

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

Direktor: Professor Dr. med. J. Neumann

**Kardiale α -1-Adrenozeptor-Veränderungen im Monocrotalin-Ratten-Modell
der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz**

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

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

**von Hans-Peter Gerbershagen
geboren am 09.01.1971 in Aalen**

Gutachterin bzw Gutachter:

- 1. Herr Prof. Brodde**
- 2. Frau PD Dr. Katschinski**
- 3. Herr Prof. Schlüter**

Halle 03.03.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010179

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010179>]

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des α -adrenergen Rezeptorsystems in Kardiomyozyten von adulten Ratten mit einer isolierten Rechtsherzhypertrophie. Als Modell für die Induktion der Rechtsherzhypertrophie diente das etablierte Monocrotalin (MCT)-Modell. Die Versuchstiere entwickelten nach einmaliger intraperitonealer Monocrotalin-Injektion eine pulmonale Hypertonie mit sekundärer Rechtsherzhypertrophie, was sich in einem erhöhten rechtsventrikulären Druck und einem erhöhten Gewicht des rechten Ventrikels widerspiegelte. Ebenso fanden sich erhöhte Plasmanoradrenalinpiegel. Die α -Adrenozeptor (AR)-Dichte in Kardiomyozyten war bei den Kontrolltieren im rechten und linken Ventrikel nahezu gleich. Bei den MCT-Ratten fand sich eine signifikante Abnahme der α -AR-Dichte nur in Zellen des rechten Ventrikels, während sie im linken Ventrikel nur unwesentlich abnahm. Die der α -1-AR Stimulation nachgeschaltete Inositoltriphosphat (IP_3)-Bildung war in rechtsventrikulären Kardiomyozyten von MCT-Ratten signifikant reduziert, während sie bei linksventrikulären Kardiomyozyten leicht aber nicht signifikant abnahm. Im Gegensatz zur α -1-AR-Dichte und der durch α -1-AR Stimulation hervorgerufenen Zunahme der IP_3 -Bildung war die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese, die durch α -1-AR Stimulation vermittelt wird und durch β -1-AR Stimulation gehemmt werden kann, in den Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten nicht kammer-spezifisch sowohl in rechts- als auch in linksventrikulären Zellen leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Blockade der β -1-AR durch 300 nM CGP 20712 A führte in rechts- wie linksventrikulären Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Noradrenalin-induzierten Proteinsynthese. Interessanterweise waren in Gegenwart von CGP 20712 A die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese in rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten von denen in Kontroll-Ratten nicht mehr unterschiedlich. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass in MCT-behandelten Ratten das kardiale α -1-AR System kammer-spezifisch im rechten Ventrikel erniedrigt ist. Die Tatsache, dass dies zwar für die durch α -1-AR Stimulation vermittelte Zunahme der IP_3 -Bildung, nicht jedoch für die Proteinsynthese gilt, deutet daraufhin, dass verschiedene α -1-AR Subtypen (α -1B-AR für die IP_3 -Bildung und α -1A-AR für die Proteinsynthese) an diesen Prozessen beteiligt sein könnten.

Gerbershagen, Hans-Peter: Kardiale α -1-Adrenozeptor-Veränderungen im Monocrotalin-Ratten-Modell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologie und Pathogenese der Herzhypertrophie und -insuffizienz	1
1.2.	Adrenerge Rezeptorsysteme des Herzens	3
1.3.	Adrenerge Rezeptorsysteme im insuffizienten Herz	4
1.4.	Tiermodell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz	7
1.5.	Fragestellung	9
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Material	10
2.1.1.	Verwendete Chemikalien	10
2.1.2.	Verwendete Lösungen	11
2.1.3.	Verwendete Geräte	11
2.1.4.	Einmalartikel	12
2.2.	Methoden	12
2.2.1.	Monocrotalin-Modell	12
2.2.2.	Entnahme und Präparation der Rattenherzen	13
2.2.3.	Enzymatische Isolierung der Kardiomyozyten	13
2.2.4.	Aufbereitung der Kardiomyozyten	14
2.2.5.	Zellkultur	15
2.2.6.	Stimulierung der Proteinsynthese mit Noradrenalin und Quantifizierung über Bestimmung der [³ H]-Phenylalanin-Inkorporation	15
2.2.7.	Invasive Messung des rechtsventrikulären Druckes	16
2.2.8.	Noradrenalinbestimmung	17
2.2.9.	Membran-Präparation aus Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels	18
2.2.10.	Bestimmung der α -1-AR-Dichte	18
2.2.11.	Inositol-Phosphat-Bildung	19
2.2.12.	Statistische Auswertung	19

3.	Ergebnisse	21
3.1.	Körpergewicht und Ventrikelgewicht der Versuchstiere	21
3.2.	Rechtsventrikuläre Druckmessung	21
3.3.	Plasmanoradrenalin Spiegel	22
3.4.	Anteil an stäbchenförmigen Kardiomyozyten aus Präparationen von rechten und linken Ventrikeln	23
3.5.	α -Adrenozeptor-Dichte in Kardiomyozyten des linken und rechten Ventrikels des Rattenherzens	24
3.6.	Inositol-Phosphat-Bildung	26
3.7.	Proteinsynthese	27
3.7.1.	Proteinsynthese in Kardiomyozyten von Kontrolltieren	27
3.7.2.	Proteinsynthese in Kardiomyozyten von MCT-Ratten	32
3.7.3.	Vergleich der Proteinsynthese in Kardiomyozyten aus MCT-Ratten gegen Kontrollen	36
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	48
6.	Literaturverzeichnis	50
7.	Thesen	60
8.	Lebenslauf	
9.	Erklärung	
10.	Vorabpublikationen	
11.	Danksagung	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AV	atrioventrikular
AZ	Adenylatzyklase
α -, β -AR	alpha-, beta-Adrenozeptor
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ci/ μ Ci	Curie/Mikrocurie
DAG	Diaclyglycerin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälber Serum)
g	Gravitationskonstante ($9,81 \text{ kg} \times \text{s}^2/\text{m}$)
G_i	inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
G_s	stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein
G_q	chemotaktisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KG	Körpergewicht
kg, g, mg, μ g	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
Lsg.	Lösung
M	Molarität
MCT	Monocrotalin
MCTP	Monocrotalinpyrrol
μ M, mM	Mikromolar, Millimolar
n	Anzahl der Experimente

Abkürzungen

NA	Noradrenalin
p	Signifikanz
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TGF- β	Transforming growth factor-beta
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Pathogenese der Herzhypertrophie und -insuffizienz

Die Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz hat in den sog. Industriestaaten zugenommen und ist hier eine der häufigsten internistischen Diagnosen. Ursächlich kann u.a. die steigende Lebenserwartung, sowie die zunehmende Verbesserung der medizinischen Behandlung akuter Koronarsyndrome angesehen werden.

Unter dem Begriff der Herzinsuffizienz versteht man ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Es definiert das Unvermögen des Herzens, das für zirkulatorische und metabolische Anforderungen des Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern.

Die Definition der Herzinsuffizienz der WHO lautet: Verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung.

In der Klinik hat sich die Stadieneinteilung der New York Heart Association [NYHA], modifiziert nach Roskamm u. Reindell (1982) durchgesetzt:

- I. Normale körperliche Leistungsfähigkeit; in Ruhe und unter Belastung keine Symptome oder Beschwerden, Füllungsdruck und/oder enddiastolisches Volumen bei erheblicher Belastung erhöht.
- II. Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit; Beschwerden erst bei stärkeren Anstrengungen, Herzminutenvolumen in Ruhe und bei Belastung normal, enddiastolisches Volumen und/oder Füllungsdruck bereits in Ruhe erhöht.
- III. Erhebliche Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit; nur noch leichte berufliche Tätigkeit bzw. Hausarbeit möglich. Herzminutenvolumen bei Belastung unzureichend.
- IV. Beschwerden und Symptome in Ruhe; Herzminutenvolumen in Ruhe unzureichend (Ruheinsuffizienz).

Eine Herzinsuffizienz kann durch eine primäre Erkrankung des Herzens wie Kardiomyopathien, koronare Herzkrankheit, Anomalien der Herzklappen oder

Herzrhythmusstörungen hervorgerufen werden. Darüber hinaus können extrakardiale Faktoren wie arterielle Hypertonie, endokrinologische Erkrankungen (z.B. Hyper-, Hypothyreose), chronische Volumenbelastung (z.B. AV-Fistel, Niereninsuffizienz) zu einer Herzinsuffizienz führen.

Je nach der bevorzugt betroffenen Kammer unterscheidet man:

1. Linksherzinsuffizienz
2. Rechtsherzinsuffizienz
3. Globalherzinsuffizienz

Nach dem zeitlichen Verlauf teilt man ein in:

1. Akute Links-/Rechtsherzinsuffizienz (z.B. Myokardinfarkt/ Lungenembolie)
2. Chronische Herzinsuffizienz (kompensiert/ dekomponiert)

Die Pumpleistung des Herzens ist abhängig von:

1. Kontraktilität
2. Nachlast
3. Herzfrequenz

Die Kontraktilität kann über drei wesentliche Mechanismen gesteigert werden:

1. Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Wandspannungs-Beziehung, Starling u. Visscher 1926)

Über eine zunehmende Vorlast (enddiastolisches Ventrikelvolumen) erhöht sich die diastolische Vordehnung, woraus (in physiologischen Grenzen) das Schlagvolumen zunimmt.

2. Bowditch-Effekt (Kraft-Frequenz-Beziehung, Bowditch 1871)

Am gesunden Herzen kommt es mit zunehmender Frequenz auch zu einer Zunahme der Kontraktionskraft.

3. Sympatho-adrenerge Aktivierung

Vermehrte Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin führt über eine Stimulierung kardialer β -1-Adrenozeptoren zu einer Kontraktilitätssteigerung.

Bei sinkendem renalen Perfusionsdruck, verminderter Erregung von Vorhof- und arteriellen Pressorezeptoren erfolgt außerdem die Aktivierung des humoralen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Guyton et al. 1975): Über Reninfreisetzung

erfolgt die Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen. Durch die Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) entsteht Angiotensin II, was über AT-1-Rezeptoren unter anderem eine Vasokonstriktion, gesteigerte renale Na⁺- und Wasser-Rückresorption und Stimulierung der Aldosteronfreisetzung bewirkt und so einen weiteren Kompensationsmechanismus bei nachlassender Herzleistung darstellt.

Um das Herzzeitvolumen unter den pathologischen Bedingungen konstant zu halten, reagiert das Herz mit einer kompensatorischen Hypertrophie. Es werden grundsätzlich zwei Formen der Myokardhypertrophie unterschieden:

1. Die exzentrische Hypertrophie: Sie ist Folge einer chronischen Volumenbelastung des Herzens und geht mit einer Dilatation der Herzhöhlen einher (z.B. Aortenklappeninsuffizienz).
2. Die konzentrische Hypertrophie: Durch eine chronische Druckbelastung nimmt die Wandstärke der Ventrikel ohne Dilatation der Ventrikel zu (z.B. Aortenklappenstenose). Hierbei bleibt die systolische Pumpfunktion zunächst erhalten. Diese Form der Hypertrophie findet man auch als physiologischen Anpassungsprozess bei dauerhaft gesteigerter Herzleistung (Sportlerherz), wobei diese Veränderungen nach Wegfallen der Belastung reversibel sind.

Der Kardiomyozyt reagiert auf die erhöhten Anforderungen mit einer reinen Hypertrophie. Die Fähigkeit zur Zellteilung, und damit auch zur Regenerierung entstandener Schäden am Herzmuskel besitzen Kardiomyozyten als terminal differenzierte Zellen nicht mehr.

1.2. Adrenerge Rezeptorsysteme des Herzens

Es existieren am menschlichen Herzen eine Reihe von Rezeptoren, welche über verschiedene Signaltransduktionsmechanismen physiologische Wirkungen im Kardiomyozyten vermitteln.

Genauere Untersuchungen existieren über adrenerge Rezeptoren des Herzens (Brodde 1991, Brodde und Michel 1999). Sie gehören zu der Familie der G-Protein (Guanin-nukleotid-bindende Proteine) gekoppelten Rezeptoren. Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren bestehen aus einer einzigen Peptidkette, welche siebenmal durch die Zellmembran verläuft und durch ihre sterische Anordnung eine Tasche bildet. Durch

Bindung eines Liganden wird der Rezeptor aktiviert. Die G-Proteine sind Heterotrimer aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Man kennt 21 verschiedene α -, 5 verschiedene β - und 7 verschiedene γ -Untereinheiten. Je nach dem Verwandtschaftsgrad der α -Untereinheiten unterteilt man die G-Proteine in Familien: G_s , G_i und G_q . Ein Agonist-aktivierter-Rezeptor aktiviert das G-Protein dadurch, dass er den Austausch des GDP an der α -Untereinheit gegen GTP katalysiert. Die Bindung an einen aktivierten Rezeptor führt danach zur Dissoziation in die GTP-tragende α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex. α -GTP oder der $\beta\gamma$ -Komplex nehmen jetzt Kontakt mit dem Effektor auf. Die wichtigsten Effektoren sind: die Adenylatzyklase (AZ), die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC), spannungsabhängige K^+ -Kanäle und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle.

Der Aktivierung folgt die Inaktivierung: GTP wird über die als GTPase fungierende α -Untereinheit zu GDP hydrolysiert und reassoziert mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zum inaktiven Trimer. Gleichzeitig kann eine funktionelle Entkopplung des Rezeptors über eine Phosphorylierung erfolgen, welche über die cAMP-abhängige Proteinkinase A und über G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK, im Herzen GRK 2,3,5) geschieht (Lohse 1995).

1.3. Adrenerge Rezeptorsysteme im insuffizienten Herz

Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz werden als Ausdruck des erhöhten Sympathikotonus erhöhte Plasma-Katecholaminspiegel gemessen (Bugaisky et al. 1992, Morgan und Baker 1991).

Bristow et al. (1982) konnten erstmals an menschlichen kardialen Gewebestreifen von herzinsuffizienten Patienten eine verminderte Dichte und Sensitivität von β -AR nachweisen. Dies hat sich in nachfolgenden Arbeiten bestätigt (Fowler et al. 1986, Feldman et al. 1987, Brodde et al. 1995).

Am menschlichen Herzen ist die Koexistenz von β -1- und β -2-AR gesichert (Brodde 1991, Bristow 1993). Das Verhältnis von β -1- : β -2-AR beträgt in den Vorhöfen 60-70%: 40-30% und in den Kammern 70-80%:30-20% (Brodde 1991). Im Stadium der Herzinsuffizienz wurde eine selektive Abnahme der β -1-AR-Dichte und eine funktionelle Entkopplung der β -2-AR festgestellt. (Bristow 1993, Brodde et al. 1995, Ferrara et al.

1997). Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um eine Rechts- oder Linksherzinsuffizienz handelt. Die meisten Daten existieren jedoch über Gewebe aus linken Ventrikeln.

Bristow et al. (1992) konnten an Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie und Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz eine kammer-spezifische Abnahme der β -1-AR-Dichte im rechten Ventrikel und verminderte Sensitivität, gemessen an der Agonist-induzierten AZ-Aktivität, nachweisen.

Neben β -AR existieren auch α -AR im menschlichen Herzen (Bristow et al. 1988, Böhm et al. 1988). Es gibt drei Subtypen von α -1-AR: α -1A-AR, α -1B-AR und α -1D-AR (Michel et al. 1995). Am menschlichen Myokard scheint dabei der α -1A-AR den größten Anteil (Weinberg et al. 1994) zu haben. Dies gilt nicht für alle Spezies: so konnte für die Ratte eine Prädominanz des Subtyps α -1B (α -1A : α -1B \cong 20:80%) festgestellt werden (Michel et al. 1994, Wolff et al. 1998, Brodde und Michel 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die α -1-AR-Dichte im Rattenherzen um den Faktor 5 bis 8 höher liegt als im Menschenherzen. Hierin unterscheiden sich die Rattenherzen nicht nur vom Menschen, sondern auch von anderen Säugetieren wie Maus, Meerschweinchen, Schwein oder Schaf, welche eine ähnliche Dichte an α -1-AR wie beim Menschen aufweisen (Steinfath et al. 1992a).

Es gibt bislang unterschiedliche Daten zu Veränderungen der α -AR in insuffizienten menschlichen Herzen. Eine Studie von Limas et al. (1989) konnte eine reduzierte Anzahl der α -1-AR aufzeigen. Dagegen konnten Böhm et al. (1988), Bristow et al. (1988) und Hwang et al. (1996) keine signifikante Veränderung der Rezeptoranzahl feststellen. In vier anderen Studien (Vago et al. 1989, Steinfath et al. 1992, Hwang et al. 1996, Yoshikawa et al., 1996) fand man hingegen eine Verdoppelung der α -AR-Dichte. In der Studie von Hwang et al. (1996) scheinen die Veränderungen der α -AR von der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz abzuhängen. So fanden diese Autoren eine erhöhte Rezeptordichte bei Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie, dagegen eine unveränderte Rezeptordichte bei der dilatativen Kardiomyopathie. Die Beobachtung, dass im Stadium der Herzinsuffizienz es zu einer Down-Regulation und verminderten Sensitivität der β -AR kommt, legte die Vermutung nahe, dass die unveränderte oder erhöhte Anzahl der α -AR einen Kompensationsmechanismus darstellt. Dieses konnte jedoch durch Arbeiten widerlegt werden in denen kein Zuwachs an inotropem Effekt

(Böhm et al. 1988) oder sogar ein verringerter inotroper Effekt (Steinfath et al. 1992b) nach α -1-AR-Stimulierung im Stadium der Herzinsuffizienz nachgewiesen wurde.

Wie in der Arbeit von Pönicke et al. (2001) gezeigt werden konnte, wird eine Noradrenalin-induzierte Hypertrophie von isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten über den α -1A-AR vermittelt. Der α -1A-AR ist ein $G_{q/11}$ gekoppelter Rezeptor. Nach Bindung eines Agonisten wird zunächst über das aktivierte $G_{q/11}$ -Protein eine PI-PLC aktiviert. Diese spaltet das Membran-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG und IP_3 dienen als second messenger: DAG verbleibt in der Membran und stimuliert die Proteinkinase C, während IP_3 an den IP_3 -Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) bindet und so Ca^{2+} aus dem SR ins Cytoplasma freisetzt. Über diesen Vorgang werden Prozesse in Gang gesetzt, welche zu einer gesteigerten Proteinsynthese und damit zur Hypertrophie führen. Man findet eine erhöhte Expression an Strukturproteinen welche, v.a. während der Fetalzeit exprimiert werden, wie z.B. β -Myosin heavy chain (Decker et al. 1993), eine verstärkte Expression von Oncogenen, welche als Transskriptionsfaktoren dienen, wie z.B. c-myc (Starksen et al. 1986). Des weiteren kommt es zur Induktion von extrazellulären Signalfaktoren wie dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) (Clark et al. 1993) oder dem Zytokin TGF β (Parker et al. 1991).

Neben Vermittlung einer Hypertrophie wird ein positiver inotroper Effekt beobachtet (Terzic et al. 1993). Zum einem wird dies über die verstärkte Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} aus dem SR vermittelt, zum anderen kommt es über die aktivierte PKC zu einer Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers, was zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes und somit zu einer Calcium-Sensibilisierung der kontraktilen Elemente führt (Noel und Pouyssegur 1995). Des weiteren konnte eine konsekutive Aktivierung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers beobachtet werden, was wiederum zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt (Iwakura et al. 1990).

1.4. Tiermodell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz

Es existiert eine Vielzahl an Tiermodellen zur Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Smith und Nuttall 1985). Dabei muss zwischen den Modellen zur Induktion einer Linksherzhypertrophie/-insuffizienz und den Modellen der Rechtsherzhypertrophie/-insuffizienz unterschieden werden. Zum Beispiel dient eine operativ induzierte Aortenstenose mit konsekutiver Druckbelastung des linken Ventrikels als Modell für die Linksherzhypertrophie.

Zur Induktion einer Rechtsherzhypertrophie/-insuffizienz gibt es verschiedene Modelle: In einem sehr aufwendigen Tiermodell entwickelt sich über eine durch chronische Hypoxie ausgelöste pulmonale Vasokonstriktion eine sekundäre Rechtsherzhypertrophie (Dennis et al. 1982).

Eine andere Methode ist die Applikation von pneumotoxischen Substanzen, welche Veränderungen im Sinne einer Schocklunge (ARDS) hervorrufen und so den pulmonal-arteriellen Blutdruck erhöhen (Michel et al. 1984, Meyrick et al. 1986).

Eine weitere Möglichkeit besteht im operativen Induzieren einer Pulmonalarterienstenose (Shipley et al. 1937), was ebenfalls einen hohen technischen Aufwand erfordert.

Ein weiteres Modell bedient sich des Pyrrolizidin-Alkaloides Monocrotalin (MCT) der Pflanze *Crotalaria spectabilis*. Erstmals wurde 1961 von Lalich und Merkow bei Ratten eine Entzündung in den Pulmonalarterien nach Fütterung mit Samen von *Crotalaria spectabilis* beschrieben. Nachfolgend wurden die Effekte dieses Alkaloides auch bei anderen Säugetieren untersucht.

MCT wird zunächst in der Leber zu Monocrotalinpyrrol (MCTP) metabolisiert, welches als biologisch aktiver Hauptmetabolit gilt (Pan et al. 1991, Kashara et al. 1997).

Angriffspunkt für die akute toxische Wirkung des MCTP ist das Endothel der Pulmonalarterien (Wilson et al. 2000, Hoorn et al. 1993). Man konnte für das MCTP einen antiproliferativen, zytotoxischen Effekt über eine Bindung an DNA nachweisen (Wagner et al. 1993). Vier bis fünf Tage nach Applikation von MCT lässt sich eine signifikante Zellschwellung der Endothelzellen *in vivo* nachweisen. Man unterscheidet eine frühe exsudative Phase und eine folgende proliferative Phase. Initial wird ein Ödem um die perialveolären Kapillaren mit einem erhöhten Gehalt an hochmolekularen Proteinen beobachtet (Sugita et al. 1983). In den Alveolen kommt es zu einer typischen Megalozytose der Typ II-Pneumozyten (Wilson und Segall 1990). Auch andere

Makrophagen in den Alveolen weisen diese Megalozytose auf (Sugita et al 1983). In den größeren, peribronchialen Arterien wird ebenfalls ein Ödem der Adventitia mit Akkumulation von mononukleären Entzündungszellen beobachtet. Als typische Veränderung wird die Ausbildung einer glattmuskulären Zellschicht in den vorher nicht-muskularisierten Arteriolen (50-70 µm Durchmesser) (Wilson et al. 1989) beschrieben. Man beobachtet durch die dauerhafte Dysfunktion der Endothelzellen nach dem initialen toxischen Effekt einen verzögerten und progressiven Verlauf der Veränderungen in den arteriellen Lungengefäßen. Im weiteren Verlauf wird eine zunehmende Hypertrophie der Lamina media vor allem der präkapillären Arteriolen beobachtet. Hervorgerufen wird dies durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen und einer Zunahme an extrazellulären Matrix-Glycoproteinen. Spätere, postexsudative Veränderungen in der Adventitia sind hauptsächlich die Zunahme an Kollagen, Infiltration von Leukozyten und Fibrinablagerungen (Reindel et al. 1990). Als Folge dieser gesamten Veränderungen kommt es zu einem Anstieg des Pulmonalarteriendrucks und dadurch zur Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie.

Appliziert man Ratten höhere Dosen von MCT so ist der hepatotoxische Effekt führend. Es kommt zu einer periazinären Nekrose von Hepatozyten und zu einem toxischen Leberversagen. Interessanterweise beobachtet man nach Verabreichen geringerer Dosen MCT diesen hepatotoxischen Effekt bei Ratten nicht. Erklärbar ist dies durch die Metabolisierung und Kinetik der aktiven Metabolite. Über eine Bindung an Erythrozyten erfolgt eine Stabilisierung des instabilen MCTP (in vitro HWZ im Serum: 5 Sekunden, Bruner et al. 1986). So gelangt MCTP in die Lunge, wo es als elektrophiles Molekül über eine kovalente Bindung seine Wirkung erzielt (Pan et al. 1991).

Die Vorteile des Monocrotalin-Modelles liegen in der einfachen Handhabung und den niedrigen Kosten. Nicht zuletzt weisen die gefundenen histologischen Veränderungen einen hohen Grad an Gemeinsamkeiten zu Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie auf. Daher eignet sich dieses Modell, um pathologische Veränderungen beim Menschen im Tiermodell zu simulieren.

1.5. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, welche Veränderungen auf der Ebene der α -AR in Kardiomyozyten unter dem anatomischen/morphologischen Bild der Rechtsherzhypertrophie stattfinden.

Unter Verwendung des Monocrotalin-Modelles, welches zur Induktion einer Rechtsherzhypertrophie bei den Versuchstieren verwendet wurde, untersuchten wir inwieweit sich α -AR in Anzahl und Funktion bei gesunden und mit MCT behandelten Tieren unterscheiden. Es galt herauszufinden, ob kammer-spezifische Veränderungen auf Rezeptorebene in den Kardiomyozyten des linken und rechten, hypertrophierten Ventrikels von MCT-Rattenherzen stattfinden. Besonders die Proteinsynthese als morphologischer Ausdruck der Hypertrophie wurde diesbezüglich untersucht und mit gesunden Kontrolltieren verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Chemikalien

Bovine Serum Albumine, Sigma, Deisenhofen

CGP 20712 A (1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethylimidazolyl)-phenoxy]-2-propanol), Ciba-Geigy, Basel; Schweiz

Collagenase, Biochrom KG, Berlin

Creatine, Sigma, Deisenhofen

Fetal Calf Serum, Boehringer, Mannheim

Heparin, Biochrom KG, Berlin

JOKLIK-MEM, Sigma, Deisenhofen

L-[2,3,4,5,6-³H] Phenylalanin, Amersham Buchler, Braunschweig, 110-140 Ci/ mmol

L-Carnitin, Sigma, Deisenhofen

LumasafeTM Plus, LUMA*LSC B.V., Groningen; Niederlande

Medium M199, Life Technologies, Eggenstein

Monocrotalin, Sigma, Deisenhofen

[³H]-Myoinositol, Amersham-Buchler, Braunschweig, 65 Ci/ mmol

Newborn Calf Serum, PAA Laboratories GmbH, Österreich

Noradrenalinhydrochlorid, Sigma, Deisenhofen

Penicillin, Streptomycin, Life Technologies, Eggenstein

Pentobarbital, United Pharmaceutical Works, Prag; Tschechien

Phentolaminhydrochlorid, Sigma, Deisenhofen

Phosphate Buffered Saline, Biochrom KG, Berlin

[³H]-Prazosin, New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien, 80 Ci/ mmol

Taurin, Sigma, Deisenhofen

Trichloressigsäure, Merck, Darmstadt

Trypsin, Sigma, Deisenhofen

2.1.2. Verwendete Lösungen

Lösung A [mM]: JOKLIK-MEM 440 ml, NaHCO₃ 24, MgSO₄ 0,6, L-Carnitin 1, Creatine 10, Taurin 20

Lösung B: 130 ml Lsg. A, CaCl₂ 0.1 mM, BSA 150 mg

Lösung C: (10 ml Lsg. A zum Spülen der Langendorff-Apparatur) in restliche 300 ml Zugabe von Trypsin 14.4 mg = 60-180 U/ ml

Lösung D: 150 ml Lsg. C, CaCl₂ 1 mM

Lösung E: 150 ml Lsg. C, BSA 150 mg

Lösung F: Medium M199, 10% fetal calf serum, 1% Penicillin Streptomycin (10000IE/ml, 10mg/ml)

Collagenase (28 mg = 90 U/ml): Lösen in 50 ml Lsg.C

Alle Lösungen wurden mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) begast. Der gemessene pH-Wert lag bei 37°C anfangs bei 7.2 , verschob sich während der Isolationsprozedur jedoch um durchschnittlich 0,4 Einheiten in den alkalischen Bereich, so dass eine fraktionierte Zugabe von 1N HCl für die pH-Konstanz nötig war.

2.1.3. Verwendete Geräte

Linearrecorder Graphtec WR 3310, Graphtec GmbH, Solingen

Potter S, B.Braun AG, Melsungen

Pressure Transducer P 75, Hugo Sachs, March-Hugstetten

Respirator, TSE GmbH, Kronberg

Spektrophotometer DU[®] 520, Beckman Instruments, Inc., Fullerton; USA

Tri-Carb[®] Liquid Szintillation Analyzer, Nr.2250CA, Packard Instrument Company

Meriden; USA

2.1.4. Einmalartikel

Counterröhrchen, Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Glasfaserfilter Whatman GF/C, Whatman, Inc., Clifton, NJ; USA
Nylonmesh (250 x 250 µm), NeoLab, Heidelberg
Scintillatorgefäße, Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zellkulturplatten, Becton-Dickinson, Heidelberg

2.2. Methoden

2.2.1. Monocrotalin-Modell

Wir verwendeten männliche Wistar-Ratten, welche ursprünglich aus Schönwalde bezogen worden waren und im Zentralinstitut für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg weitergezüchtet wurden. Die Tierhaltung und alle Untersuchungen an diesen Wistar-Ratten entsprachen den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Im Alter von 6 Wochen wurde dem einen Teil der Versuchstiere eine Einzeldosis von 60 mg/ kg KG MCT intraperitoneal appliziert. Dem anderen Teil, der als Kontrolltiere diente wurde eine äquivalente Menge von 0.9 %-iger Kochsalzlösung gespritzt.

Die Tiere wurden unter klimatisierten Bedingungen bei 22°C und 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus in Dreiergruppen gehalten.

Nach Applikation von MCT starben 8% der Versuchstiere innerhalb der ersten drei Wochen an den Folgen der akuten Intoxikation.

Es wurden tägliche Gewichtskontrollen durchgeführt, wobei die MCT-Ratten deutlich weniger Futter zu sich nahmen und einen körperlichen Entwicklungsrückstand aufwiesen. Daher bekamen MCT-Ratten Futter nach Belieben, während die Futtermenge der Kontrolltiere der von MCT-Ratten am Vortag gefressenen Menge entsprach, um größere Gewichtsunterschiede zu vermeiden. Eine tägliche Mindestfuttermenge von 12,5 g wurde jedoch für die Kontrolltiere nicht unterschritten. Trinkwasser stand allen Tieren unbegrenzt zur Verfügung.

Die MCT-Ratten zeigten neben der fehlenden Zunahme an Körpergewicht eine Minderung der Mobilität und in den späteren Stadien eine zunehmende Tachypnoe.

Nach 4-6 Wochen wurden die Tiere getötet. Zum Zeitpunkt der Tötung konnte man bei allen MCT-Ratten eine Rechtsherzhypertrophie finden. Bei einem Drittel der Tiere fand sich Aszites und Pleuraerguß als Ausdruck einer Rechtsherzinsuffizienz.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Tiere ohne Anzeichen der Rechtsherzinsuffizienz verwendet.

2.2.2. Entnahme und Präparation der Rattenherzen

Getötet wurden die Tiere unter Pentobarbitalnarkose (5mg/100g KG i.p.) und nach Heparinisierung mit 200 IE/100g KG i.p.. Nach Einbringen einer Trachealkanüle durch offene Tracheotomie und maschineller Beatmung (TSE GmbH, Kronberg) mit Raumluft wurden die Herzen rasch entnommen und in eisgekühlte, begaste Salinelösung gelegt.

Nach Einbinden eines Verbindungsstückes in die Aorta, wobei zu weit proximales Einbinden und damit Ligatur der Herzkranzgefäße unbedingt vermieden wurde, wurden die Herzen aus der gekühlten Salinelösung genommen und an einer separaten Perfusionsapparatur retrograd mit Lösung D perfundiert. Die Herzen begannen nach kurzer Latenzzeit zu schlagen. Hierdurch wurden verbliebene Blutreste aus den Herzen herausgepumpt bzw. -gespült.

2.2.3. Enzymatische Isolierung der Kardiomyozyten

Wir orientierten uns an der von Viko et al. (1995) beschriebenen Methode. Nach einer ca. 3-minütigen Stabilisierungsphase wurden die Herzen an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit Lösung E perfundiert. Um eine möglichst Ca^{2+} -freie Reperfusionslösung zu erhalten, wurden die ersten 50 ml des Perfusates verworfen. Danach wurde die Collagenaselösung zugesetzt und unter konstanter Temperatur von 37°C und Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen reperfundiert.

Um den pH-Wert konstant bei 7.2 zu halten wurden schrittweise einige Tropfen 1N HCl zugesetzt.

Nach 5 und 10 Minuten wurden je 25 μl einer 100 mM CaCl_2 -Lsg. zugesetzt und nach 15 Minuten nochmals 50 μl , um auf eine Ca^{2+} -Endkonzentration von 0.1 mM zu kommen. Dadurch wurde die Ca^{2+} -Toleranz der Zellen erhöht.

Durch lichtmikroskopische Kontrolle des Lysates auf stäbchenförmige Kardiomyozyten beurteilten wir den Grad der enzymatischen Lyse. Die bei dieser Versuchsreihe 10 bis 12 Wochen alten Rattenherzen wurden im Durchschnitt 20 Minuten perfundiert.

Die Herzen wurden nun von der Langendorff-Apparatur abgenommen, die Vorhöfe abgetrennt und verworfen. Danach erfolgte die Separierung des linken und rechten Ventrikels, wobei das Herzseptum dem linken Ventrikel zugerechnet wurde.

Mit zwei Skalpellern wurden die getrennten Herzkammern zerkleinert und mit je 20 ml der Collagenase-Perfusionslösung aus der Apparatur in zwei Teflongefäße gegeben. Dort wurde die Gewebesuspension für weitere 10 Minuten unter Carbogen-Begasung belassen und zur besseren Durchmischung alle 2 Minuten vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und langsam aus der Pipette auslaufen gelassen.

2.2.4. Aufbereitung der Kardiomyozyten

Nach 10 Minuten wurde das Lysat in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 400 U/min in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur (RT) für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 10 ml Lösung B resuspendiert. Der Überstand wurde nochmals bei 500 U/min (RT) 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet mikroskopisch auf den Anteil an intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten kontrolliert. Bei Überwiegen der Stäbchen wurde die Suspension weiter verwendet und zusammen mit dem ersten Pellet nochmals bei 400 U/min (RT) für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes und Resuspension in Lösung B wurde die Suspension über einen Büchnertrichter mit einem Nylonnetz (Porengröße 250 μm) gegeben. Das Filtrat wurde in Reagenzröhrchen aufgefangen und sedimentierte für 10 Minuten in einem 37°C Wasserbad. Zeigte sich nach 10 Minuten noch kein deutliches Zellsediment, so wurde für

15 Sekunden bei 500 U/min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Resuspension in Lösung B schloss sich noch einmal eine 10 minütige Sedimentation an. Auch hier wurden die Überstände auf Stäbchen kontrolliert. Das letztlich so gewonnene Zellpellet wurde mit einer definierten Menge Lösung F aufgenommen, um auf eine Zahl von $17 \times 10^3 / 0.8$ ml an stäbchenförmigen Kardiomyozyten zu kommen. Für die Bestimmung der Zellzahl stellten wir eine Verdünnung 1:10 her und gaben 1 ml in eine Zählkammer, wo die Anzahl morphologisch intakter, stäbchenförmiger Kardiomyozyten bestimmt wurde. Der Anteil an abgerundeten, somit morphologisch nicht mehr intakter Kardiomyozyten war bei den mit Monocrotalin behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Besonders ausgeprägt zeigte sich dies in den rechtsventrikulären Kardiomyozyten (s. Ergebnisse). Für die Verteilung war nur die Anzahl der intakten Kardiomyozyten bestimmend.

2.2.5. Zellkultur

Zur Zellkultivierung wurden sterile Becton-Dickinson 6-Loch Zellkulturplatten verwendet, welche für mind. 6 Stunden mit 0.4 ml einer Lösung aus M 199, 4% Fetal Calf Serum, 1% Penicillin/Streptomycin vorbeschichtet worden waren, um eine bessere Zellanhaftung zu erreichen. Diese Lösung wurde abgesaugt und jeweils 0.8 ml der Zellsuspension pro Loch unter sterilen Bedingungen verteilt.

Die Anzahl der stäbchenförmigen Kardiomyozyten lag bei $17 \times 10^3 / 0.8$ ml. Danach schloss sich eine ca. 18-stündige Inkubationsphase im Inkubator bei 37°C und 95% O₂ / 5% CO₂ an.

2.2.6. Stimulierung der Proteinsynthese mit Noradrenalin und Quantifizierung über Bestimmung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation

Nach dieser ersten Inkubationszeit wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch 1 ml des serumfreien Mediums mit folgender Zusammensetzung ersetzt: Medium M199, 2 mM L-Carnitin, 2 mM Creatin, 5 mM Taurin, 100 µM L-Ascorbinsäure,

1% Penicillin/Streptomycin; 10 μM Cytosine- β -D-Arabinosid (Wachstumshemmung von Nicht-Kardiomyozyten) und 60 μM L-Phenylalanin, welches davor mit [^3H]-Phenylalanin (1 μCi) versetzt worden war.

Zur Stimulierung der Proteinsynthese wurde den Zellkulturen Noradrenalin in unterschiedlichen Endkonzentrationen (10^{-9} - 10^{-5}M) zugesetzt.

Zur Untersuchung der Wirkung des hochselektiven β -1-AR-Blockers CGP 20712 A auf die Proteinsynthese wurde dieser vor der Zugabe von Noradrenalin in einer Endkonzentration von 300 nM den Zellkulturen zugesetzt.

Als Kontrolle diente je eine Zellkultur, welche nicht mit Noradrenalin und CGP 20712 A versetzt wurde.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das radioaktive Nährmedium abgesaugt und zum Stoppen der Proteinsynthese 1 ml einer 10%igen Trichloressigsäure-Lösung zugesetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung 24 Stunden bei 5°C gelagert, um sie dann mit 1 ml Phosphat-gepufferter Saline-Lösung (PBS) zu waschen und zum Lösen der Zellstrukturen mit 0.5 N Natronlauge zu versetzen.

Die Zellplatten wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Schwenker gestellt und mikroskopisch die vollständige Lösung der Zellbestandteile kontrolliert.

Zur Messung der Radioaktivität nach dem Flüssigkeitsszintillationsprinzip wurde ein Volumen von 450 μl entnommen und zusammen mit 4 ml der Szintillationsflüssigkeit in ein Probenröhrchen gegeben, welches nach guter Durchmischung im Szintillationszähler gemessen wurde. Als Referenzwert wurde 450 μl der Kontrollzellkultur verwendet. Die Differenz der gemessenen Counts pro Minute zum Referenzwert dienten als Maß für den erfolgten Einbau von [^3H]-Phenylalanin und somit als Maß für die Proteinsynthese.

2.2.7. Invasive Messung des rechtsventrikulären Druckes

Die Ratten wurden mit Pentobarbital 5 mg/100g KG i.p. narkotisiert und mit 200 IE/100g KG i.p. heparinisiert. Danach wurde die rechte Vena jugularis operativ freigelegt und über diese ein flüssigkeitsgefüllter Silikonkatheter mit einem Außendurchmesser von 0.8 mm unter Kontrolle der Pulskurve bis in den rechten Ventrikel eingeführt.

Als Druckwandler wurde der Pressure Transducer P 75 genutzt. Zum Aufzeichnen der Druckkurven diente der Linearrecorder Graphtec WR 3310.

2.2.8. Noradrenalinbestimmung

Die Noradrenalinbestimmung erfolgte mittels high performance liquid chromatography (HPLC) nach Schäfers et al. (1997).

Die Ratten wurden unter wiederholter Kontrolle der Schmerzantwort durch Kneifen der Pfote mit einer Pinzette für mindestens 15 Minuten nach Ausbleiben der letzten Schmerzantwort ohne Manipulation in Pentobarbitalnarkose belassen. Zur Blutentnahme wurde der Plexus ophthalmicus punktiert und ca. 2 ml Blut in eisgekühlten EDTA-Monovetten entnommen. Die Proben wurden sofort bei 4°C mit 1700 g für 10 Minuten zentrifugiert und 1 ml Plasma abpipettiert. Zur Stabilisierung wurde 10 µl einer 10 mM Gluthation-Lösung zugesetzt und die Proben bis zur Bestimmung des Noradrenalins bei -80°C gelagert.

Das Plasma wurde auf ein Vorsäulensystem aus Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure und Phosphatpuffer (200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 mM EDTA, 1,71 mM NaN_3 , pH 8,7) als mobile Phase aufgetragen. Die retinierten Phenylboronsäureester des Noradrenalins wurden mittels Elutionsmittel (89 Teile Phosphatpuffer [1000 mM NaH_2PO_4 , 5 mM Oktansulfonsäure, 1,71 mM NaN_3 , pH 3,0], 11 Teile Methanol) von der Vorsäule eluiert. Danach folgte die Auftrennung des Noradrenalins über eine LiChrospher 100 RP-18e – Säule. Durch Nachsäulenderivatisierung erfolgte über die Oxidation mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu Noradrenochinon sowie die oxidative Zyklisierung zu Noradrenochrom und intramolekulare Umlagerung die Bildung von fluoreszierendem 3, 5, 6-Trihydroxy-1-methylindol/ 3, 5, 6-Trihydroxyindol. Mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm erfolgte die quantitative Bestimmung der Trihydroxyindol-Derivate.

2.2.9. Membran-Präparation aus Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels

Die Kardiomyozyten-Suspension wurde mit 80 g für 10 Minuten bei 25 °C zentrifugiert, der Niederschlag in 10 ml PBS resuspendiert und rezentrifugiert (80 g für 10 Minuten). Danach wurden die Kardiomyozyten aus rechtem bzw. linkem Ventrikel in 5 ml eiskaltem Präparations-Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7,4) resuspendiert und anschließend in einem Glashomogenisator Potter S mit Teflon-Pistill homogenisiert, 3 mal mit 10 Hüben bei 1500 U/Min mit 1 Minute Intervall. Das Homogenat wurde mit 10 ml Präparationspuffer verdünnt, mit 50000 g für 20 Minute bei 4°C zentrifugiert, der Niederschlag in Präparationspuffer resuspendiert und erneut mit 50000 g für 20 Minuten bei 4°C rezentrifugiert. Danach wurde der Niederschlag im Inkubationspuffer (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) suspendiert, so dass eine Proteinkonzentration von 0.5 mg Protein/ml erhalten wurde. Der Protein-Gehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinder-Immunglobulin G als Standard bestimmt.

2.2.10. Bestimmung der α -1-AR-Dichte

Zur Bestimmung der α -1-AR-Dichte wurden die Kardiomyozyten-Membranen (300 μ g Protein/Ansatz) mit sechs Konzentrationen von [3 H]-Prazosin (0.03-1 nM) für 60 Minuten bei 25°C in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μ M Phentolamin (zur Definition der unspezifischen Bindung) in einem Gesamtvolumen von 1 ml inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 10 ml Wasch-Puffer (50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 7,4) beendet und das Reaktionsgemisch rasch über Whatman GF/C Glasfaserfilter filtriert. Die Filter wurden mit weiteren 10 ml Wasch-Puffer gewaschen, anschließend für eine Stunde bei 65°C getrocknet, in Zählfläschchen überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Die unspezifische Bindung von [3 H]-Prazosin wurde definiert als Radioaktivität gebunden in Gegenwart von 10 μ M Phentolaminhydrochlorid. Die spezifische Bindung von [3 H]-Prazosin wurde definiert als Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung und betrug üblicherweise bei 0.1 nM [3 H]-Prazosin ca. 70%. Die α -1-AR-Dichte wurde in fmol spezifisch gebundenes [3 H]-Prazosin/mg Protein angegeben.

2.2.11. Inositol-Phosphat-Bildung

Die Suspension von Kardiomyozyten aus rechtem bzw. linkem Ventrikel wurde für 24 Stunden mit 2.9 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Myo-Inositol bei 37°C inkubiert. Daran anschließend wurde das nicht inkorporierte [^3H]-Myo-Inositol durch Zentrifugation ausgewaschen. Die Kardiomyozyten wurden in Hank's gepufferter Saline-Lösung, die 10 mM LiCl und 1% Rinderserum Albumin enthielt, resuspendiert. Aliquots dieser Kardiomyozyten-Suspension (5×10^4 Zellen/ml) wurden mit Noradrenalin (10^{-9} - 10^{-5} M) in einem Gesamtvolumen von 1 ml für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol und 2 ml Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Testansätze intensiv geschüttelt und danach mit 820 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, so dass eine obere Methanol/Wasser-Phase und eine untere Chloroform-Phase entstand. Von der Methanol/Wasser-Phase wurden jeweils 1.6 ml auf Dowex AG 1-X8 Chromatografie-Säulen (200 mg/Säule) gegeben. Das freie Inositol wurde mit zweimal 5 ml H_2O und 5 ml 60 mM Ammoniumformiat-Lösung eluiert; daran anschließend wurden die Gesamt-Inositol-Phosphate durch Zugabe von 2 x 1ml 1 M Ammoniumformiat-Lösung verdünnt in 100 ml 0.1 M Ameisensäure eluiert. Zu jedem Testansatz wurden 8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Radioaktivität der Proben dann im Szintillationszähler bestimmt.

2.2.12. Statistische Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (S.E.M.) von n Experimenten angegeben.

Alle statistischen Berechnungen und nichtlineare Regressionsanalysen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) durchgeführt.

Aus den Daten der Noradrenalin-induzierten IP-Bildung und Steigerung der Proteinsyntheserate wurden mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism die passenden sigmoidalen Kurven errechnet. Bei diesen Berechnungen wurde der basale [^3H]-Phenylalanin-Einbau gleich 100% gesetzt. Der „Hill-slope“ wurde auf eins festgesetzt.

2. Material und Methoden

Mit Hilfe des Student's t-Tests für ungepaarte Proben (Vergleich Kontrolltiere gegen MCT-Ratten) und gepaarte Proben (Vergleich mit und ohne Zugabe von CGP 20712 A) wurde die Signifikanz von Unterschieden zwischen Mittelwerten ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Körpergewicht und Ventrikelgewicht der Versuchstiere

Obwohl sich die Futtermenge der Kontrolltiere an der Menge Futter orientierte, die die MCT-behandelten Tiere am Tag zuvor zu sich genommen hatten, zeigten die mit MCT-behandelten Ratten ein deutlich reduziertes Körpergewicht (MCT: 246 ± 6 g, $n = 64$; Kontroll-Ratten: 273 ± 4 g, $n = 68$; $p < 0.01$). Darüber hinaus war das Gewicht des rechten Ventrikels in MCT-Ratten (502 ± 13 mg, $n = 5$) signifikant höher als in Kontroll-Ratten (300 ± 18 mg, $n = 5$; $p < 0.01$), während das Gewicht des linken Ventrikels in MCT- und Kontroll-Ratten ungefähr gleich war (861 ± 42 mg, $n = 5$ vs. 964 ± 33 mg, $n = 5$). Dementsprechend war das Verhältnis Gewicht des rechten Ventrikels/ Körpergewicht bei MCT-Ratten (2.03 ± 0.07 mg/g KG) signifikant höher als in Kontroll-Ratten (1.12 ± 0.09 mg/g KG). Das Verhältnis Gewicht des linken Ventrikels/ Körpergewicht unterschied sich hingegen bei MCT- (3.49 ± 0.13 mg/g KG) und Kontroll-Ratten (3.54 ± 0.15 mg/g KG) nicht signifikant.

3.2. Rechtsventrikuläre Druckmessung

Die rechtsventrikuläre Druckmessung ergab bei Kontrolltieren einen systolischen Druck von 13.7 ± 0.8 mmHg ($n = 15$) und einen enddiastolischen Druck von 6.2 ± 0.5 mmHg ($n = 15$).

Bei MCT-behandelten Tieren mit rechtsventrikulärer Hypertrophie waren diese Werte signifikant ($p < 0.001$) erhöht. Der systolische Druck betrug 38.1 ± 3.6 mmHg ($n = 7$), der enddiastolische Druck 23.0 ± 2.7 mmHg ($n = 7$) (Abb.1).

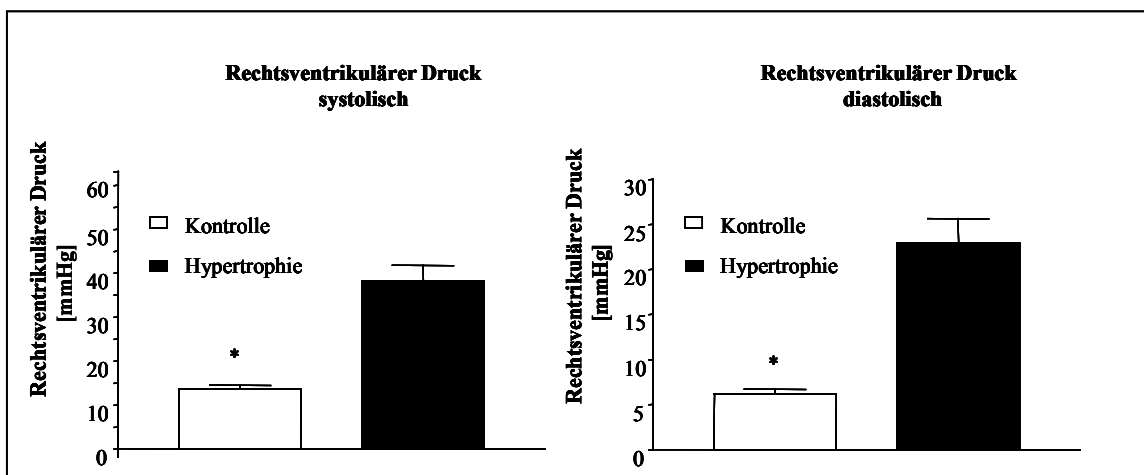


Abb. 1 Invasive Druckmessung über einen Vena jugularis-Katheter im rechten Ventrikel bei Ratten mit Rechtssherzhypertrophie (■) und Kontrolltieren (□). * $p < 0.001$.

3.3. Plasmanoradrenalinspiegel

Wie in Abb. 2 zu sehen ist, war bei den MCT-behandelten Ratten die Plasmanoradrenalinkonzentration signifikant (543 ± 40 pg/ml, $n = 26$) gegenüber den Kontrolltieren (299 ± 14 pg/ml, $n = 41$; $p < 0.001$) erhöht.

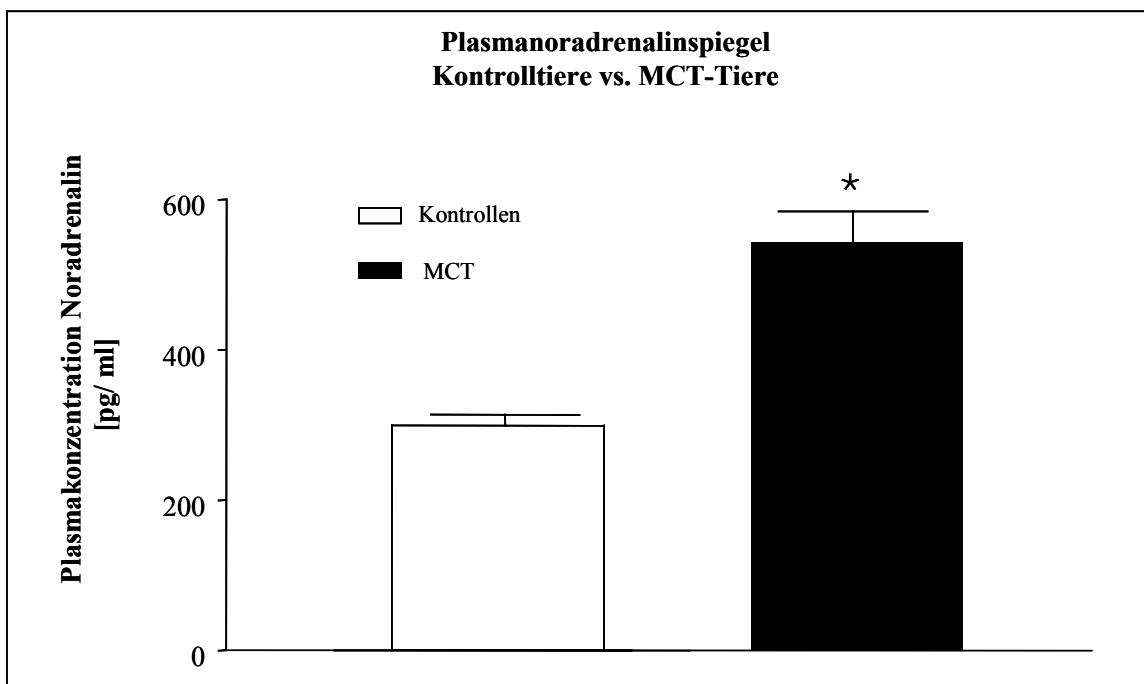


Abb. 2 Plasmakonzentration von Noradrenalin [pg/ml] bei Ratten, welche mit Monocrotalin behandelt worden waren (■, 543 ± 40 pg/ml, $n = 41$) und Kontrolltieren (□, 299 ± 14 pg/ml, $n = 26$), * $p < 0.001$.

3.4. Anteil an stäbchenförmigen Kardiomyozyten aus Präparationen von rechten und linken Ventrikeln

Die Zellausbeute an stäbchenförmigen Kardiomyozyten, welche durch den enzymatischen Isolierungsprozeß pro Herz gewonnen werden konnte war bei den MCT-Ratten sehr gering, sodass zwei Herzen gepoolt wurden für $n = 1$. Die durchschnittliche Ausbeute an Myokardzellen, aufgearbeitet aus zwei MCT-behandelten Rattenherzen, betrug $1,59 \pm 0,07 \times 10^6$ aus dem rechten Ventrikel und $3,55 \pm 0,29 \times 10^6$ aus dem linken Ventrikel. Der Anteil der Kardiomyozyten, welche morphologisch intakt waren lag im rechten Ventrikel bei nur $18,68 \pm 6,25 \%$ und im linken Ventrikel bei $45,78 \pm 5,46 \%$, $p < 0,001$.

Eine bessere Ausbeute war bei den Kontrolltieren zu erzielen. Sie lag hier für zwei gepoolte Herzen bei $2,57 \pm 0,13 \times 10^6$ Zellen aus dem rechten Ventrikel und bei $5,69 \pm 0,18 \times 10^6$ Zellen aus dem linken Ventrikel. Dabei zeigte sich bezüglich des Anteils an stäbchenförmigen Kardiomyozyten zwischen rechten und linken Ventrikeln kein Unterschied: linker Ventrikel: $67,99 \pm 2,15 \%$ vs. rechter Ventrikel $67,13 \pm 3,58 \%$ (Abb. 3).

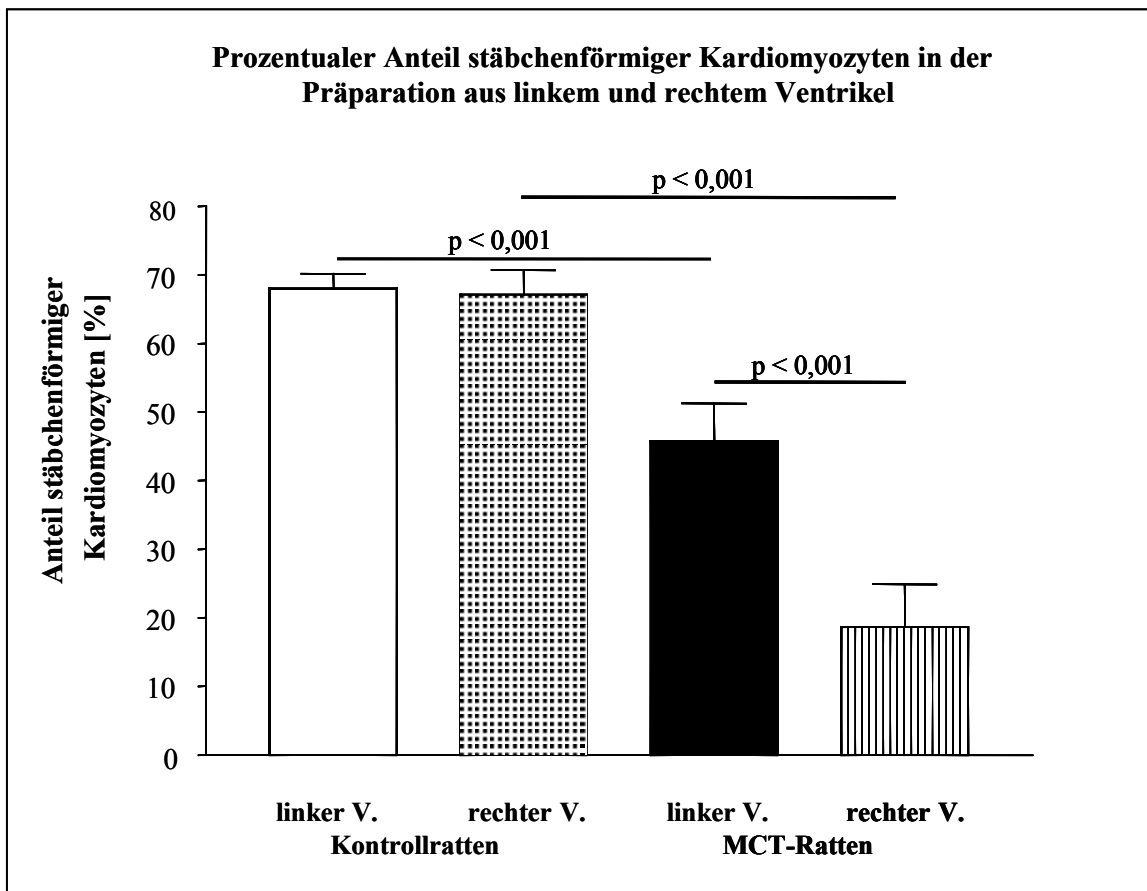


Abb.3: Lichtmikroskopische Bestimmung des prozentualen Anteils stäbchenförmiger Kardiomyozyten aus Präparationen von rechten und linken Ventrikeln von Kontrolltieren und MCT-Ratten. Der Anteil an stäbchenförmigen Kardiomyozyten war in den Präparationen der MCT-Ratten signifikant niedriger (linker Ventrikel Kontrolle vs. linker Ventrikel MCT: $67,99 \pm 2,15\%$, $n = 14$ vs. $45,78 \pm 5,46\%$, $n = 12$; $p < 0,001$). Bei den Kontrolltieren gab es keinen Unterschied zwischen rechten und linken Ventrikeln (linker Ventrikel: $67,99 \pm 2,15\%$, rechter Ventrikel: $67,13 \pm 3,58\%$). Hingegen war bei den MCT-Ratten der Anteil an intakten Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln signifikant gegenüber derer aus linken Ventrikeln erniedrigt ($18,93 \pm 6,25\%$, $n = 8$ vs. $45,78 \pm 5,46\%$, $n = 12$; $p < 0,001$).

3.5. α -Adrenozeptor-Dichte in Kardiomyozyten des linken und rechten Ventrikels des Rattenherzens

Zunächst wurde die α -1-AR-Dichte in Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels bestimmt. Dazu wurden Kardiomyozytenmembranen hergestellt und in dieser Membranfraktion die α -1-AR-Dichte mit Hilfe von [3 H]-Prazosin-Bindung bestimmt. Abb. 4 zeigt ein typisches Sättigungsexperiment.

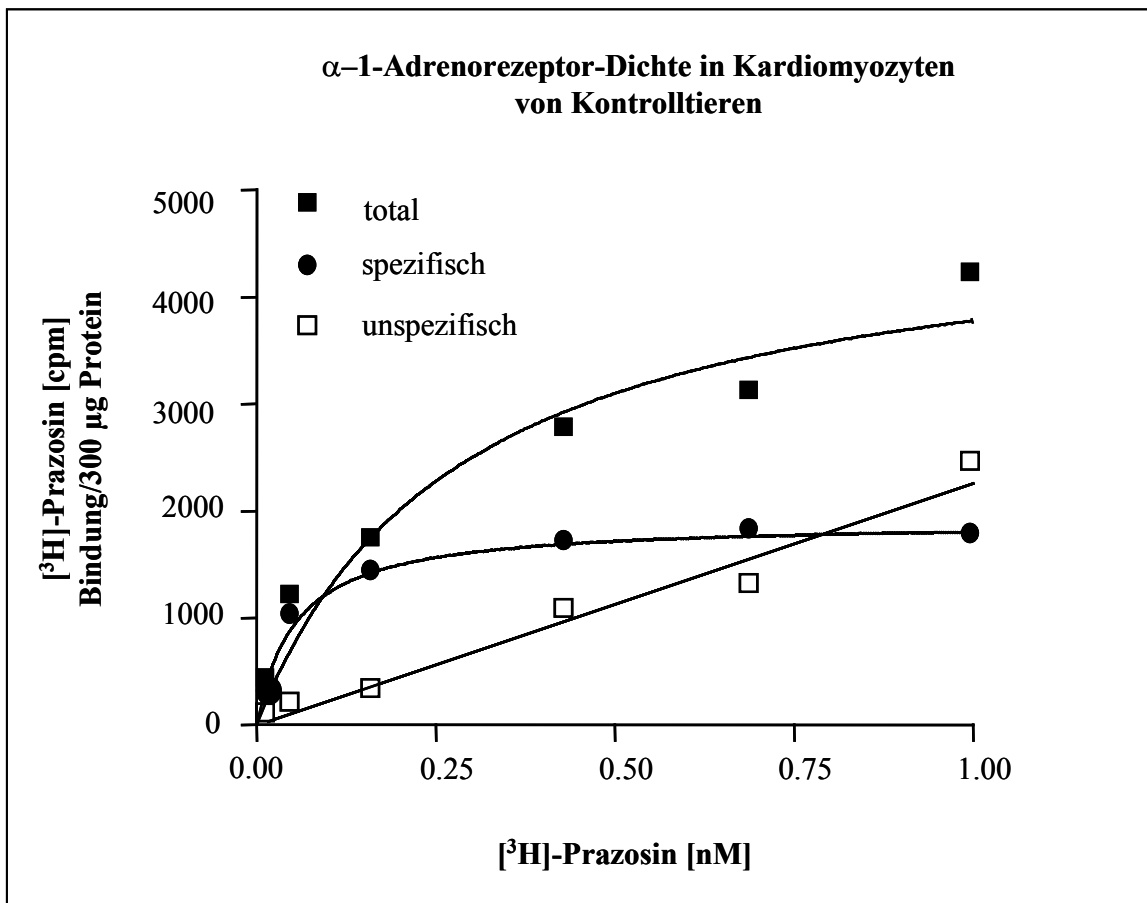


Abb. 4 Bindung von [³H]-Prazosin an Kardiomyozytenmembranen adulter Ratten als Funktion steigender [³H]-Prazosin-Konzentrationen (0.03-1nM) ohne Zugabe (■=total) und mit Zugabe von 10 µM Phentolamin (□=unspezifisch) zur Bestimmung der spezifischen Bindung (●). Ordinate: [³H]-Prazosin gebunden pro 300 µg Protein. Abszisse: freie [³H]-Prazosin in nM.

Wie man aus Abbildung 4 erkennen kann, nahm die spezifische Bindung des [³H]-Prazosin an Kardiomyozytenmembranen des linken Ventrikels mit steigenden Konzentrationen an [³H]-Prazosin (0.03 – 1 nM) zu und erreichte ihre Sättigung bei ca. 0.5 nM. Die maximale Anzahl der [³H]-Prazosin Bindungsstellen war in rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten ungefähr gleich. Sie betrug für Kardiomyozyten des rechten Ventrikels 26.9 ± 2.6 fmol spezifisch gebundenes [³H]-Prazosin/mg Protein (n = 5), für Kardiomyozyten des linken Ventrikels 27.1 ± 2.4 fmol/mg Protein (n = 5).

In MCT-behandelten Ratten war die α -1-AR-Dichte in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels signifikant erniedrigt (12.2 ± 1.9 fmol/mg Protein, n = 5, p < 0.01 vs.

Kontrolle), während sie in Kardiomyozyten des linken Ventrikels nur unwesentlich und nicht signifikant abgenommen hatte (24.0 ± 0.8 fmol/mg Protein, $n = 5$). Die K_D -Werte für [3 H]-Prazosin hingegen waren in Kontroll-Kardiomyozyten und in Kardiomyozyten von MCT-behandelten Ratten nicht unterschiedlich (rechter Ventrikel: 86 ± 19 pM vs. 97 ± 18 pM; linker Ventrikel: 89 ± 29 pM vs. 71 ± 12 pM).

3.6. Inositol-Phosphat-Bildung

Es ist allgemein bekannt, dass der wichtigste Signal-Transduktionsweg von α -1-AR die Kopplung an ein G-Protein ($G_{q/11}$) mit anschließender Bildung von IP_3 und DAG ist (Übersicht siehe Michel et al. 1995).

Wir untersuchten daher als nächstes den Einfluss der MCT-Behandlung auf die durch Noradrenalin hervorgerufene Inositol-Phosphat (IP)-Bildung in Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels. In Kardiomyozyten von Kontroll-Ratten führte Noradrenalin ($10^{-9} - 10^{-5}$ M) zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der IP-Bildung, wobei die maximale Zunahme der IP-Bildung in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels ($300 \pm 60\%$ über basal, $n = 5$) leicht, aber nicht signifikant höher war als in Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel ($227 \pm 25\%$ über basal, $n = 5$; Abb. 5).

In Kardiomyozyten von MCT-behandelten Ratten war die durch Noradrenalin hervorgerufene IP-Bildung abgeschwächt. Dies war wesentlich stärker ausgeprägt in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels als in Kardiomyozyten des linken Ventrikels und erreichte statistische Signifikanz nur in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels (Abb. 5).

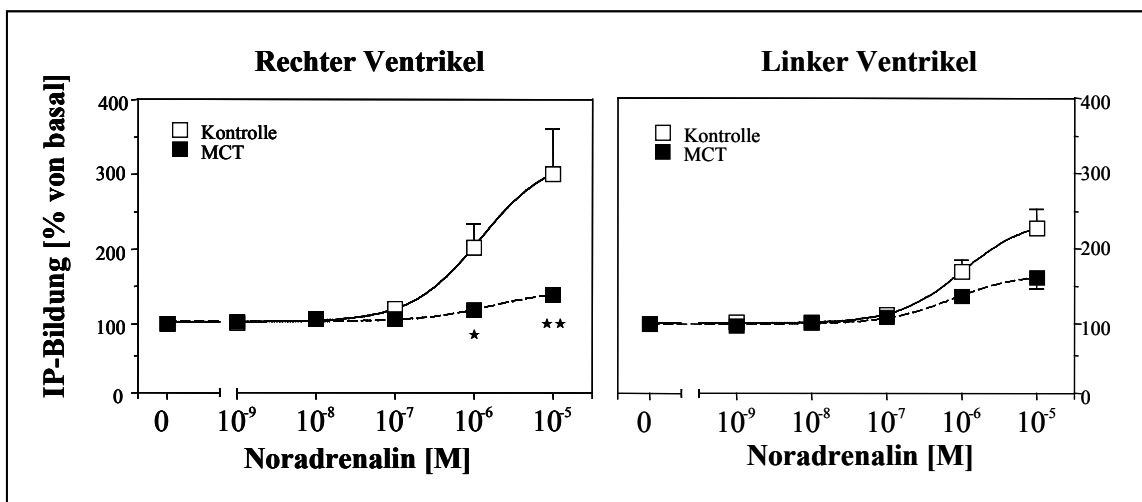


Abb. 5 Noradrenalin-induzierte Steigerung der Inositol-Phosphat [IP]-Bildung in Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels von Kontrolltieren (□) und mit MCT-behandelten Ratten (■).

* $p = 0.033$, ** $p = 0.028$ vs. Kontrolle.

3.7. Proteinsynthese

3.7.1. Proteinsynthese in Kardiomyozyten von Kontrolltieren

Noradrenalin (10^{-9} – 10^{-5} M) führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus dem rechten und linken Ventrikel.

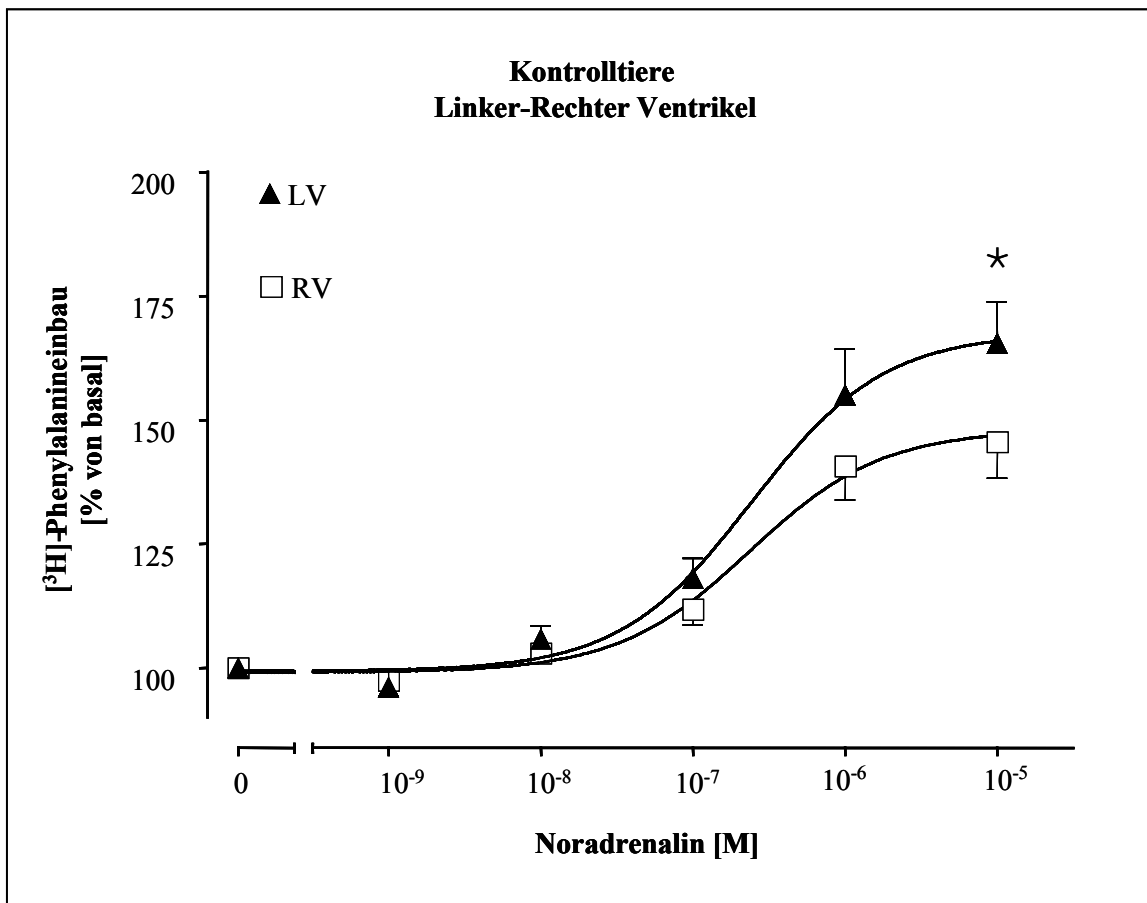


Abb. 6 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation als Maß für die Proteinsynthese in Kardiomyozyten aus rechten (RV, □, n = 9) und linken Ventrikeln (LV, ▲, n = 9) von Kontrolltieren. *p = 0.0117; LV: pEC₅₀ = 6.62 ± 0.17; RV: pEC₅₀ = 6.45 ± 0.13.

Die maximale Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war in linksventrikulären Kardiomyozyten (65 ± 8 %, n = 9) signifikant (p = 0.0117) größer als in rechtsventrikulären Kardiomyozyten (45 ± 7 %, n = 9) (Abb. 6). Die pEC₅₀-Werte für Noradrenalin unterschieden sich hingegen nicht zwischen rechtem und linkem Ventrikel (6.62 ± 0.17 vs. 6.45 ± 0.13, n = 9).

Die Zugabe des α-1-AR-Antagonisten Prazosin (10 nM) zur Inkubationsmischung führte zu einer ausgeprägten Rechts-Verschiebung der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb.7).

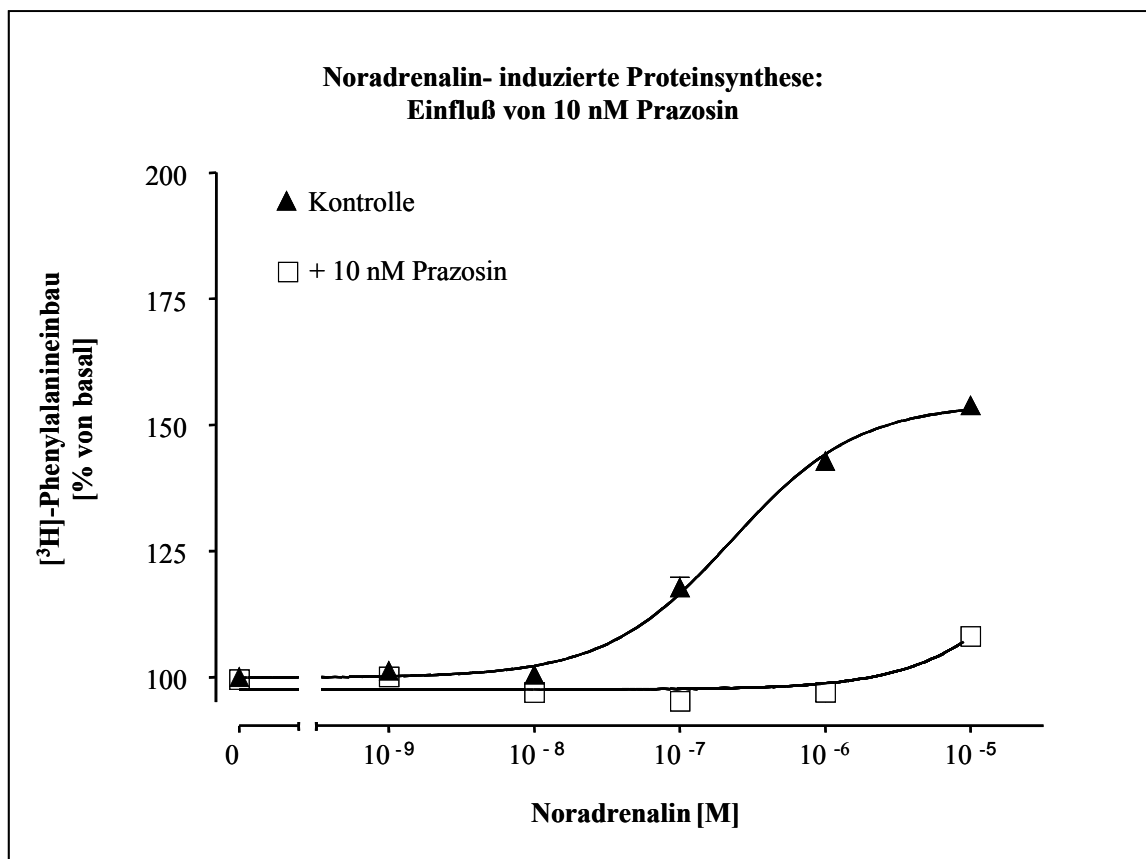


Abb. 7 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [^3H]-Phenylalanin-Inkorporation in linksventrikulären Kardiomyozyten als Maß für die Proteinsynthese ohne Prazosin (\blacktriangle , n = 6) und unter Zugabe von 10 nM Prazosin (\square , n = 6)

Dies zeigt, dass die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese in den Kardiomyozyten über α -1-AR-Stimulation vermittelt wird.

Im Gegensatz zu den Effekten des α -1-AR-Antagonisten Prazosin führte die Zugabe von 300 nM des β -1-AR selektiven Antagonisten CGP 20712 A (Dooley et al. 1986) zu einer Links-Verschiebung der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven sowohl in rechtsventrikulären, als auch in linksventrikulären Kardiomyozyten. Dementsprechend waren die pEC_{50} -Werte für Noradrenalin signifikant höher (RV: 7.22 ± 0.14 vs. 6.45 ± 0.13 ; LV: 7.16 ± 0.13 vs. 6.62 ± 0.17). In Gegenwart von 300 nM CGP 20712 A war auch die durch Noradrenalin hervorgerufene maximale Steigerung der [^3H]-Phenylalanin-Inkorporation in links- und rechtsventrikulären Kardiomyozyten signifikant höher gegenüber den Effekten ohne CGP 20712 A (Abb.8 und Abb.9).

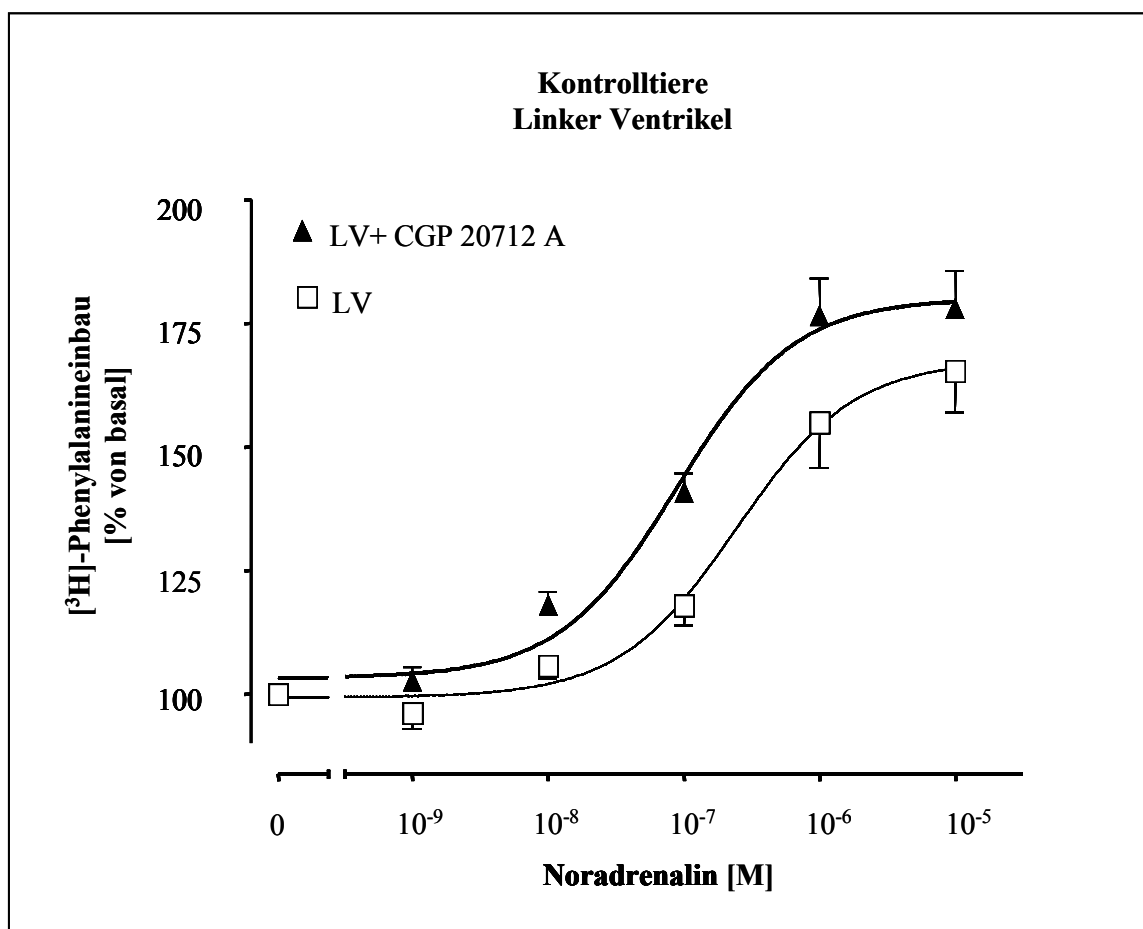


Abb. 8 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus linken Ventrikeln von Kontrolltieren (LV, □, n = 9). Durch gleichzeitige Zugabe des β-1-selektiven AR-Blockers CGP 20712 A ließ sich eine Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation erzielen (LV+CGP 20712 A, ▲, n = 9). Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten (p = 0.0248) Links-Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve: LV: pEC₅₀ = 6.62 ± 0.17 vs. LV+CGP 20712 A: pEC₅₀ = 7.16 ± 0.13

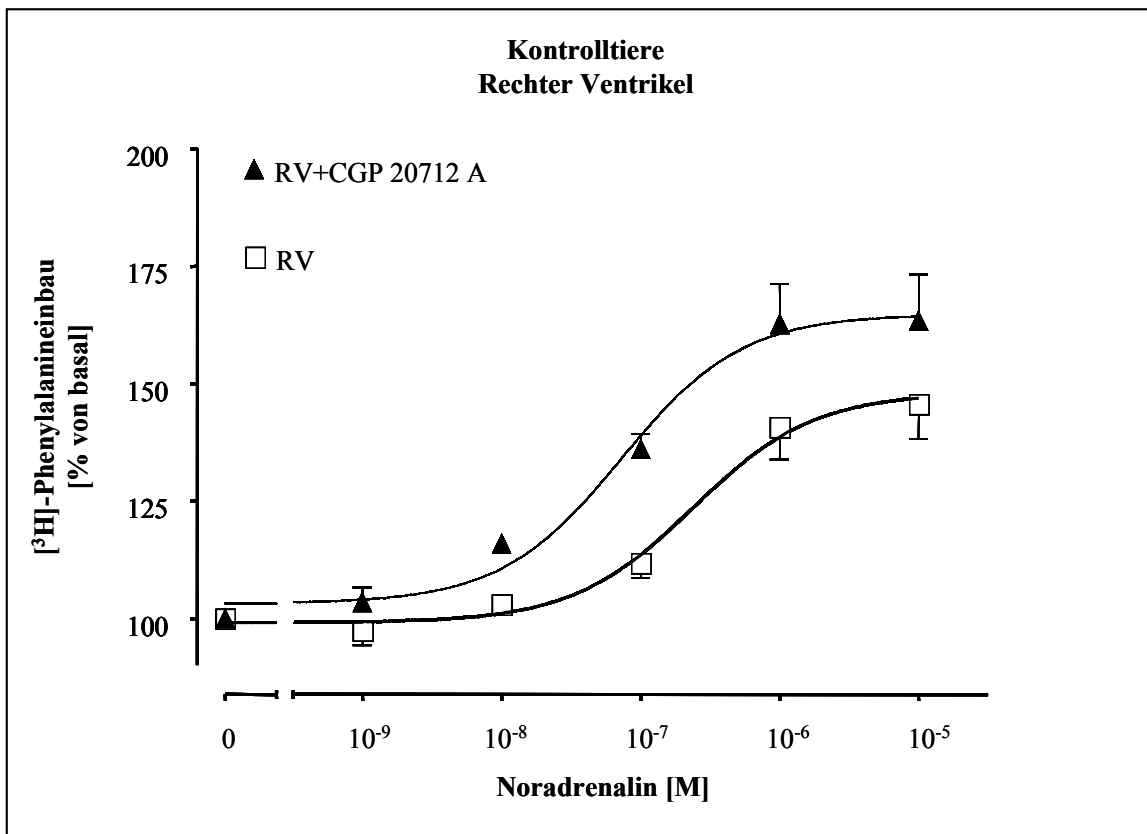


Abb. 9 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln von Kontrolltieren (RV, □, n = 9). Durch gleichzeitige Zugabe des β-1-selektiven AR-Blockers CGP 20712 A (RV+CGP 20712 A, ▲, n = 9) ließ sich eine Steigerung der maximalen [³H]-Phenylalanin-Inkorporation erzielen, welche jedoch nicht signifikant war (p = 0.287). Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten (p = 0.0016) Links-Verschiebung der Konzentrations -Wirkungskurve: RV: pEC₅₀ = 6.45 ± 0.13 vs. RV+CGP 20712 A: pEC₅₀ = 7.22 ± 0.14.

Darüber hinaus war in Gegenwart von CGP 20712 A der maximale Anstieg der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten nicht mehr statistisch signifikant verschieden (LV: 78% ± 7.6 vs. RV: 63% ± 8.5; p = 0.0503, Abb. 10).

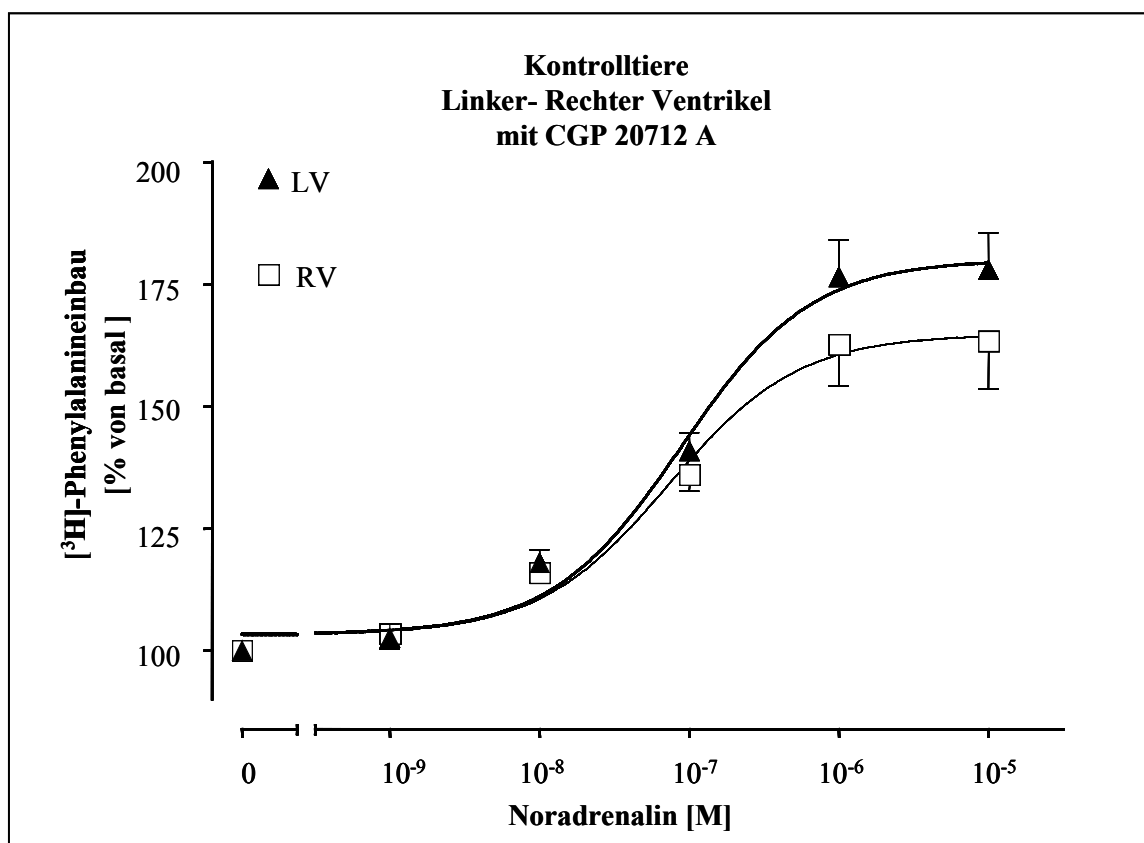


Abb. 10 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten (RV, □, n = 9) und linken Ventrikeln (LV, ▲, n = 9) von Kontrolltieren unter gleichzeitiger Zugabe von 300 nM CGP 20712 A. Die maximale Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war in linksventrikulären Kardiomyozyten gegenüber rechtsventrikulären Kardiomyozyten nicht mehr signifikant verschieden (p = 0.0503).

3.7.2. Proteinsynthese in Kardiomyozyten von MCT-Ratten

In Kardiomyozyten von MCT-behandelten Ratten war sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den Proteinsynthese-steigernden Effekt von Noradrenalin nach rechts in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben (Abb. 11).

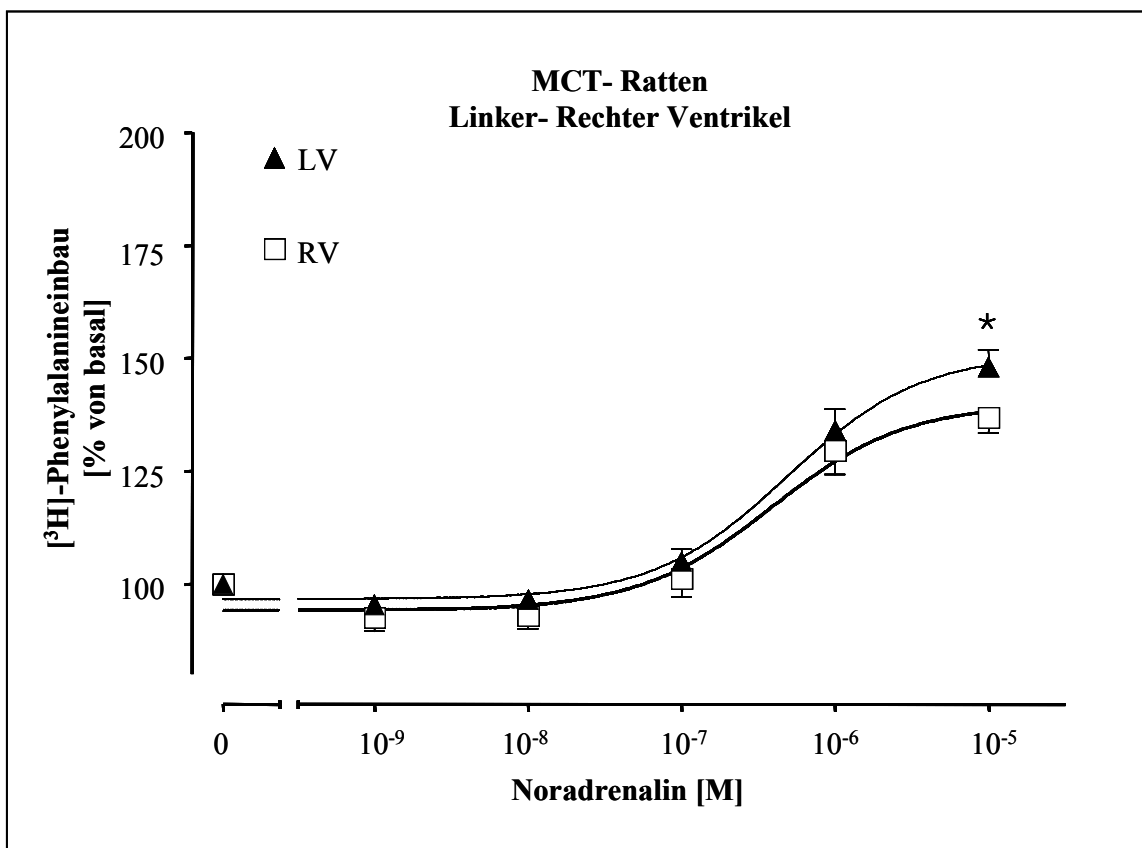


Abb. 11 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten (RV, □, n = 7) und linken Ventrikeln (LV, ▲, n = 13) von Monocrotalin-behandelten Ratten. Die maximale Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war in linksventrikulären Kardiomyozyten gegenüber rechtsventrikulären Kardiomyozyten signifikant höher (*p = 0.0161). LV: pEC₅₀ = 6.31 ± 0.11; RV: pEC₅₀ = 6.41 ± 0.23.

Auch die maximale Zunahme der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war leicht, wenn auch nicht signifikant, vermindert. Zugabe von 300 nM CGP 20712 A führte zu einer signifikanten Links-Verschiebung der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve und zu einer signifikanten Verstärkung der maximalen [³H]-Phenylalanin-Inkorporation sowohl in rechts- als auch in linksventrikulären Kardiomyozyten (Abb. 12+13).

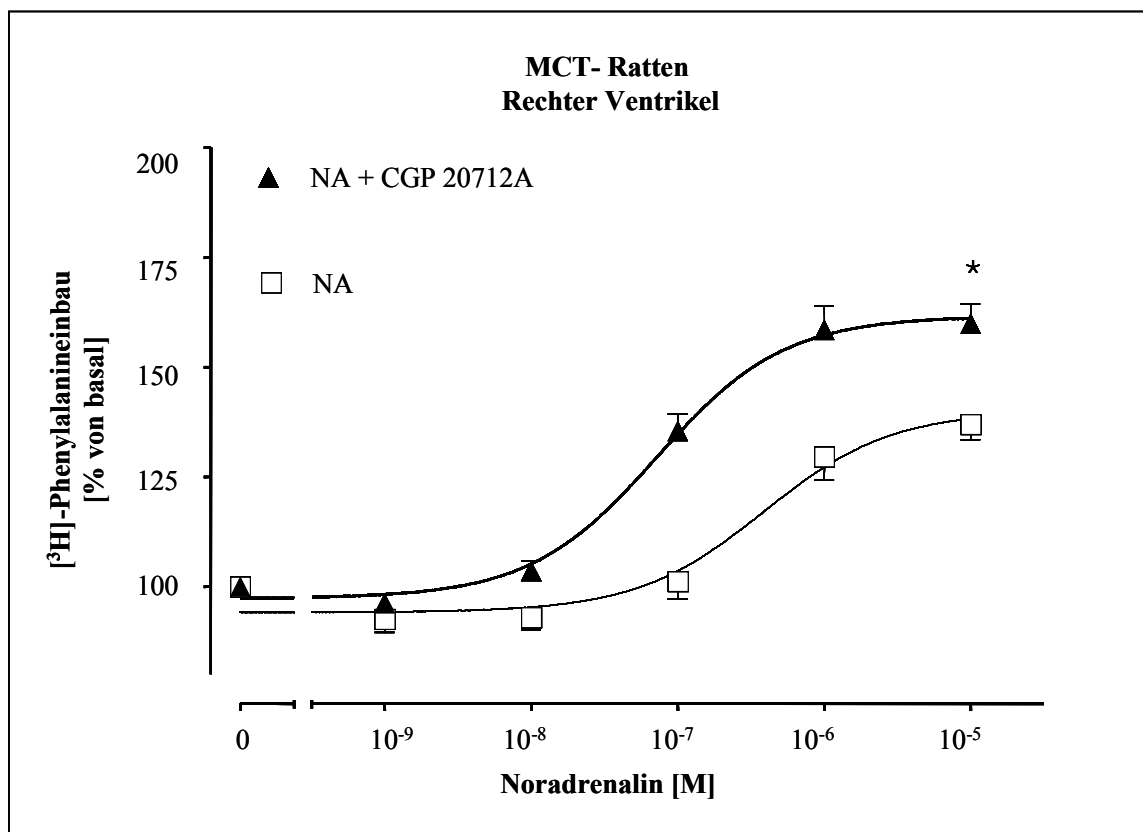


Abb. 12 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln von MCT-Ratten (□, n = 7). Durch gleichzeitige Zugabe des β-1-selektiven AR-Blockers CGP 20712 A (NA+CGP 20712 A, ▲, n = 11) ließ sich eine signifikante Steigerung der maximalen [³H]-Phenylalanin-Inkorporation erzielen (*p = 0.0026). Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten (p = 0.0003) Links-Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve: NA: pEC₅₀ = 6.41 ± 0.23 vs. NA+CGP 20712 A: pEC₅₀ = 7.14 ± 0.09.

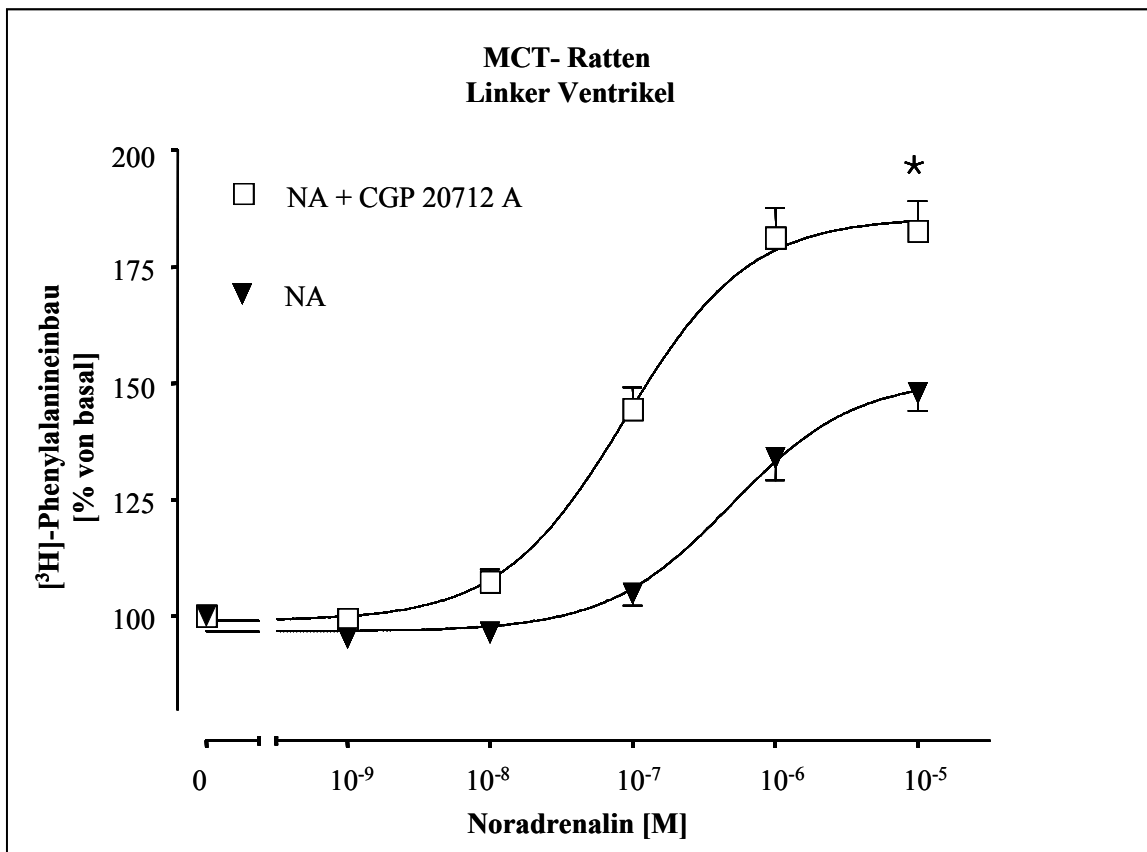


Abb. 13 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus linken Ventrikeln von MCT-Ratten (NA, ▼, n = 11). Durch gleichzeitige Zugabe des β -1-selektiven AR-Blockers CGP 20712 A (NA+CGP 20712 A, □, n = 13) ließ sich eine signifikante Steigerung der maximalen [³H]-Phenylalanin-Inkorporation erzielen ($\star p < 0.0001$). Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten ($p < 0.0001$) Links-Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve: NA: $pEC_{50} = 6.31 \pm 0.11$ vs. NA+CGP 20712 A: $pEC_{50} = 7.05 \pm 0.05$.

Die Proteinsynthese ließ sich durch die Zugabe von CGP 20712 A in den linksventrikulären Kardiomyozyten stärker stimulieren als in Zellen des rechten Ventrikels. Im Gegensatz zum gleichen Versuchsansatz bei den Kontrolltieren erreichte der Unterschied hier eine statistische Signifikanz ($p = 0.0087$, Abb. 14).

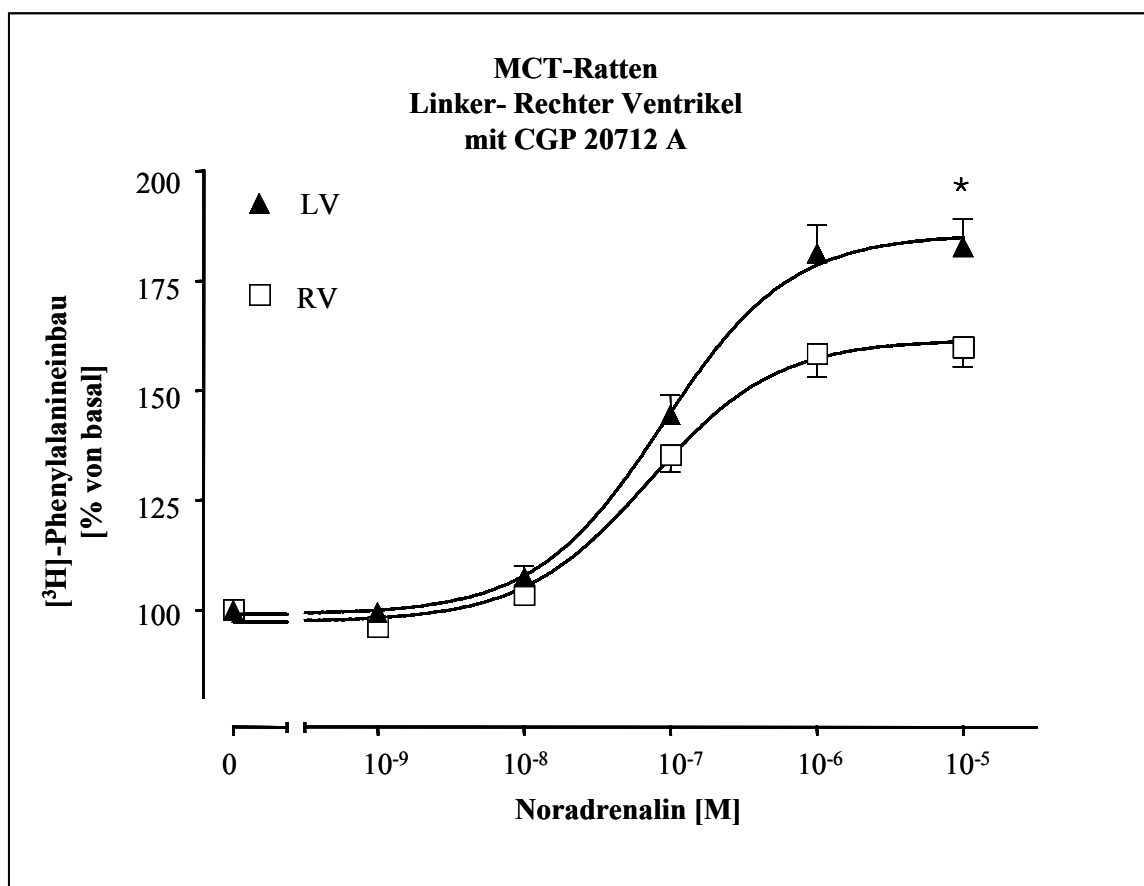


Abb. 14 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten (RV+CGP 20712 A, □, n = 11) und linken Ventrikeln (LV+CGP 20712 A, ▲, n = 11) von Monocrotalin-behandelten Ratten unter gleichzeitiger Zugabe von 300 nM CGP 20712 A. Die maximale Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war in linksventrikulären Kardiomyozyten gegenüber rechtsventrikulären Kardiomyozyten signifikant höher (*p = 0.0087). LV+CGP 20712 A: pEC₅₀ = 7.05 ± 0.05; RV+CGP 20712 A: pEC₅₀ = 7.14 ± 0.09.

3.7.3. Vergleich der Proteinsynthese in Kardiomyozyten aus MCT-Ratten gegen Kontrollen

Die Behandlung mit MCT, die zu einer signifikanten Reduzierung der α -AR-Dichte (s. 3.5.) in rechtsventrikulären Kardiomyozyten geführt hatte, wirkte sich auch auf die Proteinsynthese aus. In den Kardiomyozyten aus dem rechten Ventrikel von MCT-Ratten war eine leichte, wenn auch nicht signifikante Abnahme der Proteinsynthese zu erkennen (Kontrolle: +46% ± 7,12 vs. MCT: +37% ± 3,53, p = 0.0512; Abb. 15).

3. Ergebnisse

Stärker ausgeprägt war dieser Effekt in den Zellen aus dem linken Ventrikel (Abb. 16). Die maximale Steigerung der Proteinsynthese mit Noradrenalin 10^{-5}M war in Kardiomyozyten des linken Ventrikels von MCT-Ratten niedriger als bei den Kontrolltieren, jedoch war auch dieser Effekt nicht statistisch signifikant

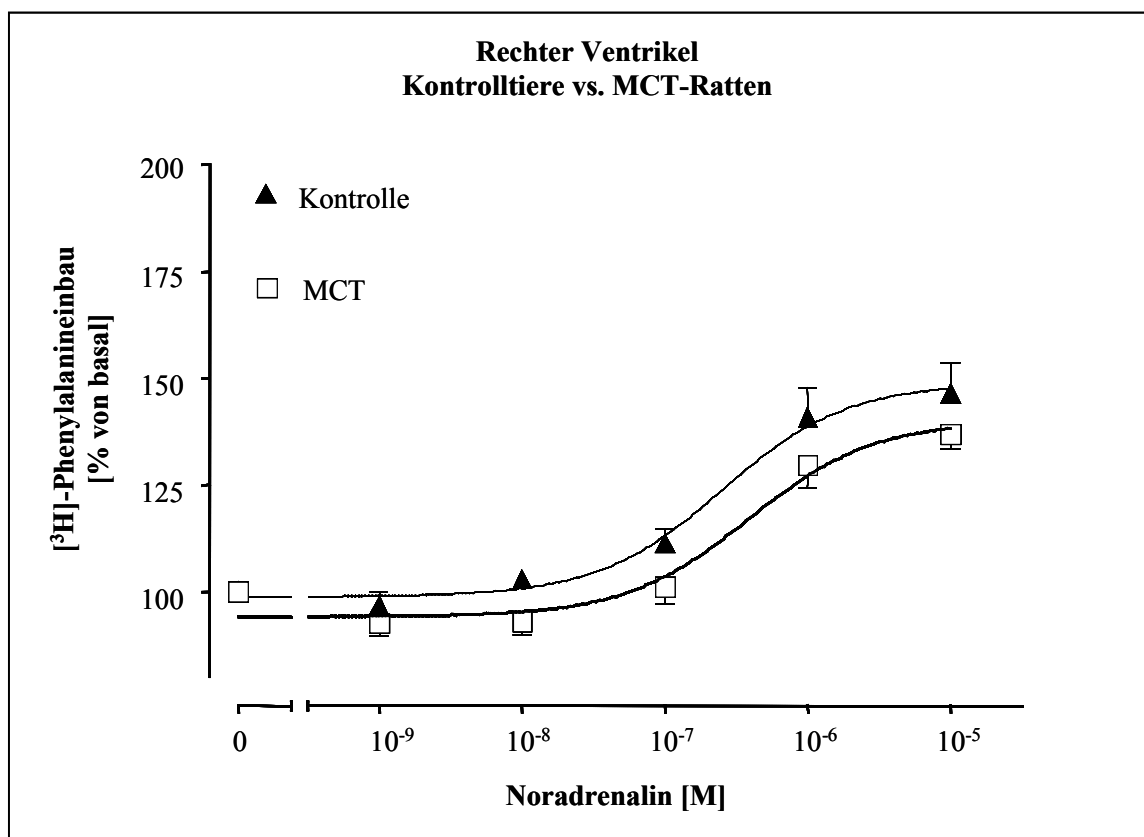


Abb. 15 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [^3H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln von MCT-Ratten (\square , $n = 7$) und Kontrolltieren (\blacktriangle , $n = 9$). Die größere Steigerung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten von Kontrolltieren war statistisch nicht signifikant ($p = 0.512$).

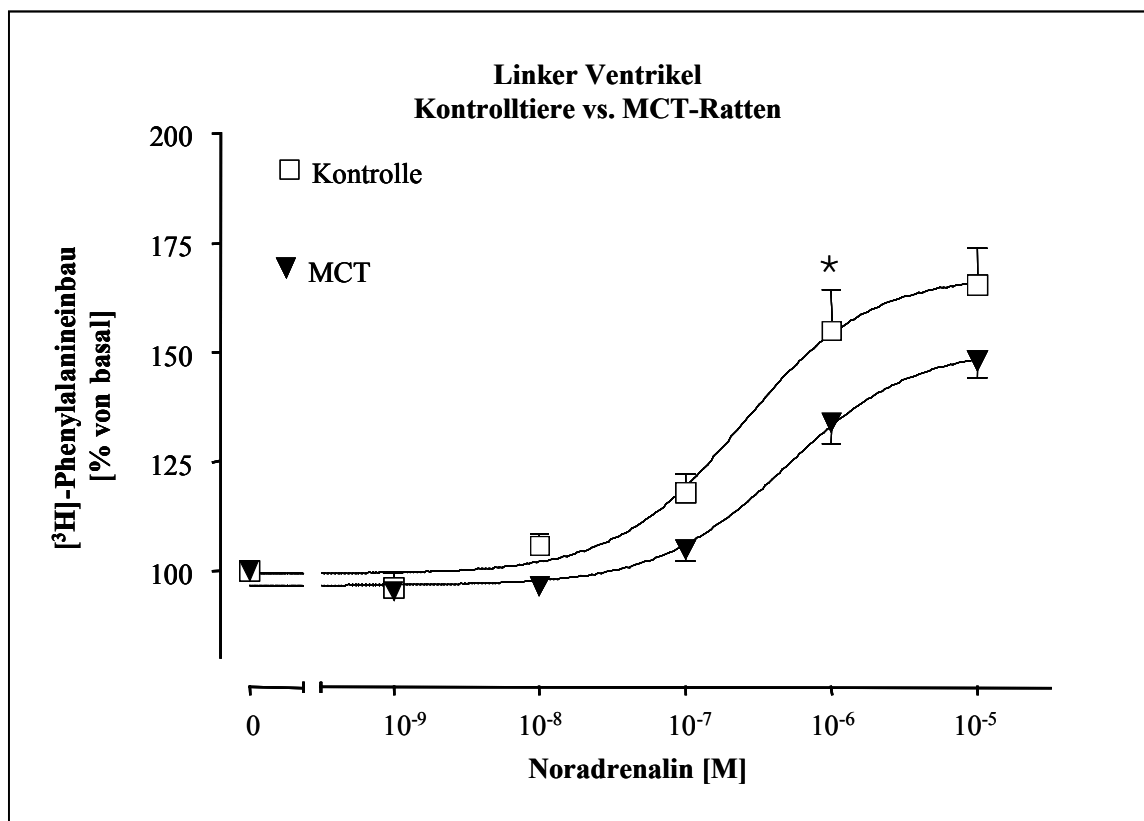


Abb. 16 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [^3H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus linken Ventrikeln von MCT-Ratten (\blacktriangle , $n = 11$) und Kontrolltieren (\square , $n = 9$). Die Steigerung der Proteinsynthese war in Zellen aus Kontrolltieren höher als in MCT-behandelten Tieren. Statistische Signifikanz nur bei Noradrenalin-Konzentration von 10^{-6}M , $\star p = 0.0406$.

Interessanterweise waren die Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Gegenwart von CGP 20712 A in MCT-behandelten Ratten und Kontroll-Ratten sowohl rechts- als auch linksventrikulär nahezu identisch (Abb.17+18).

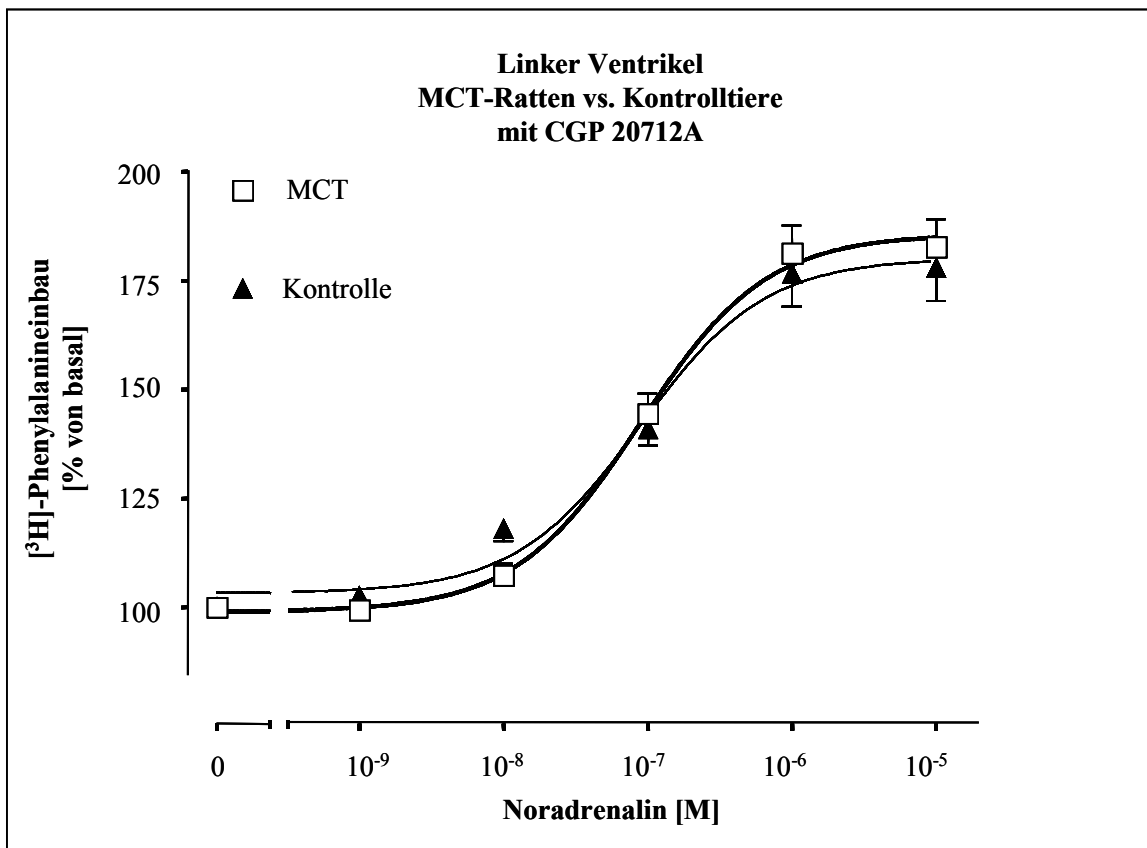


Abb. 17 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus linken Ventrikeln von Monocrotalin-behandelten Ratten (MCT, □, n = 11) und Kontrolltieren (Kontrolle, ▲, n = 9) unter gleichzeitiger Zugabe von 300 nM CGP 20712 A.

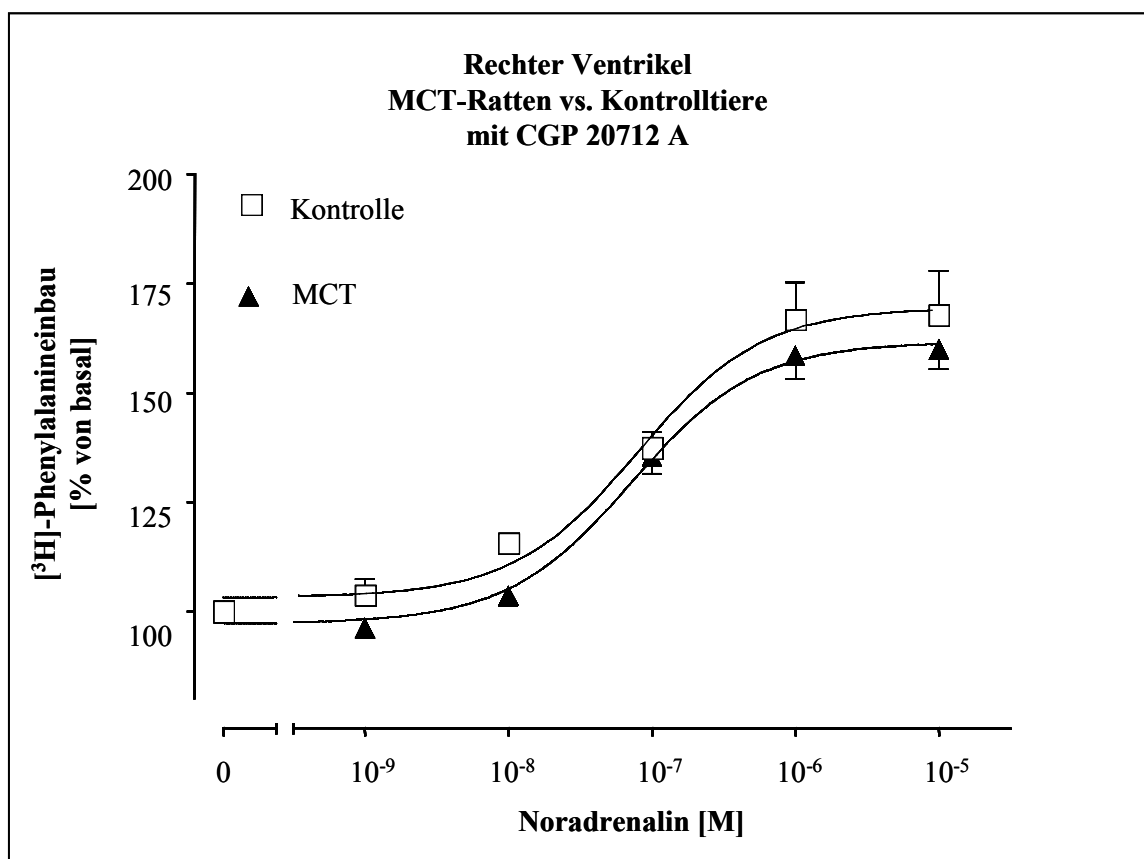


Abb. 18 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation unter gleichzeitiger Zugabe von 300 nM CGP 20712 A in Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln von Monocrotalin-behandelten Ratten (MCT, ▲, n = 11) und Kontrolltieren (Kontrolle, □, n = 9).

Die signifikant höhere Proteinsynthese in linksventrikulären Kardiomyozyten gegenüber rechtsventrikulären Zellen war nach Behandlung mit Monocrotalin nicht mehr nachweisbar. Die Proteinsynthese in rechtsventrikulären Kardiomyozyten von Kontrolltieren war vergleichbar mit denen aus linksventrikulären Kardiomyozyten von Monocrotalin-behandelten Ratten (Abb. 19).

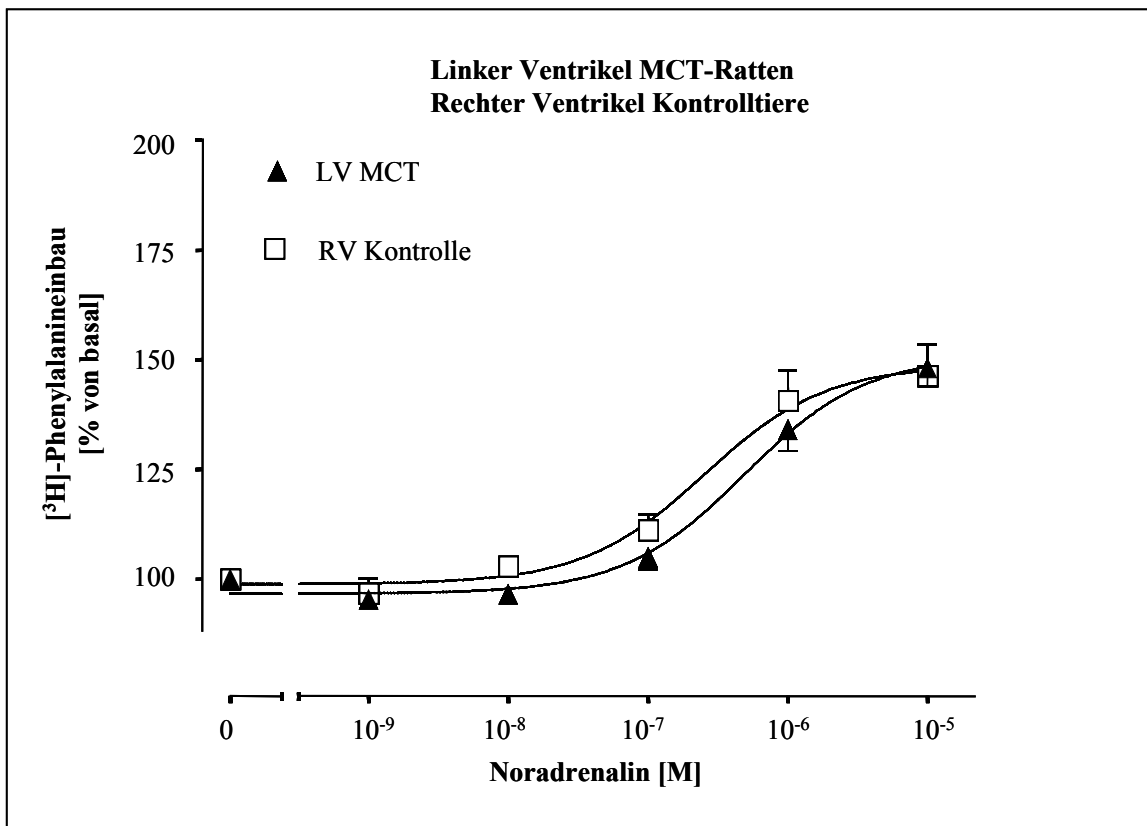


Abb. 19 Noradrenalin-induzierte Steigerung der [³H]-Phenylalanin-Inkorporation in Kardiomyozyten aus rechten Ventrikeln von Kontrolltieren (RV Kontrolle, □, n = 9) und Kardiomyozyten aus linken Ventrikeln Monocrotalin-behandelter Ratten (LV MCT, ▲, n = 13).

4. Diskussion

Untersuchungen der letzten zwanzig Jahre haben gezeigt, dass es bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu charakteristischen Veränderungen der autonomen Rezeptorsysteme kommt. Bristow et al. (1982) waren die ersten, die zeigen konnten, dass Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine signifikant erniedrigte Anzahl an myokardialen β -AR aufwiesen. Dieser Befund wurde in den darauf folgenden Jahren durch zahlreiche Arbeitsgruppen bestätigt und erweitert. So ist heute allgemein anerkannt, dass bei Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie die kardiale β -1-AR-Dichte erniedrigt, die kardiale β -2-AR-Dichte zwar unverändert ist, aber diese Rezeptoren vom Effektor-System (Adenylatylase) entkoppelt sind. Darüber hinaus kommt es zu einer Erhöhung des inhibitorischen G-Proteins G_i . Diese Veränderungen führen dazu, dass im insuffizienten menschlichen Herzen alle Rezeptorsysteme, die ihre positiv inotropen Effekte durch cAMP-Erhöhung vermitteln (β -AR eingeschlossen), abgeschwächt sind (Übersichten siehe Bristow, 1993; Brodde et al., 1995; Kaumann u. Molenaar, 1997; Brodde u. Michel, 1999). Bei biventrikulärer Herzinsuffizienz wurden solche β -AR-Veränderungen für den rechten und linken Ventrikel gefunden. Auf der anderen Seite konnten Bristow et al. (1992) zeigen, dass es bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzversagen kammer-spezifisch nur zu Veränderungen von β -AR im rechten Ventrikel kommt, während im linken Ventrikel dieser Patienten das β -AR-System nahezu normal war.

Das Monocrotalin (MCT)-Ratten-Modell ist ein etabliertes tierexperimentelles Modell für Rechtsherzversagen auf Grund einer pulmonalen Hypertonie (Doggrell u. Brown, 1998; Hasenfuss, 1998). So führt eine einmalige Injektion des Pyrrolizidin-Alkaloides MCT, das in der Leber zu Dehydromonocrotalin metabolisiert wird, durch massive Zerstörung pulmonaler Endothelzellen ca. 14 Tage nach der Applikation zu einem „Remodelling“ der pulmonalen Gefäße und damit zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes, die in einer rechtsventrikulären Hypertrophie endet (Ghodsi und Will, 1981; Meyrick et al., 1981).

Vier- bis sechs Wochen nach Applikation von MCT manifestiert sich die Symptomatik der Rechtsherzhypertrophie mit oder ohne Anzeichen einer

Rechtsherzinsuffizienz. Diese kardialen Veränderungen scheinen in erster Linie ihre Ursache im persistent hohen pulmonal-arteriellen Druck zu haben (Schultze und Roth, 1998). Somit scheint das MCT-Modell ein Modell für die primäre pulmonale Hypertonie des Menschen zu sein.

Veränderungen kardialer β -AR-Systeme sind im MCT-Modell der Ratte gut untersucht. Generell wurde gefunden, dass es bei diesen Ratten zu einer Abnahme der β -AR-Dichte kommt, wobei dieser Effekt im rechten Ventrikel mehr als im linken Ventrikel ausgeprägt ist (Ishikawa et al., 1991; Yoshi et al., 1994; Brown et al., 1998; Seyfarth et al., 2000). Interessanterweise waren die Ergebnisse etwas unterschiedlich, wenn das β -AR-System nicht in ventrikulären Membranen, sondern in isolierten rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten untersucht wurde. Dann kam es nämlich bei MCT-Ratten zu einer kammerspezifischen Abnahme der β -AR in Kardiomyozyten aus dem rechten Ventrikel, nicht aber – oder nur sehr geringfügig – in Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel (Leineweber et al., 2003). Ähnliche Befunde wurden auch für die durch β -AR-Stimulation hervorgerufenen positiv inotropen Effekte beschrieben. Diese waren in rechtsventrikulären Kardiomyozyten von MCT-Ratten signifikant erniedrigt, nicht aber in linksventrikulären Kardiomyozyten dieser Ratten (Vescovo et al., 1989).

Im Gegensatz zum β -AR-System ist nur relativ wenig bekannt über Veränderungen kardialer α -1-AR bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. α -1-AR-Stimulation führt im menschlichen Herzen über ein G-Protein (vermutlich $G_{q/11}$) zu einer Aktivierung einer Phospholipase C, welche die second messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol Triphosphat (IP_3) generiert (Michel et al., 1995). Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz scheint die Anzahl der ventrikulären α -1-AR eher erhöht zu sein (Übersicht s. Brodde und Michel, 1999), während der immunologisch nachweisbare Gehalt an $G_{q/11}$ unverändert ist (Pönicke et al., 1997), wie auch die durch α -1-AR-Stimulation hervorgerufene IP-Bildung unverändert zu sein scheint (Bristow et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Kardiomyozyten aus dem rechten und linken Ventrikel von MCT-behandelten Ratten untersucht, wie sich α -1-AR bei diesem tierexperimentellen Modell der pulmonalen Hypertonie verhalten. Wir fanden – im Gegensatz zu den Befunden am menschlichen Herzen (wobei allerdings angemerkt werden

sollte, dass es keine α -AR-Daten für Patienten mit pulmonaler Hypertonie gibt) – dass in den MCT-behandelten Ratten kammerpezifisch die α -1-AR-Dichte in den Kardiomyozyten aus dem rechten Ventrikel erniedrigt waren, während die des linken Ventrikels nahezu unverändert waren. Dies ging einher mit einer signifikanten Erniedrigung der durch α -1-AR Stimulation hervorgerufenen IP-Bildung in rechtsventrikulären Kardiomyozyten, während in linksventrikulären Kardiomyozyten die α -1-AR-vermittelte IP-Bildung nicht signifikant unterschiedlich zwischen MCT-behandelten- und Kontroll-Ratten war.

Es ist nicht bekannt, warum es zu diesen Unterschieden in α -1-AR Veränderungen im kranken Menschen- vs. Rattenherzen kommt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die im MCT-Modell der Ratte beobachteten Veränderungen spezifisch für die pulmonale Hypertonie sind (und damit mit den Veränderungen beim Menschen, die bei biventrikulärer Insuffizienz beobachtet wurden, nicht vergleichbar sind).

α - und β -AR im Rattenherzen unterscheiden sich sehr von denen im Menschenherzen: das Rattenherz hat ca. 8 mal mehr α -AR als der Mensch, und nur ca. 25 % der β -AR des menschlichen Herzens (Übersicht s. Brodde und Michel, 1999). Im menschlichen Herzen scheint der α -1A Subtyp zu überwiegen (Brodde und Michel, 1999), während im Rattenherzen der α -1B Subtyp überwiegt. Dieser Subtyp ist besonders anfällig gegenüber Agonist-induzierter Down Regulation (Yang et al., 1999). Dementsprechend wäre denkbar, dass in unserem MCT-Modell, bei dem die Plasmanoradrenalin Spiegel erhöht waren (s. Abb.2, was auf eine erhöhte Sympathikus-Aktivität schließen lässt, Goldstein, 1988), diese erhöhte Sympathikus-Aktivität zu einer gesteigerten Down-Regulation der rechtsventrikulären α -1B-AR geführt hat. Eine solche Down-Regulation der α -1B AR wäre auch im Einklang mit der Tatsache, dass in den Kardiomyozyten des rechten Ventrikels die durch Noradrenalin-hervorgerufene IP-Bildung erniedrigt war. Pönicke et al. (2001) hatten zeigen können, dass in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte die durch Noradrenalin-hervorgerufene IP-Bildung zum größten Teil über Stimulation von α -1B-AR vermittelt wird.

Die funktionelle Rolle von α -1-AR im Herzen ist nicht ganz geklärt. α -1-AR-Stimulation kann zu positiv inotropen Effekten führen (Übersicht siehe Terzic et al., 1993). Darüber hinaus kann α -1-AR-Stimulation in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu

einer gesteigerten Proteinsynthese führen (Übersicht s. Sudgen u. Clerk, 1998; Schlüter u. Piper, 1999).

Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich zeigen können, dass - in Kardiomyozyten adulter Ratten – der körpereigene Transmitter Noradrenalin zu einer Steigerung der Proteinsynthese (gemessen als Inkorporation von [³H]-Phenylalanin in die Kardiomyozyten) über α -1-AR führt, da dieser Effekt durch den α -1-AR Antagonisten Prazosin gehemmt werden kann (Schäfer et al., 2001; Pönicke et al., 2001).

Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Proteinsynthese-steigernde Effekt von Noradrenalin über Stimulation des α -1A-AR Subtyps vermittelt wird. Nachgeschaltete Prozesse sind die Aktivierung einer Protein Kinase C, der PI-3-Kinase und p70^{S6}-Kinase (Pönicke et al., 2001).

Die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese konnte durch β -AR Antagonisten wie Propanolol, CGP 20712 A (Schäfer et al., 2001), Bisoprolol, Carvedilol und Bucindolol (Pönicke et al., 2002) gesteigert werden, und durch β -AR Agonisten wie Isoprenalin oder Dobutamin verringert werden (Schäfer et al., 2001; Brodde et al., 2001). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass – in Kardiomyozyten der Ratte – Noradrenalin einen dualen Effekt auf die Proteinsynthese ausübt. Es steigert die Proteinsynthese via α -1-AR-Stimulation und hemmt sie gleichzeitig via β -1-AR-Stimulation.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Befunde. Sie zeigen, dass Noradrenalin sowohl in Kardiomyozyten aus dem rechten als auch aus dem linken Ventrikel die Proteinsynthese (hier gemessen als [³H]-Phenylalanin-Inkorporation) steigert. In beiden Präparaten konnte der Noradrenalin-Effekt durch Prazosin gehemmt werden und durch den hochselektiven β -1-AR Antagonisten CGP 20712 A gesteigert werden.

Die Effekte von Noradrenalin, in Gegenwart und Abwesenheit von CGP 20712 A, waren in Kardiomyozyten des linken Ventrikels signifikant stärker als in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels.

In den MCT-behandelten Ratten waren die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die durch Noradrenalin hervorgerufene Proteinsynthese sowohl in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels als auch in Kardiomyozyten des linken Ventrikels leicht nach rechts in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben.

Auch die maximale [³H]-Phenylalanin-Inkorporation war leicht, aber nicht signifikant gegenüber den nicht-MCT-behandelten Ratten erniedrigt. Interessanterweise war jedoch in den Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten in Gegenwart von CGP 20712 A sowohl im rechten wie im linken Ventrikel das Ausmaß der durch Noradrenalin-induzierten Proteinsynthese nicht mehr von dem in Kontroll-Ratten unterschiedlich.

In Gegenwart von CGP 20712 A ist die Noradrenalin-Wirkung eine (überwiegend) reine α -1-AR stimulierende Wirkung. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass in Kardiomyozyten von MCT-Ratten die über α -1-AR Stimulation hervorgerufene Proteinsynthese nur unwesentlich beeinträchtigt ist, obwohl in den Kardiomyozyten aus dem rechten Ventrikel von MCT-Ratten die α -1-AR-Dichte signifikant erniedrigt ist. Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen α -1-AR-Dichte und α -1-AR-vermittelter Proteinsynthese ist nicht bekannt. Es sollte aber darauf hingewiesen werden, dass im Rattenherzen α -1B-AR überwiegen und α -1A-AR nur eine Minderheit darstellen (s. oben).

Wie oben erwähnt, vermitteln α -1B-AR die Inositol-Phosphat-Bildung (Pönicke et al., 2001) und sind besonders anfällig gegenüber Agonist-induzierter Down-Regulation (Yang et al., 1999), während α -1A-AR die Proteinsynthese vermitteln (Pönicke et al., 2001). Es wäre also denkbar, dass in den MCT-Ratten auf Grund der erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems (s. oben) die rechtsventrikulären α -1B-AR down-reguliert sind (was zu einer Abnahme der α -1-AR-Dichte und der durch Noradrenalin-hervorgerufenen IP-Bildung führt), während die myokardialen α -1A-AR unverändert sind und somit auch eine nahezu unveränderte Proteinsynthese vermitteln können.

Allerdings lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht schließen, in wie weit diese Rezeptor-Veränderungen zur Ausbildung der rechtsventrikulären Hypertrophie bei den MCT-behandelten Ratten beitragen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es bei Monocrotalin-behandelten Ratten mit einer Rechtsherzhypertrophie zu einer kammerspezifischen Abnahme der α -1-AR-Dichte in rechtsventrikulären Kardiomyozyten kommt, während sich die α -1-AR-Dichte in linksventrikulären Kardiomyozyten nicht von der in unbehandelten Kontrolltieren unterscheidet. Auch die durch α -1-AR Stimulation hervorgerufene Zunahme der IP-Bildung war in rechtsventrikulären Kardiomyozyten

MCT-behandelter Ratten signifikant stärker reduziert, als in linksventrikulären Kardiomyozyten.

Im Gegensatz zur α -1-AR-Dichte und der durch α -1-AR Stimulation hervorgerufenen Zunahme der IP-Bildung war die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese in den Kardiomyozyten (vermittelt durch α -1-AR Stimulation und gehemmt durch β -1-AR Stimulation) MCT-behandelter Ratten nicht kammer-spezifisch sowohl in rechts- als auch in linksventrikulären Zellen leicht, aber nicht signifikant, erniedrigt. Blockade der β -1-AR durch CGP 20712 A führte in rechts- wie linksventrikulären Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Noradrenalin-induzierten Proteinsynthese. Interessanterweise waren in Gegenwart von CGP 20712 A die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese in rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten von denen in Kontroll-Ratten nicht mehr unterschiedlich.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass in MCT-behandelten Ratten das kardiale α -1-AR-System kammer-spezifisch im rechten Ventrikel erniedrigt ist. Die Tatsache, dass dies zwar auch für die durch α -1-AR Stimulation IP-Bildung, nicht aber für die durch α -1-AR Stimulation hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese gilt, deutet daraufhin, dass verschiedene α -1-AR Subtypen an diesen Prozessen beteiligt sein könnten.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des α -adrenergen Rezeptorsystems in Kardiomyozyten von adulten Ratten mit einer isolierten Rechtsherzhypertrophie. Als Modell für die Induktion der Rechtsherzhypertrophie diente das etablierte Monocrotalin (MCT) -Modell. Nach einer einmaligen i.p. Applikation von 60 mg/kg KG MCT entwickelten die Versuchstiere eine pulmonale Hypertonie mit sekundärer Rechtsherzhypertrophie, welche sich in einem erhöhten rechtsventrikulären Druck (gemessen über Mikrokatheter) und einem erhöhten Gewicht des rechten Ventrikels widerspiegelte. Ebenso fanden sich erhöhte Plasmanoradrenalin Spiegel bei den mit MCT-behandelten Ratten.

Wir untersuchten die α -1-AR-Dichte in Kardiomyozyten von MCT-Ratten und Kontrolltieren. Bei den Kontrolltieren war die α -1-AR-Dichte in Kardiomyozyten aus dem rechten und linken Ventrikel nahezu gleich. In MCT-Ratten fand sich eine signifikante Abnahme der α -1-AR-Dichte nur in Zellen des rechten Ventrikels, während die α -1-AR-Dichte in linksventrikulären Kardiomyozyten nur unwesentlich abnahm.

Dies wurde von einer signifikanten Reduktion der durch α -1-AR Stimulation hervorgerufenen Zunahme der IP-Bildung in rechtsventrikulären Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten begleitet, während in Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel MCT-behandelter Ratten die durch α -1-AR Stimulation hervorgerufene Zunahme der IP-Bildung nur leicht, aber nicht signifikant reduziert war.

Im Gegensatz zur α -1-AR-Dichte und der durch α -1-AR Stimulation hervorgerufenen Zunahme der IP-Bildung war die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese, die durch α -1-AR Stimulation vermittelt wird und durch β -1-AR Stimulation gehemmt werden kann, in den Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten nicht kammerspezifisch sowohl in rechts- als auch in linksventrikulären Zellen leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Blockade der β -1-AR durch 300 nM CGP 20712 A führte in rechts- wie linksventrikulären Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Noradrenalin-induzierten Proteinsynthese. Interessanterweise waren in Gegenwart von CGP 20712 A die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die durch Noradrenalin hervorgerufene Zunahme der Proteinsynthese in rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten von denen in Kontroll-Ratten nicht mehr

unterschiedlich. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass in MCT-behandelten Ratten das kardiale α -1-AR System kammerspezifisch im rechten Ventrikel erniedrigt ist. Die Tatsache, dass dies auch für die durch α -1-AR Stimulation vermittelte Zunahme der IP₃-Bildung, nicht jedoch für die Proteinsynthese gilt, deutet daraufhin, dass verschiedene α -1-AR Subtypen (α -1B-AR für die IP₃-Bildung und α -1A-AR für die Proteinsynthese) an diesen Prozessen beteiligt sein könnten. Ob diese Rezeptor-Veränderungen auf Patienten mit Rechtsherzinsuffizienz übertragbar sind, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

6. Literaturverzeichnis

1. 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* **12** (1988); 357-361
2. Bowditch HP: Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft zu Leipzig. *Mathematisch-Physische Classe* **23** (1871): 652–689
3. 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
4. Bristow MR: Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J Am Coll Cardiol* **22 (Suppl A)** (1993); 61A-71A
5. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB: Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* **307** (1982); 205-211
6. Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV: β -adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest* **89** (1992); 803-815
7. Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, Hoffman BB: Alpha1-adrenergic receptors in the nonfailing and failing heart. *J Pharmacol Exp Ther* **247** (1988); 1039-1045

8. Brodde O-E: β_1 - and β_2 -Adrenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* **43** (1991); 203-242
9. Brodde O-E, Michel MC: Adrenergic and muscarinergic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51** (1999); 651-689
10. 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); 570-587
11. Brodde O-E, Pönicke K, Goldberg M: In adult rat cardiomyocytes noradrenaline-induced hypertrophic response is inhibited by β_1 adrenoceptor stimulation and by pertussis toxin treatment. *FASEB J* **15** (2001); A 230 (Abstr.)
12. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C: Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **31** (1998); 108-115
13. Bruner LH, Carpenter LJ, Hamlow P, Roth RA: Effect of a mixed function oxidase inducer and inhibitor on monocrotaline pyrrole pneumotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **85** (1986); 416-427
14. Bugaisky LB, Gupta M, Gupta MP, Zak R: Cellular and molekular mechanisms of cardiac hypertrophy. In: *The heart and Cardiovascular System (2nd. ed.)*, edited by H.A. Fozzard. New York: Raven, 1992, p. 1621-1640
15. Clark WA, Rudnik SJ, Simpson DG, LaPres JJ, Decker RS: Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthetic capacity of intact adult hearts. *Am J Physiol* **265** (1993); H573-H582

16. Decker RS, Cook MG, Behnke-Barclay MM, Decker ML, Lesch M, Samarel AM: Catecholamines modulate protein turnover in cultured, quiescent rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol* **265** (1993); H329-H339
17. Dennis P, Vaughan-Williams EM: Hypoxic cardiac hypertrophy is not inhibited by cardioselective or non-selective β -adrenoceptor antagonists. *J Physiol* **324** (1982); 365-374
18. Doggrell SA, Brown L: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* **39**(1998); 89-105
19. Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC: CGP 20712 A: A useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **130** (1986); 137-139
20. Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK: Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* **75** (1987); 331-339
21. Ferrara N, Davia K, Abete P, Rengo F, Harding SE: Alterations in β -adrenoceptor mechanisms in the aging heart: Relationship with heart failure. *Ageing Clin Exp Res* **9** (1997);391-403
22. Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR: Assessment of the β -adrenergic receptor pathway in the intact and failing human heart: progressive receptor downregulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* **74** (1986); 1290-1309
23. Ghodsi F, Will JA: Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol.* **240** (1981); H149-H155
24. Goldstein GS: Plasma catecholamines and essential hypertension: an analytical review. *Hypertension* **5** (1988); 86-99

25. Guyton AC, Taylor AE, Granger HJ: Dynamics and control of body fluids. *Circulatory physiology II*, Saunders, Philadelphia (1975).
26. Hasenfuss G: Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* **39** (1998); 60-76
27. Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA: Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol* **120** (1993); 281-287
28. Hwang K-C, Gray CD, Sweet WE, Moravec CS, Im M-J: α_1 -adrenergic receptor coupling with G_h in the failing human heart. *Circulation* **94** (1996); 718-726
29. Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Morioka S, Moriyama K: Biventricular downregulation of β -adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Jpn Circ J* **55** (1991); 1077-1085
30. Iwakura K, Hori M, Watanabe Y, Kitabatake A, Cragoe EJ Jr, Yoshida H, Kamada T: α_1 -Adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and Ca^{2+} in cardiomyocytes through Na^+/H^+ and Na^+/Ca^{2+} exchange. *Eur J Pharmacol* **186** (1990); 29-40
31. Kashara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Subito K, Kakusaka I, Yamagata S, Ohmori S, Kitada M, Kuriyama T: Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J Cardiovasc Pharmacol* **30** (1997); 124-129
32. Kaumann AJ, Molenaar P: Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355** (1997); 667-681
33. Lalich JJ, Merkow L: Pulmonary arteritis produced in rats feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* **10** (1961); 744-750

34. Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen H-P, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde O-E: Cardiac β -adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **41** (2003); 333-342
35. Limas CJ, Limas C, Goldenberg IF: Intracellular distribution of adrenoceptors in the failing human myocardium. *Am Heart J* **117** (1989); 1310-1316
36. Lohse MJ: G-protein-coupled receptor kinases and the heart. *Trends Cardiovasc Med* **5** (1995); 63-65
37. Meyrick B, Brigham KL: Repeated Escherichia coli endotoxin-induced pulmonary inflammation causes chronic pulmonary hypertension in sheep. Structural and functional changes. *Lab Invest* **55** (1986); 164-176
38. Meyrick B, Gamble W, Reid L: Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* **239** (1981); H692-H702.
39. Michel MC, Kenny B, Schwinn DA: Classification of α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **352** (1995): 1-10
40. Michel MC, Hanft G, Groß G: Radioligand binding studies of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol* **111** (1994); 533-538
41. Michel RP, Smith TT, Poulsen RS: Distribution of fluid in bronchovascular bundles with permeability lung edema induced by α -naphthyl-thiourea in dogs – a morphometric study. *Lab Invest* **51** (1984); 97-103
42. Morgan HE, Baker KM: Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* **83** (1991); 13-25

43. Noel J, Pouyssegur J: Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na⁺-H⁺-exchanger isoforms. *Am J Physiol* **268** (1995); C2283-C2296
44. Pan LC, Lamé MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ: Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. *Toxicol Appl Pharmacol* **110** (1991); 336-446
45. Parker TG, Packer SE, Schneider MD: Growth factors, protooncogenes and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu Rev Physiol* **53** (1991); 179-200
46. Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde O-E: Differential effects of bucindolol and carvedilol on noradrenalin-induced hypertrophic response in ventricular cardiomyocytes of adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* **301** (2002); 71-76
47. Pönicke K, Schlüter KD, Heinroth-Hoffmann I, Seyfarth T, Goldberg M, Osten B, Piper H-M, Brodde O-E: Noradrenalin-induced increase in protein synthesis is mediated by α_{1A} -adrenoceptors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364** (2001); 444-453
48. Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowski HR, Brodde O-E: Endothelin receptors in the nonfailing and the failing human heart. *Circulation* **97** (1998); 744-751
49. Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA: Development of morphologic, hemodynamic, and biological changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol* **106** (1990); 179-200
50. Roskamm H, Reindell H: *Herzkrankheiten; 2. Aufl.* ,Springer, Berlin (1982).

51. Schäfer M, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde O-E, Piper HM, Schlüter KD: β -adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of α -adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* **37** (2001); 300-307
52. Schäfers RF, Poller U, Pönicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC, Brodde O-E: Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and endogenous noradrenaline released by infused tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355** (1997); 239-249
53. Schlüter KD, Piper H: Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *FASEB J* **13 (Suppl)** (1999); 317-322
54. Schultze AE, Roth RA: Chronic pulmonary hypertension – the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **1** (1998); 271-346
55. Seyfarth T, Gerbershagen H-P, Giessler C, Leineweber K, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde O-E: The cardiac β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenyl-cyclase system in monocrotaline-treated rats. *J Mol Cell Cardiol.* **32** (2000); 2315- 2326
56. Shipley RA, Shipley LJ, Wearn JT: The capillary supply in normal and hypertrophied hearts of rabbits. *J Exp Med* **65** (1937); 29-42
57. Smith HJ, Nuttall A: Experimental models of heart failure. *Cardiovasc Res* **19** (1985); 181-186
58. Starksen NF, Simpson PC, Bisphoric N, Coughlin SR, Lee WMF, Escobedo JA, Williams LT: Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc proto-oncogen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** (1986); 8348-8350

59. Starling EH and Visscher MB.: The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol* **62** (1926): 243–261
60. Steinfath M, Chen Y-Y, Lavický J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H: Cardiac α_1 -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* **102** (1992a); 185-188
61. Steinfath M, Danielsen W, Leyen H van der, Mende U, Meyer W, Neumann J, Nose J, Reich T, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmar P, Haverich A: Reduced α_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in human end-stage heart failure. *Br J Pharmacol* **105** (1992b); 463-469
62. Sudgen PH, Clerk A: Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* **76** (1998); 725-746
63. Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT: Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* **54** (1983); 371-374
64. Terzic A, Puceat M, Vassorit G, Vogel SM: Cardiac α_1 -adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* **45** (1993); 147-175
65. Vago T, Bevilacqua M, Norbiato G, Baldi G, Chebat E, Bertora P, Baroldi G, Accinni R: Identification of α_1 -adrenergic receptors on sarcolemmal from normal subjects and patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: Characteristics and linkage to GTP-binding protein. *Circ Res* **64** (1989); 474-481
66. Vescovo G, Jones SM, Harding SE, Poole-Wilson PA: Isoproterenol sensitivity of isolated cardiac myocytes from rats with monocrotaline-induced right-sided hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **21** (1998); 1047-1061

67. Viko H, Osnes JB, Sjetnan AE, Skomedal T: Improved isolation of cardiomyocytes by trypsination in addition to collagenase treatment. *Pharmacol Toxicol* **76** (1995); 68-71
68. Wagner JG, Petry TW, Roth RA: Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-link in pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* **264** (1993); L517-L522
69. Weinberg DH, Trivedi P, Tan CP, Mitra S, Perkins-Barrow A, Borkowski D, Strader CD, Bayne M: Cloning, expression and characterization of human α -adrenergic receptors α_{1A} , α_{1B} and α_{1C} . *Biochem Biophys Res Commun* **201** (1994); 1296-1304
70. Wilson DW, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ: DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **166** (2000); 69-80
71. Wilson DW, Segall HJ: Changes in type II cell populations in monocrotaline pneumotoxicity. *Am J Pathol* **136** (1990); 1293-1299
72. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK: Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* **38** (1989); 57-80
73. Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Feffries WB, Scofield MA: Distribution of α_1 -adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **32** (1998); 117-122
74. Yang M, Ruan J, Voller M, Schalken J, Michel MC: Differential regulation of human α_1 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **359** (1999); 439-446

75. Yoshi H, Tobise K, Ondera S: Intraventricular changes in the β -adrenoceptor-adenylate-cyclase system of the rat heart with the progress of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Jpn Circ J* **58** (1994); 855-865
76. Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher D, Roden RL, Minobe W, Tremmel KD, Bristow MR: Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *Eur Heart J* **17 (Suppl B)** (1996); 8-16

7. Thesen

1. Einmalige intraperitoneale Injektion von Monocrotalin (MCT) (60 mg/ kg KG) führt bei Ratten zu einer pulmonalen Hypertonie und Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie.
2. Bei mit MCT behandelten Ratten lassen sich erhöhte Plasmanoradrenalin Spiegel nachweisen.
3. Die Dichte von α -1-Adrenozeptoren (AR) ist in Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels bei gesunden Ratten gleich.
4. Die Dichte der α -1-AR nimmt kammerpezifisch in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels von MCT-Ratten ab.
5. Die über α -1-AR Stimulation induzierte Bildung von Inositoltriphosphat ist auch kammerpezifisch in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels von MCT-Ratten herabgesetzt.
6. Die Proteinsynthese wird in Kardiomyozyten der Ratte über α -1-AR vermittelt.
7. In den Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten ist die Proteinsynthese sowohl in rechts- als auch in linksventrikulären Zellen erniedrigt, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.
8. Die Proteinsynthese wird in Kardiomyozyten der Ratte durch Stimulation von β -1-AR gehemmt.

8. Lebenslauf

8. Lebenslauf

Name Hans-Peter Gerbershagen
Anschrift Schleifweg 15, 06114 Halle
Geburtsdatum 09.01.1971
Geburtsort Aalen
Familienstand verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

1977-1981 Grundschule Weinheim /Bergstr.
1981-1990 Werner-Heisenberg-Gymnasium Weinheim – Abitur

Zivildienst

7/1990-10/1991 Caritas Sozialer Hilfsdienst

Studium

10/1991-10/1997 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Berufliche Tätigkeit

1/1998-6/1999 Arzt im Praktikum in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und
Thoraxchirurgie des Diakoniekrankenhauses Halle/ S.
7/1999-2/2000 Promotionsarbeit als Doktorand im Institut für Pharmakologie/
Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
ab 3/2000 Assistenzarzt in der Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
13.07.2005 Facharzt für Urologie

Halle, 14. September 2005

9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Weiterhin erkläre ich, dass ich diesen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens der vorliegenden Arbeit erstmalig beim Dekan des Wissenschaftlichen Rates der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stelle und in der Vergangenheit auch an keiner anderen weder im In- noch im Ausland Universität gestellt habe.

Halle, 14. September 2005

10. Vorabpublikationen

Seyfarth T, Gerbershagen H-P, Giessler C, Leineweber K, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde O-E: The cardiac β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl-cyclase system in monocrotaline-treated rats. *J Moll Cell Cardiol* **32** (2000); 2315-2326.

Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen H-P, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde O-E: Cardiac β -adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **41** (2003); 333-342.

11. Danksagung

Mein Dank gilt zu aller erst Herrn Professor Dr. Brodde für seine wissenschaftliche Betreuung und hilfreiche Unterstützung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Hoffmann-Heinroth für die Einweisung und Hilfe bei den Herzkatheteruntersuchungen und Blutentnahmen der Versuchstiere, sowie bei der Isolierung und Kultur der Kardiomyozyten.

Herrn Dr. Pönicke und den technischen Mitarbeiterinnen Frau Dunemann und Frau Niebisch gilt mein Dank für ihre wertvolle Hilfe bei der Laborarbeit.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Torsten Seyfarth und Frau Dr. Kirsten Leineweber während der Arbeit an dem gemeinsamen Projekt bedanken.

Nicht zuletzt meiner lieben Frau Claudia gebührt mein Dank für ihre stetige Motivierung zum Fertigstellen dieser Arbeit.