in human heart. *Circulation* 1995; 91: S. 1461-1471.
- [62] Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. *Circulation* 1993; 88: S. 1228-1237.
- [63] Lenz O, Schmid B, Kilter H, LaRosee K, Flesch M, Kuhn-Regnier F, Südkamp M, Böhm M. Effects of angiotensin II and angiotensin-converting enzyme inhibitors on human myocardium. *Eur J Pharmacol* 1995; 294: S. 17-27.
- [64] Baker KM, Singer HA. Identification and characterisation of guinea pig angiotensin II ventricular and atrial receptors: coupling to inositol phosphate production. *Circ Res* 1988; 62: S. 896-904.
- [65] Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, Bond M. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation* 1990; 82: S. 1973-1984.
- [66] Zerkowski HR, Broede A, Kunde K, Hillemann S, Schäfer E, Vogelsang M, Michel MC, Brodde O.-E.. Comparison of the positive inotropic effects of serotonin, histamine, angiotensin II, endothelin and isoprenaline in the isolated human right atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: S. 347-352.
- [67] Rosenkranz S, Nickenig G, Flesch M, Cremers B, Schnabel P, Lenz O, Krause T,

Ganten D, Hoffmann S, Böhm M. Cardiac angiotensin II receptors: studies on functional coupling in Sprague-Dawley rats and TGR ((MHC-hAT1) transgenic rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 330: S. 35-46.

[68] 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: S. 411-415.

[69] 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: S. 2863-2867.

[70] Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, Kimura C, Kosaka T, Inoue A, Ishida N, Mitsui Y, Onda H, Fujino M, Masaki T. Cloning and sequence analysis of c-DNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 1988; 231: S. 29-40.

[71] Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationship of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S. S5-S7.

[72] Galron R, Kloog Y, Bdolah A, Sokolovsky M. Functional endothelin-sarafotoxin receptors in rat heart myocytes: structure-activity relationships and receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 136: S. 936-943.

[73] Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto S, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988; 255: S. H970-H973.

[74] Lee JA, Elliot JD, Sutiphong JA, Friesen WJ, Ohlstein EH, Stadel JM, Gleason JG, Peishoff. Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: S. 7164-7168.

- [75] Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyooka T, Masaki T. Distinct subdomaines of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin_A-selective antagonist and endothelin_B-selective agonists. *J Biol Chem* 1993; 268: S. 8547-8553.
- [76] Davenport AP, Nunez DJ, Hall JA, Kaumann AK, Brown MJ. Autoradiographical localisation of binding sites for porcine [¹²⁵J] endothelin-1 in humans, pigs and rats: functional relevance in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S. S166-S170.
- [77] Gu XH, Casley D, Nayler W. Specific high-affinity binding sites for ¹²⁵J-labelled porcine endothelin in rat cardiac membranes. *Eur J Pharmacol* 1989; 167: S. 281-290.
- [78] Gu XH, Casley D, Nayler W. Characterisation of [¹²⁵J]endothelin-1 binding sites in rat cardiac membrane fragments. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S. S171-S173.
- [79] Moody CJ, Dashwood MR, Sykes RM, Chester M, Jones SM, Yacoub MH, Harding SE. Functional and autoradiographic evidence for endothelin-1 receptors on human and rat cardiac myocytes. Comparsion with single smooth muscle cells. *Circ Res* 1990; 67: S. 764-769.
- [80] Power RF, Wharton J, Zhao Y, Bloom SR, Polak JM. Autoradiographic localisation of endothelin-1 binding sites in the cardiovascular and respiratory systems. *J Biol Chem* 1989; 13 (Suppl 5): S. S50-S56.
- [81] Molenaar P, O ` Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP. Characterisation and localisation of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 1993; 72: S. 526-538.
- [82] Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS. Review: role of endothelin in heart function in health and disease. *Can J Cardiol* 1993; 9: S. 635-653.
- [83] Clozel M, Fischli W. Human cultured endothelial cells do secret endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S. 229-231.

- [84] Bacon CR, Cary NRB, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res* 1996; 79: S. 794-801.
- [85] Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpujel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: S. C408 -C415.
- [86] Marsen TA, Simonson MS, Dunn MJ. Thrombin induces the preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine kinase-linked mechanism. *Circ Res* 1995; 76: S. 987-995.
- [87] Landzberg JS, Parker JD, Gauthier DF, Colucci WS. Effects of myocardial α_1 -adrenoceptor stimulation and blockade on contractility in humans. *Circulation* 1991; 84: S. 1608-1614.
- [88] Böhm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, Erdmann E. α -adrenoceptors and α -adrenoceptor-mediated positiv inotropic effects in failing human myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12: S. 357-364
- [89] Wagner J Brodde oE. On the presence and distribution of α -adrenoceptors in the heart of various mammalian species. *Naunyn-Schmiedebergs´s Arch Pharmacol* 1978; 302: S. 239-254.
- [90] Kinami J, Tsuchihashi H, Baba S, Mano F, Maruyama K and Nagatomo T. α_1 -Adrenoceptor subtypes in the rat ventricular muscle. *J Pharm Parmacol* 1992; 44: S. 97-100.
- [91] Noguchi H, Muraoka R, Kigoshi S and Muramatsu I. Pharmacological characterization of α_1 adrenoceptor subtypes in rat heart: a binding study. *Br J Pharmacol* 1995; 114: S. 1026-1030.
- [92] Steinfath M, Chen Y-L, Lavicky J, Magnussen O, Nosse M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H. Cardiac α_1 -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* 1992; 107: S. 185-188.
- [93] Michel MC, Kenny BA, Schwinn DA. Classification of α_1 - adrenoceptorsubtypes. *Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol* 1995; 352: S. 1-10.

- [94] Taguchi K, Yang M, Goepel M, Michel MC. Comparsion of human adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998; 357: S. 100-110.
- [95] Hajnoczky G, Thomas AP. The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate. Nature 1994; 370: S. 474-477.
- [96] Lacerda AE, Rampe D, Brown AM. Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca⁺⁺ channels. Nature 1988; 335: S. 249-251.
- [97] Maly K, Überall F, Loferer H, Doppler W, Oberhuber H, Groner B, Grunicke HH. Ha-ras activates the Na⁺-H⁺-antiporter by a protein kinase C independent mechanism. J Biol Chem 1989; 264: S. 11839-11842.
- [98] Meyer M, Maly K, Überall F, Hoflacher J, Grunicke H. Stimulation of K⁺ transport systems by Ha ras. J Biol Chem 1989; 266: S. 8230-8235.
- [99] Molenaar WH, Tertoolen LGJ, de Laat SW. Phorbol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH. Nature 1984; 312: S. 371-373.
- [100] Noel J, Pouyssegur J. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na⁺-H⁺-exchanger isoforms. Am J Physiol 1995; 268: S. C283-C296.
- [101] Orlowski J, Grinstein S. Na⁺-H⁺-exchangers of mammalian cells. J Biol Chem 1997; 272: S. 22373-22376.
- [102] Piwnica-Worms D, Liebermann M. Microfluorometric monitoring of pH_i, in cultured heart cells. Na⁺-H⁺-exchange. Am J Physiol 1983; 244: S. C422-C428.
- [103] Piwnica-Worms D, Jacob R, Horres CR, Liebermann M. Na⁺-H⁺-exchange in cultured chick heart cells. J Gen Physiol 1985; 85: S. 43 -64.
- [104] Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure and

- expression of the human growth factor-activatable $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ -antiporter. *Cell* 1989; 56: S. 271-280.
- [105] Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ -antiporter, a glycoprotein of 110 kD. *Science* 1990; 247: S. 723-726.
- [106] Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin stimulates phospholipase C, $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ -exchange, c-fos expression and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83: S. 708-712.
- [107] Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J. The $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ -antiporter cytoplasmic domain mediates growth factors signals and controls „H-sensing“. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: S. 2424-2428.
- [108] Wang J, Morgan JP. Endocardial endothelium modulates myofilament Ca^{++} responsiveness in aequorin loaded ferret myocardium. *Circ Res* 1992; 70: S. 754-760.
- [109] Wang J, Morgan JP. Endothelin reverses the effect of acidosis on the intracellular Ca^{++} transient and contractility in ferret myocardium. *Circ Res* 1992; 71: S. 631-639.
- [110] Winkel GK, Sardet C, Pouyssegur J, Ives HE. Role of cytoplasmatic domain of the $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ -exchanger in hormonal activation. *J Biol Chem* 1993; 268: S. 3396-3400.
- [111] Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α -subunit of the G_q family. *J Biol Chem* 1992; 267: S. 25798-25802.
- [112] Puceat M, Terzic A, Clement O, Scamps F, Vogel SM, Vassort G. Cardiac alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropy via myofibrillar sensitization. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 7: S. 263-265.
- [113] Blatter LA, McGuigan JAS. Intracellular pH regulation in ferret ventricular muscle. The role of $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ exchange and the influence of metabolic substrate. *Circ Res* 1991; 68: S. 150-161.
- [114] Vaughan-Jones RD, Eisener DA, Lederer WJ. Effects of changes of intracellular pH

on contraction in sheep cardiac Purkinje fibres. J Gen Physiol 1987; 89: S. 1015-1032.

[115] Vigne P, Lazdunski M, Frelin C. The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. FEBS Lett 1989; 249: S. 143 -146.

[116] Hu JR, von Harsdorf R, Lang RE. Endothelin has potent inotropic effects in rat atria. J Pharmacol 1988; 158: S. 275 -278.

[117] Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, Bond M. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1989; 159: S. 14-18.

[118] Kim D, Narayanan TK, Duff RA. Mechanism of chronotropic actions of endothelins in neonatal rat atrial and ventricular cells. Circulation 1991; 94 (suppl. II): II391. (Abst.)

[119] Reid JJ, Wong-Dusting HK, Rand MJ. The effect of endothelin on noradrenergic transmission in rat and guinea pig atria. Eur J Pharmacol 1989; 168: S. 93-96.

[120] Wong-Dusting HK, Reid JJ, Rand MJ. Paradoxical effects of endothelin on cardiovascular noradrenergic neurotransmission. Clin Exp Pharmacol Physiol 1989; 16: S. 229-233.

[121] Ishikawa T, Li L, Shinmi O, et al.. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts: Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes. Circ Res 1991; 69: S. 918-926.

[122] Poli E, Barbosa G, Casoli C, Starcish R, Bertaccini G. Positive inotropic effect of endothelin-2 on human atrium preparations in vitro. Cardioscience 1991; 2: S. 99-104.

[123] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype. Circ Res 1993; 73: S. 413-423.

[124] Iwaki K, Sukhatme VP, Chien KR. α - and β -adrenergic stimulation induces distinct patterns

of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. J Biol Chem 1990; 265: S. 13809-13817.

[125] Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is a alpha 1 adrenergic response. J Clin Invest 1983; 72: S. 732-738.

[126] Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N, Coughlin SR, Lee WMF, Escobedo JA, Williams LT. Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc proto-oncogene expression. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: S. 8348-8350.

[127] Shubeita HE, McDonught PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Heller Brown J and Chien KR. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis sarcomere assembly and cardiac gene expression in ventricular myocytes. J Biol Chem 1990; 265: S. 20555-20562.

[128] Harnett JD, Kent KM, Barre PE, Taylor R, Parfrey PS. Risk factors for the development of left ventricular hypertrophy in a prospectively followed cohort of dialysis patients. J AM Soc Nephrol 1994; 4: S. 1486-1490.

[129] Harnett JD, Kent KM, Foley HN, Parfrey PS. Cardiac function and haematocrit level. Am J Kidney Dis 1995; 25: suppl.1 S3-S7.

[130] Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Signalling pathways for cardiac hypertrophy. Cell Signal 1998; 10: S.693-698.

[131] Mall G, Huther w, Schneider P, Lundin P and Ritz E. Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uraemic patients. Nephrol Dial Transplant 1990; 5: S. 39-44.

[132] Amann K, Wolf B, Nichols C, Törnig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E. Aortic changes in experimental renal failure. Hyperplasia or hypertrophy of smooth muscle cells? Hypertension 1997; 29(3): S. 770-775.

[133] London GM, Panier B, Guerin AP Marchais SJ, Safar ME, Cuche JL. Cardiac hypertrophy, aortic compliance, peripheral resistance, and wave reflections in end-stage renal disease:

comparative effects of ACE inhibition and calcium channel blockade. Circulation 1994; 90: S. 2786-2796.

[134] London GM. Increased arterial stiffness in end-stage renal failure: why is it of interest to the clinical nephrologist? Nephrol Dial Transplant. 1994; 9: S. 1709-1712.

[135] Kakinuma Y, Kawamura T, Bills T, Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A. Blood pressure independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure. Kidney Int 1992; 42: S. 46-55.

[136] Amann K, Neusüß R, Ritz E, Irzyniec T, Wiest G, Mall G. Changes of vascular architecture independent of blood pressure in experimental uraemia. Am J Hypertens 1995; S. 4

[137] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. The Lancet 1992; 339: S. 572-575.

[138] Motomura S, Zerkowski HR, Daul A, Brodde O.-E.. On the physiologic role of beta₂-adrenoceptors in the human heart: in vitro and in vivo studies. Am Heart J 1990; 119: S. 608-619.

[139] van Rossum JM. Cumulative dose response curves II: Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. Arch Int Pharmacodyn Ther 1963; 143: S. 299-330.

[140] Motulsky H. The GraphPad guide to: Analysing radioligand binding data (booklet). GraphPad Software Inc. San Diego. USA, 1996.

[141] Brodde O.-E.. Die Rolle adrenerger alpha- und beta-Rezeptoren in der Pathogenese von Hypertonie und Herzerkrankungen. Internist 1988; 29: S. 397-413.

[142] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 1973; 22(23): S.3099-3108.

- [143] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: S. 248-254.
- [144] Salomon Y, Londos C, Rodbell M. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* 1974; 58: S. 541-548.
- [145] Brown L, DeightonNM, Bals S; Söhlmann W, Zerkowski HR, Michel MC, Brodde O.-E.. Spare receptors for β -adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of catecholamines in the human heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: S. 222-232.
- [146] Johnson RA, Sutherland EW. Detergent-dispersed adenylate cyclase from rat brain. Effects of fluoride,cations, and chelators. *J Biol Chem* 1973; 248(14): S. 5114-5121.
- [147] Manganiello VC, Vaughan M J. Activation and inhibition of fat cell adenylate cyclase by fluoride. *Biol Chem* 1976; 251(20): S. 6205-6209.
- [148] Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(6): S. 3363-3367.
- [149] Drummond GI. Mg^{2+} and Mn^{2+} effects on membrane-bound and detergent-solubilized adenylate cyclase. *Can J Biochem* 1981; 59(9): S. 748-756.
- [150] Mittag TW, Tormay A, Podos SM. Manganous chloride stimulation of adenylate cyclase responsiveness in ocular ciliary process membranes. *Exp Eye Res* 1988; 46(6): S. 841-851.
- [151] de Vente J, Zaagsma. Effects of adenosine and adenosine-analoges on adenylate cyclase activity in the rat adipocyte plasma membrane: comparison of the properties of the enzyme with Mn^{2+} and Mg^{2+} as divalent cations. *Mol Cell Biochem* 1981; 40(2): S. 65-73.
- [152] Deighton NM, Motomura S, Borquez D, Zerkowski HR, Doetsch N, Brodde O.-E.. Muscarinic cholinoreceptors in the human heart: demonstration, subclassification and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1990; 341: S. 14-21.

- [153] Brodde O.-E., Konschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski HR. Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 1998; 101(2): S. 471-478.
- [154] Wagner J, Brodde O.-E.. On the presence and distribution of α_1 -adrenoceptors in the heart of various mammalian species. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1978; 302: S. 239-254.
- [155] Michel MC, Büscher R, Philipp T, Brodde O.-E.. α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors enhance inositol phosphate generation in rat renal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: S. 180-185.
- [156] Skomedal T, Schiander IG, Husøy A, Tveiten A und Osnes JB. Lithium increases the α_1 -adrenoceptor mediated inotropic effect in rat heart. *Pharmacol und Toxicol* 1991; 68: S. 88-92.
- [157] Becker K, Erdbrügger W, Heinroth-Hoffmann I, Michel MC, Brodde O.-E.. Endothelin induced phosphoinositol formation in rat kidney. Studies on receptor subtypes, G-proteins and regulation during ontogenesis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 354: S. 572-578.
- [158] Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowski HR, Brodde O.-E.. Endothelin receptors in the failing and non-failing human heart. *Circulation* 1998; 97: S. 744-751.
- [159] Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC. CGP 20712A: a useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1986; 130: S. 137-139.
- [160] Reithmann C, Gierschik P Werdan K und Jakobs KH. Hormonal regulation of $G_{i\alpha}$ and adenylyl cyclase responsiveness. *Br J clin Pharmacol* 1990; 30: S. 1185-1205.
- [161] Suzuki T, Hoshi H, Mitsui Y. Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiomyocytes in a serum free medium. *FEBS Lett* 1990; 268: S. 149-151.
- [162] Ito H, Hirata Y, Hiroe M, et al. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression

- of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circ Res 1991; 69: S. 209-215.
- [163] Simpson PC, Kariya K, Karns LR, Long CS, Karliner JS. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. Mol Cell Biochem 1991; 104: S. 35-43.
- [164] Heinrich CJ, Simpson PC. Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat cardiomyocytes to α_1 -adrenergic and phorbol ester stimulation. J Mol Cell Cardiol 1988; 20: S. 1081-1085.
- [165] Dunnmon PM, Iwaki K, Henderson SA, Sen A, Chien KR. Phorbol esters induce immediate-early genes and activate cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. J Mol Cell Cardiol 1990; 22: S. 901-910.
- [166] Allo SN, McDermott PJ, Carl LL, Morgan HE. Phorbol ester stimulation of protein kinase C activity and ribosomal DNA transcription. J Biol Chem 1991; 266: S. 2203-2209.
- [167] Olson JL. Role of heparin as a protective agent following reduction of renal mass. Kid Int 1984; 25: S. 376-382.
- [168] Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, Zoja C, Benatti L, Remuzzi G. Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. Kid Int 1993; 43: S. 354-358.
- [169] Dworkin LD, Bernstein JA, Parker M, Tolbert E, Feiner HD. Calcium antagonists and converting enzyme inhibitors reduce renal injury by different mechanisms. Kid Int 1993; 43: S. 808-814.
- [170] Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. J Clin Invest 1985; 76: S. 612-619.
- [171] Mehls O, Ritz E, Gilli G, Schmidt Gayk H, Kourist B, Wesch H, Prager P. Skeletal changes and growth in experimental uremia. Nephron 1977; 18: S. 288-300.

- [172] McMahon AC, Vescovo G, Dalla Libera L, Wynne DG, Fluck RJ, Harding SE, Raine AEG. Contractile dysfunction of isolated ventricular myocytes in experimental uraemia. *Exp Nephrol* 1996; 4: S. 144-150.
- [173] Weber KT; Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosteron system. *Circulation* 1991; 83: S. 1849-1865.
- [174] Amann K, Kronenberg G, Gehlen F; Wessels S, Orth S, Münter K, Ehmke H, Mall G, Ritz E. Cardiac remodelling in chronic renal failure-an immunohischemical study. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: S. 1958-1966.
- [175] Rambausek M, Ritz E, Mall G, Mehls O, Katus H. Myocardial hypertrophy in rats with renal insufficiency. *Kidney Int* 1985; 28: S. 775-787.
- [176] Penpargkul S, Scheuer J. Effect of uraemia upon the performance of the rat heart. *Cardiovasc Res* 1972; 6: S. 702-708.
- [177] Mall G, Rambausek M, Neumeister A, Kollmar S, Vetterlein F, Ritz E. Myocardial interstitial fibrosis in experimental uremia-implications for cardiac compliance. *Kid Int* 1988; 33: S. 804-811.
- [178] Benigni A, Perico N, Gaspari F, Zoja C, Bellizzi L, Gabanelli M, Remuzzi G. Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol* 1991; 260: S. F331-339.
- [179] Belz GG, Systolic time intervals: a methode to assess cardiovascular drug effects in humans. *Eur J Clin Invest* 1995; 25; Suppl.1 35-41.
- [180] Brodde O.-E., Michel MC, Zerkowski HR. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Card Res* 1995; 30: S. 570-584.
- [181] Lau YH, Robinson RB, Rosen MR, Bilezikian JP. Subclassification of β -adrenergic receptors in rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res* 1980; 47: S. 41-48.

- [182] Freissmuth M, Hausleithner V, Nees S, Böck M, Schütz W. Cardiac ventricular β_2 -adrenoceptors in guinea-pigs and rats are located on the coronary endothelium. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol 1986; 334: S. 56-62.
- [183] Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF. β_2 -adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. Circ Res 1995; 76: S. 40-52.
- [184] Simmond WF. G-protein regulation of adenylate cyclase (review). TIPS 1999;20; S. 66-73
- [185] Sarsero D, Molenaar P. Effects of chronic infusion of (-)-isoprenaline on rat cardiac muscarinic (M_2)-cholinoreceptors and β_1 - and β_2 -adrenoceptors. J Auton Pharmacol 1995; 15: S. 239-255.
- [186] Ferchland A, Rettkowski O, Pönische K, Deuber HJ, Osten B, Brodde O.-E.. Effects of uraemic plasma on α - and β -adrenoceptor subtypes. Nephron 1998; 80: S. 46-50.
- [187] Miyauchi T, Sakai S, Ihara M, Kasuya J, Yamaguchi Sugishita Y, Goto K. Increased [125 I]-endothelin-1 binding to cardiac membranes in rat with heart failure. Fourth international conference on endothelin. London 1995: P157.
- [188] Brooks DP, Contino LC, Storer B, Ohlstein EH. Increased endothelin excretion in rats with renal failure induced by partial nephrectomy. Br J Pharmacol 1991; 104: S. 987-989.
- [189] Haynes GW, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. J Hypert 1998; 16: S. 1081-1098.
- [190] Brady AJ, Warren JB, Pool-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. Am J Physiol 1993; 265: S. H176-H182.
- [191] Flesch M, Kilter H, Cremers B, Lenz O, Südkamp M, Kuhn- Regnier F, Böhm M. Acute effect of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. J Pharm Exp Ther 1997; 281; S. 1340-1349.

- [192] Ito N, Bartunek J, Spitzer KW, Lorell BH. Effects of the Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside on Intracellular pH and Contraction in Hypertrophied Myocytes. *Circulation* 1997; 95: S. 2303-2311.
- [193] Vila-Petrov MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollot SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and c-GMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84: S. 1020-1031.
- [194] Sumii K, Sperelakis N. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Circulation Research*. 1995; 77: S. 803-812.
- [195] Mery P, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca^{++} current. *J Biol Chem* 1993; 268: S. 26286-26295.
- [196] Kirstein M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Benardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 1995; 95: S. 794-802.
- [197] Wu Cf, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: S. 14860-14866.
- [198] Loweth AC, Williams GT, Scarpello JH, Morgan NG. Evidence for the involvement of c-GMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line HIT-T. *FEBS Letters* 1997; 400: S. 285-288.
- [199] Shimojo T, Hiroe M, Ishiyama S, Ito H, Nishikawa T, Marumo F. Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway. *Exp Cell Res* 1999; 247(1): S. 38-47.

Anhang: Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

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

Dhein S, Röhnert P, Markau S, Kotchi Kotchi E, Becker K, Poler U, Osten B, Brodde O.-E.. Cardiac β -adrenoceptors in chronic uraemia. Studies in humans and rats. J Am Coll Cardiol 2000; im Druck

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Otto-Erich Brodde gebührt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, für die Schärfung meines Blicks für das Wesentliche, für die vielen Anregungen zu dieser Arbeit und für die Vermittlung einer fundierten wissenschaftlichen Arbeitsweise.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Stefan Dhein, der durch seine konstruktiven Hinweise und Einwände in unseren zahlreichen Diskussionen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor, für die Vermittlung Ihrer Erfahrungen in der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie für Ihre Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen möchte ich Frau Dr. Karin Becker danken. Die offene und zuvorkommende Unterstützung von Herrn Dr. Emanuell Kotchi, Frau Christine Gießler und Herrn Dr. Klaus Pönische war mir bei der Durchführung der Experimente eine unerlässliche Hilfe, wofür ich an dieser Stelle recht herzlich Dank sagen möchte.

Eine große Erleichterung im Umgang mit den Versuchstieren waren die Erfahrungen, die mir Frau Dr. Ingrid Hoffmann-Heinroth vermittelte. Unsere Zusammenarbeit war sehr lehrreich und vermittelte mir zahlreiche Fähigkeiten in der tierexperimentellen Methodik. Herrn Dr. Michael Preiß möchte ich meinen Dank aussprechen für die Einführung in die Operationstechnik. Frau Dr. Schneider danke ich für die unkomplizierte Hilfe bei der Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff und Kalium.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und der Erleichterung der Arbeit im Labor bedanke ich mich bei Frau Pia Matthess, Frau Ilona Michalke, Frau Heidi Katzer und Frau Sonja Reber.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Henning Schröder für die Zeit und Mühe bedanken, die er für die Betreuung der Arbeit aufgebracht hat.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich an Sonja Jacob aussprechen, die mich mit Ihren Anregungen und Ihrer geduldigen Unterstützung stets nach vorn blicken ließ und die mir während der gesamten Arbeit eine ausdauernde Hilfe war.

.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 23.07.2000

Peter Röhnert

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Peter Röhnert
Geboren am	21.05.1974
Name der Eltern	Helmut und Brigitte Röhnert
Geburtsort	Riesa

Schulbildung

1980-1988	Polytechnische Oberschule Riesa
1988-1992	Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftliche Richtung Riesa
1992	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1998-1999	Rudolf-Steiner-Verein Elster-Aue e.V Gutshof Döllnitz
-----------	---

Hochschulausbildung

1992-1996	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
September 1996	2. Pharmazeutisches Staatsexamen
1996-1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Klinikum der medizinischen Fakultät
1999-2000	Pharmaziepraktikum in der Apotheke Silberhöhe, Halle
April 2000	3. Pharmazeutisches Staatsexamen
Mai 2000	Approbation als Apotheker

Halle, 23.10.2000