

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

(Direktor: Prof. Dr. O.-E. Brodde)

**Altersabhängige Veränderungen der
M₂-Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion
im rechten Vorhof des menschlichen Herzens**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ulrich Konschak
geboren am 05. Dezember 1971 in Nordhausen.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Brodde
2. Priv.-Doz. Dr. Simms
3. Prof. Dr. Schmitz (Mainz)

06.02.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003274

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003274>]

Kurzreferat

Zielsetzung: Untersuchungen der letzten Jahre hatten gezeigt, daß der M₁-selektive Muskarin-Rezeptor-Antagonist Pirenzepin in niedrigen Dosierungen einen paradoxen parasympathomimetischen Effekt hat und zur Senkung der Ruheherzfrequenz führt (29). Dieser Effekt zeigte in *in-vivo*-Untersuchungen eine Altersabhängigkeit: gleiche Dosierungen Pirenzepin führten bei jungen Probanden zu einer wesentlich stärkeren Absenkung der Ruheherzfrequenz als bei älteren Probanden (30). Bezug nehmend darauf bestimmten wir *in-vitro* die Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion im menschlichen rechten Vorhof bei 39 Patienten unterschiedlichen Alters (von 5 Tagen bis 76 Jahre).

Methodik: Das Material wurde gewonnen aus den rechten Vorhöfen von 39 Patienten (14 Kinder, 25 Erwachsene), bei denen eine offene Herzoperation durchgeführt werden mußte. Nach Einteilung in 3 Altersgruppen (Gruppe A: Alter < 20 Jahre; Gruppe B: Alter zwischen 20 und 50 Jahren; Gruppe C: Alter > 50 Jahre) bestimmten wir mittels [³H]-NMS-Bindungsstudien die M₂-Muskarin-Rezeptor-Dichte. Des Weiteren untersuchten wir am gewonnenen Material von 7 jungen Patienten der Gruppe A und 9 älteren Patienten der Gruppe C, wie stark der Muskarin-Rezeptor-Agonist Carbachol die Aktivität der zuvor durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase hemmte und nahmen dies als Parameter der Muskarin-Rezeptor-Funktion.

Ergebnisse: Die mittlere Dichte der M₂-Muskarin-Rezeptoren nahm in den 3 Gruppen von Gruppe A über Gruppe B bis hin zu Gruppe C signifikant ab, es bestand bei den 39 Patienten eine signifikant negative Korrelation zwischen Alter der Patienten und Dichte der Muskarin-Rezeptoren. Der Muskarin-Rezeptor-Agonist Carbachol führte in den Membranen aus rechten Vorhöfen der 7 jüngeren Patienten zu einer signifikant stärkeren Hemmung der zuvor durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase als in denen der 9 älteren Patienten.

Schlußfolgerung: Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion unterliegen einer Altersabhängigkeit, sie nehmen mit steigendem Alter ab. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die in *in-vivo*-Untersuchungen gefundene Altersabhängigkeit des paradoxen parasympathomimetischen Effekts von Pirenzepin (Senkung der Ruheherzfrequenz) sein (30).

Inhalt:

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | <i>Einleitung</i> | 1 |
| 2. | <i>Material</i> | 3 |
| 2.1. | Patientengut | 3 |
| 2.2. | Präoperative Medikation und Anaesthesieverfahren | 4 |
| 2.3. | Einteilung nach Altersgruppen | 5 |
| 3. | <i>Methoden</i> | 6 |
| 3.1. | Membranpräparation und [³ H]NMS -Bindungsstudien | 6 |
| 3.2. | Bestimmung der Adenylyl Zyklase - Aktivität | 8 |
| 3.3. | Statistische Berechnung | 9 |
| 3.4. | Verwendete Substanzen | 10 |
| 4. | <i>Ergebnisse</i> | 11 |
| 4.1. | Dichte der Muskarin-Rezeptoren im rechten Vorhof | 11 |
| 4.2. | Aktivität der Adenylyl Zyklase im rechten Vorhof | 12 |
| 5. | <i>Diskussion</i> | 13 |
| 6. | <i>Zusammenfassung</i> | 17 |
| 7. | <i>Literatur</i> | 18 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 8. | <i>Tabellen und Abbildungen</i> | 23 |
| Tab.1 | Patientengut der Gruppe A | 23 |
| Tab.2 | Patientengut der Gruppe B | 24 |
| Tab.3 | Patientengut der Gruppe C | 25 |
| Tab.4 | Adenylyl Zyklase – Aktivität verschiedener Altersgruppen | 26 |
| Abb. 1 | Bindung von [³ H]NMS als Funktion steigender [³ H]NMS-Konzentration bei Patient Nr. 21 | 27 |
| Abb. 2 | Scatchard-Analyse der spezifischen [³ H]NMS-Bindung bei Patient Nr. 21 | 28 |
| Abb. 3 | Muskarin-Rezeptor-Dichte in verschiedenen Altersgruppen | 29 |
| Abb. 4 | Korrelation zwischen Muskarin-Rezeptor-Dichte und Patientenalter | 30 |
| Abb. 5 | Einfluß von Atropin auf die Hemmung der Adenylyl Zyklase – Aktivität durch Carbachol | 31 |
| Abb. 6 | Hemmung der stimulierten Adenylyl Zyklase durch verschiedene Konzentrationen Carbachol in verschiedenen Altersgruppen | 32 |
| 9. | <i>Thesen</i> | 33 |

Anhang:

I Lebenslauf

II Selbständigkeitserklärung

III Publikation von Ergebnissen der Arbeit

IV Erklärung über frühere Promotionsversuche

V Danksagung

Abkürzungen

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| [³ H]NMS | [³ H]N-Methylscopolamin |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromol je Liter |
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| B _{max} | maximale Anzahl der Bindungen |
| ca. | zirka |
| cAMP | zyklisches Adenosin-Monophosphat |
| Ci | Curie |
| cpm | counts per minute |
| d.h. | das heißt |
| EC ₅₀ | Effektive Konzentration 50% |
| EDTA | Ethyldiamintetraessigsäure |
| fmol | femtomol |
| g | Gramm |
| g | Normalfallbeschleunigung |
| GTP | Guanosin-Triphosphat |
| i.v. | intravenös |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat |
| M | Mol je Liter |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol je Liter |

| | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| n | Anzahl |
| n.s. | nicht stimuliert |
| N ₂ O | Distickstoffmonoxid |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| nM | Nanomol je Liter |
| Nr. | Nummer |
| NYHA | New York Heart Association |
| O ₂ | Sauerstoff |
| P | errechnete Wahrscheinlichkeit |
| p.o. | per os |
| r | Korrelationskoeffizient |
| s | Sekunde(n) |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| Vol% | prozentualer Anteil am Volumen |
| vs. | versus |

1. Einleitung

Der Alterungsprozeß ist verbunden mit einer Abnahme der Funktion vieler Hormon- und Neurotransmitter-Rezeptoren (Übersicht siehe 31). Während derartige altersabhängige Unterschiede für menschliche adrenerge Rezeptoren ausführlich untersucht worden sind (Übersichten siehe 8, 12, 16, 24), ist relativ wenig bekannt über mögliche altersabhängige Veränderungen menschlicher Muskarin-Rezeptoren.

Muskarin-Rezeptoren werden in die Subtypen M₁, M₂, M₃, M₄, und M₅ eingeteilt (10). M₁-, M₃- und M₅- Rezeptoren koppeln über ein G_{q/11}-Protein an das Phospholipase C/Inositol Trisphosphat/Diacyl Glycerin/Protein Kinase C System, während M₂- und M₄-Rezeptoren über ein G_{i/o}-Protein an die Hemmung der Adenylyl Zyklase koppeln (Übersichten siehe 8, 14, 36). Im menschlichen Herzen sind Muskarin-Rezeptoren überwiegend vom M₂-Subtyp (Übersicht siehe 8, 10, 18, 22). Die physiologische Stimulation dieser Rezeptoren erfolgt mittels Acetylcholin und führt zu einem direkten negativ chronotropen Effekt (Reduktion der basalen Ruheherzfrequenz) und einem indirekten negativ inotropen und chronotropen Effekt (Hemmung der Adenylyl Zyklase-Aktivität) sowie zur Senkung der über β-Adrenozeptoren-Stimulation vermittelten Erhöhung der Herzfrequenz und der Ventrikel-Kontraktilität (2, 11, 25, 34, Übersichten siehe 8, 18).

Untersuchungen der letzten Jahre hatten gezeigt, daß bei gesunden jungen Probanden der M₁-selektive Muskarin-Rezeptor-Antagonist Pirenzepin dosisabhängig zu einem paradoxen parasympathomimetischen Effekt führt: in niedrigen Dosierungen konnte Pirenzepin die Ruheherzfrequenz senken, während es in hohen Dosierungen zu einer Steigerung der Ruheherzfrequenz führte (29, 30). Der Mechanismus dieser paradoxen parasympathomimetischen Wirkung von Pirenzepin ist bislang nicht geklärt, es wäre denkbar, daß er auf einer Hemmung präsynaptischer, die Acetylcholin-Freisetzung regulierender Autorezeptoren beruht, was zu einer erhöhten Freisetzung endogenen Acetylcholins führt, das dann über Stimulation postsynaptischer M₂-Rezeptoren zur Senkung der Ruheherzfrequenz führt (Literatur siehe 8).

Interessanterweise ist der paradoxe parasympathomimetische Effekt des Pirenzipins (also Senkung der Ruheherzfrequenz) altersabhängig: die Senkung der Ruheherzfrequenz war bei jungen Probanden wesentlich stärker ausgeprägt als bei älteren Probanden (30).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, mögliche Mechanismen, die dieser altersabhängigen Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Funktion im menschlichen Herzen unterliegen, näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck bestimmten wir an rechten Vorhöfen von 39 Patienten unterschiedlichen Alters (von 5 Tagen bis 76 Jahre) die Dichte von Muskarin-Rezeptoren (mit Hilfe von [³H]N-Methylscopolamin Bindungsstudien) sowie die durch Carbachol hervorgerufene Hemmung der durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase (als Parameter der Funktion der M₂-Rezeptoren).

2. Material

2.1. Patientengut

Material vom rechten Vorhof wurde gewonnen von 14 Kindern (8 weiblich, 6 männlich) und 25 erwachsenen Patienten (7 weiblich, 18 männlich).

Die Kinder litten unter azyanotischen angeborenen Herzfehlern und unterzogen sich einer offenen Herzoperation aufgrund von Ventrikelseptumdefekten ($n = 5$), kombinierten Atrio-Ventrikulären Septumdefekten ($n = 3$), Vorhofseptumdefekten ($n = 3$) oder Aortenstenosen ($n = 3$). Deren Eltern hatten ihr schriftliches Einverständnis erteilt. Keines der Kinder litt an akutem Herzversagen oder wurde in den letzten 3 Wochen vor der Operation mit Sympathomimetika (d.h. Katecholamine) oder Cholinergika behandelt (Tabelle 1).

Die erwachsenen Patienten, von denen Material aus dem rechten Vorhof gewonnen wurde, hatten sich entweder einer offenen Herz-Operation aufgrund eines Aortenklappen-Fehlers ($n = 9$, New York Heart Association [NYHA] -Stadium I-II, ausgenommen 1 Patient mit NYHA-Stadium II-III) bzw. einer Mitralklappen-Insuffizienz ($n = 2$, NYHA-Stadium III) oder aber einer elektiven koronaren Bypass-Operation, wobei zum Zeitpunkt der Operation kein klinisch manifestes Herzversagen bestand ($n = 14$, NYHA-Stadium I-II), unterzogen. Sie hatten alle ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Keiner dieser Patienten wurde in den letzten 6 Wochen vor dem Eingriff mit β -Adrenozeptor-Agonisten oder Cholinergika behandelt. Jedoch hatten die Patienten Nitrate ($n = 17$), β -Adrenozeptor-Antagonisten ($n = 9$), Calcium-Antagonisten ($n = 6$), Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer ($n = 10$), Diuretika ($n = 7$), Digitalis-Glykoside ($n = 4$), Heparin ($n = 13$), 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase-Hemmer ($n = 8$), Acetylsalicylsäure ($n = 5$) und Antibiotika ($n = 4$) eingenommen, sowohl als Mono- als auch als Kombinations-Therapie (Tabellen 2 und 3).

2.2. *Präoperative Medikation und Anaesthesieverfahren*

Die anaesthesiologische Prämedikation bei den Kindern unmittelbar vor dem Eingriff bestand gewöhnlich aus 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Diazepam i.v. bei Kleinkindern mit einem Körpergewicht < 10 kg, 0,3mg/kg KG Diazepam rektal bei Kindern mit einem Körpergewicht zwischen 10 und 25 kg und 0,4 mg/kg KG Diazepam p.o. bei Kindern mit einem Körpergewicht > 25kg. Die Operation wurde durchgeführt unter balancierter Anaesthesia mit Midazolam und Isofluran (bis zu 1,5 Vol% bis zum Wirkungseintritt). N₂O wurde in allen Fällen vermieden. Fentanyl wurde zur Analgesie hinzugefügt. Die kontrollierte Ventilation wurde durchgeführt mit einer inspiratorischen O₂ -Fraktion von 50-100 %. Das Material aus dem rechten Vorhof wurde unmittelbar nach Installation des kardio-pulmonalen Bypasses entnommen.

Die Prämedikation bei den erwachsenen Patienten bestand gewöhnlich aus 0,5 mg Lorazepam p.o. am Abend vorher und 0,5 - 1,0 mg p.o. am Morgen des Eingriffes. Die Operation wurde durchgeführt unter einer balancierten Anaesthesia, bestehend aus Midazolam, Fentanyl und Pancuronium-Bromid als Muskelrelaxans sowie Isofluran (0,6 - 1,0 Vol%) zur Narkose; N₂O wurde in allen Fällen vermieden. Die kontrollierte Ventilation wurde durchgeführt mit einer inspiratorischen O₂ -Fraktion von 50-100 %. Bei allen Patienten wurde das Material aus dem rechten Vorhof während der Installation des kardio-pulmonalen Bypasses entnommen.

Unmittelbar nach der Exzision wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.3. Einteilung nach Altersgruppen

Die Patienten wurden willkürlich in drei Altersgruppen geteilt:

Kinder (Gruppe A, < 20 Jahre),
Erwachsene (Gruppe B, 20 - 50 Jahre)
und ältere Personen (Gruppe C, > 50 Jahre).

Das jeweils mittlere Alter der drei Gruppen war:

Gruppe A, 7.3 +/- 1.5 Jahre (von 5 Tagen bis 15 Jahren), n = 14;
Gruppe B, 32.6 +/- 2.5 Jahre (von 22 bis 43 Jahren), n = 9;
und Gruppe C, 66.8 +/- 1.8 Jahre (von 55 bis 76 Jahren), n = 16.

3. Methoden

3.1. Membranpräparation und [³H]NMS - Bindungsstudien

Für die Radioligand-Bindungsstudien wurde das Gewebe mit einer Schere zerkleinert und in 10 ml einer eiskalten 1 mM KHCO₃ - Lösung mit einem Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) zweimal für 20 s bei voller Geschwindigkeit in 1-Minuten-Intervallen homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 1mM KHCO₃ auf 50 ml verdünnt und mit 700g für 15 min zentrifugiert; der Überstand wurde durch 4 Lagen Mull gegossen und mit 21.000g für 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde in eiskaltem Inkubationspuffer (10 mM Na₂HPO₄ , 10 mM NaH₂PO₄ , pH 7.4) aufgenommen und so verdünnt, daß eine Protein-Konzentration von 0.6 - 0.7 mg/ml erreicht wurde. Der Protein-Gehalt wurde nach der Methode von Bradford (4) bestimmt, wobei Rinderimmunglobulin G als Standard benutzt wurde.

[³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) und alle Substanzen, die in diesen Versuchen benutzt wurden, wurden in 10 mM Na₂HPO₄ , 10 mM NaH₂PO₄ Puffer, pH 7.4 gelöst. Wenn nicht anderweitig festgelegt, wurden Aliquote der Membran-Suspension (150 µl) mit [³H]NMS in einem Gesamtvolumen von 250 µl inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 25°C und wurde durch die Zugabe von 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer zum Reaktionsgemisch beendet. Anschließend folgte eine Vakuumfiltration über Whatman GF/C Glasfaser-Filter, die vorher mit 1mM unmarkiertem NMS getränkt wurden.

Jeder Filter wurde mit zusätzlichen 10 ml Puffer gewaschen. Die Filter wurden getrocknet, in Zählgefäß überführt, die 5ml Lumasafe plus Scintillator (Lumac-LSC B.V., Groningen, Niederlande) enthielten. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillations-Counter (LS 6000; Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California) mit einer Effizienz von 42% bestimmt. Die unspezifische Bindung von [³H]NMS wurde definiert als die an die Membranen gebundene Radioaktivität, die von einer hohen Konzentration Atropin (1 µM) nicht verdrängt wurde. Die spezifische

Bindung von [³H]NMS war definiert als die Gesamtbinding abzüglich der unspezifischen Bindung; sie betrug 80-90% bei 0.5 - 3 nM und 70% bei 10 nM [³H]NMS.

Zur Bestimmung der Gesamtdichte der Muskarin-Rezeptoren im menschlichen rechten Vorhof wurden die Membranen mit 7 verschiedenen Konzentrationen von [³H]NMS (zwischen 0.1 nM und 10 nM) inkubiert und die spezifische Bindung, wie oben beschrieben, ermittelt.

3.2. Bestimmung der Adenylyl Zyklase - Aktivität

Die Aktivität der Adenylyl Zyklase wurde bestimmt wie bei Salomon et al. (32) beschrieben mit geringfügigen Modifikationen, die anderweitig erläutert sind (9). Die Membranen (35 - 45 µg Protein) wurden inkubiert für 10 Minuten bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 100 µl, bestehend aus 40mM Hepes-Puffer, pH 7,4, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10 µM GTP, 500µM ATP, ca. 1,000,000 cpm [α³²P]-ATP, 100 mM cAMP und einem ATP regenerierenden System (5mM Phosphokreatin und 50 U/ml Phosphokreatinkinase) mit oder ohne Zusatz von Isoprenalin (10 µM), Forskolin (10 µM) und verschiedenen Konzentrationen Carbachol (10 nM - 100 µM). Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (50 mM Tris, 40 mM ATP, 1,4 mM cAMP, 2% SDS, pH 7,5 und ca. 10000 cpm [³H]cAMP), danach wurden 800 µl Aqua dest. hinzugegeben. Die Isolation des gebildeten [³²P]cAMP's aus dem α-[³²P]-ATP erfolgte durch Säulenchromatographie. Dazu wurde das Reaktionsgemisch nach Zugabe von Aqua dest. und Stopplösung vollständig auf DOWEX-Säulen (1 g DOWEX AG 50 W-X4 pro Säule) gegeben. Die Proben wurden nun zweimal mit 1ml Aqua dest. Gewaschen, über Alumina-Säulen (580 mg Alumina für Chromatographie pro Säule) gestellt und das [³²P]cAMP mit 5 ml einer 0,1 M Imidazol-Lösung von den Säulen gewaschen. Nach Zugabe von 14 ml Szintillator (Luma Safe plus Szintillator) wurde die Radioaktivität im β-Counter (Tri-Carb liquid szintillation counter 2250 CA Packard) bestimmt. Über das gleichzeitig eluierte [³H]cAMP wurde die Wiederfindungsrate des cAMP's bestimmt. Sie betrug gewöhnlich zwischen 70 und 80 %.

3.3. Statistische Berechnung

Die Ergebnisse im Text und in den Abbildungen sind angegeben als Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Wertes von n Versuchen. Die Äquilibrium-Dissoziations-Konstante (K_D) und die maximale Anzahl der Bindungen (B_{max}) für [3H]NMS wurde mit Hilfe der Scatchard-Analyse (33) ermittelt. Zur Bestimmung der EC₅₀-Werte für die durch Carbachol hervorgerufene Hemmung der Adenylyl Zyklase wurden sigmoide Kurven an die Daten mit Hilfe des iterativen Kurvenanpassungsprogramms PRISM angepaßt; dabei wurde der Anfang der Kurve als 0% Hemmung festgesetzt und die Hemmung der Adenylyl Zyklase durch 10µM Carbachol wurde als maximale Hemmung festgesetzt. Der Hill-Koeffizient als Parameter für den Kurvenverlauf wurde variabel gehalten. Unter diesen Bedingungen wurden aus den Kurven EC₅₀-Werte für Carbachol berechnet, die nur unwesentlich (max. um den Faktor 2) von den EC₅₀-Werten variierten, die erhalten wurden, wenn der Hill-Koeffizient als Faktor für den Kurvenverlauf mit 1,0 konstant gehalten würde.

Die lineare Regressions-Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechnet (Modell: [3H]NMS-Bindungsstellen = $a \times Alter + b$).

3.4. Verwendete Substanzen

Atropin-Sulfat, Isoprenalin-Bitartrat, Carbachol-Chlorid und Forskolin wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) gekauft, N-Methyl-Scopolamin-Nitrat von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), [³H]NMS (spezifische Aktivität 85 Ci/mmol), [α -³²P]ATP (spezifische Aktivität 30 Ci/mmol) und [³H]cAMP (spezifische Aktivität 44.5 Ci/mmol) von New England Nuclear (Dreieich, Deutschland). Alle anderen Chemikalien waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsprodukt.

4. Ergebnisse

4.1. Dichte der Muskarin-Rezeptoren im rechten Vorhof

Die spezifische [³H]NMS-Bindung an Membranen aus menschlichen rechten Vorhöfen nahm linear mit steigenden Membran-Protein-Konzentrationen von 0,25 - 1,5 mg/ml zu. Routinemäßig wurde eine Protein-Konzentration von ca. 0,7 mg/ml (entspricht 100 µg/Ansatz) in den meisten Experimenten verwendet. Die spezifische Bindung von [³H]NMS an Membranen aus menschlichem rechten Vorhof nahm mit steigenden [³H]NMS-Konzentrationen von 0,1 - 10 nM zu. Die Sättigung wurde zwischen 4 und 6 nM erreicht (Abb. 1). Die Scatchard-Analyse (33) dieser Bindung (Abb. 2) ergab eine Gerade , was darauf hindeutet, daß [³H]NMS nur an eine einzige Bindungsstelle bindet. Aus der Scatchard-Analyse ergab sich eine Aqulilibrium-Dissoziations-Konstante (K_D) von 1,4 nM.

Die mittlere Dichte der Muskarin-Rezeptoren im rechten Vorhof nahm in den drei Gruppen von Gruppe A (Patienten jünger als 20 Jahre) über Gruppe B (Patienten zwischen 20 und 50 Jahren) bis hin zu Gruppe C (Patienten älter als 50 Jahre; Abb.3) ab, der Unterschied zwischen den Gruppen A und C war hoch signifikant. Darüber hinaus bestand für alle 39 Patienten eine signifikante negative Korrelation zwischen der Dichte der Muskarin-Rezeptoren des rechten Vorhofs und dem Alter der Patienten (Abb. 4). Die K_D -Werte für [³H]NMS ergaben keinen signifikanten Unterschied in den drei Gruppen (siehe Legende zu Abb.3).

4.2. Aktivität der Adenylyl Zyklase im rechten Vorhof

Der Muskarin-Rezeptor-Agonist Carbachol (10nM - 100 μ M) hemmte die durch 10 μ M Forskolin stimulierte Adenylyl Zyklase - Aktivität in Membranen des rechten Vorhofs in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 6); der EC₅₀-Wert betrug ca. 3 μ M. Der nicht selektive Muskarinrezeptor-Antagonist Atropin (1 μ M) führte zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrationshemmungskurve für Carbachol (Abb. 5), was darauf hindeutet, daß die durch Carbachol hervorgerufene Hemmung der Adenylyl Zyklase durch Muskarinrezeptoren vermittelt wird.

Aufgrund der begrenzten Menge an Gewebe konnten wir die Aktivität der Adenylyl Zyklase nur bei 7 Patienten der Gruppe A (mittleres Alter 10.4 +/- 1.8 Jahre) und 9 Patienten der Gruppe C (mittleres Alter 67.3 +/- 2.7 Jahre) bestimmen. In Übereinstimmung mit bereits anderweitig beschriebenen Ergebnissen (9, 36) war die basale, durch 10 μ M GTP, durch 10 μ M Isoprenalin und durch 10 μ M Forskolin stimulierte Adenylyl Zyklase - Aktivität in Gruppe A signifikant höher als in Gruppe C (Tabelle 4).

Die Hemmung der durch 10 μ M Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase-Aktivität war bei jeder Konzentration von Carbachol (10 nM - 100 μ M) in Membranen der Gruppe A signifikant mehr ausgeprägt als in Membranen der Gruppe C (Abb. 6). Darüber hinaus war der EC₅₀ -Wert für Carbachol in Gruppe A (0.76 +/- 0.22 μ M) signifikant niedriger als in Gruppe C (7.2 +/- 2.1 μ M P < 0.05).

5. Diskussion

In-vivo-Untersuchungen an jungen Probanden haben gezeigt, daß Atropin und der M₁-selektive Muskarin-Rezeptor-Antagonist Pirenzepin einen biphasischen Effekt auf die Ruheherzfrequenz ausüben: in niedrigen Dosierungen können sie zu einer Abnahme der Herzfrequenz führen, wogegen sie in höheren Dosen, wie bekannt, die Herzfrequenz erhöhen (26, 29, 30, 35).

Der Mechanismus dieser herzfrequenzsenkenden Effekte von niedrigen Dosierungen von Atropin und Pirenzepin ist nicht vollständig verstanden. Auf Grund seines Affinitätsprofils an M₁-, M₂-, M₃- und M₄-Muskarin-Rezeptoren sollte Pirenzepin in den Dosen, die in diesen Untersuchungen verwendet wurden, zu einer selektiven Blockade von M₁-Rezeptoren führen (8, 13); es wäre daher denkbar, daß der herzfrequenzsenkende Effekt von Pirenzepin auf einer Blockade präsynaptischer M₁-muskarinerger Autorezeptoren beruht; dies führt zu einer erhöhten Freisetzung des endogenen Acetylcholins, das dann über Stimulation postsynaptischer M₂-Rezeptoren die Herzfrequenz senkt. Die Existenz solcher präsynaptischer Acetylcholin-Autorezeptoren, die die Freisetzung endogenen Acetylcholins modulieren, ist in der Tat in Hühnchen- (5,23), Ratten-(1), Kaninchen- (21) und Meerschweinchen-Vorhöfen (23) (und kürzlich auch in menschlichen Vorhöfen [27]) nachgewiesen worden.

Poller et al. (30) hatten zeigen können, daß Pirenzepin die Herzfrequenz junger Probanden (Alter ca. 25 Jahre) wesentlich stärker senken konnte als die älterer Probanden (Alter > 60 Jahre). Ausgehend davon, daß Pirenzepin seinen negativ chronotropen Effekt durch Hemmung präsynaptischer M₁-muskarinerger Autorezeptoren mit daraus folgender Freisetzung von endogenem Acetylcholin erzielt, könnte die altersabhängige Verminderung dieses Effekts entweder auf eine geringere Freisetzung von Acetylcholin oder eine geringere Ansprechbarkeit der postsynaptischen M₂-Muskarin-Rezeptoren auf freigesetztes Acetylcholin zurückzuführen sein.

Um diese Frage zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit die Dichte von Muskarinrezeptoren im rechten Vorhof von Patienten unterschiedlichen Alters (von 5 Tagen bis 76 Jahren) mit Hilfe von [³H]NMS-Bindungsstudien bestimmt. Durch diese Methode werden nur M₂- Muskarin-Rezeptoren im menschlichen Herzen erfaßt (11, 20). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Dichte der Muskarin-Rezeptoren von Gruppe A (Patienten jünger als 20 Jahre) über Gruppe B (Patienten zwischen 20 und 50 Jahren) bis hin zu Gruppe C (Patienten älter als 50 Jahre); weiterhin bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen der Dichte der Muskarin-Rezeptoren im rechten Vorhof und dem Alter der Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Muskarinrezeptordichte in nicht aufgereinigten ("crude") Membranen des rechten Vorhofs bestimmt. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß es im alternden Herzen zur Fibrose und zu einem Verlust von Myozyten kommt (28); dies könnte natürlich zur altersabhängigen Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Dichte im rechten Vorhof führen. Diese Möglichkeit ist nicht völlig auszuschließen, doch sie erscheint sehr unwahrscheinlich, da verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, daß im kranken menschlichen Herzen, in dem es zu einem wesentlich größeren Verlust an Kardiomyozyten und einer vermehrten Fibrosierung kam, die Muskarin-Rezeptor-Dichte unverändert zu nicht vorgeschädigten menschlichen Herzen war (2, 3, 6, 11, 17, 18).

Die altersabhängige Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Dichte war in der vorliegenden Arbeit begleitet von einer altersabhängigen Abnahme der durch Carbachol hervorgerufenen Hemmung der durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase; darüber hinaus war die Affinität von Carbachol an die rechtsatrialen M₂-Rezeptoren mit zunehmendem Alter signifikant geringer (Abb. 6). Zusammengenommen sind diese Resultate ein Indiz dafür, daß eine altersabhängige Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion im rechten Vorhof des menschlichen Herzens zu der Altersabhängigkeit des anfangs beschriebenen negativ chronotropen Effekts durch Pirenzepin (30) beiträgt. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß an isolierten elektrisch gereizten rechtsatrialen Präparationen des menschlichen Herzens auch gezeigt werden konnte, daß der negativ inotrope Effekt von Carbachol an mit Forskolin vorstimulierten Präparaten mit dem Alter signifikant abnahm (19). Ob die Abnahme der Rezeptor-Dichte oder

die Abnahme der Agonisten-Affinität für diese altersabhängigen Reduktionen entscheidender sind, kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht mit Sicherheit geschlossen werden; der Fakt, daß die Korrelation zwischen dem Alter und der Rezeptor-Dichte relativ schwach war und daß viele Punkte außerhalb des 95%-Vertrauensintervalls lagen, könnte aber darauf hindeuten, daß die verminderte Agonisten-Affinität für die altersabhängige Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Funktion wichtiger ist als die Abnahme der Rezeptor-Dichte. Zusätzlich sei bemerkt, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine verminderte Freisetzung von Acetylcholin zur altersabhängigen Abnahme der negativ chronotropen Wirkung von Pirenzepin beitragen könnte.

Es ist mehrfach gezeigt worden, daß im menschlichen Herzen die β -Adrenozeptor-Funktion mit dem Alter abnimmt (8, 12, 15, 16, 24). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Befunde, sie zeigen, daß nicht nur die durch Isoprenalin hervorgerufene Aktivierung der Adenylyl Zyklase in der Gruppe der alten Patienten signifikant geringer war als in der Gruppe der jungen Patienten, sondern auch die durch GTP (das G_s und G_i stimuliert) und durch Forskolin (das die katalytische Einheit der Adenylyl Zyklase stimuliert) signifikant erniedrigt war. Der Mechanismus der altersabhängigen Abnahme der β -Adrenozeptor-Ansprechbarkeit ist noch nicht vollständig geklärt. Er könnte sowohl auf eine altersabhängige Abnahme der katalytischen Untereinheit der Adenylyl Zyklase (rechter Vorhof [9]) als auch auf eine Abnahme der Anzahl der β -Adrenozeptoren (linker Ventrikel [37]) zurückzuführen sein.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß also im alten menschlichen Herzen sowohl die β -Adrenozeptor- als auch die Muskarin-Rezeptor-Funktion abnimmt, dies ist ein Unterschied zum kranken menschlichen Herzen, in dem es nur zu einer Abnahme der β -Adrenozeptor-Funktion, nicht aber zu einer Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Funktion kommt (Übersichten siehe 6, 7, 8).

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, daß mit steigendem Alter die Muskarin-Rezeptor-Dichte und –Funktion im rechten Vorhof des menschlichen Herzens abnimmt. Diese altersabhängige Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Funktion im rechten Vorhof des menschlichen Herzens könnte eine

Erklärung dafür sein, warum der parasympathomimetische Effekt von niedrig dosiertem Pirenzepin (Senkung der Ruheherzfrequenz) bei jungen Probanden stärker ausgeprägt ist als bei älteren Probanden (30).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob Muskarinrezeptoren des menschlichen Herzens einer altersabhängigen Regulation unterliegen. Zu diesem Zweck wurde in Membranen aus dem rechten Vorhof von 39 Patienten unterschiedlichen Alters (5 Tage bis 76 Jahre alt) ohne erkennbare Anzeichen einer Herzinsuffizienz, die sich einer offenen Herzoperation unterziehen mußten, die rechtsatriale Muskarin-Rezeptor-Dichte (mit Hilfe von $^3\text{H-N-Methylscopolamin}$ Bindungsstudien) und -Funktion (Hemmung der durch $10\mu\text{M}$ Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase durch Carbachol) bestimmt. Es bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen der Dichte der Muskarin-Rezeptoren im rechten Vorhof und dem Alter der Patienten ($r = - 0,3946$, $n = 39$, $P = 0,0129$). In einem Teil der Patienten konnte darüber hinaus die Adenylyl Zyklase - Aktivität in Membranen des rechten Vorhofs bestimmt werden. Die basale, durch $10 \mu\text{M GTP}$, $10 \mu\text{M Isoprenalin}$ und $10 \mu\text{M Forskolin}$ stimulierte Adenylyl Zyklase - Aktivität war in der Gruppe der jüngeren Patienten (mittleres Alter: $10,4 +/- 1,8$ Jahre, $n = 7$) signifikant größer als in der Gruppe der älteren Patienten (mittleres Alter: $67,3 +/- 3,7$ Jahre, $n = 9$). Darüber hinaus war auch die durch Carbachol hervorgerufene Hemmung der durch $10\mu\text{M}$ Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase bei den jüngeren Patienten signifikant stärker ausgeprägt als bei den älteren Patienten. Diese Befunde zeigen, daß im menschlichen Herzen mit zunehmendem Alter die Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion abnehmen.

7. Literatur

1. Bognar IT, Beinhauer B, Kann P, Fuder H: Different muscarinic receptors mediate autoinhibition of acetylcholine release and vagally-induced vasoconstriction in the rat isolated perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 341 (1990) 279 - 287.
2. Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Piesk B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E: Increase of G_i in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. Circulation 89 (1990) 164 - 168.
3. Böhm M, Ungerer M, Erdmann E: Beta adrenoceptors and m-cholinoceptors in myocardium of hearts with coronary artery disease or idiopathic dilated cardiomyopathy removed at cardiac transplantation. Am. J. Cardiol. 66 (1990) 880 - 882.
4. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248 - 254.
5. Brehm G, Lindmar R, Löffelholz K: Inhibitory and excitatory muscarinic receptors modulating the release of acetylcholine from the postganglionic parasympathetic neuron of the chicken heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346 (1992) 375 - 382.
6. Bristow MR: Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. 22 (Suppl. 4) (1993) 61A - 71A.
7. Brodde O-E, Michel MC, Zerkowski H-R: Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. Cardiovasc. Res. 30 (1995) 570 - 584.

8. Brodde O-E, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* (1999) 651 - 689.
9. Brodde O-E, Zerkowski H-R, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schäfer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, Oelert H: Age-dependent changes of the β -adrenoceptor-G-Protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (1995) 20 - 26.
10. Caulfield MP, Birdsall NJM: International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 279 - 290.
11. Deighton NM, Motomura S, Borquez D, Zerkowski H-R, Doetsch N, Brodde O-E: Muscarinic Cholinoreceptors in the human heart: demonstration, subclassification, and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341 (1990) 414 - 421.
12. Docherty JR: Cardiovascular responses in aging: a review. *Pharmacol. Rev.* 42 (1990) 103 - 125.
13. Eglen RM, Watson N: Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. *Pharmacol. Toxicol.* 78 (1996) 59 - 68.
14. Felder CC: Muscarinic acetylcholin receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9 (1995) 619 - 625.
15. Ferrara N, Davia K, Abete P, Rengo F, Harving SE: Alterations in β -adrenoceptor mechanisms in the aging heart: Relationship with heart failure. *Aging Clin. Exp. Res.* 9 (1997) 391 - 403.
16. Folkow B, Svanborg A: Physiology of cardiovascular aging. *Physiol. Rev.* 73 (1993) 725 - 764.

17. Fu L-X, Liang Q-M, Waagstein F, Hoebeke J, Sylven C, Jansson E, Sotonyi P, Hjalmarson A: Increase in functional activity rather than in amount of G_i-α in failing human heart with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 26 (1992) 950 - 955.
18. Giessler C, Dhein S, Pönicke K, Brodde O-E: Muscarinic receptors in the failing human heart. *Eur. J. Pharmacol.* 375 (1999) 197 - 202.
19. Giessler C, Wangemann T, Zerkowski H-R, Brodde O-E: Age-dependent decrease in the negative inotropic effect of carbachol on isolated human right atrium. *Eur. J. Pharmacol.* 357 (1998) 199 - 202.
20. Giraldo E, Martos F, Gomez A, Garcia A, Vigano MA, Ladinsky H, Sanchez de la Cuesta F: Characterization of muscarinic receptor subtypes in human tissues. *Life Sci.* 43 (1988) 1507 - 1515.
21. Habermeier-Muth A, Altes U, Forsyth KM, Muscholl E: A presynaptic excitatory M₁ muscarine receptor at postganglionic cardiac noradrenergic nerve fibres that is activated by endogenous acetylcholine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342 (1990) 483 - 489.
22. Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ: Muscarinic receptors subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1990) 633 - 673.
23. Jeck D, Lindmar R, Löffelholz K, Wanke M: Subtypes of muscarinic receptors on cholinergic nerves and atrial cells of chicken and guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* 93 (1988) 357 - 366.
24. Lakatta EG: Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol. Rev.* 73 (1993) 413 - 467.

25. Landzberg JS, Parker JD, Gauthier DF, Colluci WS: Effect of intracoronary acetylcholine and atropine on basal and dobutamin-stimulated left ventricular contractility. *Circulation.* 89 (1994) 164 - 168
26. Meyer EC, De Sommers K: Possible mechanisms of anti-cholinergic drug-induced bradycardia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 35 (1988) 503 - 506.
27. Oberhauser V, Schwertfeger E, Rutz T, Beyersdorf F, Rump LC: Acetylcholine release in human heart atrium. Influence of muscarinic autoreceptors , diabetes and age. *Circulation* 103 (2001) 1638 - 1643.
28. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P: Cardiomyopathy of the aging human heart: Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Cirv. Res.* 68 (1991) 1560 - 1568.
29. Pitschner HF, Wellstein A: Dose-response curves of pirenzepine in man in relation to M₁ - and M₂-cholinoreceptor occupancy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338 (1988) 207 - 210.
30. Poller U, Nedelka G, Radke J, Pönicke K, Brodde O-E: Age-dependent changes in cardiac muscarinic receptor function in healthy volunteers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29 (1997) 187 -193.
31. Roth GS: Hormone receptor changes during adulthood and senescence: significance for aging research. *Fed Proc.* 38 (1979) 1910 - 1914.
32. Salomon Y, Londos C, Rodbell M: A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58 (1974) 541 - 548.
33. Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. Ny Acad. Sci.* 51 (1949) 660 - 672.

34. Von Scheidt W, Böhm M, Stäblein A, Authenrieth G, Erdmann E: Antidiuretic effect of M-cholinoreceptor stimulation on human ventricular contractility in vivo. Am. J. Physiol. 263 (1992) H1927 - H1931.
35. Wellstein A, Pitschner HF: Complex dose-response curves of atropine in man explained by different functions of M₁- and M₂-cholinoreceptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 338 (1988) 19 - 27.
36. Wess J: Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. Crit. Rev. Neurobiol. 10 (1996) 69 - 99.
37. White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, Port D, Anderson F, Campbell D, Feldmann AM, Bristow MR: Age-related changes in β-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. Circulation. 90 (1994) 1225 - 1238.

8. Tabellen und Abbildungen

| Pat. Nr. | Alter in Jahren | Geschlecht | Diagnose | NYHA- Stadium | Medikation (Wirkstoff) | Anzahl Rez. (fmol/mg) | Kd (nM) |
|-------------|--------------------|------------|--|------------------|--|--------------------------|------------|
| 1 | 0,014 | w | 1. Atrium-Septumdefekt; 2. Ventrikel-Septumdefekt; 3. fehlgebildeter Aortenbogen | - | Depril ; Refobacin (Gentamicin); Mucosolvan (Ambroxol-HCl) | 171 | 1,77 |
| 2 | 0,014 | m | 1. Pulmonal-atresie | - | keine Angabe | 132 | 2,61 |
| 3 | 1,0 | w | 1. AV-Septumdefekt; 2. Ductus art. persistens | - | keine Angabe | 106 | 0,76 |
| 4 | 2,3 | w | 1. AV-Kanal | - | keine Angabe | 123 | 4,0 |
| 5 | 3,6 | w | 1. Pulmonal-stenose | I | keine Angabe | 80,5 | 1,23 |
| 6 | 5,1 | w | 1. Ventrikel-Septumdefekt | - | keine Angabe | 117,5 | 1,23 |
| 7 | 6,1 | m | 1. Ventrikel-Septumdefekt | I | keine Angabe | 109 | 0,91 |
| 8 | 9,2 | m | 1. Atrium-Septumdefekt (Fo-Type) | - | keine Angabe | 173 | 1,88 |
| 9 | 10,0 | w | 1. Atrium-SeptumdefektII | - | keine Angabe | 107 | 0,70 |
| 10 | 11,8 | w | 1. Ventrikel-Septumdefekt | - | keine Angabe | 91,5 | 1,73 |
| 11 | 12,6 | w | 1. Aorten-Stenose | - | keine Angabe | 160,5 | 1,19 |
| 12 | 14,2 | m | 1. Aneurysma; Rechts-Links-Shunt | - | keine Angabe | 173 | 1,56 |
| 13 | 14,6 | m | 1. Aorten-Stenose | I - II | keine Angabe | 187 | 0,36 |
| 14 | 15,5 | m | 1. Aorten-Insuff. III -IV | - | keine Angabe | 150 | 0,17 |

Anästhesie bei allen Patienten: Dormicum; Pancuronium; Fentanyl; Isofluran

Tabelle 1: Patientengut der Altersgruppe A

| Pat. Nr. | Alter in Jahren | Geschlecht | Diagnose | NYHA- Stadium | Medikation (Wirkstoff) | Anzahl Rez. (fmol/mg) | Kd (nM) |
|---------------------|----------------------------|-------------------|---|--------------------------|--|----------------------------------|--------------------|
| 15 | 21,8 | m | 1. Aorten- Insuff. III° 2. Aorten- Stenose I° | II-III | keine Angabe | 62,5 | 0,89 |
| 16 | 26 | m | 1. Fallot- Tetralogie | | keine Angabe | 110,5 | 0,82 |
| 17 | 27,3 | m | 1. kombiniertes Aorten-vitium 2. Aorten- Ins. III° | III | - Heparin s.c. | 87 | 1,31 |
| 18 | 28 | m | 1. Ventrikel- Septumdefekt | II | keine Angabe | 141 | 3,33 |
| 19 | 32,7 | m | 1. Bakterielle Endokarditis 2. Aorten- Insuff. III° 3. Mitral- Insuff. II° | III | - Digitoxin - Furosemid - Ranitidin - Penicillin G | 115 | 1,72 |
| 20 | 33,7 | w | 1. Aorten- Insuff. III°-IV° | II-III | keine Angabe | 72 | 0,95 |
| 21 | 40,7 | m | 1. Koronare Herzkrankheit | II-III | - Isosorbidmono- nitrat - Molsidomin - Piretanid - Captopril - Metoprolol - Lovastatin - Heparin s.c. | 128 | 0,92 |
| 22 | 41,9 | w | 1. Aorten- Stenose III°-IV° 2. Aorten- Insuff. II° 3. Mitral- Insuff. I° | III | - Heparin s.c. | 161 | 1,02 |
| 23 | 43,0 | m | 1. Aorten- Stenose III° | keine Angabe | - Isosorbidmono- nitrat | 155 | 1,14 |

Anästhesie bei allen Patienten: Dormicum; Pancuronium; Fentanyl; Isofluran

Tabelle 2: Patientengut der Altersgruppe B

| Pat. Nr. | Alter in Jahren | Geschlecht | Diagnose | NYHA- Stadium | Medikation (Wirkstoff) | Anzahl Rez. (fmol/mg) | Kd (nM) |
|-------------|--------------------|------------|---|------------------|---|--------------------------|------------|
| 24 | 55,4 | m | 1. Aorten- Insuffizienz III° 2. Aorten- Stenose I° | II-III | Digitoxin; Furosemid; Fe2+; Folsäure; Cyanocobalamin; Heparin s.c. | 75 | 0,11 |
| 25 | 56,0 | m | 1. Mitralsuffi- zienz III°-IV° | III | Vancomycin; Amikacin; Maninil; Captopril; Molsidomin; Heparin s.c. | 105 | 1,83 |
| 26 | 57,7 | m | 1. KHK - 2-Gefäßkr. | II | Isosorbidenonitrat; Metoprolol; Heparin s.c. | 73 | 1,13 |
| 27 | 59,8 | m | 1. KHK - 3-Gefäßkr. | II-III | Lovastatin; Lisinopril; Furosemid; Isosorbidenitrat; Heparin s.c. | 58 | 5,07 |
| 28 | 62,2 | m | 1. KHK | II | ASS100; Haes500; Molsidomin; Lovastatin; Heparin s.c. | 78 | 0,55 |
| 29 | 63,0 | w | 1. KHK - 3-Gefäßkr. | III | Maninil; ASS100; Captopril; Lovastatin; Metoprolol; Isosorbidenonitrat | 118 | 0,52 |
| 30 | 67,7 | m | 1. KHK 2. Mitralsuffi- zienz II°-III° | III | Isosorbidenitrat; Verapamil; Digitoxin; Captopril; Fenoterol; Prednisolut; Heparin s.c. | 38 | 1,36 |
| 31 | 69,1 | m | 1. KHK - Mehrgefäßkr. | II-III | Nifedipin; ASS 100 | 138 | 0,28 |
| 32 | 70,0 | m | 1. KHK - 3-Gefäßkr. | keine Angabe | Lovastatin; Isosorbidenitrat; Cilazapril; Propranolol; Thiamazo l | 84 | 0,10 |
| 33 | 70,3 | w | 1. KHK - 2-Gefäßkr. | keine Angabe | Metoprolol; Lovastatin; Benazepr il; Isosorbidenonitrat; Heparin s.c. | 143 | 1,76 |
| 34 | 71,7 | m | 1. KHK | III | Pentoxyfyllin; Celiprolol; Nifedipin | 92,5 | 3,89 |
| 35 | 71,8 | m | 1. KHK - 3-Gefäßkr. | II-III | Molsidomin; Cilazapril; Metoprolol; ASS100; Pulmicort spray | 120 | 0,43 |
| 36 | 73,4 | w | 1. KHK - 3-Gefäßkr. 2. Z.n. Hinter- wandinfarkt 9/96 | III | Trimethoprim+Sulfamethoxazol; Urapidil; Captopril; Metoprolol; Isosorbidenonitrat; Lovastatin; Furosemid; Heparin s.c. | 125 | 1,87 |
| 37 | 74,2 | w | 1. Aorten- Sten. II° 2. Aorten-Insuffi- zienz. II° | III | Digitoxin; Nitrendipin; Heparin s.c. | 100,5 | 1,76 |
| 38 | 74,6 | m | 1. KHK | III | Furosemid; Isosorbidenonitrat | 70 | 0,91 |
| 39 | 76,8 | w | 1. KHK 2. Mitralsuffizienz | I | Trimethoprim+Sulfamethoxazol; Maninil; Pentoxyfyllin; Furosemid; Sotalol; Captopril; Isosorbidenitrat; Molsidomin; Heparin s.c. | 75 | 1,36 |

Anästhesie bei allen Patienten: Dormicum; Pancuronium; Fentanyl; Isofluran

Tabelle 3: Patientengut der Altersgruppe C

Adenylyl Zyklase-Aktivität

| | Gruppe A (n = 7) | Gruppe C (n = 9) |
|-----------------------------------|------------------|------------------------------|
| <i>pmol cAMP/ mg Protein/ min</i> | | |
| Basal | 62.1 +/- 9.2 | 39.6 +/- 4.4 ^{a)} |
| GTP | 81.9 +/- 5.0 | 57.8 +/- 4.1 ^{b)} |
| ISO | 42.6 +/- 5.6 | 26.4 +/- 2.7 ^{c)} |
| FOR | 1104.9 +/- 60.5 | 703.1 +/- 53.7 ^{d)} |

Tabelle 4: Adenylyl Zyklase - Aktivität in Membranen des rechten Vorhofs von 7 Patienten der Gruppe A (< 20 Jahre) und 9 Patienten der Gruppe C (> 50 Jahre).

Gruppe A: mittleres Alter 10,4 +/- 1,8 Jahre (n = 7)

Gruppe C: mittleres Alter 67,3 +/- 2,7 Jahre (n = 9)

Einzelheiten siehe Methoden und Ergebnisse.

Die basale Adenylyl Zyklase-Aktivität (Basal) ist angegeben in pmol cAMP/mg Protein/min; die GTP-, Isoprenalin- und Forskolin-stimulierte Adenylyl Zyklase - Aktivität als Nettozunahme der Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min.

Angegeben sind Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes von 7 (Gruppe A) bzw. 9 (Gruppe C) Versuchen.

GTP: 10 µM GTP - basal

ISO: 10 µM Isoprenalin - GTP

FOR: 10 µM Forskolin - GTP

^{a)} p = 0,0324; ^{b)} p = 0,0021; ^{c)} p = 0,0148; ^{d)} p < 0,0003 vs. den entsprechenden Werten in Gruppe A.

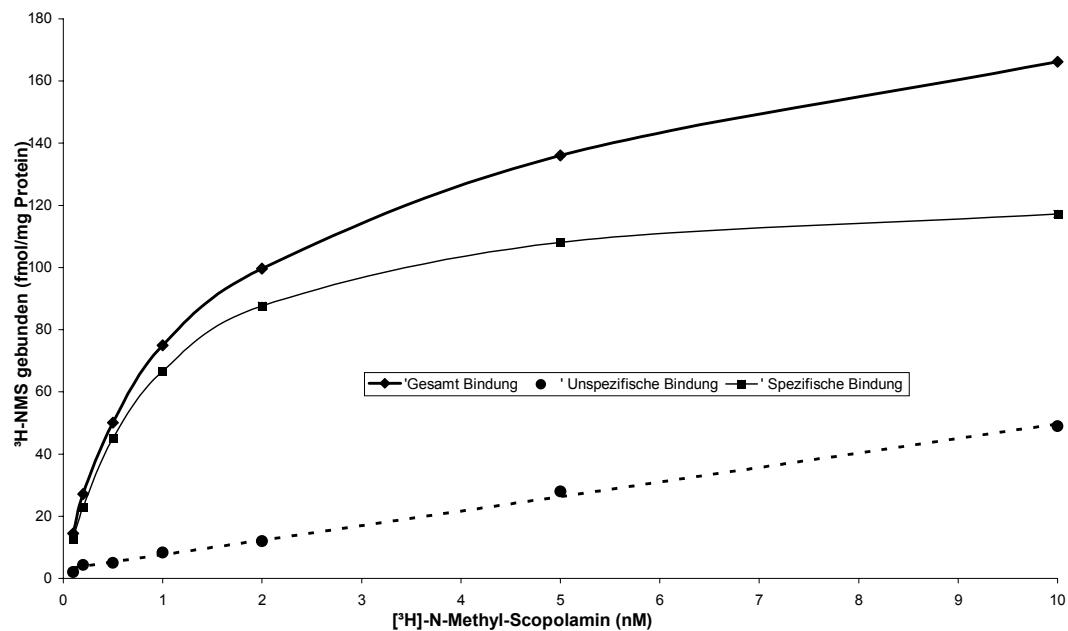


Abbildung 1: Bindung von $[^3\text{H}]$ -NMS an Membranen aus dem rechten Vorhof des menschlichen Herzens als Funktion steigender $[^3\text{H}]$ -NMS - Konzentrationen. Die Membranen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von $[^3\text{H}]$ -NMS (0,1 - 10 nM) in Abwesenheit (◆-◆ = Gesamtbinding) und Anwesenheit (●-● = unspezifische Bindung) von 1 μM Atropin inkubiert, um die spezifische Bindung zu bestimmen

(■-■). Die Abbildung zeigt ein typisches Bindungsexperiment (Patient Nr. 21).

Ordinate: $[^3\text{H}]$ -NMS gebunden (fmol/mg Protein)

Abszisse: freies $[^3\text{H}]$ -NMS (nM).

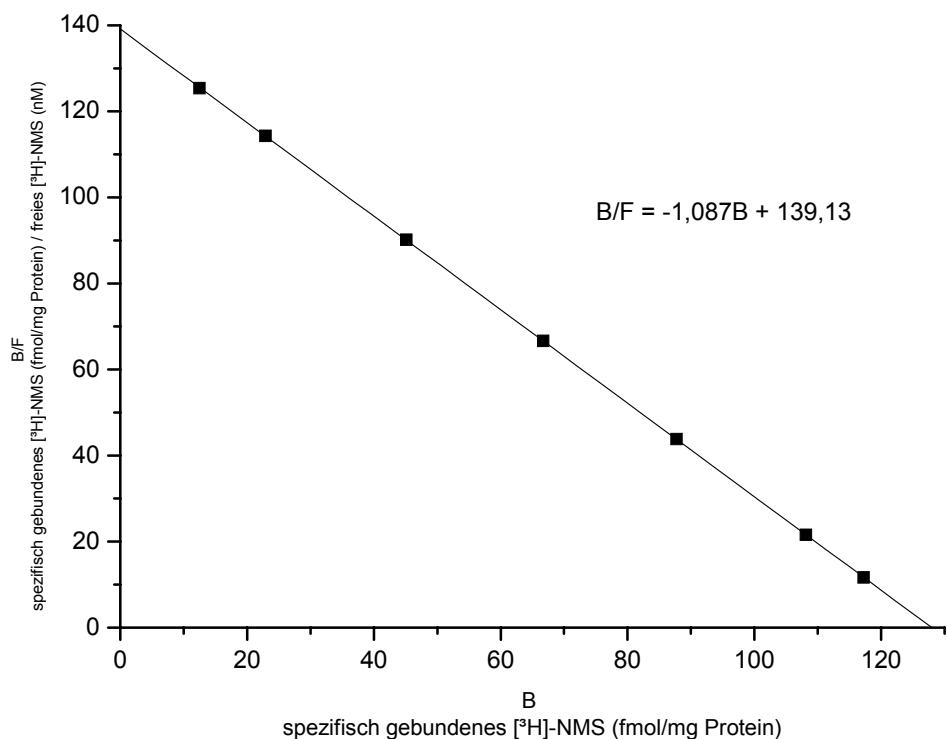


Abbildung 2: Scatchard-Analyse (1949) der spezifischen [³H]NMS - Bindung von Abbildung 1. Das Verhältnis B/F von spezifisch gebundenem [³H]NMS (fmol/ mg Protein) zu freiem [³H]NMS (nM) ist aufgetragen als Funktion von B = spezifisch gebundenes [³H]NMS (fmol/mg Protein).

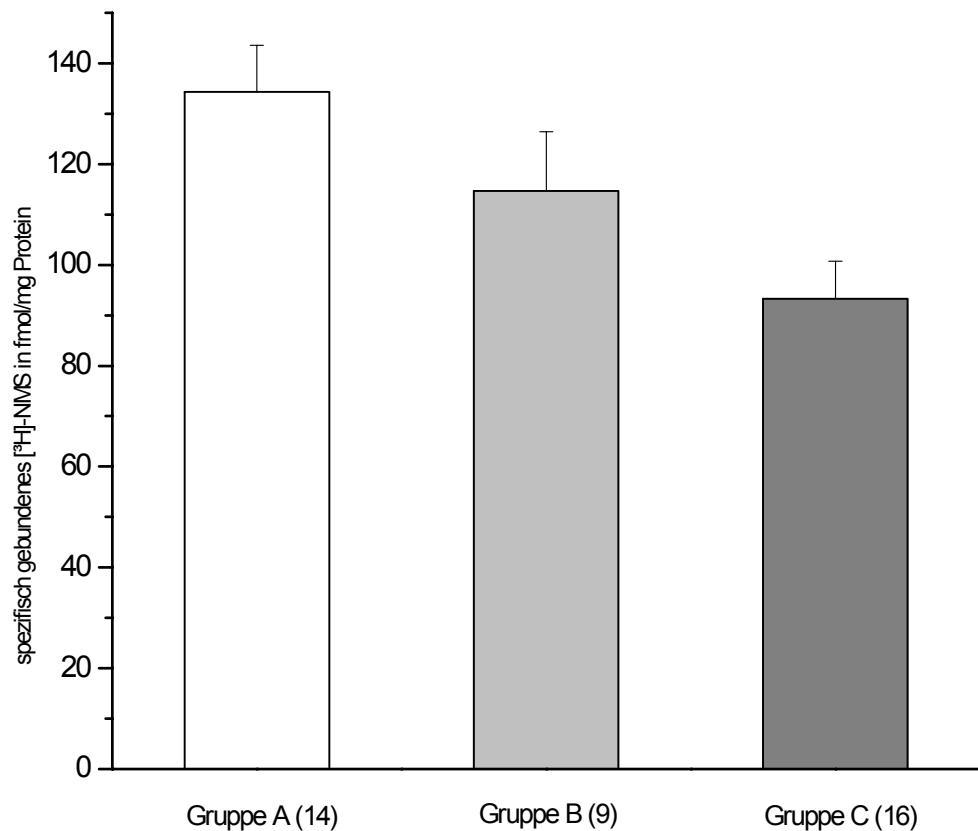


Abbildung 3: Muskarin-Rezeptor-Dichte in Membranen aus dem rechten Vorhof von Patienten verschiedenen Alters;

Gruppe A (< 20 Jahre alt, weiße Säule, n = 14)

Gruppe B (20 - 50 Jahre alt, hellgraue Säule, n = 9)

Gruppe C (> 50 Jahre alt, dunkelgraue Säule, n = 16), Einzelheiten siehe Methoden.

Ordinaten: Spezifisch gebundenes $[^3\text{H}]$ NMS in fmol/mg Protein, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche.

Die K_D -Werte für $[^3\text{H}]$ NMS betragen in Gruppe A 1.43 +/- 0.26 nM (n = 14), in Gruppe B 1.35 +/- 0.27 nM (n = 9) und in Gruppe C 1.43 +/- 0.34 nM (n = 16).

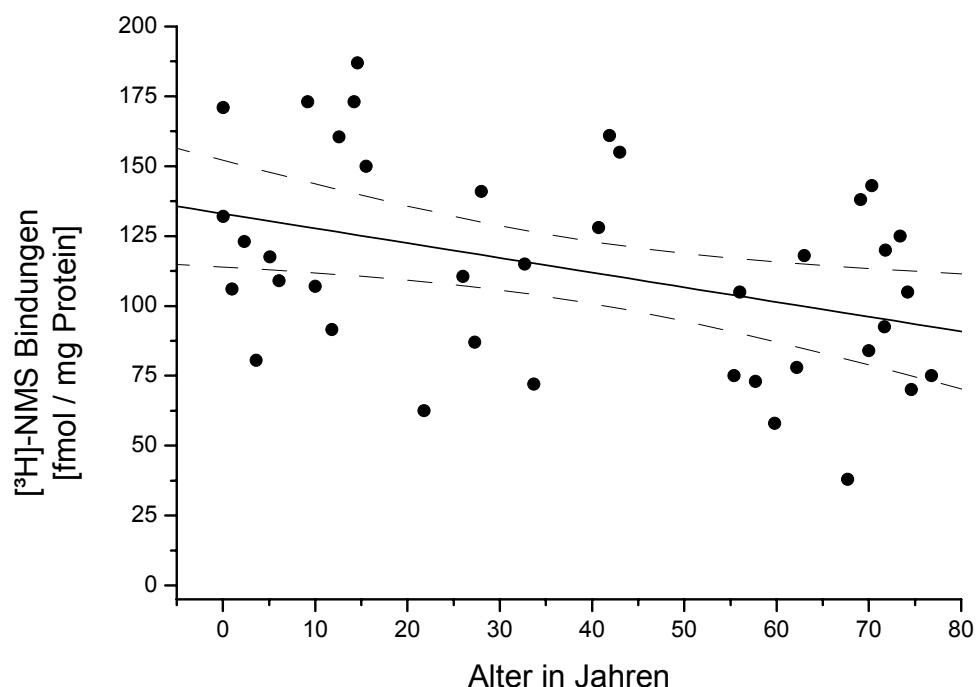


Abbildung 4: Korrelation zwischen rechtsatrialer Muskarin-Rezeptor-Dichte und Alter der 39 untersuchten Patienten, Einzelheiten siehe Methoden.

Ordinate: Muskarin-Rezeptor-Dichte in Membranen des rechten Vorhofs in femtomol spezifisch gebundenes [³H]NMS / mg Protein.

Abszisse: Alter der Patienten.

$$y = -0.531x + 132.9; n = 39; r = -0.3946; P = 0,0129.$$

Die gestrichelten Linien beschreiben das 95% - Konfidenzintervall für die Regressionslinie.

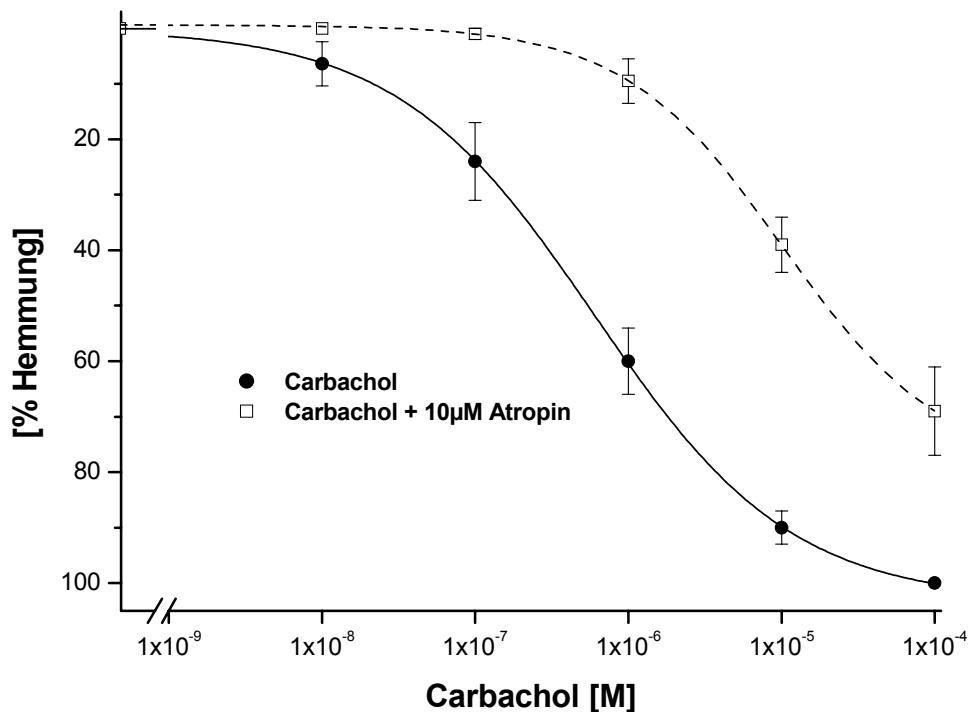


Abbildung 5: Einfluß von Atropin (10 μ M) auf die durch Carbachol hervorgerufene Hemmung der durch 10 μ M Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase - Aktivität in Membranen des menschlichen rechten Vorhofs.

Ordinate: Hemmung der Adenylyl Zyklase - Aktivität in % ; Abszisse: molare Konzentrationen von Carbachol.

Angegeben sind Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes von jeweils 5 Versuchen.

Die basale Adenylyl Zyklase - Aktivität (in Gegenwart von 10 μ M GTP) war 122,9 +/- 11 pmol cAMP/mg Protein/min, die durch 10 μ M Forkolin-stimulierte Adenylyl Zyklase - Aktivität betrug 988,9 +/- 82 pmol cAMP/mg Protein/min.

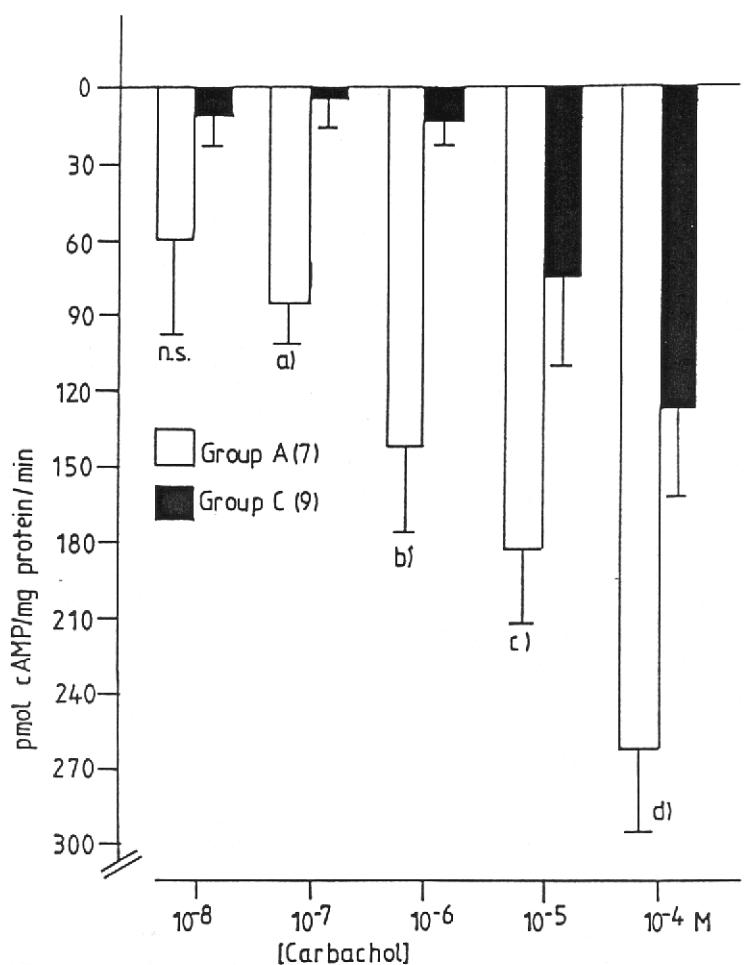


Abbildung 6: Hemmung der durch $10\mu\text{M}$ Forskolin stimulierten Adenylat-Cyclase-Aktivität durch Carbachol in Membranen des rechten Vorhofs von 7 Patienten der Gruppe A (< 20 Jahre alt, weiße Balken) und 9 Patienten der Gruppe C (> 50 Jahre alt, schwarze Balken). Einzelheiten siehe Methoden und Ergebnisse.

Ordinate: Hemmung der Adenylyl Zyklase - Aktivität in pmol cAMP/mg Protein/min; Abszisse: molare Konzentrationen von Carbachol.

Angegeben sind Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes von 7 (Gruppe A) bzw. 9 (Gruppe C) Versuchen.

Basale Aktivität und durch $10 \mu\text{M}$ Forskolin-stimulierte Aktivität siehe Tabelle 4.

n.s., $P = 0,1960$; a), $P = 0,0083$; b), $P = 0,0028$; c), $P = 0,041$; und d), $P = 0,0083$ gegen die Korrespondenzwerte für Gruppe C (ungepaarte, doppelte t-Verteilung).

9. Thesen

1. Die Dichte der M₂-Muskarin-Rezeptoren im rechten menschlichen Vorhof nimmt mit zunehmendem Alter signifikant ab. Es besteht eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der M₂-Muskarin-Rezeptordichte im rechten menschlichen Vorhof.
2. Sowohl die basale als auch die durch GTP, Isoprenalin und Forskolin stimulierte Aktivität der Adenylyl Zyklase ist im rechten Vorhof junger Patienten höher als bei älteren Patienten. Dies spricht für eine Abnahme der β-Adrenozeptorfunktion mit zunehmendem Alter.
3. Bei der Hemmung der durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase durch den Muskarin-Rezeptor-Agonisten Carbachol führt der nicht selektive Muskarin-Rezeptor-Antagonist Atropin zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrationshemmungskurve. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Hemmung der Adenylyl Zyklase - Aktivität über Muskarin-Rezeptoren vermittelt wird.
4. Der Muskarin-Rezeptor-Agonist Carbachol bewirkt an Membranen des rechten menschlichen Vorhofs in signifikanter Weise bei jungen Patienten eine stärkere Hemmung der zuvor durch Forskolin stimulierten Adenylyl Zyklase als bei älteren Patienten, was für eine Abnahme der Muskarin-Rezeptor-Funktion im Alter spricht.

Anhang I

Lebenslauf

| | |
|-------------------|--|
| Name: | Ulrich Konschak |
| Geburtsdatum: | 05. Dezember 1971 |
| Geburtsort: | Nordhausen |
| Familienstand: | ledig |
| 09/1978 -07/1988 | Besuch der Polytechnischen Oberschule in Nordhausen, Klasse mit erweitertem Russisch-Unterricht ab 1980 |
| 09/1988 -07/1990 | Besuch der Erweiterten Oberschule in Nordhausen mit Ablegung der Hochschulreife |
| 09/1990 - 08/1991 | Ableistung des Zivildienstes im Südharz-Krankenhaus Nordhausen als pflegerische Hilfskraft auf einer kardiologischen Station |
| 10/1991 -09/1992 | Arbeit als Hilfskraft in einem Notariat in Nordhausen |
| 10/1992 | Beginn des Medizinstudiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 09/1994 | Ablegung der ärztlichen Vorprüfung |
| 08/1995 | Ablegung des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung |
| 03/1998 | Ablegung des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung |
| 05/1999 | Ablegung des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung |
| 07/1999 -06/2001 | Arzt im Praktikum bzw. Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin des Klinikums Bernburg |
| seit 07/2001 | Assistenzarzt in der Klinik für Pädiatrie des Klinikums Bernburg |

Anhang II

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation "Altersabhängige Veränderungen der M₂-Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion im rechten Vorhof des menschlichen Herzens" von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Halle/Saale, 23. August 2001

Ulrich Konschak

Anhang III

Publikation von Ergebnissen der Arbeit

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse sind Teil folgender Veröffentlichung:

Brodde O-E, Konschak U, Becker K, Rüter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski H-R. Cardiac Muscarinic Receptors Decrease with Age - in vitro and in vivo Studies. Journal of Clinical Investigation 101 (1998) 471 - 478.

Anhang IV

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation "Altersabhängige Veränderungen der M₂-Muskarin-Rezeptor-Dichte und -Funktion im rechten Vorhof des menschlichen Herzens" zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird.
Außer diesem liegen von mir keine weiteren Anträge auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, 23. August 2001

Ulrich Konschak

Anhang V

Danksagung

Mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung in praktischen wie theoretischen Fragen in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. O.-E. Brodde.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. K. Becker für die Beratung ebenso bedanken wie bei Frau P. Matthes für die Hilfe vor allem bei der praktischen Arbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei meiner Freundin, Katja Wollschläger.