

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)
des Fachbereichs Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Das kardiale sympathoadrenerge System im Altersverlauf des gesunden Herzens und des Herzens
bei hypertensiver Herzkrankheit - Untersuchungen an Ratten des normotensiven WKY- und des
spontanhypertensiven SHR-Stammes**

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

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

von Stefan Dreßler

geboren am 30.12.1977 in Halle/Saale

Betreuerin: PD Dr. Kirsten Leineweber

Gutachter:

Halle 2008

In memoriam Prof. Dr. rer. nat. Otto-Erich Brodde

(02.01.1942 - 13.10.2007)

Referat

Ziel der Arbeit war es, die Altersveränderungen des sympathoadrenergen Systems im gesunden Herzen zu erfassen und mit denen eines erkrankten, hypertensiven Herzens zu vergleichen. Hierbei sollte festgestellt werden inwieweit sich Veränderungen des myokardialen sympathoadrenergen Systems im Alter bzw. in der Linksherzhypertrophie voneinander unterscheiden.

Dazu wurden in spontan hypertensiven Okamoto-Ratten (SHR) und in normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) in den Alterstufen 4, 8, 12, 24, 36 und 52 Wochen der Plasma-Noradrenalinspiegel, die Noradrenalin-Clearance (Aktivität und Dichte des neuronalen Noradrenalin-Transporters; nNAT) sowie die Anzahl und Subtypenverteilung der β -Adrenozeptoren (β -AR) im Herzen untersucht.

In SHR manifestierte sich bereits in den frühen Lebensjahren eine arterielle Hypertonie und eine kompensierte Linksherzhypertrophie. Im Altersverlauf zeigte sich bei beiden Stämmen ein Anstieg des Noradrenalinspiegels im Blutplasma mit nahezu gleichen Werten im hohen Alter. In SHR erfolgte der Anstieg jedoch zu einem früheren Zeitpunkt als in WKY-Ratten. Ein altersabhängiger Rückgang der nNAT-Aktivität in beiden Ventrikeln zeigte sich in SHR ebenfalls eher als in WKY-Ratten. Im Alter fand sich dann bei beiden Stämmen eine gleichermaßen reduzierte Aktivität. Eine altersabhängige Reduktion der nNAT-Dichte zeigte sich dagegen nur in SHR. Die Affinität des nNAT zum Liganden war im Altersverlauf beider Stämme sowie zwischen den Stämmen nicht signifikant verändert.

Eine Hypertonie-bedingte Downregulation der β -AR war in SHR nicht nachweisbar. Jedoch fand sich in beiden Stämmen vor allem im linken Ventrikel eine nahezu gleichwertige, altersabhängige Abnahme der β -AR-Dichte. Nur in SHR war im Alter der Anteil des β_1 -Subtyps an der gesamten β -AR-Dichte reduziert, am ehesten aufgrund des Anstieges des β_2 -Subtyps. Die Affinität der β -AR war im Altersverlauf beider Stämme sowie im Vergleich zwischen den Stämmen nicht verändert.

Veränderungen des sympathoadrenergen Systems im „hypertensiven Herzen“ können zum Teil eher und intensiver auftreten als im „alternden Herzen“. Es gibt daneben kardiale Veränderungen, die sich im Alter unabhängig von einer hypertensiven Herzkrankheit darstellen und umgekehrt, so dass ein altes Herz in seinem Funktionsverlust nicht zwangsläufig einem kranken Herzen entspricht.

Dreßler, Stefan: Das kardiale sympathoadrenerge System im Altersverlauf des gesunden Herzens und des Herzens bei hypertensiver Herzkrankheit - Untersuchungen an Ratten des normotensiven WKY- und des spontanhypertensiven SHR-Stammes. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Arterielle Hypertonie – Bedeutung, Pathogenese und kardiale Folgen	1
1.2. Das sympathische Nervensystem	3
1.2.1. Aufbau und Funktion	3
1.2.2. Noradrenalin-Clearance	3
1.3. β -Adrenozeptoren	4
1.3.1. Einteilung, Verteilung und Funktion	4
1.3.2. Signaltransduktion	6
1.3.3. Regulation der Signaltransduktion	7
1.4. Das sympathoadrenerge System während des Alterns und bei kardiovaskulären Erkrankungen	8
1.5. Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Tiermodell	11
2.1.1. Verwendete Rattenstämme	11
2.1.2. Bestimmung des systolischen Blutdruckes	11
2.1.3. Gewinnung des Blutplasmas, Tötung der Tiere und Organentnahme	12
2.2. Bestimmung der Plasma-Noradrenalkonzentration	12
2.3. Theoretische Grundlagen zu Radioligand-Bindungsstudien	13
2.4. Untersuchungen zur kardialen Noradrenalin-Clearance	17
2.4.1. Präparation der Rohmembranfraktion	17
2.4.2. Bestimmung der nNAT-Dichte	18
2.4.3. Bestimmung der nNAT-Aktivität	19
2.5. Untersuchungen kardialer β -Adrenozeptoren	20
2.5.1. Präparation der Rohmembranfraktion	20
2.5.2. Bestimmung der β -Adrenozeptordichte	20
2.5.3. Bestimmung des β_1 - und β_2 - Subtypen-Verhältnisses	21
2.6. Statistik	22

2.7.	Verwendete Chemikalien	22
2.8.	Verwendete Geräte und Software	23
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Blutdruck und Linksherzhypertrophie in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter	25
3.1.1.	Systolischer Blutdruck	25
3.1.2.	Relatives linksventrikuläres Gewicht als Hypertrophiemarker	25
3.2.	Plasma-Noradrenalin-Konzentration	27
3.3.	Kardiale Noradrenalin-Clearance in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter	28
3.3.1.	nNAT-Dichte im rechten und linken Ventrikel	28
3.3.2.	K _D -Werte der Radioligand-Bindungsstudien am Noradrenalin-Transporter	30
3.3.3.	nNAT-Aktivität im rechten und linken Ventrikel	30
3.4.	Kardiale β -Adrenozeptoren in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter	32
3.4.1.	β -Adrenozeptordichte im rechten und linken Ventrikel	32
3.4.2.	K _D -Werte der Radioligand-Bindungsstudien an den β -Adrenozeptoren	35
3.4.3.	β_1 - und β_2 - Subtypen-Verhältnis im rechten und linken Ventrikel	35
4.	Diskussion	37
4.1.	Entwicklung von arterieller Hypertonie und Linksherzhypertrophie	37
4.2.	Plasma-Noradrenalin-Konzentration bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter	40
4.3.	Kardiale Noradrenalin-Clearance bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter	41
4.4.	β -Adrenozeptoren	43
4.4.1.	Kardiale β -Adrenozeptoren bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter	43
4.4.2.	Signaltransduktion bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter	46

5.	Zusammenfassung	48
6.	Literaturverzeichnis	49
7.	Anlagen	67
8.	Thesen	71

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

α-AR	α -Adrenozeptor
β-AR	β -Adrenozeptor
β-Arr	β -Arrestin
A	Adrenalin
A₁-R	Adenosin A ₁ -Rezeptor
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AR	Adrenozeptor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AZ	Adenylat Zykklase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DHPG	3,4-Dihydroxy-Phenylglykol
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GRK	G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HG	Herzgewicht
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LVG	linksventrikuläres Gewicht
M₂-R	muskarinerges M ₂ -Rezeptor
MAO	Monoaminoxidase
MOPEG	3-Methoxy-4-Hydroxy-Phenylglykol
NA	Noradrenalin

nNAT	neuronaler Noradrenalin-Transporter
PKA	Proteinkinase A
RVG	rechtsventrikuläres Gewicht
SHR	<u>S</u> pontan <u>H</u> ypertensive <u>R</u> atten
SS-R	Somatostatin-Rezeptor
WKY	<u>W</u> istar- <u>K</u> yoto-Ratten

Abbildungsverzeichnis

(sämtliche Graphen und Abbildungen wurden mit der Software GraphPad™Prism® 2.00 erstellt)

	Seite
Abb.1: Sättigungsbindungskurve	15
Abb.2: Spezifische, Unspezifische und Gesamtbindung	15
Abb.3: Biphasische Kompetitionsbindungskurve	17
Abb.4: Plasma-Noradrenalin-Konzentration in SHR und WKY-Ratten	27
Abb.5: Sättigungsbindungsstudie am linken Ventrikel 24 Wochen alter SHR und WKY-Ratten	28
Abb.6: nNAT-Dichte im rechten Ventrikel von SHR und WKY-Ratten	29
Abb.7: nNAT-Dichte im linken Ventrikel von SHR und WKY-Ratten	29
Abb.8: nNAT-Aktivität im linken Ventrikel 24 Wochen alter SHR und WKY-Ratten	30
Abb.9: nNAT-Aktivität in Gewebestücken des rechten Ventrikels von SHR und WKY-Ratten bei einer Inkubation mit 25 nM Noradrenalin	31
Abb.10: nNAT-Aktivität in Gewebestücken des linken Ventrikels von SHR und WKY-Ratten bei einer Inkubation mit 25 nM Noradrenalin	32
Abb.11: β -AR Sättigungsbindungsstudie am linken Ventrikel 12 Wochen alter SHR und WKY-Ratten	33
Abb.12: β -AR-Dichte im rechten Ventrikel von SHR und WKY-Ratten	34
Abb.13: β -AR-Dichte im linken Ventrikel von SHR und WKY-Ratten	34
Abb. 14: Kompetitionsbindungsstudie am linken Ventrikel 52 Wochen alter SHR und WKY-Ratten	35

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab.1: Mittelwerte \pm SEM des systolischen Blutdruckes (mmHg)	67
Tab. 2: Mittelwerte \pm SEM der Körpergewichte (g)	67
Tab. 3: Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum Körpergewicht (g)	67
Tab. 4: Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum gesamten Herzgewicht (mg)	68
Tab. 5: Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum rechten Ventrikelgewicht (mg)	68
Tab.6: Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an Noradrenalin-Transportern im rechten Ventrikel (fmol)	68
Tab.7: Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an Noradrenalin-Transportern im linken Ventrikel (fmol)	69
Tab. 8: Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an β -AR im rechten Ventrikel (pmol)	69
Tab. 9: Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an β -AR im linken Ventrikel (pmol)	69
Tab. 10: Mittelwerte \pm SEM des Anteils der β_1 -AR an der gesamten β -AR-Anzahl im rechten Ventrikel (%)	70
Tab. 11: Mittelwerte \pm SEM des Anteils der β_1 -AR an der gesamten β -AR-Anzahl im linken Ventrikel (%)	70

1. Einleitung

1.1. Arterielle Hypertonie – Bedeutung, Pathogenese und kardiale Folgen

Die Hypertonie zählt zu den häufigsten Krankheiten in der westlichen Welt. Die Prävalenz beträgt in den Industrienationen ca. 20 %, in der Gruppe der 65-75jährigen sogar zwischen 40-45 % (88). Nach internationaler Übereinkunft (WHO 1999) bezeichnet man einen Blutdruck >140 mmHg systolisch und/oder >90 mmHg diastolisch als hyperten (140,165). Obwohl auch bei Blutdruckwerten im so genannten „noch normalen“ Bereich (systolisch 130-139 mmHg und/oder diastolisch 85-89 mmHg) das Risiko für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen bereits erhöht ist, fehlen kontrollierte klinische Studien, welche die Effektivität einer medikamentösen Therapie in diesem Bereich belegen (35). Frühere Ansichten, bei denen altersabhängige Grenzwerte Anwendung fanden (100 mmHg plus Lebensalter) gelten heute nicht mehr. Für alle Altersstufen im Erwachsenenalter ist die Normgrenze 140/90 mmHg bindend (35,165).

Nur bei 5-10 % aller Hypertoniker ist die genaue Pathogenese bekannt (so genannte sekundäre Hypertonieformen), wohingegen bei ca. 90-95 % aller Bluthochdruckpatienten die Ausschlussdiagnose primäre, essentielle Hypertonie gilt (26,88,101). Verantwortlich für die Entstehung einer primären Hypertonie ist ein multifaktorielles Geschehen, bei dem eine genetische Disposition sowie Umweltfaktoren zur Krankheitsmanifestation beitragen. Welche der beeinflussenden Faktoren dabei dominieren, ist individuell verschieden (66). Der Einfluss einer genetischen Disposition auf die primäre Hypertonieentstehung beträgt zwischen 30-60 % (66,67,88,125) mit Hinweisen auf Genvariationen unter anderem beim Angiotensinogen, beim Angiotensin-Converting-Enzym, beim Insulinrezeptor und beim atrialen natriuretischen Faktors (26,125). Weiterhin scheinen Genvariationen der Adrenozeptoren eine Rolle bei der Ausprägung einer Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen (siehe 1.3).

Als Umweltfaktor ist der erhöhte Konsum von Natriumchlorid bedeutsam, welcher in den Industrieländern bei ca. 10 g/d und damit weit über dem Bedarf von ca. 1-3 g/d liegt (144). Zwischen Kochsalzaufnahme und Prävalenz der Hypertonie besteht eine positive Korrelation. Bei 1/3 aller Hypertoniker steigt der Blutdruck bei erhöhter Kochsalzzufuhr und sinkt bei Salzzug. Diese Kochsalzsensibilität ist dabei wiederum genetisch determiniert (125,146,151). Adipositas ist ein weiterer wichtiger Faktor zur Hypertoniegenese. Eine Zunahme des Gewichtes führt zu einer systolischen Blutdruckerhöhung (72). Eine Rolle könnte hierbei die durch Fettsucht induzierte Insulinresistenz spielen. Die resultierende Hyperinsulinämie verursacht eine Steigerung der Sympathikusaktivität sowie der renalen Wasser- und

Natriumretention und induziert Fettstoffwechselstörungen sowie arteriosklerotische Gefäßveränderungen (26,66,144,151). Umstritten bleibt inwieweit unabhängig genetischer Variationen (siehe oben) das Renin-Angiotensin-System an der Entstehung des primären Bluthochdruckes beteiligt ist: ca. 20 % der Hypertoniker haben eine erhöhte, 50 % eine normale und 30 % eine erniedrigte Plasma-Renin-Aktivität (84). Physiologisch führt ein erhöhter Blutdruck zu einer Suppression der Plasma-Renin-Aktivität, so dass auch normale Werte bei der Hypertonie pathologisch sein können und sich damit die blutdrucksenkende Wirkung von ACE-Hemmern auch bei nicht erhöhter Plasma-Renin-Aktivität erklären könnte (36,125).

Weitere Faktoren, die mit der Entstehung und Aufrechterhaltung der Hypertonie in Verbindung gebracht werden, sind unter anderem psychosozialer Stress, Alkohol- und Nikotinabusus (125), unzureichende Einnahme von Kalium und Kalzium (26), Störungen des Kallikrein-Kinin-Systems (144) und eine Verminderung der Barorezeptorsensitivität (36). Dabei ist zu beachten, dass genetische Veranlagungen und Umweltfaktoren sich gegenseitig beeinflussen können wie zum Beispiel bei der Alkoholabhängigkeit oder der Fettsucht. Eine klare Differenzierung zwischen genetischer Disposition und Umwelteinfluss ist daher nicht immer möglich (26).

Als Ursache einer sekundären Hypertonie finden sich zu ca. 50 % renoparenchymatöse und zu ca. 30 % renovaskuläre Schädigungen. Seltener sind endokrine sowie kardiovaskuläre Erkrankungen. Letztere können einerseits Folge einer Hypertonie sein (siehe unten), andererseits auch als deren Ursache gelten und somit zu einer Manifestation der Hypertonie beitragen (26,66,84,151).

Chronischer Bluthochdruck führt zu einer Vielzahl von Organveränderungen und -schädigungen. So besteht eine Korrelation zwischen der Blutdruckhöhe und der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (35,36, 84,88,125). Die arterielle Hypertonie im großen Kreislauf führt zu einer gesteigerten Nachlast des linken Ventrikels und kompensatorisch zu einer konzentrischen Linksherzhypertrophie. Durch die vermehrte Muskelmasse kann so das Schlagvolumen gegen den erhöhten Widerstand primär konstant gehalten werden (5,70,83,135,159). In diesem Stadium ist die Linksherzhypertrophie durch Blutdrucksenkung (= Nachlastsenkung) reversibel (5,84). Weitere strukturelle Veränderungen am Herzen (Remodelling) sind neben der Kardiomyozytenhypertrophie eine intramurale Fibrosierung mit Zunahme des kardialen Kollagengehaltes (57). Funktionell nimmt die Kontraktilität und Elastizität des Ventrikels ab. Es kommt bei anhaltender Druckbelastung zur Gefügedilatation und die konzentrische Hypertrophie geht allmählich in eine dilatative, exzentrische Hypertrophie über (5,88,159). Koronarsklerose und -stenose sowie eine relative Koronarinsuffizienz aufgrund der vermehrten Muskelmasse des hypertrophierten Herzens verschlechtern zusätzlich die Versorgung und somit die kardiale Funktion. Letztlich führen chronisch erhöhter Blutdruck und dekompensierte Ventrikelhypertrophie zu chronischer Herzinsuffizienz (12,29,41,144).

Ein klassisches Tiermodell der arteriellen essentiellen Hypertonie sind spontan hypertensive Ratten (SHR). Wie beim Menschen ist die genaue Pathogenese der arteriellen Hypertonie in diesem Rattenstamm nicht bekannt. Es wird jedoch auch ein multifaktorielles Geschehen auf Grund einer genetischen Disposition vermutet. Da die Hypertonie-bedingten Organveränderungen und -schädigungen in SHR ebenfalls auftreten, wird der Stamm verwendet, um Folgeerkrankungen der arteriellen essentiellen Hypertonie zu untersuchen (119,121,171,172).

1.2. Das sympathische Nervensystem

1.2.1. Aufbau und Funktion

Das autonome Nervensystem, bestehend aus Sympathikus und Parasympathikus, ist ein wichtiges Kontrollsystem für kardiovaskuläre Funktionen. Die Regulation erfolgt in der Medulla oblongata sowie in übergeordneten Zentren des Hypothalamus, des limbischen Systems und des Kortex (32,55,159).

Neben einer Frequenzzunahme (positive Chronotropie) führt ein gesteigerter Sympathikustonius am Herzen zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (positive Inotropie), der Reizleitungsgeschwindigkeit (positive Dromotropie) und der kardialen Erregbarkeit (positive Bathmotropie). An den Gefäßen induziert der Sympathikus eine Vasokonstriktion (66,76,80,155). Da der Blutdruck definiert ist als Produkt aus Herzzeitvolumen und dem peripheren Gefäßwiderstand (144), führt die Erhöhung des Sympathikustonius zu einem Blutdruckanstieg. Das sympathische System kann demzufolge zur Entstehung und Manifestation einer arteriellen essentiellen Hypertonie beitragen (4,29,54,55,106).

1.2.2. Noradrenalin-Clearance

Die Überträgersubstanz fast aller postganglionärer Neurone des Sympathikus ist Noradrenalin (NA). Dessen Synthese und Speicherung findet in den Varikositäten der Endverzweigungen postganglionärer, noradrenerger Neurone statt. Vorstufen des Noradrenalins sind Tyrosin, Dopa und Dopamin. Bei Erregung des Neurons erfolgt durch Exozytose die Ausschüttung des in Vesikeln gespeicherten Noradrenalins in den synaptischen Spalt. Seine Wirkung vermittelt das Noradrenalin an der postsynaptischen Membran des Erfolgsorgans durch Bindung an Adrenozeptoren (AR) (75,80,116,148,163).

Der wichtigste Mechanismus, um das freigesetzte Noradrenalin wieder aus dem synaptischen Spalt zu entfernen und somit die Stimulation postsynaptischer Rezeptoren zu beenden, ist dessen Wiederaufnahme in das Axoplasma. Die Wiederaufnahme erfolgt über den neuronalen Noradrenalin-Transporter (nNAT), genannt Uptake-1. Dieser ist ein Kotransporter, wobei neben Noradrenalin im Verhältnis 1:1:1 Natrium- und Chlorid-Ionen transportiert werden. Der Antrieb des Kotransporters erfolgt durch den extra-

intrazellulären Na^+ -Gradienten. Kokain und trizyklische Antidepressiva blockieren den nNAT an der Axoplasmamembran. Der Wiederaufnahme schließt sich ein enzymatischer Abbau des Transmitters oder die erneute Speicherung in die Vesikel an. Dazu ist ein zweiter unspezifischer Monoamintransporter notwendig, welcher durch einen H^+ -Gradienten angetrieben wird und durch Reserpin blockiert werden kann (79,99,148,166).

Zu ca. 90 % wird Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt durch Uptake-1 entfernt (116,149). Daneben kann Noradrenalin auch zu 5-10 % durch einen extraneuralen Noradrenalin-Transporter, genannt Uptake-2, entfernt werden. Die Noradrenalin-Aufnahme erfolgt hier unter anderem in glatte Muskel-, Herzmuskel- und Leberzellen. Die physiologische Bedeutung dieses Transportsystems ist jedoch gering (42,79,149,156).

Weitere Vorgänge, welche die Wirkung des Noradrenalins beenden, ist dessen Diffusion aus dem synaptischen Spalt in das umgebende Interstitium (75,148) und nach zellulärer Aufnahme der enzymatische Abbau durch die Monoaminoxidase (MAO) (129) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (2,3,87,156). Abbauprodukte des Noradrenalins im Blut und Urin sind unter anderem 3-Methoxy-4-Hydroxy-Phenylglykol (MOPEG) und Vanillinmandelsäure, deren Gehalt indirekt die Aktivität des sympathischen Nervensystems widerspiegelt (43,75,148).

1.3. β -Adrenozeptoren

1.3.1. Einteilung, Verteilung und Funktion

Die Rezeptoren für die sympathischen Überträgerstoffe Adrenalin (A) und Noradrenalin werden als Adrenozeptoren bezeichnet (80). 1948 fand Ahlquist anhand von Studien über die unterschiedlichen Wirksamkeitsreihenfolgen der Adrenozeptoragonisten, dass es verschiedene Rezeptortypen gibt. Diese werden als α - und β -Adrenozeptoren (α - und β -AR) bezeichnet (1,15,59). An den α -AR haben Noradrenalin und Adrenalin eine größere Affinität als Isoprenalin, während an den β -AR die Affinität von Isoprenalin über der von Noradrenalin und Adrenalin liegt (14,15,75). Eine weitere Klassifizierung der AR erfolgt durch deren Unterteilung in Subtypen (siehe unten).

Studien an α -AR zeigten, dass Noradrenalin und andere α -AR-Agonisten (z.B. Clonidin) die Freisetzung von Noradrenalin aus den noradrenergen Neuronen hemmen. Dies führte zur Entdeckung präsynaptischer α -AR. Sie wurden als α_2 -AR bezeichnet, gegenüber den postsynaptischen α_1 -AR (95,147). Heute ist bekannt, dass α_2 -AR in mehreren Geweben (unter anderem an glatten Gefäßmuskelzellen, Neuronen im Hirn, endokrinen Zellen und Fettzellen) auch postsynaptisch vorkommen (75). Die beiden α -AR-Subtypen werden in weitere Subtypen unterteilt. Für α_1 -AR sind die Subtypen α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} , für α_2 -

AR die Subtypen α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} beschrieben. Ob ein vierter α_1 -Subtyp α_{1L} existiert und/oder ob es sich hierbei um eine Variante von α_{1A} handelt, ist bisher nicht geklärt (20).

β -AR werden durch Isoprenalin und physiologische Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin aktiviert. Es sind bisher drei verschiedene β -AR-Subtypen bekannt (20). Eine erste Einteilung erfolgte in β_1 - und β_2 -AR (94). Dabei gilt, dass Adrenalin und Noradrenalin am β_1 -AR die gleiche Affinität besitzen, während am β_2 -AR die Affinität für Adrenalin ungefähr 10-50fach höher ist als die für Noradrenalin (75). Bei beiden Subtypen hat Isoprenalin eine höhere Affinität als Adrenalin und Noradrenalin (20). Später gelang die Entdeckung des β_3 -AR (44), wobei hier Noradrenalin eine höhere Affinität als Adrenalin besitzt (75). Gen und molekulare Struktur des β_3 -AR unterscheiden sich wesentlich von denen der β_1 - und β_2 -AR (20,75). Seit Jahren vermutet man die Existenz eines vierten β -AR-Subtypen. Seine genetische Codierung, sein Vorkommen im menschlichen Organismus sowie weitere Eigenschaften dieses mutmaßlichen β_4 -AR sind noch nicht vollständig aufgeklärt und lassen vermuten, dass es sich eher um eine β_1 -AR Variante handelt (20). Darüber hinaus sind die einzelnen β -AR Subtypen polymorph infolge des Austausches einzelner Basen. Bekannt sind beim β_1 -AR zwei Basenaustausche, beim β_2 -AR vier und beim β_3 -AR einer. Es wird vermutet, dass diese genetische Varianz in den einzelnen β -AR für die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen und deren Ansprechbarkeit auf Pharmaka ein Rolle spielen könnte (97).

Die β -AR-Subtypen unterscheiden sich untereinander in Lokalisation und Funktion. β_1 - und β_2 -AR kommen beide im menschlichen Herzen vor (13,16,20,115). Dabei beträgt der Anteil der β_2 -AR an der gesamten β -AR-Dichte in den Ventrikeln ca. 20 % und in den Vorhöfen ca. 30 % (16,21). Im Bereich des Sinusknotens findet sich ein noch größerer Anteil der β_2 -AR, dennoch dominiert auch hier der β_1 -AR-Subtyp (20).

β_1 -AR werden im menschlichen Herzen hauptsächlich durch Noradrenalin aktiviert, wodurch Kontraktionskraft und Herzfrequenz erhöht werden. Für den β_2 -AR ist eine Aktivierung durch Adrenalin typisch, was primär zum Anstieg der Herzfrequenz führt (20,80,139).

Die Existenz von β_3 -AR im menschlichen Herzen ist umstritten und nicht eindeutig geklärt, sie scheinen jedoch eher eine negative Inotropie zu vermitteln (20,41,160).

1.3.2. Signaltransduktion

β -AR bestehen aus einer Peptidkette, welche die Zellmembran siebenmal durchzieht, wobei der Amino- (NH-) Terminus in den extra-, der Carboxy- (COOH-) Terminus in den intrazellulären Raum ragt. Es bilden sich durch diese Konformation sieben Transmembrandomänen, die durch drei extra- und drei intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind.

β -AR gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. G-Proteine sind Heterotrimer bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Diese Untereinheiten werden aufgrund unterschiedlicher Aminosäuresequenzen weiter in Subtypen unterteilt. Abhängig vom Subtyp der α -Untereinheit erfolgt die Einteilung der G-Proteine in Familien, wobei insbesondere stimulatorische G_{α_s} - und inhibitorische G_{α_i} -Proteine mit den an sie koppelnden Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Regulation der Herzarbeit spielen (21,41).

Die β_1 -AR-vermittelte Signaltransduktion erfolgt im Herzen über das G_{α_s} -Protein. Nach Bindung von Noradrenalin erfährt der β_1 -AR eine Konformationsänderung, wodurch über die Positionierung des intrazellulären COOH-Terminus das G_{α_s} -Protein aktiviert wird und ebenfalls seine Konformation ändert. Es folgt die Dissoziation der G_{α_s} -Untereinheit von der membranständigen $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit unter Verdrängung von GDP durch GTP. Die G_{α_s} -Untereinheit aktiviert in der Zelle die Adenylat Zykklase (AZ), welche die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert. Die intrazellulär erhöhte cAMP-Konzentration steigert die Aktivität der Proteinkinase A (PKA). Dieses Enzym phosphoryliert so genannte Target-Proteine (unter anderem L-Typ Ca^{2+} -Kanal, Troponin I, Phospholamban), wodurch über einen gesteigerten Ca^{2+} -Efflux aus bzw. erhöhten Ca^{2+} -Reuptake ins sarcoplasmatische Retikulum die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und damit die Kontraktion bzw. Relaxation des Kardiomyozyten gesteuert wird.

Die Signalübertragung des β_2 -AR, primär durch Adrenalin stimuliert, erfolgt am Herzen wie beim β_1 -AR über das G_{α_s} -Protein und die oben genannte Kaskade. Untersuchungen von Xiao et al. an isolierten Kardiomyozyten von Rattenherzen zeigten jedoch zusätzlich eine Kopplung der β_2 -AR an das inhibitorische G_{α_i} -Protein und somit Hemmung der AZ (168). Daaka et al. beschrieben weiterhin eine verminderte Affinität phosphorylierter und internalisierter β_2 -AR (siehe unten) zum G_{α_s} -Protein mit gesteigerter Kopplungsbereitschaft zum G_{α_i} -Protein (33). Unklar bleibt bisher, ob am menschlichen Herzen β_2 -AR neben der Signaltransduktion über G_{α_s} -Proteine auch an G_{α_i} -Protein koppeln können (20).

Rezeptorsysteme, die über inhibitorische G_{α_i} -Proteine die AZ hemmen und das Herz so vor einer sympathoadrenergen Überstimulation schützen, sind muskarinerge Rezeptoren (M_2 -R), Adenosin-Rezeptoren (A_1 -R) sowie Somatostatin-Rezeptoren (SS-R) (21).

1.3.3. Regulation der Signaltransduktion

Um die Zellantwort nach Rezeptoraktivierung zu beenden sowie die Ansprechbarkeit der Zelle nach lang anhaltendem bzw. wiederholtem Stimulus zu verringern, kann eine Desensibilisierung des Rezeptors erfolgen.

Am schnellsten und quantitativ bedeutendsten ist bei den β -AR die Desensibilisierung durch Phosphorylierung des Rezeptors mittels einer spezifischen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Kinase (GRK). Bisher sind sieben verschiedene GRKs bekannt, wobei im Herzen die GRK-2 (β -Adrenozeptor-Kinase, β ARK) dominiert (78). Nach Rezeptoraktivierung und nach Dissoziation der G_{α_s} -Untereinheit vom heterotrimeren G-Protein bindet die GRK-2 an die membranständige $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und phosphoryliert am COOH-Terminus den vom Agonisten besetzten β -AR, wodurch sich die Affinität des β -AR für das zytoplasmatische Protein β -Arrestin (β -Arr) erhöht. Das am COOH-Terminus und 3. Loop des β -AR gebundene β -Arr hält den Rezeptor im so genannten „niedrigaffinen“, vom G_{α_s} -Protein entkoppelten Zustand (41,104).

Neben dieser homologen (vom Agonisten abhängigen) Desensibilisierung kann auch eine heterologe Desensibilisierung durch Effektorinasen erfolgen. Hierzu gehört die PKA, welche durch oben genannte Signalkaskade aktiviert wird, den β -AR anschließend phosphoryliert und so im Sinne eines negativen Feedbacks dessen Interaktion mit dem G_{α_s} -Protein vermindert. Im Vergleich zur homologen Desensibilisierung durch die GRK ist die PKA-Desensibilisierung langsamer und nicht von einer hohen Agonistenkonzentration bzw. lang anhaltender β -AR-Stimulation abhängig (21,41). Zwischen den einzelnen β -AR-Subtypen gibt es Unterschiede in der Relevanz und Ausprägung der PKA vermittelten Desensibilisierung: Der β_2 -AR hat zwei, der β_1 -AR eine und der β_3 -AR keine PKA-Phosphorylierungsstelle(n), so dass die PKA-Desensibilisierung beim β_2 -AR die größte, beim β_3 -AR dagegen keine Rolle spielt (104).

Als Downregulation wird die Abnahme der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche bezeichnet. Ein Mechanismus hierfür ist die Internalisierung des Rezeptors. Dabei erfolgt die Entfernung des β -AR von der Zelloberfläche durch Endozytose nach dessen Phosphorylierung mittels GRK und Bindung des β -Arr. Innerhalb der Vesikel folgt die Dissoziation des β -Arr-GRK-Rezeptorkomplexes in die einzelnen Komponenten (β -Arr, GRK, Rezeptor). Der Rezeptor kann dabei durch spezifische Phosphatasen dephosphoryliert und als funktionstüchtiger Rezeptor an die Membran zurück transferiert werden. Die Abnahme des Rezeptors von der Zelloberfläche kann bei der Internalisierung demnach reversibel sein. Nicht-recycelte, nicht-dephosphorylierte Rezeptoren werden hingegen durch lysosomale Enzyme abgebaut.

Neben der Internalisierung führt eine verminderte Synthese der β -AR ebenfalls zu deren Downregulation. Im Gegensatz zu den oben genannten schnellwirksamen Regulationsmechanismen, welche Sekunden bis Minuten dauern, benötigt diese Form der Downregulation mehrere Stunden bis Tage. Entscheidend für eine verminderte β -AR-Synthese ist die Reduktion der β -AR-mRNA durch deren Destabilisierung. Unklar bleibt jedoch, ob diese Destabilisierung Agonist-spezifisch und/oder PKA-abhängig vermittelt wird (41,104).

1.4. Das sympathoadrenerge System während des Alterns und bei kardiovaskulären Erkrankungen

Als Altern bezeichnet man „eine teils genetisch, teils exogen bedingte Resultante zeit- und zufallsabhängiger irreversibler Veränderungen der lebenden Substanz“ (23). Aufgrund der erhöhten Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen im Alter (unter anderem arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit und chronische Herzinsuffizienz) mit einer häufig resultierenden Überschneidung von Alterserscheinungen und Krankheitssymptomen ist es in Altersstudien jedoch schwierig zu differenzieren, welche der Veränderungen durch die Krankheit, welche durch den Altersvorgang und welche durch die Kombination von Alter und Krankheit bedingt sind (37,91,92). Während des Alterns kommt es zu einer verringerten Gefäßelastizität (23,30,88,91), einer Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels (91), einer Kardiomyozyten-Hypertrophie und einer zunehmenden kardialen Fibrosierung (164). Diese morphologischen Altersveränderungen sind, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, vergleichbar mit den pathophysiologischen Veränderungen des kardiovaskulären Systems in der chronischen Herzinsuffizienz (s.1.1.).

Am sympathoadrenergen System ähneln die Altersveränderungen ebenfalls denen kardiovaskulärer Erkrankungen. In beiden Fällen ist der Sympathikustonus erhöht (141), wobei Indikatoren zur Beurteilung der gesteigerten sympathischen Aktivität die erhöhte NoradrenalinKonzentration im Blutplasma (63, 106,109,142), die erhöhte Diffusionsrate (Spilloverrate) des Noradrenalins aus den Nervenendigungen (86,106), der verminderte Gehalt von Noradrenalin in verschiedenen Geweben (39) und die Konzentration von Noradrenalinmetaboliten im Blut und Urin (116) sind.

Demzufolge konnte sowohl im Alter (37,49,51,62,91,124,161,173) als auch bei Patienten mit arterieller Hypertonie (60,64,106) und Herzinsuffizienz (16,20,41,56,108) eine erhöhte Plasma-NoradrenalinKonzentration festgestellt werden. Untersuchungen am Tiermodell sowie an herzinsuffizienten Patienten lassen weiterhin auf einen verringerten kardialen Noradrenalingehalt bei der Herzinsuffizienz schließen (16,91,127). Der kardiale Noradrenalingehalt im Alter scheint dagegen nicht im gleichen Maße wie bei der Herzinsuffizienz verringert zu sein (164). Ursache für eine erhöhte NoradrenalinKonzentration im synaptischen Spalt und einen verminderten Noradrenalingehalt im Gewebe

könnte neben einem gesteigerten Noradrenalin-Spillover vor allem ein reduzierter Uptake-1 sowohl im menschlichen Altersherzen (49,50,51,100,141) als auch im hypertensiven (46,134) und insuffizienten (7,10,16,123) Herzen sein.

Eine erhöhte sympathische Aktivität dient kurzfristig der Anpassung des Herz-Kreislaufsystems an eine gesteigerte Belastung unter anderem mittels β -AR vermittelter Steigerung von Herzfrequenz und Kontraktionskraft. Eine langfristig erhöhte Noradrenalin-Konzentration führt jedoch wie oben geschildert zu einer β -AR-Desensibilisierung bzw. -Downregulation und somit zu einer verminderten sympathoadrenergen Ansprechbarkeit des Herzens. Sowohl bei der chronischen Herzerkrankung als auch im Alter ist eine verminderte Ansprechbarkeit des β -adrenergen Systems bekannt. Beim insuffizienten Herzen kommt es zu einer Downregulation der β -AR, wobei hier hauptsächlich die Noradrenalin-sensitiven β_1 -AR betroffen sind, während β_2 -AR bei unveränderter Dichte eher desensibilisiert vorliegen (13,17,20,41,103). Weiterhin sind bei der chronischen Herzinsuffizienz ein erhöhter Gehalt und eine erhöhte Aktivität des G_{α_i} -Proteins bei einer unveränderten Aktivität und unverändertem Gehalt des G_{α_s} -Proteins bekannt. Die Aktivität der AZ ist ebenfalls unverändert (20,41). Im Gegensatz zu einer gleichbleibenden Aktivität der PKA ist die Aktivität der GRK bei der chronischen Herzinsuffizienz erhöht (20,21,98) und scheint somit eine wichtige Rolle bei der Desensibilisierung/Downregulation im erkrankten Herzen zu spielen.

In welcher Weise im menschlichen Altersherzen Desensibilisierung und Downregulation zu einer verminderten Ansprechbarkeit beitragen ist noch nicht genau geklärt (20,91). Ähnlich zur Herzinsuffizienz fanden White et al. in beiden Ventrikeln eine altersabhängige Abnahme der β_1 -AR neben einer Entkopplung der β_2 -AR, wohingegen sich anders als bei einem insuffizienten Herzen eine reduzierte AZ-Aktivität und ein verminderter Gehalt der G_{α_s} -Protein-Untereinheit bei unverändertem Gehalt der G_{α_i} -Protein-Untereinheit fanden (164). Untersuchungen von Brodde et al. an rechten Vorhöfen zeigten dagegen eine unveränderte β -AR-Dichte im Alter mit einem gleich bleibenden Gehalt der G_{α_s} -Protein-Untereinheit und erhöhtem Gehalt der G_{α_i} -Protein-Untereinheit (22). Die Aktivität der GRK-2 ist im Alter unverändert und scheint somit im Gegensatz zur Herzinsuffizienz keinen Einfluss auf die altersabhängig verminderte Ansprechbarkeit des β -adrenergen Systems zu haben (98,169).

1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche sympathoadrenergen Veränderungen durch die hypertensive Herzkrankheit plus Alter und welche alleine durch den primären Altersvorgang bedingt sind. Hierzu wurden die Veränderungen des sympathoadrenergen Systems spontan-hypertensiver Ratten (SHR, ein Tiermodell für eine Hypertonie-induzierte hypertrophe Herzkrankheit) in den Alterstufen 4, 8, 12, 24, 36 und 52 Wochen mit den Veränderungen gesunder, altersgleicher Wistar-Kyoto-Ratten verglichen. Es sollte damit geklärt werden, ob altersabhängige Veränderungen am kranken Herzen eventuell eher und stärker ausgeprägt erfolgen und ob herzkranken SHR-Ratten somit möglicherweise „schneller altern“ als WKY-Ratten.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Inwieweit unterscheidet sich die durch Gefäßsteifigkeit bedingte Hypertonie im Alter von der genetisch determinierten Hypertonie?
2. Ist der Anstieg der Plasma-Noradrenalin-Konzentration im Alter geringer ausgeprägt als bei der Hypertonie-induzierten Linksherzhypertrophie?
3. Inwieweit tragen nNAT-Dichte und -Aktivität in der Hypertonie-induzierten Linksherzhypertrophie bzw. im Alter zum jeweiligen Noradrenalin-Spillover und zum Anstieg der Plasma-Noradrenalin-Konzentration bei?
4. Inwieweit unterscheiden sich die kardiale β -AR-Dichte und das Subtypenverhältnis im Altersverlauf zwischen hypertensiven von normotensiven Ratten?
5. Ist ein altes Herz ein krankes Herz?

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

2.1.1. Verwendete Rattenstämme

Als Versuchstiere dienten männliche spontanhypertensive Albinoratten vom Okamoto-Stamm (SHR) sowie männliche normotone Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) als Kontrollgruppe. Die Tiere stammten aus der Zucht der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Untergebracht wurden die Tiere in Käfigen zu je drei Tieren, bei 22 °C und einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit „Altromin[®]-Haltungsfutter-Ratten/Mäuse“ (Altromin, GmbH, Lage, Deutschland). Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.1.2. Bestimmung des systolischen Blutdruckes

Es wurde an der Schwanzarterie eine unblutige Messung des systolischen Blutdruckes mit einem Sphygmomanometer durchgeführt. An jedem Tier fanden an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Tötung jeweils fünf einzelne Messungen statt, aus welchen der Mittelwert gebildet wurde. Die Messungen erfolgten in einem geschlossenen, ruhigen Raum. Die Tiere verweilten vor der Blutdruckbestimmung 30 Minuten in einer Anpassungsphase. Durch diesen Untersuchungsablauf sollten sich die Tiere an die Messungen gewöhnen, um eventuelle Blutdruck-Abweichungen infolge Stress zu minimieren. Nach der Anpassungsphase wurden die Ratten in eine Kunststoffröhre gesperrt, deren Ende eine Öffnung für den Schwanz der Tiere hatte. Die Röhre befand sich in einer an die Körpertemperatur der Tiere angepassten, klimatisierten Kammer (34 °C), da ansonsten eine Blutdruckmessung durch Abkühlen der Schwanzarterie nicht gewährleistet wäre. Die Tiere verharrten in der Röhre erneut für 30 Minuten, um sich zu akklimatisieren. An der Schwanzarterie wurde mit einer Blutdruckmanschette der Druck gemessen, der über einen Piezokristall in einen elektrischen Impuls umgewandelt, verstärkt und über einen Oszillographen sichtbar gemacht wurde. Regulation und Messung des Druckes erfolgte über das Sphygmomanometer, welches über einen dünnen Schlauch mit der Druckmanschette verbunden war. Der Pulsnehmer war hinter dieser Manschette lokalisiert. Als Messwert wurde der Wert übernommen, bei welchem der erste Puls sichtbar wurde.

2.1.3. Gewinnung des Blutplasmas, Tötung der Tiere und Organentnahme

Die Blutentnahme und Tötung der Tiere erfolgte am Versuchstag. Die Ratten wurden mit Pentobarbital (50 mg/ kg Körpergewicht, intraperitoneal injiziert; i.p.) narkotisiert. Zusätzlich wurden 2000 I.U. Heparin (i.p.) verabreicht. Die Blutentnahme erfolgte 15-20 Minuten nach Narkoseeintritt mittels einer Steigkapillare aus dem retroorbitalen Venenplexus. Es wurden 2-3 ml Blut entnommen und in eine EDTA-haltige, eisgekühlte Monovette überführt sowie pro Milliliter Blut 10 µl einer Glutathion-Lösung (10 mM) als Antioxidants zugegeben. Das gewonnene Blut lagerte bis zur Zentrifugation auf Eis. Die Zentrifugation erfolgte bei 1700 g, 4 °C und 10 min. Das Plasma wurde nach der Zentrifugation bis zur Bestimmung der NoradrenalinKonzentration bei -80 °C gelagert.

An den narkotisierten Ratten wurde danach eine Laparo-und Thorakotomie durchgeführt. Das komplette Herz wurde nach Durchtrennung der Aorta thoracica zügig entnommen und in die für die jeweiligen Experimente vorgesehenen eiskalten Präparationspuffer überführt. Die Herzen wurden anschließend zur Bestimmung der Herz- und Ventrikelmasse trocken getupft, gewogen und wieder in die Puffer überführt.

2.2. Bestimmung der Plasma-NoradrenalinKonzentration

Die Messung der NoradrenalinKonzentration im Blutplasma erfolgte mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) (139).

Da Blutplasma mehrere Substanzen enthält (unter anderem Eiweiße, Proteine, Elektrolyte), welche vor der Messung entfernt werden müssen, wurden die Katecholamine (sowie andere aromatische 1,2-Diol-Verbindungen) auf einer Vorsäule (Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure) in Anwesenheit eines Phosphatpuffers (mM: 200 (NH₄)₂HPO₄, 10 EDTA, 1,71 NaN₃, mit NH₄OH auf pH 8,7 eingestellt) mittels Esterbildung retiniert. Dadurch konnte die biologische Matrix quantitativ eluiert werden.

Über ein elektronisches Ventil wurde das Elutionsmittel (89 Teile Phosphatpuffer (mM: 1000 NaH₂PO₄, 5 Oktansulfonsäure, 1,71 NaN₃, pH 3,0) und 11 Teile Methanol) nach 12 Minuten gewechselt. Dadurch wurden die Phenylboronsäureester der Katecholamine hydrolysiert und die Katecholamine von der Vorsäule eluiert. Nach dem Transfer des Eluats auf eine analytische Säule (12,5 cm LiChrospher100, RP18ec) wurden die Katecholamine hier aufgetrennt. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte bei 4 °C eine Nachsäulenderivatisierung zu den entsprechenden fluoreszierenden Trihydroxyindolderivaten in 3 Stufen:

- Oxidation mit K₃[Fe(CN)₆] zu Adrenochinon bzw. Noradrenochinon
- Oxidative Zyklisierung zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom
- Intramolekulare Umlagerung zu 3,5,6-Trihydroxy-1-methyl-indol bzw. 3,5,6-Trihydroxy-indol.

Die Messung der Trihydroxyindol-Derivate erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion (Anregungswellenlänge 405 nm, Emissionswellenlänge 520 nm). Die Quantifizierung erfolgte durch externe Standards unter Verwendung der „ClinRep-Standardlösung für Katecholamine im Plasma“.

2.3. Theoretische Grundlagen zu Radioligand-Bindungsstudien

Die Bestimmung der Rezeptordichten, deren Subtypenverteilung sowie des Bindungsverhaltens der Rezeptoren erfolgte durch Radioligand-Bindungsstudien in Form von Sättigungs- und Kompetitionsbindungsstudien. Sättigungsanalysen werden hauptsächlich verwendet, um die Gesamtzahl von Rezeptoren zu bestimmen. Dazu werden Rohmembranfraktionen, die den Rezeptor enthalten, mit steigenden Konzentrationen eines radioaktiv markierten und Rezeptor-spezifischen Liganden inkubiert. Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Bindungsreaktion durch ein schnelles Abfiltrieren der Ansätze gestoppt und nicht gebundene Radio-Liganden ausgewaschen. Die gebundenen Radio-Liganden können mit einem Counter quantifiziert werden.

Kompetitions- oder Verdrängungsverfahren dienen unter anderem zur Klassifizierung der Subtypen. Hierbei werden Rohmembranfraktionen, die den Rezeptor enthalten, mit einer konstanten Menge des radioaktiv markierten Liganden inkubiert, wobei in unterschiedlichen Ansätzen jetzt die Zugabe eines zweiten nicht markierten Liganden in aufsteigender Konzentration erfolgt, welcher den radioaktiv markierten Liganden aus der Bindung verdrängt. Durch Filtrieren und Auswaschen werden die nicht gebundenen Radio-Liganden wie bei der Sättigungsbindungsstudie entfernt und die gebundenen Radio-Liganden mittels Counter quantifiziert.

Die Reaktionen der Radioligand-Bindungsstudien unterliegen dem Massewirkungsgesetz. Für die Sättigungsbindungsstudien gilt dabei die Reaktionsgleichung:



Als k_{+1} wird die Geschwindigkeitskonstante der Hin-, als k_{-1} die der Rückreaktion bezeichnet. Es gilt (85):

$$v_{\text{Hin}} = k_{+1} \times [\text{Ligand}] \times [\text{Rezeptor}] \quad [2]$$

$$v_{\text{Rück}} = k_{-1} \times [\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}] \quad [3]$$

Nach einer bestimmten Zeit befindet sich die Gesamtreaktion in einem Fließgleichgewicht, bei der die Hin- und Rückreaktion mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Daraus ergibt sich:

$$\frac{k_1}{k_{+1}} = \frac{[\text{Ligand}] \times [\text{Rezeptor}]}{[\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}]} = K_D \quad [4]$$

K_D wird als Dissoziationskonstante bezeichnet. Ist die Hälfte der Rezeptoren durch den Liganden besetzt, gilt $[\text{Rezeptor}] = [\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}]$ und es folgt aus [4] $K_D = [\text{Ligand}]$. Die Dissoziationskonstante K_D entspricht demnach der Konzentration von freien Liganden, die notwendig ist, um 50 % der Rezeptoren zu binden. Der K_D -Wert ist ein indirektes Maß für die Affinität eines Liganden zum Rezeptor. Dabei verhalten sich K_D -Wert und Affinität umgekehrt proportional zueinander.

Die Gesamtzahl der Rezeptoren (B_{\max}) in einer Rohmembranfraktion ist die Summe der ungebundenen und gebundenen Rezeptoren ($[\text{Rezeptor}] + [\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}]$). Daraus folgt aus Gleichung [4]:

$$K_D = \frac{[\text{Ligand}] \times (B_{\max} - [\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}])}{[\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}]} \quad [5]$$

Der Ligand-Rezeptor-Komplex wird als spezifische Rezeptorbindung bezeichnet. Er berechnet sich aus [5]:

$$[\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}] = \frac{B_{\max} \times [\text{Ligand}]}{K_D + [\text{Ligand}]} \quad [6]$$

Die Anzahl an spezifischen Bindungen ist somit neben der Variablen $[\text{Ligand}]$ auch von der gesamten Rezeptorzahl B_{\max} und der Dissoziationskonstanten K_D abhängig. Die graphische Darstellung von Gleichung [6] entspricht einer Hyperbel der mathematischen Funktion $y = (a \times x) / (b + x)$. Der Wert y bzw. $[\text{Ligand-Rezeptor-Komplex}]$ nähert sich bei $x \rightarrow \infty$ bzw. $[\text{Ligand}] \rightarrow \infty$ einer (horizontalen) Asymptote bei B_{\max} an.

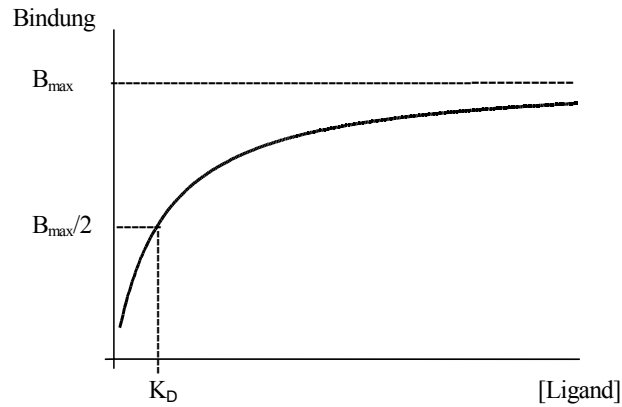


Abb.1: Sättigungsbindungskurve

Neben der spezifischen Bindung des Liganden an Rezeptoren (spezifische Bindung), kommt es bei den Experimenten immer zu einer unspezifischen Bindung der Liganden an andere Membranproteine und -lipide sowie an den verwendeten Arbeitsmaterialien (z.B. Glasfilter). Die unspezifische Bindung verhält sich proportional zur eingesetzten Ligandenkonzentration. Die in den Versuchen ermittelte Gesamtbindung ist die Summe aus der spezifischen und der unspezifischen Bindung. Aufgrund des linearen Verlaufes der unspezifischen Bindung zeigt die Gesamtbindung im Gegensatz zur spezifischen Bindung kein Sättigungsverhalten. Um die spezifische Bindung bestimmen zu können, wird in parallelen Ansätzen zur Gesamtbindung die unspezifische Bindung ermittelt, indem die Rezeptoren durch einen nicht markierten, hydrophilen Liganden vollständig und spezifisch blockiert werden. Die unspezifische Bindung entspricht der Radioaktivität, die jetzt noch messbar ist. Die spezifische Rezeptorbindung ergibt sich aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung.

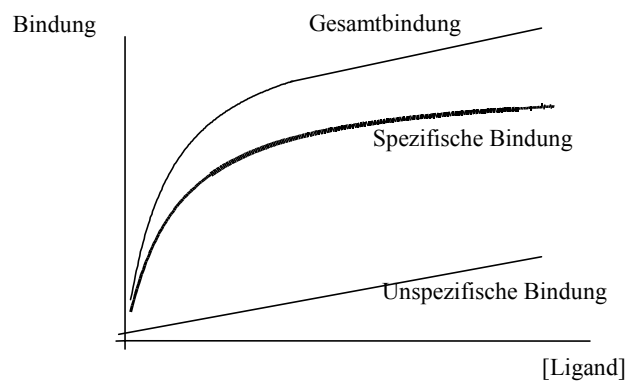
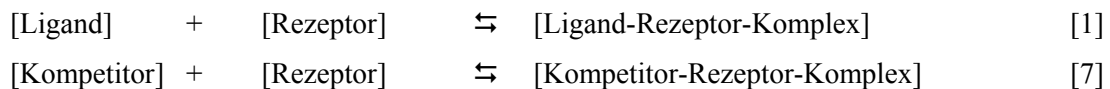


Abb.2: Spezifische, Unspezifische und Gesamtbindung

Die Berechnung von B_{\max} und der Dissoziationskonstante K_D sowie sämtliche graphische Darstellungen (Abb.1 und 2) erfolgten Computer-gestützt mit Hilfe der Software GraphPad™Prism® 2.00.

Bei Kompetitionsanalysen zur Bestimmung von z.B. Rezeptorsubtypverteilungen wird der spezifische Ligand mit gleicher Affinität für alle Rezeptorsubtypen vom Rezeptor durch einen zweiten nicht markierten Liganden (dem Kompetitor) mit unterschiedlicher, spezifischer Affinität zu den jeweiligen Subtypen verdrängt. Hierbei finden folgende Reaktionen statt:



Die Gleichung lässt sich entsprechend den Sättigungsanalysen vereinfachen. Dabei gilt die Näherung, dass sowohl ein vernachlässigbarer Teil von Ligand als auch Kompetitor in gebundenen Zustand vorliegen. Es gilt:

$$\text{Spezifische Bindung} = \frac{B_{\max} \times [\text{Ligand}]}{[\text{Ligand}] + K_D \times (1 + [\text{Kompetitor}] / K_i)} \quad [8]$$

B_{\max} = Gesamt-Rezeptorzahl

K_D = Dissoziationskonstante des Liganden

K_i = Hemmkonstante des Kompetitors

Der IC_{50} –Wert entspricht der Konzentration des Kompetitors, bei der 50 % des radioaktiv markierten Liganden aus der Rezeptorbindung verdrängt sind. Man erhält die Gleichung nach Cheng-Prussoff (31):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [Ligand] / K_D} \quad [9]$$

Besitzen Kompetitor und Ligand die gleiche Affinität zum Rezeptor gilt $K_i = K_D$ und somit:

$$IC_{50} = K_D + [Ligand].$$

Kommen in den Rohmembranfraktionen wie am Beispiel des β -adrenergen Systems verschiedene Subtypen von Rezeptoren vor, zeigt sich ein biphasischer Verlauf der Verdrängungskurve. Grund ist die unterschiedliche Affinität des Kompetitors zu den jeweiligen Subtypen. Anhand des Wendepunktes

zwischen beiden sigmoiden Kurvenverläufen, welche jeweils die monophasische Verdrängung von einem Rezeptortyp beschreiben, kann die prozentuale Verteilung der Subtypen bestimmt werden.

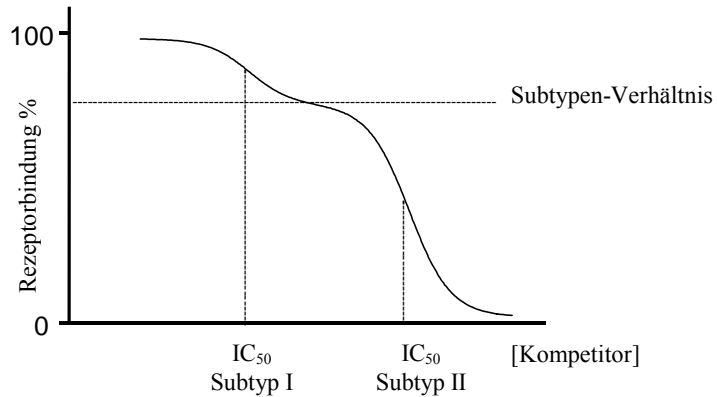


Abb.3: Biphaseische Kompetitionsbindungskurve

Die Auswertung und graphische Darstellung (Abb. 3) der Daten des Kompetitionsverfahrens erfolgte wie bei der Sättigungsanalyse mit Hilfe des Programms GraphPad™Prism® 2.00. Mit dem F-Test wurde dabei überprüft, welchem mathematischen Modell der Kurvenverlauf (mono- oder biphasisch) am ehesten entspricht.

2.4. Untersuchungen zur kardialen Noradrenalin-Clearance

2.4.1. Präparation der Rohmembranfraktion

Die Präparation der Rohmembranfraktionen erfolgte nach der Methode von Shearman und Meyer (143). Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nachdem Bindegewebs- und Gefäßreste von den Herzen entfernt wurden, erfolgte die Präparation und Abtrennung des rechten und linken Ventrikels (ohne Septum). Anschließend wurde das ventrikuläre Gewebe tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Das gefrorene Gewebe (ca. 100 mg) wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung in 5 ml kaltem Inkubationspuffer (mM: 10 Na_2HPO_4 , 120 NaCl, 5 KCl, pH 7,4) inklusive 250 mM Saccharose aufgetaut und mit einer Schere grob zerkleinert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit einem Ultra-Turrax einmalig für 10 Sekunden mit maximaler Leistung (25000 U/min) sowie nach je einminütigen Intervallen zweimalig für 20 Sekunden bei submaximaler Leistung (18000 U/min). Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (1200 g, 10 min, 0 °C) und der Überstand über vierlagigen Mull filtriert. Es folgte eine zweimalige Ultrazentrifugation (20000 g, 20 min, 4 °C), wobei der Überstand jeweils verworfen und die

Pellets in 1ml eiskaltem Inkubationspuffer (ohne Saccharose) resuspendiert worden. Anschließend wurde die Suspension auf eine Proteinkonzentration von 250 µg/ml eingestellt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Bradford (11) mit bovinem Immunglobulin G als Standard mit einem UV/VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.4.2. Bestimmung der nNAT-Dichte

Grundlagen für die Untersuchungen zur nNAT-Dichte im rechten und linken Ventrikel sind die in 2.3. aufgeführten theoretischen Aspekte zu den Radioligand-Bindungsstudien. Die Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes nach dem Massewirkungsgesetz erfolgt hier durch die Kopplung eines radioaktiv markierten Liganden an den nNAT entsprechend einer Liganden-Rezeptor-Interaktion.

Als radioaktiv markierter Ligand wurde der spezifische Uptake-1-Inhibitor [³H]-Nisoxetin (spezifische Aktivität 80 Ci/mmol) verwendet, welcher den jeweiligen Ansätzen in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,3 nM-10 nM) zugeführt wurde. Die unspezifische Bindung wurde in Parallelansätzen durch Zugabe des spezifischen Uptake-1-Inhibitors Desipramin (1µM) ermittelt. Es erfolgten Doppelbestimmungen mit Berechnung der Mittelwerte, welche für die Auswertung verwendet wurden.

Ein Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 500 µl) setzte sich demnach wie folgt zusammen:

- 50 µl Inkubationspuffer (Zusammensetzung 2.4.1, ohne Saccharose), parallel mit Desipramin (1 µM, Bestimmung der unspezifischen Bindung)
- 50 µl Inkubationspuffer mit [³H]-Nisoxetin (0,3 nM-10 nM)
- 400 µl Rohmembransuspension (250 µg/ml)

Die Ansätze wurden für drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch Vakuumfiltration. Verwendet wurde hierfür ein Filtrationstopf, der an einer Vakuumpumpe angeschlossen war. Die Ansätze wurden mit 10 ml Inkubationspuffer verdünnt, über Whatmann GF/C Filter (Ø 25 mm) filtriert sowie mit 10 ml Inkubationspuffer nachgespült. Nach der Filtration wurden die Filter in Scintillationsgefäße gelegt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml Scintillations-Cocktail (Lumasafe™ Plus). Die Scintillationsgefäße wurden danach für 10 min geschüttelt (Schüttler Promax) und nachfolgend die [³H]-markierten Rezeptoren über einen Beta-Scintillationscounter quantifiziert. Die Zählausbeute (α) betrug 60 %. Sie gibt den Anteil der vom Counter erfassten Zerfälle (counts per minute, cpm) wieder. Aus der detektierten Radioaktivität lassen sich unter Angaben des Herstellers zum Radioliganden die Konzentrationen der Liganden, die Rezeptordichte und die Dissoziationskonstante (K_D) errechnen. Nebenher erfolgte die Bestimmung der in den einzelnen Verdünnungen tatsächlich verwendeten [³H]-Nisoxetin-Konzentrationen. Hierzu wurde in

parallelen Ansätzen (den Totals) die Radioaktivität der jeweilig pipettierten Ligandenkonzentration direkt gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit Hilfe von iterativer Kurveanpassung durch das Programm GraphPad™Prism® 2.00.

2.4.3. Bestimmung der nNAT-Aktivität

Die Bestimmung der nNAT-Aktivität erfolgte durch Aufnahme von Tritium-markiertem D,L-Noradrenalinhydrochlorid (spezifische Aktivität 13,5 Ci/mmol) in die Gewebsslices nach der Methode von Liang et al. (102).

Gewebe vom rechten und linken Ventrikel wurde in eisgekühltem, modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂, 0,54 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 11 Glucose, 0,094 EDTA, 1,14 Ascorbinsäure, 0,067 MAO-Hemmer Nialamid, Begasung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂) mit einer Schere grob zerkleinert. Auf einem Mc Illwain Tissue-Chopper wurde das Gewebe anschließend auf eine Größe von 250 x 250 µm zerkleinert. Die Slices wurden dazu auf eine Teflonscheibe gegeben und mit wenig eiskaltem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer versetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Inkubation erfolgte nach Zugabe von fünf verschiedenen Konzentrationen des (³H)-Noradrenalin (1,56 nM - 25 nM) für 15 Minuten bei 37 °C. In diesem Konzentrationsbereich besteht zwischen der eingesetzten NoradrenalinKonzentration und dessen Aufnahme ein linearer Verlauf. Bei höheren NoradrenalinKonzentrationen käme es zu einem Sättigungsverhalten am Transporter (99). Die Bestimmung der unspezifischen (³H)-Noradrenalin-Akkumulation erfolgte in parallelen Reaktionsansätzen bei 4 °C. Es wurden erneut Doppelbestimmungen mit Berechnung der Mittelwerte durchgeführt.

Ein Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 500 µl) setzte sich demnach wie folgt zusammen:

- 50 µl Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung siehe oben)
- 50 µl Krebs-Henseleit-Puffer mit (³H)-Noradrenalin (1,56 nM - 25 nM)
- 400 µl Krebs-Henseleit-Puffer mit 10 mg Gewebsslices

Die Reaktion wurde mittels Vakuumfiltration über einem Filtrationstopf beendet (siehe 2.4.2.), die Filter mit anhaftenden Gewebsstücken in den jeweiligen Scintillationsgefäßen mit 3 %iger eiskalter Trichloressigsäure versetzt und bei 4 °C für zwölf Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Scintillations-Cocktail (Lumasafe™ Plus) erfolgte die Detektion der Radioaktivität entsprechend Punkt 2.4.2. Eine Auswertung der Ergebnisse sowie deren graphische Darstellung erfolgte durch das Programm GraphPad™Prism® 2.00. Dabei berechnete sich die Spezifische Aktivität aus der Differenz von totaler (37 °C) und unspezifischer Aktivität (4 °C).

2.5. Untersuchungen kardialer β -Adrenozeptoren

2.5.1. Präparation der Rohmembranfraktion

Die Präparation der Rohmembranfraktionen erfolgte nach der Methode von Brodde et al. (18). Es wurde Gewebe von frisch ektomierten Rattenherzen verwendet und alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nachdem Bindegewebs- und Gefäßreste von den Herzen entfernt wurden, erfolgte die Präparation und Abtrennung des rechten und linken Ventrikels (ohne Septum). In 10 ml eisgekühlten Präparationspuffer (mM: 1 KHCO_3) wurden die Ventrikel mit einer Schere grob zerkleinert. Die weitere Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit einem Ultra-Turrax in jeweils einminütigen Intervallen einmalig für 10 Sekunden bei maximaler (25000 U/min) und zweimalig für 20 Sekunden bei submaximaler Geschwindigkeit (18000 U/min). Die erhaltene Suspension wurde mit dem Präparationspuffer (mM: 1 KHCO_3) auf 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1000 g, 15 min, 4 °C). Nach der Filtration des Überstandes über vierlagigen Mull erfolgte eine zweimalige Ultrazentrifugation (50000 g, 20 min, 4 °C). Die jeweiligen Überstände wurden verworfen und die Pellets jeweils in 1 ml Inkubationspuffer (mM: 10 TRIS-HCl, 154 NaCl, 0,55 Ascorbinsäure, pH 7,4 bei 25 °C) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Einstellung der Suspensionen auf eine Proteinkonzentration von 20 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ (entsprechend 2.4.1).

2.5.2. Bestimmung der β -Adrenozeptordichte

Die Bestimmung der β -AR-Dichte erfolgte mittels Sättigungsbindungsstudie entsprechend der Methode nach Brodde et al. (21). Als radioaktiv markierter Ligand fungierte der subtyp-unspezifische β -AR-Antagonist (-)-[^{125}J]-Jodocyanopindolol (JCYP, spezifische Aktivität 2200 Ci/mmol) (45). Der Ligand wurde in sechs verschiedenen Konzentrationen (5-200 pM) den jeweiligen Ansätzen zugeführt. In Parallelansätzen erfolgte die Ermittlung der unspezifischen Bindung durch Zugabe des subtyp-unspezifischen β -AR-Antagonisten CGP 12177 in einer Konzentration von 1 μM . Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte für die Auswertung verwendet.

Ein Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 250 μl) setzte sich demnach wie folgt zusammen:

- 50 μl Inkubationspuffer (Zusammensetzung siehe 2.5.1., Gesamtbindung), parallel mit CGP 12177 (1 μM , unspezifische Bindung)
- 50 μl Inkubationspuffer mit JCYP (5 bis 200 pM)
- 150 μl Rohmembransuspension (20 μg Proteingehalt)

Die Ansätze wurden für 90 min bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Beendigung der Reaktion zwischen Ligand und Rezeptor durch die Überführung der Ansätze auf Eis

und der Zugabe von 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer. Die nicht gebundenen Liganden wurden durch Vakuumfiltration mit einem Harvester über Whatman GF/C Filter (\varnothing 25mm) ausgewaschen. Die Filtration erfolgte zügig (max. 10 sec) und beinhaltete vier Auswaschschritte mit jeweils 2 ml Inkubationspuffer. Nach der Vakuumfiltration wurden die [125 J]-markierten Rezeptoren in einem Gamma-Counter detektiert. Die Zählausbeute (α) betrug 80 %. Die Auswertung der gemessenen Werte (cpm) sowie deren Umrechnung in Konzentrationsangaben erfolgte entsprechend Punkt 2.4.2.

2.5.3. Bestimmung des β_1 - und β_2 - Subtypen-Verhältnisses

Die Bestimmung der Rezeptor-Subtypenverteilung erfolgte mittels Kompetitionsanalysen. Als Kompetitor wurde der selektive β_1 -Rezeptor-Antagonist CGP 20712A verwendet, welcher eine 1000-fach höhere Affinität zum β_1 -AR besitzt als zum β_2 -AR (40). Der Kompetitor wurde den Ansätzen in 21 verschiedenen Verdünnungsstufen in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 μ M zugegeben, um den radioaktiv markierten Liganden (JCYP, 100 pM, siehe 2.5.2) quantitativ aus seiner spezifischen Rezeptorbindung zu verdrängen. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte wie bei der Sättigungsanalyse parallel mit CGP 12177 (1 μ M). Es wurden erneut Doppelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte berechnet.

Ein Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 250 μ l) setzte sich demnach wie folgt zusammen:

- 50 μ l Inkubationspuffer (Zusammensetzung siehe 2.5.1.) ,
mit jeweiliger Verdünnung von CGP 20712A (1nM-100 μ M),
parallel stattdessen mit CGP 12177 (1 μ M, Bestimmung der unspezifischen Bindung)
- 50 μ l Inkubationspuffer mit JCYP (100 pM)
- 150 μ l Rohmembransuspension (20 μ g Proteingehalt)

Die Inkubation der Ansätze, die Filtration sowie die Detektion der Radioaktivität erfolgten entsprechend den Sättigungsanalysen (siehe 2.5.2). Ausgewertet und graphisch dargestellt wurden die Daten der Kompetitionsanalysen mit Hilfe des Programms GraphPadTMPrism[®] 2.00.

2.6. Statistik

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel der einzelnen Messungen angegeben. Es werden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) aufgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den jeweiligen Mittelwerten wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test für ungepaarte Proben ermittelt. Als signifikant gelten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, sehr signifikant $p < 0,01$ und hochsignifikant $p < 0,001$ (68). Mit dem F-Test wurde überprüft, welchem mathematischen Modell der Kurvenverlauf einer Verdrängungskurve am ehesten entspricht. Die Durchführung aller Berechnungen und graphischen Darstellungen erfolgte mittels der Software GraphPad™Prism® 2.00.

2.7. Verwendete Chemikalien

Produkt:

ClinRep Standardlösung für
Katecholamine in Plasma
Desipramin

Heparin

Lumasafe™ Plus

Pentobarbital

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Hersteller:

Recipe, München; Deutschland

Research Biochemicals International,
Natick; USA

Biochrom KG, Berlin; Deutschland

LUMA*LSC B.V., Groningen; Niederl.

United Pharmaceutical Works, Praha;
Tschechien

Biochrom KG, Berlin; Deutschland

Merck, Darmstadt; Deutschland:

Ameisensäure

Analytische Säule 12,5 cm LiChrospher 100, RP18ec

Ascorbinsäure

EDTA-dinatrium-dihydrat

Glucose

Glutathion

Kaliumchlorid

Kaliumhydrogenkarbonat

Natriumchlorid

Vinyl-Copolymer-Vorsäule mit Phenylboronsäure

New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien:

[³H]-Nisoxetin

DL-[7-³H(N)]-Noradrenalinhydrochlorid

(-)-[¹²⁵J]-Jodcyanopindolol

Sigma, Deisenhofen; Deutschland:

Kaliumchlorid

Nialamid

(-)-Noradrenalinhydrochlorid

Folgende Chemikalien wurden freundlicherweise von Firmen zur Verfügung gestellt:

(±)-CGP 12177, (±)-4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazole-2-on und CGP 20712A (1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethylimidazolyl)-phenoxy]-2-propanol von Ciba-Geigy (Basel; Schweiz)

2.8. Verwendete Geräte und Software

Produkt:

Hersteller:

Beta-Scintillationscounter: Tri-Carb[®]

Liquid Szintillation Analyzer Nr.2250CA

Filtrationstopf

Gamma-Counter: Auto-Gamma CobraTM II

GraphPadTMPrism[®] 2.00

Harvester

Mc Illwain Tissue-Chopper

Schüttler Promax 1020

Sphygmomanometer

Ultra-Turrax T25

UV/VIS Spektrophotometer DU[®]520

Packard Instrument Company, Meriden; USA

Millipore GmbH, Eschborn; Deutschland

Canberra-Packard, Meriden; USA

GraphPad Software, San Diego,
Kalifornien, USA

Brandel Biomedical Research and Development
Lab. Inc., Gaithersburg; USA

Bachhofer, Reutlingen; Deutschland

Heidolph, Deutschland

Hugo Sachs Electronics; March, Deutschland

IKA Labortechnik GmbH & Co-KG,
Staufen; Deutschland

Beckman Instruments, Inc., Fullerton; USA

Vakuumfiltrationsanlage

Brandel Biomedical Research and
Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA

Zentrifugen:

Sorvall[®] RC-5B Refrigerated
Tischzentrifuge 5415C

DuPont Company, Newtown; USA
Eppendorf GmbH, Hamburg; Deutschland

Einmalartikel:

Counterröhrchen

Greiner Labortechnik, Frickenhausen;
Deutschland

Filter Whatman GF/C

Whatman, Inc., Clifton, NJ; USA

Scintillatorgefäße

Greiner Labortechnik, Frickenhausen;
Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Blutdruck und Linksherzhypertrophie in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter

3.1.1. Systolischer Blutdruck

Die Blutdruckmessung an beiden Rattenstämmen erfolgte in den Altersstufen 4, 8, 12, 24, 36 und 52 Wochen bei insgesamt 54 SHR und 67 WKY. In SHR zeigte sich ein Anstieg des systolischen Blutdruckes zwischen der 4. und 12. Woche um 44,2 %. In den darauf folgenden Alterstufen kam es zu keiner weiteren Erhöhung. Der systolische Blutdruck der WKY-Ratten blieb dagegen in allen Altersstufen konstant. Die Blutdruckwerte der SHR zeigten im Alter von 4 Wochen keine Unterschiede zu den WKY-Ratten. In der 8. Woche war der Blutdruck der SHR im Vergleich zu WKY um 14,3 %, in der 12. Woche um 48,9 % erhöht. Die Blutdruckwerte der SHR lagen ab der 8. Woche signifikant ($p < 0,05$), ab der 12. Woche hochsignifikant ($p < 0,001$) über denen der WKY (Tab.1).

3.1.2. Relatives linksventrikuläres Gewicht als Hypertrophiemarker

Das gesamte Herzgewicht sowie das Gewicht des rechten (RVG) und linken Ventrikels (LVG) wurden einzeln bestimmt und miteinander verglichen. Weiterhin wurde jeweils das Gewicht des linken Ventrikels in das Verhältnis zum Körpergewicht (KG) gesetzt. Die Gewichtsverhältnisse der linken Ventrikel zum gesamten Herzen (LVG/HG) bzw. der linken zu den rechten Ventrikeln (LVG/RVG) wurden ebenfalls bestimmt. Diese gelten als körperrgewichtsunabhängige Marker einer kardialen Hypertrophie.

Das Körpergewicht nahm in SHR und WKY-Ratten erwartungsgemäß bis zur 52. Woche zu. Das Körpergewicht der SHR war mit 52 Wochen im Vergleich zu den 4 Wochen alten Ratten um 408,1 %, bei WKY um 372,3 % erhöht. In den jeweiligen Alterstufen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Körpergewichten der SHR und WKY-Ratten (Tab.2).

In SHR wie auch in WKY-Ratten war das Verhältnis des linken Ventrikels zum Körpergewicht (LVG/KG) im Alter von 4 Wochen größer als in allen späteren Alterstufen (Tab.3). In SHR kam es danach zu einem kontinuierlichen Anstieg des LVG/KG-Verhältnisses von der 8. bis zur 52. Woche um insgesamt 12,4 %. In WKY-Ratten reduzierte sich dagegen das LVG/KG-Verhältnis von der 8. bis zur 36. Woche um 11,4 %. Das Verhältnis war in der 52. Woche noch um 8,2 % niedriger als in der 8. Woche. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Vergleich zwischen beiden Rattenstämmen fand sich kein Unterschied des Verhältnisses von LVG/KG in der 4. und in der 8.

Lebenswoche. Ab der 12. Woche lagen jedoch alle LVG im Verhältnis zum KG in SHR über denen der WKY-Ratten. Die Unterschiede waren in diesen Alterstufen hochsignifikant (Tab.3).

Das linksventrikuläre Gewicht im Verhältnis zum gesamten Herzgewicht (LVG/HG) stieg in SHR zwischen der 4. Woche und der 36. Woche um 17,1 % (Tab.4). Danach verzeichnete sich ein leichter Abfall des Gewichtsverhältnisses von der 36. bis zur 52. Woche. Das Verhältnis lag bei 52 Wochen mit 13,1 % über dem der 4 Wochen alten SHR. In WKY- Ratten dagegen fand sich der höchste Wert bereits im Alter von 24 Wochen. Das Verhältnis des LVG/HG war zu diesem Zeitpunkt um 8,1 % größer als in 4 Wochen alten WKY-Ratten. Danach zeigte sich ein Rückgang des LVG/HG-Verhältnisses bis zur 52. Woche auf das Ausgangsniveau der 4 Wochen alten Ratten. Zwischen den Alterstufen 4 und 52 Wochen bestand damit kein signifikanter Unterschied. Die Werte der Verhältnisse zwischen dem LVG und HG lagen im Vergleich beider Stämme in SHR ab der 8. Wochen in allen Alterstufen signifikant über denen der WKY-Ratten (Tab.4).

Das Verhältnis des linksventrikulären Gewichtes zu dem des rechten Ventrikels (LVG/RVG) stieg in SHR ebenfalls von der 4. bis zur 36. Woche an (Tab.5). Danach zeigte sich auch hier ein Rückgang bis zur 52. Woche. Insgesamt war das LVG/RVG-Verhältnis in 52 Wochen alten SHR um 57,5 % größer als in 4 Wochen alten Versuchstieren. In WKY-Ratten fand sich erneut ein Maximum des Gewichtsverhältnisses in der 24. Woche mit einer Steigerung um 35,9 % im Vergleich zur 4. Woche. Danach näherten sich die Werte bis zur 52. Woche auf das Ausgangsniveau von 4 Wochen alten WKY-Ratten zurück. Zwischen den Alterstufen 4 und 52 Wochen war der Unterschied des Verhältnisses vom LVG zum RVG nicht signifikant. Wie beim LVG/HG-Verhältnis lagen auch hier ab der 8. Woche alle LVG/RVG-Verhältnisse in SHR signifikant über denen der WKY-Ratten (Tab.5).

Zusammenfassend war die Steigerung der Gewichtsverhältnisse des LVG zum HG bzw. des LVG zum RVG in WKY-Ratten weniger ausgeprägt als in SHR, wobei jeweils ab der 8. Lebenswoche ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Rattenstämmen bestand.

3.2. Plasma-NoradrenalinKonzentration

In allen Altersstufen (4, 8, 12, 24, 36 und 52 Wochen) wurde die NoradrenalinKonzentration im Blutplasma (pg/ml) von insgesamt 37 SHR und 65 WKY-Ratten (s. Abb. 4) bestimmt.

In SHR zeigte sich zwischen der 8. und 12. Woche ein sprunghafter Anstieg des Noradrenalinhalt um 41,7 % ($314,5 \pm 29,7$ pg/ml n=10 bzw. $445,8 \pm 82,9$ pg/ml, n=6). Diese Differenz wurde jedoch erst zwischen der 8. und 24. Lebenswoche signifikant ($481,3 \pm 44,2$ pg/ml, n=4). Bis zur 52. Woche verblieb der Noradrenalinhalt auf diesem erhöhten Niveau. Im Vergleich zur 4. Woche war die Plasma-NoradrenalinKonzentration in der 52. Woche signifikant um 49 % erhöht ($337,0 \pm 20,3$ pg/ml, n=5 bzw. $502,1 \pm 51,9$ pg/ml, n=7). In WKY-Ratten dagegen wurde ein Anstieg des Noradrenalinhalt im Blutplasma erst später, ab der 24. Woche sichtbar ($339,2,0 \pm 31,7$ pg/ml, n=13). Der Plasma-Noradrenalinhalt erhöhte sich hier insgesamt von der 12. bis zur 52. Woche kontinuierlich um 80 % ($237,5 \pm 20,6$ pg/ml, n=10 bzw. $427,5 \pm 70,6$ pg/ml, n=10). Im Vergleich lag in SHR bereits in den Alterstufen 4 und 8 Wochen der Noradrenalinhalt über dem der WKY-Ratten. Jedoch wurde der Unterschied erst ab der 12. Woche durch die sprunghafte Noradrenalinerhöhung signifikant ($p < 0,01$). Danach näherten sich die Werte der WKY-Ratten durch eine kontinuierliche Steigerung des Noradrenalinhalt denen der SHR an. In der 52. Woche fand sich zwischen beiden Stämmen kein signifikanter Unterschied mehr (s. Abb. 4).

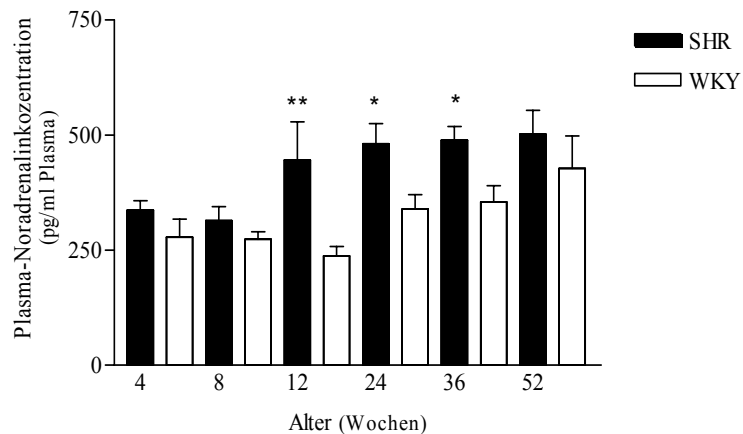


Abb.4: Plasma-NoradrenalinKonzentration in SHR und WKY-Ratten

3.3. Kardiale Noradrenalin-Clearance in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter

3.3.1. nNAT-Dichte im rechten und linken Ventrikel

Abbildung 5 gibt ein Beispiel für eine Sättigungsanalyse zur Bestimmung der nNAT-Dichte im linken Ventrikel von 24 Wochen alten SHR und WKY-Ratten wieder. Als Radioligand wurde [³H]-Nisoxetin (0,3-10 nM, spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol) verwendet. Die spezifische Bindung berechnet sich aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung. Da im dargestellten Fall die Gesamtbindung in SHR deutlich reduziert ist, ergibt sich eine verminderte spezifische Bindung am Transporter.

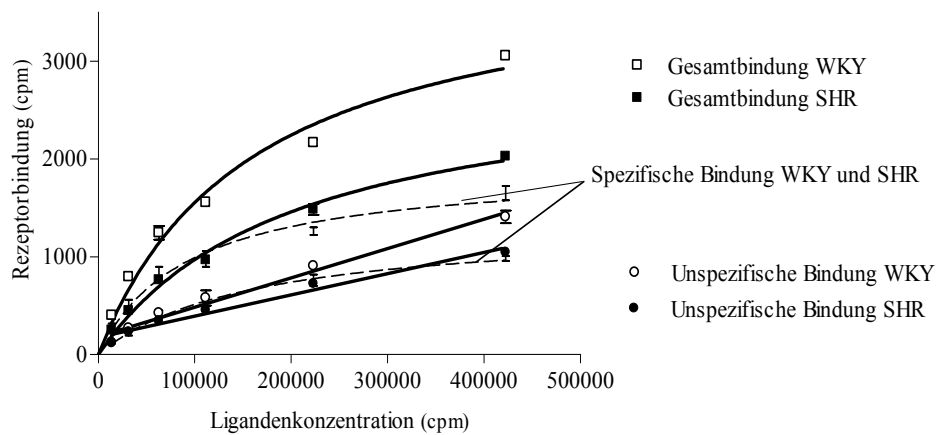


Abb.5: Sättigungsbindungsstudie am linken Ventrikel 24 Wochen alter SHR und WKY-Ratten

Im Altersverlauf der SHR zeigte sich am rechten Herzventrikel von der 4. bis zur 12. Woche kein signifikanter Unterschied in der nNAT-Dichte ($123,11 \pm 17,07$ fmol/mg, $n=3$ bzw. $97,78 \pm 11,33$ fmol/mg, $n=4$). Danach reduzierte sich die Dichte sprunghaft um 42,3 % bis zur 24. Lebenswoche ($56,39 \pm 5,37$ fmol/mg, $n=3$) und blieb bis zur 52. Woche quantitativ auf diesem niedrigeren Niveau ($69,60 \pm 11,18$ fmol/mg, $n=4$). In WKY-Ratten dagegen kam es zu keiner Abnahme der nNAT-Dichte im Altersverlauf. Die ermittelten Werte entsprachen in WKY-Ratten in allen Alterstufen denen der jungen SHR (z.B. WKY 4 Wochen: $112,64 \pm 12,89$ fmol/mg, $n=3$ bzw. WKY 52 Wochen: $111,51 \pm 8,96$ fmol/mg, $n=3$), so dass sich im Vergleich zwischen beiden Rattenstämmen im rechten Ventrikel erst ab der 24. Woche eine signifikante Abnahme der nNAT-Dichte in SHR zeigte (s. Abb. 6).

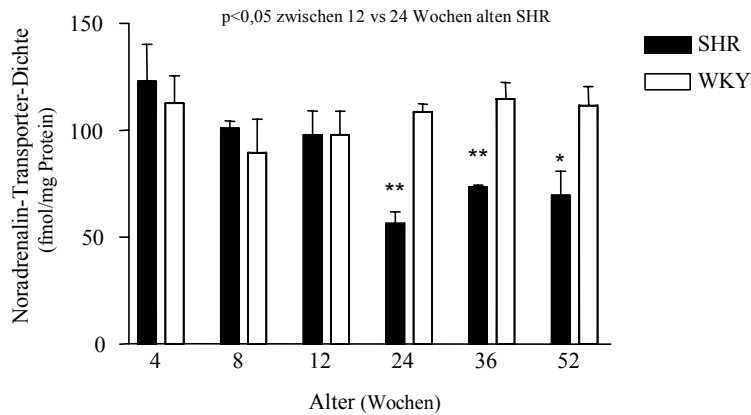


Abb.6: nNAT-Dichte im rechten Ventrikel von SHR und WKY-Ratten

Im linken Herzventrikel entsprach der Altersverlauf in beiden Rattenstämmen in etwa dem des rechten Ventrikels. In SHR fand sich die höchste nNAT-Dichte in der 4. Woche und 8. Woche ($74,61 \pm 12,65$ fmol/mg, $n=3$ bzw. $78,44 \pm 3,32$ fmol/mg, $n=3$). Danach reduzierte sich die Dichte sprunghaft zwischen 12. und 24. Woche um 37,7 % ($63,23 \pm 11,85$ fmol/mg, $n=4$ vs. $39,37 \pm 3,92$ fmol/mg, $n=3$). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant, wohingegen zwischen der 8. und 24. Woche die Abnahme statistisch zu sichern war. Die Werte blieben bis zur 52. Woche auf diesem Niveau ($33,66 \pm 5,80$ fmol/mg, $n=4$). In WKY-Ratten fand sich dagegen im Altersverlauf keine Abnahme der nNAT-Dichte (z.B. WKY 4 Wochen: $87,38 \pm 9,07$ fmol/mg, $n=3$ bzw. WKY 52 Wochen: $90,30 \pm 7,50$ fmol/mg, $n=3$). In SHR ergab sich im Vergleich zum WKY-Stamm bereits ab der 8. Lebenswoche eine verringerte nNAT-Dichte im linken Ventrikel. Die Unterschiede wurden jedoch wie am rechten Ventrikel erst ab der 24. Woche statistisch signifikant (s. Abb. 7).

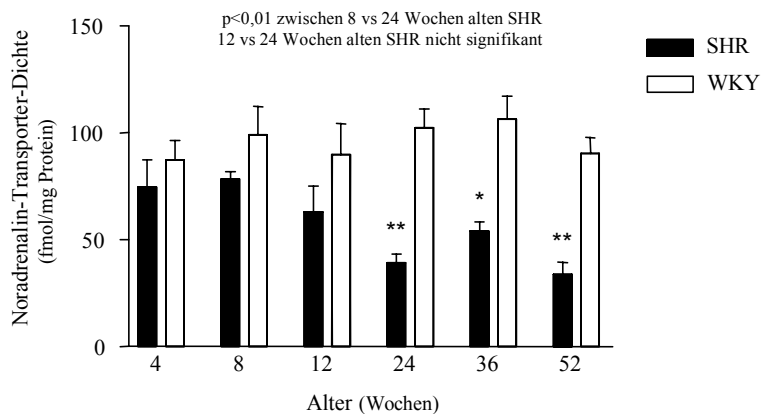


Abb.7: nNAT-Dichte im linken Ventrikel von SHR und WKY-Ratten

3.3.2. K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudien am Noradrenalin-Transporter

Der K_D -Wert einer Radioligand-Bindungsstudie gibt die Affinität eines Rezeptors zum eingesetzten Liganden wieder (siehe 2.3.). Tab. 6 und Tab. 7 zeigen die K_D -Werte der Bindungsstudien mit [^3H]-Nisoxetin am Noradrenalin-Transporter im rechten bzw. linken Ventrikel von SHR und WKY-Ratten. Im Altersverlauf beider Stämme ergaben sich in beiden Herzventrikeln keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den K_D -Werten erkennbar.

3.3.3. nNAT-Aktivität im rechten und linken Ventrikel

Abbildung 8 zeigt ein Beispiel für eine konzentrationsabhängige Anreicherung des Noradrenalins in Gewebsstücken des linken Ventrikels 24 Wochen alter SHR und WKY-Ratten. Dargestellt ist jeweils die aufgenommene Konzentration an Noradrenalin in pmol pro mg Herzgewebe pro Zeiteinheit (pmol NA/ mg Gewebe/ 15min). Die spezifische Aufnahme über den nNAT berechnet sich aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Aufnahme. Die Gesamt-Aufnahme ist in diesem Fall in SHR in allen Konzentrationsstufen signifikant niedriger als in WKY-Ratten, so dass sich eine reduzierte spezifische nNAT-vermittelte Aufnahme in SHR ergibt. In dem verwendeten Konzentrationsbereich (max. 25 nM) besteht zwischen der eingesetzten Noradrenalin-Konzentration und der spezifischen nNAT-vermittelten Aufnahme ein linearer Verlauf, wobei es bei höheren Konzentrationen zur Sättigung am Transporter kommen würde (99).

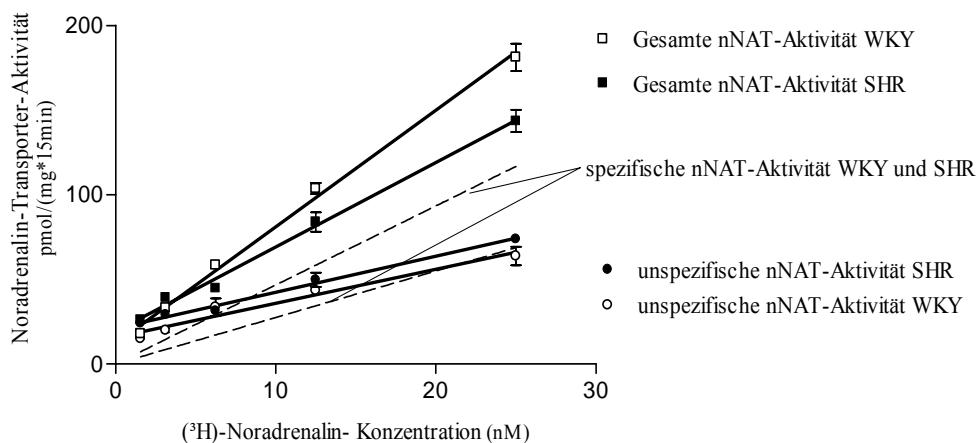


Abb.8: nNAT-Aktivität im linken Ventrikel 24 Wochen alter SHR und WKY-Ratten

Im rechten Ventrikel der SHR stieg die nNAT-Aktivität kontinuierlich von der 4. bis zur 12. Woche um 90,6 % ($74,69 \pm 4,81$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4 bzw. $142,37 \pm 11,47$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4). Danach reduzierte sich die nNAT-Aktivität bis zur 52. Woche leicht ($118,88 \pm 8,32$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=5), wobei statistisch keine Unterschiede zwischen den Werten bestanden. In WKY-Ratten dagegen stieg die nNAT-Aktivität von der 4. Woche bis zur 24. Woche um 107,5 % ($88,92 \pm 13,72$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4 bzw. $184,49 \pm 6,93$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4). Danach kam es hier auch zu einer Reduktion der Aktivität. Diese Abnahme wurde vor allem zwischen der 36. und der 52. Woche mit einem Rückgang um 44,6 % deutlich ($177,33 \pm 7,62$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4 bzw. $98,3 \pm 10,70$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4). Die Werte der nNAT-Aktivität im rechten Ventrikel zeigten somit in beiden Rattenstämmen einen glockenförmigen Altersverlauf. In SHR fand sich die maximale Aktivität bereits im Alter von 12 Wochen, in WKY dagegen erst mit 24 Wochen. Weiterhin lag dieses Maximum in SHR unter dem der WKY-Ratten. Es bestanden damit zwischen beiden Rattenstämmen im Alter von 24 und 36 Wochen signifikante Unterschiede. Im Alter von 52 Wochen war durch die Abnahme der nNAT-Aktivität in WKY-Ratten im hohen Alter kein Unterschied mehr vorhanden (s. Abb. 9).

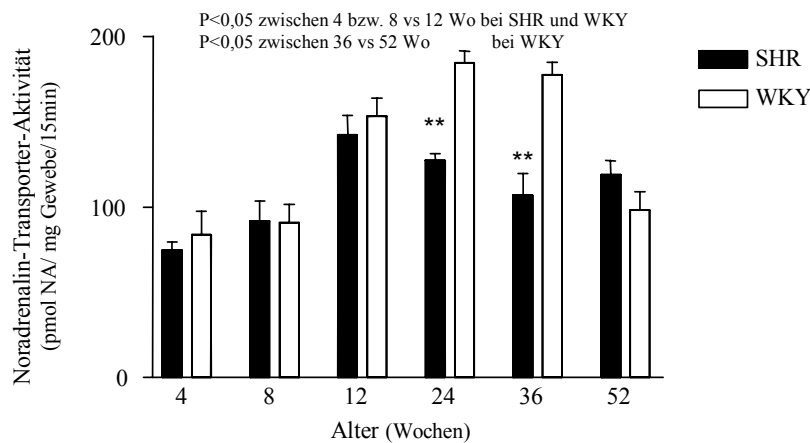


Abb.9: nNAT-Aktivität in Gewebestücken des rechten Ventrikels von SHR und WKY-Ratten bei einer Inkubation mit 25 nM Noradrenalin

Im linken Ventrikel kam es in SHR nicht zu einer Erhöhung der nNAT-Aktivität in den ersten Lebenswochen wie im rechten Ventrikel. Die Werte blieben von der 4. bis zur 12. Lebenswoche unverändert ($99,31 \pm 3,07$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4 bzw. $88,33 \pm 13,06$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4). Darauf folgend reduzierte sich die Transporteraktivität bis zur 52. Woche kontinuierlich ($37,61 \pm 9,37$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=5). In WKY-Ratten zeigte sich dagegen wie im rechten Ventrikel ein glockenförmiger Altersverlauf. Die nNAT-Aktivität erhöhte sich hier von der 4.

Lebenswoche bis zur 12. Woche um 58,3 % ($84,29 \pm 13,36$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4 bzw. $133,44 \pm 4,02$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=3). Danach reduzierte sich die nNAT-Aktivität bis zur 52. Woche um insgesamt 72,2 % ($37,09 \pm 2,30$ pmol/mg/15min bei 25 nM NA, n=4). Im Vergleich zwischen den beiden Stämmen war die nNAT-Aktivität im linken Ventrikel der SHR wegen des fehlenden Anstieges gegenüber den WKY-Ratten ab der 12. Woche vermindert. In der 52. Lebenswoche zeigten sich aufgrund des altersabhängigen Rückgangs in WKY-Ratten keine Unterschiede mehr in der Aktivität des nNAT (s. Abb.10).

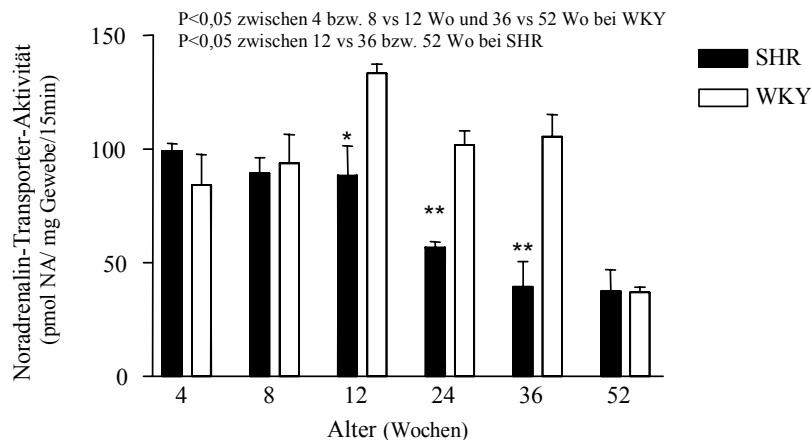


Abb.10: nNAT-Aktivität in Gewebestücken des linken Ventrikels von SHR und WKY-Ratten bei einer Inkubation mit 25 nM Noradrenalin

Zusammenfassend war die nNAT-Aktivität in SHR in beiden Ventrikeln gegenüber den WKY-Ratten in den mittleren Altersstufen vermindert. Das lag zum einen an der vorzeitigen altersabhängigen Reduktion bzw. an einem fehlenden oder verringerten Anstieg in den ersten Wochen. Im hohen Alter fanden sich aufgrund der Reduktion der nNAT-Aktivität in WKY-Ratten die gleichen Werte in beiden Stämmen.

3.4. Kardiale β -Adrenozeptoren in SHR und WKY-Ratten in Abhängigkeit zum Alter

3.4.1. β -Adrenozeptordichte im rechten und linken Ventrikel

Die β -AR-Dichte wurde durch Radioligand-Bindungssanalysen bestimmt. Als Radioligand fungierte (-)- $[^{125}\text{J}]$ -Jodocyanopindolol (JCYP, spezifische Aktivität 2200 Ci/mmol) (45).

Ein Beispiel für eine Bindungskurve ist in Abb.11 gegeben. Es sind die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung an den Rohmembranfraktionen des linken Ventrikels von 12 Wochen alten SHR und WKY-Ratten dargestellt. Die spezifische Bindung an den β -AR berechnet sich aus der Differenz von

gesamter und unspezifischer Bindung. In Abb.11 ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied der spezifischen Bindung an β -AR 12 Wochen alten SHR und WKY-Ratten.

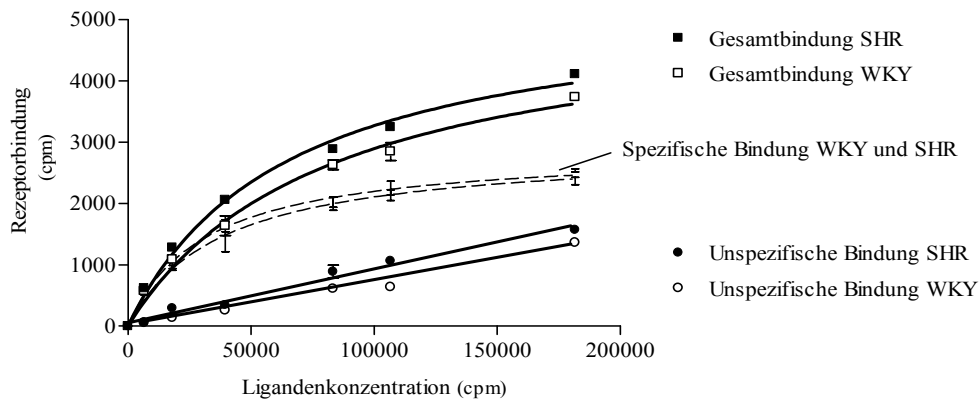


Abb.11: β -AR Sättigungsbindungsstudie am linken Ventrikel 12 Wochen alter SHR und WKY-Ratten

Die β -AR-Dichte (fmol/mg Herzgewebe) zeigte während des Alterns beider Rattenstämme im rechten und linken Ventrikel einen ähnlichen Verlauf:

Im rechten Ventrikel der SHR (s. Abb. 12) fand sich die größte Dichte der β -AR in der 4. und 8. Lebenswoche ($26,83 \pm 3,30$ fmol/mg $n=4$ bzw. $27,04 \pm 3,35$ fmol/mg, $n=5$). Danach reduzierte sich die β -AR-Dichte um 29,9 % bis zur 12. Woche ($18,95 \pm 2,15$ fmol/mg, $n=4$). In den darauf folgenden Altersstufen blieb die β -AR-Dichte bis zur 52. Woche auf diesem erniedrigten Niveau ($18,87 \pm 3,08$ fmol/mg, $n=4$). Im Gegensatz zum linken Ventrikel ließ sich jedoch in SHR die Abnahme der β -AR-Dichte im rechten Ventrikel statistisch nicht sichern, das heißt zwischen den einzelnen Alterstufen bestand kein signifikanter Unterschied. In WKY-Ratten zeigte sich im rechten Ventrikel ebenfalls in der 4. bzw. 8. Lebenswoche die höchste β -AR-Dichte ($27,23 \pm 2,72$ fmol/mg, $n=3$ bzw. $27,77 \pm 1,95$ fmol/mg, $n=4$). Auch hier fanden sich von der 12. bis zur 52. Woche erniedrigte Werte ($21,86 \pm 1,50$ fmol/mg, $n=3$ bzw. $22,78 \pm 1,61$ fmol/mg, $n=3$). Jedoch ließ sich nur zwischen den Werten der 8. und 24. Woche ein signifikanter Unterschied feststellen ($27,77 \pm 1,95$ fmol/mg, $n=4$ vs. $19,39 \pm 1,9$ fmol/mg, $n=3$, $p<0,05$). Im Vergleich zwischen beiden Rattenstämmen zeigten sich im rechten Ventrikel in allen Alterstufen keine Unterschiede der β -AR-Dichte (s. Abb. 12).

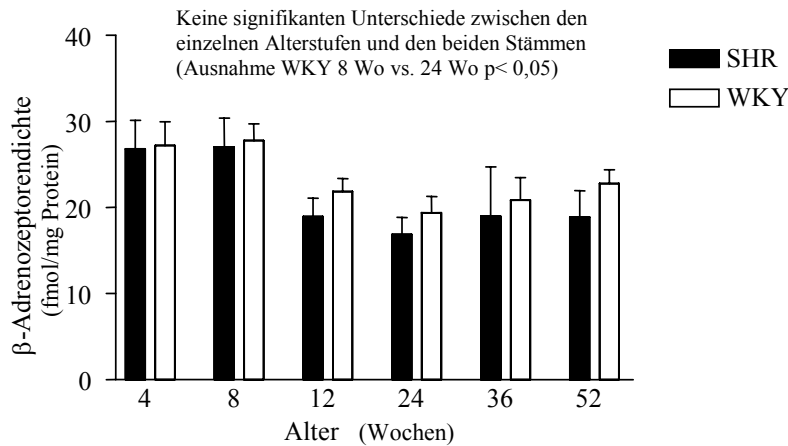


Abb.12: β -AR-Dichte im rechten Ventrikel von SHR und WKY-Ratten

Im linken Ventrikel fand sich in SHR die höchste β -AR-Dichte im Alter von 4 und 8 Wochen ($28,30 \pm 2,46$ fmol/mg, n=4 bzw. $25,97 \pm 2,31$ fmol/mg, n=5). Zwischen 8. und 12. Woche verringerte sich die β -AR-Dichte sprunghaft um 29,1 % ($18,40 \pm 1,91$ fmol/mg, n=4) und reduzierte sich kontinuierlich bis zum Alter von 36 Wochen ($13,25 \pm 2,10$ fmol/mg, n=3). Im Alter von 52 Wochen lag die β -AR-Dichte leicht über dem Wert der 36 Wochen alten Ratten ($15,29 \pm 1,54$ fmol/mg, n=4). Diese Erhöhung war jedoch statistisch nicht signifikant. Von der 4. bis zur 52. Woche reduzierte sich die β -AR-Dichte insgesamt um 46 %. In WKY-Ratten zeigte sich in der 4. Lebenswoche eine β -AR-Dichte im linken Ventrikel von $31,91 \pm 1,14$ fmol/mg, n=3. Auch fand sich ein Rückgang der β -AR-Dichte bis zur 36. Woche ($16,03 \pm 1,51$ fmol/mg, n=4) mit einem leichten, nicht signifikanten Anstieg in der 52. Woche ($19,24 \pm 1,80$ fmol/mg, n=3). Die β -AR-Dichte reduzierte sich insgesamt von der 4. bis zur 52. Woche um 39,7 %. Wie in den rechten Ventrikeln waren die Unterschiede der β -AR-Dichte im linken Ventrikel zwischen den beiden Rattenstämmen in allen Alterstufen nicht signifikant (s. Abb. 13).

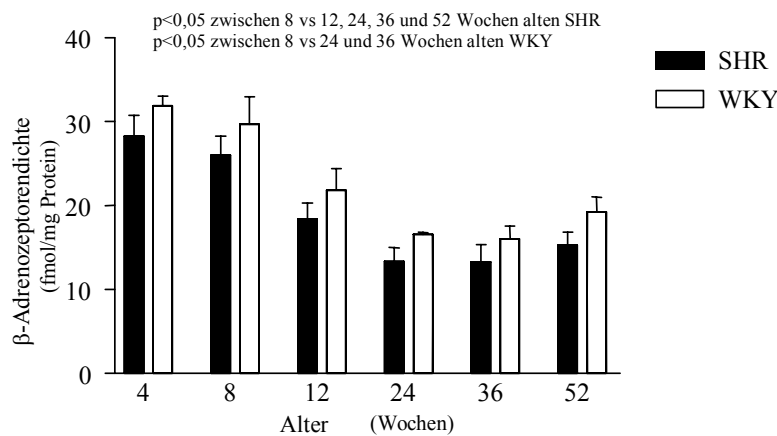


Abb.13: β -AR-Dichte im linken Ventrikel von SHR und WKY-Ratten

3.4.2. K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudien an den β -Adrenozeptoren

Der K_D -Wert einer Radioligand-Bindungsstudie ist ein Ausdruck für die Affinität eines Rezeptors zu dem eingesetzten Liganden (siehe 2.3.). In Tab.8 und Tab. 9 sind die K_D -Werte der Bindungsstudien mit (-)-[125 J]-Jodocyanopindolol (JCYP) an den β -AR rechter bzw. linker Ventrikel von SHR und WKY-Ratten aufgeführt. Während des Alterns der SHR und WKY-Ratten waren an beiden Ventrikeln keine signifikanten Veränderungen der K_D -Werte zu beobachten. Auch bestand zwischen den Stämmen in allen Altersstufen kein signifikanter Unterschied zwischen den K_D -Werten.

3.4.3. β_1 - und β_2 - Subtypen-Verhältnis im rechten und linken Ventrikel

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel einer Kompetitionsbindungsstudie zur Bestimmung der β -AR-Subtypen-Verteilung. Als Kompetitor wurde der selektive β_1 -AR-Antagonist CGP 20712A verwendet. In der Abbildung sind die biphasischen Kurven der Kompetitionsstudien an Rohmembranen des linken Herzventrikels von 52 Wochen alten SHR und WKY-Ratten dargestellt. Die senkrechten Linien zeigen den IC_{50} -Wert der jeweiligen Rezeptor-Kompetitor-Interaktion (siehe 2.3.). Es ist zu erkennen, dass in SHR im Bereich mittlerer Konzentrationen des Kompetitors prozentual weniger JCYP durch den β_1 -AR-spezifischen Liganden verdrängt wurde als in WKY-Ratten. Daraus lässt sich schließen, dass der relative Anteil der β_1 -AR in diesem Fall in SHR geringer als in WKY-Ratten ist.

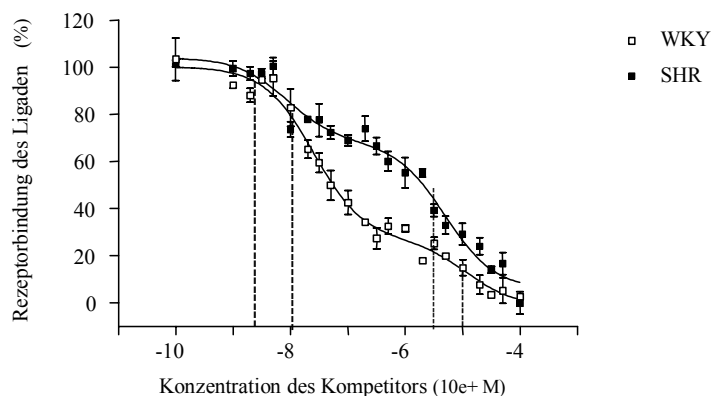


Abb.14: Kompetitionsbindungsstudie am linken Ventrikel 52 Wochen alter SHR und WKY-Ratten

Im rechten Ventrikel fand sich in SHR bis zur 36. Lebenswoche keine signifikante Veränderung des relativen Anteils der β_1 -AR an der gesamten β -AR-Dichte. In der 52. Woche verringert sich der β_1 -AR-Anteil gegenüber 4 Wochen alten Ratten um 18,6 %. In WKY-Ratten zeigte sich dagegen die Verteilung

der Subtypen in allen Alterstufen konstant. Im Alter von 52. Wochen fand sich demnach in SHR im Vergleich mit gleichaltrigen WKY-Ratten eine signifikante Verringerung des β_1 -AR-Anteils (Tab. 10).

Im linken Ventrikel zeigte sich in SHR ein ähnlicher Verlauf wie beim rechten Ventrikel. Bis zur 36. Woche blieb der β_1 -AR-Anteil unverändert und verringerte sich erst in der 52. Woche. Diese Abnahme war stärker ausgeprägt als beim rechten Ventrikel. Insgesamt verringerte sich der relative Anteil der β_1 -AR zwischen der 4. und 52. Lebenswoche um 37,2 %. In WKY-Ratten hingegen blieb die prozentuale Verteilung der β -AR-Subtypen wie im rechten Ventrikel in allen Alterstufen konstant. Damit fand sich auch am linken Ventrikel in SHR gegenüber den WKY-Ratten eine signifikante Abnahme des relativen Anteils von β_1 -AR in der 52. Woche (Tab. 11).

4. Diskussion

4.1. Entwicklung von arterieller Hypertonie und Linksherzhypertrophie

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Ratten vom SHR-Stamm verwendet, welcher als ein Tiermodell zur Erforschung der essentiellen arteriellen Hypertonie beim Menschen gilt. Die genauen Ursachen der Hypertonie sind in diesem Stamm noch nicht bekannt. Man geht jedoch auch hier - wie beim Menschen - von einem multifaktoriellen Geschehen aus, bei dem mehrere Organsysteme betroffen sind (171,172). Bei der Entstehung des essentiellen Bluthochdruckes scheinen unter anderem genetisch determinierte Veränderungen an den Nieren eine Rolle zu spielen. Die Transplantation von Nieren des SHR-Stammes in normotensive WKY-Ratten führte zum Bluthochdruck in den WKY-Ratten, während umgekehrt Nieren von WKY-Ratten die Bluthochdruckentstehung in SHR verhinderten (19,130). Grund hierfür könnte die schon in der prähypertensiven Phase erhöhte renale α -AR-Dichte sein. Dadurch werden hypertensive Effekte wie Vasokonstriktion sowie NaCl- und Wasserretention verstärkt (15,19,112,138,154,). Andere Untersuchungen zeigten jedoch eine unveränderte renale α -AR-Dichte in SHR (111). Weitere Faktoren, die in SHR zur Hypertoniegenese beitragen, sind möglicherweise das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (71,82,105,172) sowie zelluläre Prozesse, die das Gefäßwachstum regulieren (172).

Es liegen unterschiedliche Daten vor, in welchem Alter es in SHR zu einer Ausprägung der Hypertonie kommt. Gray stellte in SHR bereits am ersten postnatalen Tag eine Blutdruckdifferenz im Vergleich zu WKY-Ratten fest (65). Andere Autoren berichten jedoch von einem Blutdruckanstieg erst ab der 4 Lebenswoche (90,131,154). Schließlich deuten weitere Untersuchungen auf unveränderte Blutdruckwerte in der 4. und 5. Woche (25,28,71,114) und eine signifikante Hypertonie erst in der 8. Woche hin (136). Zwar lagen in unseren Untersuchungen die Blutdruckwerte in SHR bereits in der 4. Woche über denen der WKY-Ratten, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Erst ab der 8. Woche fand sich ein signifikant erhöhter Blutdruck in SHR. Der stärkste Blutdruckanstieg erfolgte zwischen der 8. und 12. Lebenswoche.

Eine linksventrikuläre Hypertrophie wurde in der vorliegenden Arbeit durch das Verhältnis des linken Ventrikelgewichtes zum gesamten Herzgewicht, zum rechten Ventrikelgewicht und zum Körpergewicht gekennzeichnet. Dabei gilt das Verhältnis des linken Ventrikelgewichtes zum gesamten Herzgewicht sowie zum Gewicht des rechten Ventrikels als körperrgewichtsunabhängiger Index einer kardialen Hypertrophie.

In SHR zeigte sich ab dem Alter von 8 Wochen eine Zunahme des relativen linksventrikulären Gewichtes, insbesondere bei den körperrgewichtsunabhängigen Hypertrophiemarkern. Beim Verhältnis des linken Ventrikels zum gesamten Körpergewicht wurde der Unterschied jedoch erst ab der 12. Woche signifikant. Diese Ergebnisse wurden als eine ab der 8. bis 12. Lebenswoche bestehende Linksherzhypertrophie in SHR gewertet. Auffällig war, dass in 4 Wochen alten SHR und WKY-Ratten das Verhältnis des linken Ventrikels zum Körpergewicht weit über den übrigen Altersstufen lag. Ursache hierfür scheinen die bei unausgereiften Individuen typisch veränderten Körperproportionen zu sein. Relativ zum Körpergewicht haben einzelne Organe damit ein größeres Gewicht als bei ausgewachsenen Tieren.

Folgen der kardialen Hypertrophie sind eine erhöhte Wandsteifigkeit assoziiert mit einer verringerten Kontraktilität, eine systolische Dysfunktion mit nachfolgender Dekompensation des Herzens. Dieses Stadium wird klinisch als dekompensierte Herzinsuffizienz bezeichnet (12,29), welches die SHR im Alter von ca. 18 Monaten erreichen sollen (153). Demnach befanden sich unsere Versuchstiere in allen Alterstufen im Stadium einer kompensierten Linksherzhypertrophie.

Ein erhöhter Sympathikustonus ist charakteristisch bei der Entstehung und Ausprägung des essentiellen Bluthochdruckes (4,29,54,55,106). Die Ursache für diese gesteigerte Sympathikusaktivität ist nicht genau bekannt. Ein Grund könnte eine durch Angiotensin II hervorgerufene Verstärkung sympathischer Aktivität sein. Dazu gehören eine gesteigerte Noradrenalinfreisetzung aus den Nervenendigungen und damit verbunden eine vermehrte Stimulation postsynaptischer adrenerger Rezeptoren (106). Eine weitere mögliche Ursache für einen erhöhten Sympathikustonus ist eine Insulin-Resistenz mit reaktiver Hyperinsulinämie, welche zu einer Steigerung der sympathischen Aktivität führt. Allerdings verursacht eine erhöhter Sympathikustonus wiederum eine Insulin-Resistenz, so dass Ursache und Folge hier nicht klar zu trennen sind (66,106,144,151). Weiterhin wird eine zentrale, vom Hypothalamus und Subkortex ausgehende Übererregbarkeit auf Umweltreize als mögliche Ursache gesteigerter sympathischer Aktivität angesehen (106). Dass ein beeinträchtigter Baroreflex über eine Sympathikussteigerung zur essentiellen Hypertonie führt, wird diskutiert (106).

In SHR ist die sympathische Aktivität ebenfalls erhöht (24,27,81,106,120,154,172). Mehrere Studien weisen auf einen gesteigerten Sympathikustonus bereits in der prähypertensiven Phase bzw. im frühen Stadium einer Hypertonie hin. So konnte gezeigt werden, dass eine Sympathektomie in neonatalen Ratten die Bluthochdruckentstehung verhinderte (96). Head berichtet von einer gesteigerten sympathischen Innervation am Gefäßsystem prähypertensiver SHR (69). Böhm wies einen erhöhten Gehalt von Noradrenalin im Myokard prähypertensiver SHR nach (8). Donohue et al. fanden einen erhöhten Noradrenalinegehalt pro Gramm Gewebe in den Nieren und Mesenterialgefäßen (39). Cabassi zeigte im

Plasma prähypertensiver SHR eine Erhöhung von DHPG, einem Noradrenalinmetaboliten (25). Eine gesteigerte Sympathikusaktivität könnte demnach in SHR ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Hypertonieentstehung spielen.

Der durch den gesteigerten Sympathikustonus erhöhte Blutdruck führt zu einer Verdickung der Intima-Media und damit zum Elastizitätsverlust der Gefäßwände. Durch die zunehmende Gefäßsteifigkeit wird die Manifestation einer Hypertonie erleichtert (54,106,172). Die erhöhte Nachlast wiederum führt am Herzen zu einer kompensatorischen linksventrikulären Hypertrophie. Der genaue molekulare Vorgang ist dabei noch nicht vollständig bekannt. Die Hypertonie alleine ist jedoch nicht für die Entstehung einer kardialen Hypertrophie verantwortlich, sondern hierfür scheint auch der erhöhte Sympathikustonus notwendig zu sein (29,106). Dabei spielen Noradrenalin und Adrenalin durch Bindung an AR eine entscheidende Rolle (58,106,129). Bereits subhypertensive Dosen von Noradrenalin können zu einer kardialen Hypertrophie führen (93). Morisco et al. fanden durch Untersuchungen an Rattenherzen heraus, dass die Hypertrophie hauptsächlich über Stimulation der β_1 -Subtypen induziert wird (115). Weiterhin führt die Stimulation von α_1 -adrenergen aber auch von Angiotensin 1- und Endothelin 1-Rezeptoren über die Proteinkinase C zu einer Hypertrophie (12).

Zusammenfassend kam es zu einer Ausprägung der hypertensiven Herzkrankheit in SHR in der 8. Lebenswoche mit erhöhten Blutdruckwerten und einer linksventrikulären Hypertrophie. Dabei ist zu vermuten, dass die Hypertonie die Ursache für die Ausbildung der Linksherzhypertrophie ist. Einige Autoren beobachteten in SHR jedoch eine Hypertrophie bereits in der prähypertensiven Phase, was bedeuten würde, dass die Linksherzhypertrophie nicht nur sekundär zum erhöhten Blutdruck entsteht (170). Unabhängig von einer Hypertonie könnte es demnach durch einen gesteigerten Sympathikustonus zur Hypertrophie kommen.

4.2. Plasma-NoradrenalinKonzentration bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter

Die Erhöhung des zirkulierenden Noradrenalins gilt als wichtiger Marker für einen gesteigerten Sympathikustonus (63,106,109,142). Die überwiegende Zahl von Autoren berichtet von einer erhöhten Plasma-NoradrenalinKonzentration in SHR (25,117,126,133,157). In den jeweiligen Studien wurden jedoch SHR unterschiedlichen Alters untersucht. Es gibt daher unterschiedliche Aussagen, ab welchem Zeitpunkt es zu einer Noradrenalinerhöhung im Plasma kommt und welcher chronologische Zusammenhang zwischen dieser Erhöhung und der Bluthochdruckentwicklung besteht: Laflamme stellte auch nach Ausprägung des Bluthochdruckes keine Veränderung der Plasma-NoradrenalinKonzentration fest (82). Andere Autoren hingegen berichten von einer Katecholaminerhöhung schon in der prähypertensiven Phase (117,131).

In der vorliegenden Arbeit war die Plasma-NoradrenalinKonzentration in allen Alterstufen in SHR höher als in WKY-Ratten. Dieser Unterschied wurde erst im Alter von 12 Wochen signifikant. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich eine arterielle Hypertonie und eine Linksherzhypertrophie bereits entwickelt. Ein signifikant erhöhter Noradrenalinspiegel zeigte sich demnach sekundär zur Hypertonie und Hypertrophie und scheint daher nicht deren primäre Ursache sein.

Wie bei der hypertensiven Herzkrankheit ist auch im Alter ein gesteigerter Sympathikustonus bekannt. Ursachen könnten ein beeinträchtigter Baroreflex und/oder eine erhöhte zentralnervöse Aktivität sein (141). Daneben findet sich auch im Alter eine erhöhte Plasma-NoradrenalinKonzentration (37,49,51,62,91,124,161,173). In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich im fortgeschrittenen Alter in beiden Stämmen ein erhöhter Noradrenalinspiegel. In SHR stieg die NoradrenalinKonzentration jedoch bereits sprunghaft zwischen der 8. und 12. Woche, während dagegen in WKY-Ratten die Erhöhung der NoradrenalinKonzentration zu einem späteren Zeitpunkt - ab der 24. Woche - langsam und kontinuierlich erfolgte. Im hohen Alter bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den NoradrenalinKonzentrationen im Blutplasma von SHR und WKY-Ratten. Die plötzlich erhöhte NoradrenalinKonzentration von jüngeren, hypertensiven Tieren glich der von alten, gesunden Tieren.

Der Noradrenalinspiegel im Blutplasma wird beeinflusst durch dessen Clearance (Uptake, enzymatischer Abbau) und durch die Diffusionsrate des Noradrenalins aus den Nervenendigungen in umgebendes Gewebe und Blutgefäße. Diese Diffusion wird als Spillover bezeichnet (86). Hoeldtke et al. fanden heraus, dass zwischen 12 %-20 % des aus den Neuronen freigesetzten Noradrenalins in das Blutplasma gelangt (74). Eine reduzierte Wiederaufnahme durch eine verminderte nNAT-Aktivität und/oder nNAT-

Dichte führen zu einer erhöhten Konzentration des Noradrenalins im synaptischen Spalt, einem dadurch gesteigerten Spillover und einer erhöhten Plasma-Noradrenalin-Konzentration (10,37,108,134).

Die Erhöhung des Noradrenalinspiegels in SHR sowie im Altersverlauf beider Stämme kann also entweder Folge eines gesteigerten Sympathikotonus mit einem gesteigerten Spillover und/oder die Folge einer reduzierten nNAT-Aktivität bzw. -Dichte sein.

4.3. Kardiale Noradrenalin-Clearance bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter

Um die Beziehung zwischen Noradrenalin-Clearance zum erhöhten Plasma-Noradrenalin-Spiegel beurteilen zu können, untersuchten wir die Aktivität, die Dichte und die Affinität des nNAT in beiden Ventrikeln des hypertensiven Herzens sowie im Altersverlauf beider Stämme.

Studien zeigten in SHR einen reduzierten Uptake im Herzen (77,137), in den Nieren (122) und in der Skelettmuskulatur (25). Im Vergleich zu WKY-Ratten zeigte sich in unseren Untersuchungen eine Verminderung der nNAT-Aktivität im rechten Ventrikel der SHR ab der 24. Woche, im linken Ventrikel bereits ab der 12. Woche. Die Dichte des nNAT war im rechten Ventrikel ab der 24. Woche reduziert. Im linken Ventrikel zeigte sich schon in der 8. und 12. Woche eine verringerte Dichte, der Unterschied wurde aber ebenfalls erst in der 24. Woche signifikant. Die Affinität des Transporters zu dem Liganden [³H]-Nisoxetin, bestimmt durch den K_D -Wert der Radioligand-Bindungsstudien, änderte sich nicht. Eine verminderte Affinität ist demnach nicht die Ursache für einen reduzierten Uptake.

Ein Grund für die zeitlichen Differenzen in den beiden Ventrikeln könnte deren Anordnung zum großen Blutkreislauf zu sein. Der linke Ventrikel ist dem hypertensiven Körperkreislauf direkt vorgeschaltet, so dass sich durch die Hypertonie induzierte Effekte hier eher manifestieren. Ein reduzierter Uptake könnte also eine direkte oder indirekte Folge der arteriellen Hypertonie zu sein, welche zu diesem Zeitpunkt bereits ausgeprägt war. Die Reduktion des neuronalen Uptakes erfolgte weiterhin zu dem Zeitpunkt in welchem sich auch der erhöhte Plasma-Noradrenalin-Spiegel manifestierte. Eine Kausalität lässt sich dabei nicht sicher beweisen. Einerseits führt ein reduzierter Uptake zu einem erhöhten Plasma-Noradrenalin-Spiegel (siehe 4.2.), andererseits kommt es durch eine andauernde Erhöhung der Katecholamine im Plasma wiederum zu einer Verringerung des neuronalen Uptakes im Herzen und damit zu einer erhöhten Katecholamin-Konzentration im interstitiellen Herzgewebe (38,73), so dass sich die Plasma-Noradrenalin-Erhöhung und die neuronale Uptake-Reduktion hier wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen.

Die vorliegenden Ergebnisse in den SHR korrelieren mit den Untersuchungen im hypertensiven menschlichen Herzen bei denen neben den erhöhten Noradrenalin-Werten im Blutplasma (60,61,64,106) auch ein beeinträchtigter kardialer Uptake (46,134) festgestellt wurde.

Während des Alterungsprozesses ist ebenfalls beim Menschen neben einem gesteigerten Spillover (51,52,107,128) eine Abnahme des neuronalen Uptakes bekannt (49,50,51,100,141). Ein Grund dafür könnte neben einer reduzierten nNAT-Aktivität eine verringerte Dichte von Nervenendigungen im alternden Gewebe sein. Die Dichte noradrenerger Nervenendigungen vermindert sich dabei durch einen Abbau der Nervenenden oder durch einen vergrößerten Abstand untereinander (37).

In unseren Untersuchungen zeigte sich im Altersverlauf der gesunden WKY-Ratten eine Abnahme der nNAT-Aktivität im hohen Alter. Dabei fand sich ein glockenförmiger Verlauf mit einem Maximum in den mittleren Alterstufen. Die darauf folgende Reduktion der Aktivität erfolgte dabei zu einem Zeitpunkt, in der sich die altersbedingte Erhöhung des Plasma-Noradrenalinpiegels in WKY-Ratten bereits abzeichnete. Auch hier kann wie bei der Reduktion des Uptakes infolge einer arteriellen Hypertonie über die gegenseitige Beeinflussung dieser Effekte nur spekuliert werden (siehe oben). Im Vergleich mit WKY-Ratten zeigte sich in SHR in beiden Ventrikeln nach anfänglich ähnlichem Altersverlauf keine dermaßen ausgeprägte Steigerung der nNAT-Aktivität in den mittleren Alterstufen. Weiterhin kam es eher zu der alterungsbedingten Reduktion der nNAT-Aktivität, korrelierend mit der vorzeitig erhöhten Plasma-NoradrenalinKonzentration in SHR. Im hohen Alter fanden sich in beiden Rattenstämmen wieder annähernd vergleichbare Werte für die Noradrenalinaufnahme. Im Gegensatz zur nNAT-Aktivität änderte sich die nNAT-Dichte in WKY-Ratten in beiden Ventrikeln nicht im Altersverlauf. Der reduzierte Noradrenalin-Reuptake im Alter scheint demnach in herzgesunden WKY-Ratten nicht auf Grund einer verringerten Transporterdichte, sondern viel mehr durch eine Aktivitätsminderung zu erfolgen. In SHR zeigte sich dagegen im Altersverlauf ab der 24. Woche, also zu einem Zeitpunkt als sich die nNAT-Aktivität ebenfalls verringerte, eine Reduktion der nNAT-Dichte, so dass hier sowohl eine verminderte Aktivität als auch eine vermindert Transporterdichte zu einem reduzierten neuronalen Uptake beitragen. Die Affinität des Transporters zum Liganden änderte sich in beiden Stämmen nicht im Altersverlauf.

Zusammenfassend erfolgte die Reduzierung der nNAT-Aktivität im Altersverlauf im kranken Herzen früher und intensiver als im gesunden Herzen. Weiterhin zeigte sich nur im kranken Herzen eine Verringerung der nNAT-Dichte. Unklar bleibt jedoch, ob es im sehr hohen Alter in gesunden Tieren - zu einem späteren Zeitpunkt als der 52. Lebenswoche - ebenfalls zu einer verminderten nNAT-Dichte kommt und die Abnahme der Transporterdichte in kranken Tieren diesem nur voraus ging. Hinweise für eine im Alter reduzierte Transporterdichte zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am rechten Ventrikel gesunder menschlicher Herzen, bei denen es zu einer altersabhängigen Abnahme der nNAT-Dichte kam (100).

4.4. β -Adrenozeptoren

4.4.1. Kardiale β -Adrenozeptordichte bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter

Die kardiale Reizantwort nach Stimulation der AR durch Agonisten ist bei der hypertensiven Herzkrankheit im Tiermodell und im Menschen vermindert (24,29,53). Grund dafür scheint eine Desensibilisierung und/oder eine Downregulation der β -AR zu sein.

Untersuchungen am chronisch insuffizienten Herzen zeigten, dass ein erhöhter Sympathikonus zur Desensibilisierung der β -AR beiträgt. Bei der Herzinsuffizienz wurde im Menschen eine erhöhte Plasma-Noradrenalin-Konzentration (16,20,41,56,108), ein erhöhter Noradrenalin-Spillover (47) und ein reduzierter kardialer Uptake (7,10,16,123) festgestellt. Dies führt zu einer langfristig erhöhten Konzentration des Noradrenalins im synaptischen Spalt und somit an den β -AR (7,118). Die Folge ist die für die Herzinsuffizienz typische Verringerung der β -AR-Dichte im Herzen. Da Noradrenalin eine höhere Affinität zum β_1 -AR besitzt (94), zeigt sich in den meisten Formen der Herzinsuffizienz primär eine spezifische Downregulation dieses Rezeptors, wohingegen für den β_2 -Subtypen eine Entkopplung von der Signalkaskade typisch ist (13,17,20,41,103).

Nicht vollständig geklärt ist, welche Veränderungen der β -AR bei der essentiellen arteriellen Hypertonie zu einer verminderten Rezeptorantwort führen. Auch bei der Hypertonie sind ein erhöhter Plasma-Noradrenalin-Spiegel (60,61,64,106), ein gesteigerter Spillover (48) und ein reduzierter kardialer Uptake (46,134) bekannt. Die Folge könnte auch hier eine Desensibilisierung und/oder eine Downregulation der β -AR sein. Diese Veränderungen könnten wiederum eine Rolle bei der Progredienz der hypertensiven kompensierten Hypertrophie bis hin zur Herzinsuffizienz spielen (29,41). Es existieren jedoch kaum Daten über Veränderungen kardialer β -AR bei der essentiellen arteriellen Hypertonie im Menschen. Um auf Modifikationen des β -adrenergen Systems im menschlichen Herzen schließen zu können, verwendet man hypertensive Tiermodelle wie den SHR-Stamm. Als Ausdruck einer verminderten Rezeptorantwort zeigt sich hier eine verringerte Reaktion des kardialen β -AR-Systems auf die Stimulation mit Isoprenalin (24,154). Ein Grund hierfür könnte eine Verringerung der β -AR-Dichte in SHR sein, jedoch sind die bisherigen Studien darüber sehr kontrovers. Es wird sowohl von einer verminderten (8,9,28,29,154,167,170), einer unveränderten (6,28,29,82,154,167) als auch einer erhöhten β -AR-Dichte (6,29,154) berichtet. Als Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse bei Studien in SHR kommt neben der Heterogenität innerhalb der Rattenstämme auch die Verwendung unterschiedlicher Methoden und vor allem unterschiedlicher Altersstufen in Betracht (29,89,145,154,167). Tendenziell zeigen die meisten Studien jedoch eine Verringerung der β -AR-Dichte, vor allem durch Reduktion des β_1 -AR-Subtyps (29,132,154,167,170). In der prähypertensiven Phase scheint die β -AR-Dichte unverändert (28,154), was

darauf schließen lässt, dass β -adrenerge Veränderungen nach der Manifestation einer Hypertonie erfolgen (15,19,29).

In der vorliegenden Studie konnten links- sowie rechtsventrikulär in allen Altersstufen keine signifikanten Unterschiede der β -AR-Dichte zwischen den SHR und den WKY-Ratten festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt folgende Schlussfolgerungen zu: Die arterielle Hypertonie, die kompensierte Linksherzhypertrophie sowie die vorzeitig erhöhte Plasma-Noradrenalin-Konzentration und der reduzierte neuronale Uptake in SHR hatten an beiden Ventrikeln keinen Einfluss auf die Dichte der β -AR bis zu einem Alter von 52 Wochen. Im kompensierten Stadium einer Linksherzhypertrophie bleibt hier im Gegensatz zur Herzinsuffizienz die β -AR-Dichte unverändert.

Trotz gleich bleibender β -AR-Dichte kann eine Veränderung der Subtypen-Verteilung zu einer verminderten Ansprechbarkeit der AR führen. Am Herzen vermittelt Noradrenalin seine Wirkung überwiegend über die β_1 -AR (20), so dass deren spezifische Downregulation zu einer Störung der Signalübertragung führt. Ähnlich wie bei den Studien zur β -AR-Dichte lieferten auch Untersuchungen zur Subtyp-Verteilung in SHR unterschiedliche Ergebnisse. Viele Autoren berichten von einer selektiven Reduktion der β_1 -AR (29,132,154,167,170). Andere Autoren fanden eine Downregulation beider Rezeptoren (8) oder ein unverändertes Verhältnis der β_1/β_2 -Subtypen-Verteilung (6).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bis zur 36. Woche in beiden Ventrikeln der prozentuale Anteil vom β_1 -AR-Subtyp an der gesamten β -AR-Dichte in SHR unverändert war. Der Anteil der β_1 -Rezeptoren in den gewonnenen Rohmembranfraktionen entspricht in diesen Altersabschnitten ca. 60 %. Im Alter von 52 Wochen dagegen zeigte sich in SHR eine Reduktion des relativen β_1 -AR-Anteils. Da die Dichte der gesamten β -AR in SHR im Alter von 52 Wochen unverändert war, muss die Reduktion des β_1 -AR-Anteils mit einer Erhöhung der β_2 -AR einhergehen. Mehrere Autoren berichten von einer Reduktion der β_1 -AR-Dichte, welche von einem Anstieg der β_2 -AR maskiert wurde (82,113). Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Die von uns zur Untersuchung gewonnenen kardialen Zellmembranen stammen jedoch neben den Kardiomyozyten auch von Endothelzellen und Fibroblasten. Diese Zelltypen enthalten hauptsächlich β_2 -AR (150). Eine durch die Linksherzhypertrophie induzierte Kollagenisierung und somit erhöhte Fibroblastenzahl (siehe 1.1.) könnte der Grund für eine gesteigerte Anzahl an β_2 -AR im linken Ventrikel sein.

Die Affinität eines Rezeptors zu den Liganden wird charakterisiert durch den K_D -Wert der Sättigungsbindungsstudien. Dieser ist in den meisten Studien an kardialen β -AR in SHR unverändert (6,8,29,154,167,170). Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich zwischen den WKY-Ratten

und SHR in allen Alterstufen keine Unterschiede der K_D -Werte. Die Affinität des β -AR zum Liganden scheint daher bei der kompensierten Herzinsuffizienz unverändert zu sein.

Während des Alterns ist im Menschen (20,34,152,162,164) und im Tiermodell (20,37,91,164,169) nach Stimulation der β -AR eine verminderte Ansprechbarkeit bekannt. Ein Grund für eine Desensibilisierung und/oder Downregulation des β -adrenergen Systems könnte wie beim insuffizienten Herzen der im Alter erhöhte Noradrenalin Spiegel im Blutplasma sein (20,164). Unklar ist auch hier, zu welchen genauen Veränderungen es an den β -AR und bei der Signaltransduktion kommt. White et al. fanden durch Untersuchungen an menschlichen Herzen eine verminderte β -AR-Dichte aufgrund einer Reduktion des β_1 -AR-Subtypen sowie eine verringerte Affinität des β -AR zu Agonisten. Die maximale Stimulation der Adenylat Zykase als Antwort auf die β -AR-Agonisten Isoprenalin und Zinterol war im Alter reduziert. (164). Untersuchungen von Brodde et al. ergaben dagegen eine unveränderte β -AR-Dichte mit einer verringerten Adenylat Zykase-Aktivität im rechten Vorhof von alternden menschlichen Herzen (22).

In Untersuchungen im Tiermodell fanden sich ebenfalls unterschiedliche Aussagen zu den Veränderungen des β -adrenergen Systems im Alter. Die meisten Studien zeigten zwar eine unveränderte β -AR-Dichte (20,37,91; 164), jedoch ergaben dem gegenüber andere Untersuchungen eine Reduzierung der β -AR-Dichte (158,169).

In der vorliegenden Studie wurde während des Alterns der SHR und der WKY-Ratten in beiden Ventrikeln eine Abnahme der β -AR-Dichte festgestellt. Jedoch ließ sich nur an den linken Ventrikeln dieser Rückgang statistisch sichern. Die Abnahme der β -AR-Dichte erfolgte in beiden Stämmen zum selben Zeitpunkt und mit gleicher Intensität. Es fand sich ein sprunghafter Rückgang vor allem nach der 8. Lebenswoche. Ob die Ursache für die Abnahme der β -AR-Dichte der im Alter erhöhte Noradrenalin Spiegel ist, bleibt hier unklar. Zwar erhöhte sich in SHR in diesem Altersabschnitt von 8-12 Wochen die Noradrenalin Konzentration sprunghaft (siehe 4.2.), jedoch trat diese Katecholamineralhöhung in WKY-Ratten erst später, zwischen der 12. und 24. Woche auf, zu einem Zeitpunkt also, in der die β -AR-Dichte sich bereits verringert hatte.

Wie bei der Hypertonie und Hypertrophie wird auch während des Alterns eine Veränderung der Subtypen-Verteilung der β -AR diskutiert. Das alternde Herz zeigt einen erhöhten Anteil von kollagenem Bindegewebe (91,164). Die damit verbundene gesteigerte Anzahl von β_2 -AR könnte wie bei der hypertensiven Herzkrankheit zu einem veränderten β_1/β_2 -Verhältnis mit einer Verminderung des relativen β_1 -Anteils führen. Weiterhin könnte die erhöhte Plasma-Noradrenalin Konzentration im Alter zu einer selektiven Abnahme des β_1 -AR-Subtypen führen (164). In der vorliegenden Studie fand sich jedoch in

normotensiven WKY-Ratten während des Alterns keine Veränderung des β_1/β_2 -AR-Verhältnisses. Es erfolgte demzufolge eine gleichmäßige Downregulation beider Subtypen. Dies korreliert mit Untersuchungen von Xiao et al., die ebenfalls am Rattenherzen die Downregulation beider β -AR-Subtypen im Alter feststellten (169). In hypertensiven SHR zeigte sich dagegen eine Reduktion des relativen β_1 -AR-Anteils im hohen Alter (siehe oben). Unklar bleibt, ob dieser Effekt die alleinige Folge der hypertrophen Herzkrankheit ist oder ob hier auch hier Altersveränderungen im Herzen eine Rolle spielen und die Reduktion des β_1 -AR-Anteils in SHR einer theoretisch vergleichbaren Reduktion in WKY-Ratten zu einem späteren Zeitpunkt als der 52. Lebenswoche vorausgeht. Gegen die Annahme, dass die Veränderung des β_1/β_2 -AR-Verhältnisses in SHR alleine durch die Herzkrankheit getriggert wurde, spricht die Tatsache, dass die Änderung des Verteilungsmusters erst im hohen Alter erfolgte, lange nachdem sich die Hypertrophie und der erhöhte Noradrenalinspiegel manifestierten. Hier scheinen sich also Alters- und Krankheitsfolgen zu überlagern.

In mehreren Studien wird über eine verringerte Affinität der β -AR zu den Agonisten im Alter berichtet (37,91,164). In den vorliegenden Untersuchungen fand sich jedoch in beiden Rattenstämmen keine signifikante Änderung des K_D -Wertes der Sättigungsbindungsstudien im Altersverlauf. Die Affinität des β -AR zum Liganden blieb während des Alterns wie bei der Herzkrankheit unverändert.

4.4.2. Signaltransduktion bei der hypertensiven Herzkrankheit und im Alter

Zusätzlich zu einer Verringerung der gesamten β -AR-Dichte oder einzelner Subtypen können auch Veränderungen an der Signalkaskade zu der verminderten Rezeptorantwort im Alter und bei der Herzkrankheit führen. Hier zeigen die bisherigen Studien unterschiedliche Ergebnisse sowohl im Tiermodell als auch im menschlichen Herzen.

Verschiedene Autoren berichten in SHR von einer gesteigerten, einer unveränderten oder einer verminderten Aktivität der G_{α_s} -Untereinheit (154). Der Gehalt an G_{α_s} -Proteinen scheint sich nicht zu verändern (6,110,154). Unklarheiten gibt es dagegen über einen gleichbleibenden (6,110,154,167) oder einen erhöhten (6,8,9,29,154,167) Gehalt der G_{α_i} -Untereinheit im Herzen der SHR. Die meisten Studien beschreiben in SHR eine verringerte Aktivität der Adenylat Zykklase nach Stimulation durch Katecholamine und Isoprenalin (9,29,112,154).

Im insuffizienten menschlichen Herzen scheint der Gehalt und die Aktivität der G_{α_i} -Untereinheit erhöht zu sein. Die Aktivität der G_{α_s} -Untereinheit bleibt ebenso wie die der Adenylat Zykklase unverändert (20). Am Altersherzen ist die Adenylat Zykklase-Aktivität dagegen reduziert (20,37,91,164). Des Weiteren werden auch Veränderungen an den G_{α_s} - und den G_{α_i} -Untereinheiten während des Alterns diskutiert. Bisher

zeigten sich hier jedoch unterschiedliche Ergebnisse, so dass unklar bleibt, wo bei der Signaltransduktion die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zum kranken Herzen liegen (20,91,164).

5. Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie sowie damit verbundene Herz-Kreislaufkrankungen zählen zu den häufigsten Krankheiten in den Industrienationen. Veränderungen am Herzen, die durch die Hypertonie hervorgerufen werden, treten in ähnlicher Form auch im Alter auf. Dabei kann oft aufgrund von Überschneidungen nicht zwischen der reinen Alterserscheinung und der Krankheit unterschieden werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, Veränderungen des sympathoadrenergen Systems im Altersverlauf im hypertensiven und im normotensiven Herzen zu erfassen. Als hypertensives Tiermodell wurden dazu Ratten vom SHR-Stamm verwendet und diese mit normotensiven WKY-Ratten verglichen.

Bereits in den frühen Lebensjahren kam es in SHR zur Ausprägung einer Hypertonie und einer kompensierten linkskardialen Hypertrophie. Der Noradrenalin Spiegel im Blutplasma war im Alter in beiden Stämmen gleichermaßen erhöht, wobei der Anstieg in SHR zu einem früheren Zeitpunkt erfolgte.

In WKY-Ratten fand sich in beiden Ventrikeln ein Maximum der nNAT-Aktivität in den mittleren Lebensjahren. Im Alter reduzierte sich die nNAT-Aktivität. In SHR zeigte sich im Altersverlauf die Reduktion der nNAT-Aktivität eher als in den normotensiven Kontrolltieren. Im Alter fanden sich keine Unterschiede mehr zwischen beiden Stämmen. Die nNAT-Dichte reduzierte sich nur im Altersverlauf der SHR, jedoch bleibt unklar, ob es im sehr hohen Alter über die 52. Lebenswoche hinaus in normotensiven WKY auch zu einer altersabhängigen Reduktion der Transporterdichte kommt und dies ähnlich wie bei der nNAT-Aktivität in SHR nur vorzeitig erfolgte. Die Affinität des Uptake-Transporters zu [³H]-Nisoxetin blieb im Altersverlauf des hypertensiven und des gesunden Herzens konstant. Zwischen beiden Stämmen zeigten sich keine Unterschiede.

Die Dichte und die Affinität der β -AR veränderten sich in beiden Ventrikeln nicht bei der hypertensiven Herzkrankheit mit kompensierter Hypertrophie. Während des Alterns zeigte sich jedoch eine Hypertonie-unabhängige Abnahme beider β -AR-Subtypen, welche jedoch nur im linken Ventrikel statistisch zu sichern war. Die Affinität der β -AR zum Liganden blieb im Altersverlauf unverändert. Weiterhin fand sich nur am hypertensiven Herzen eine Abnahme des relativen Anteils des β_1 -AR-Subtyps im hohen Alter, wobei sich hier höchstwahrscheinlich Alters- und Hypertrophieeffekte überlagern. Die bei der Herzkrankheit und im Alter verminderte Rezeptorantwort nach deren Stimulation scheint jeweils unterschiedliche Ursachen zu haben. Hier sind weitere Untersuchungen zu Veränderungen in der Signaltransduktions-Kaskade und bei der heterologen und homologen Desensibilisierung erforderlich.

Gemeinsame Veränderungen eines kranken Herzens und eines alten Herzens erfolgen bei dem kranken Herzen eher und zum Teil intensiver. Dies zeigte sich vor allem bei der Noradrenalin-Clearance. Jedoch fanden sich neben diesen gemeinsamen Veränderungen auch Unterschiede, vor allem an den β -AR. Ein altes Herz entspricht demzufolge strukturell und funktionell nicht einem kranken Herzen.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Ahlquist RP: A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153 (1948) 586-600
- 2) Axelrod J: Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. *Pharmacol Rev* 18 1 (1966) 95-113
- 3) Axelrod J: Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. *Science* 173 997 (1971) 598-606
- 4) Axelrod J: Catecholamines and hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl* 3 (1976) 415s-421s
- 5) Bäumer AT: Morphologische Veränderungen des insuffizienten Herzens. In: Böhm M (Hrsg): *Herzinsuffizienz*. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 2000 S. 9-11
- 6) Bazan A, Van de Velde E, de Paepe B, Fraeyman N: Properties of the ventricular adrenergic signal transduction system during ontogeny of spontaneous hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 4 (2000) 653-63
- 7) Beau SL, Saffitz JE: Transmural heterogeneity of norepinephrine uptake in failing human hearts. *J Am Coll Cardiol* 23 3 (1994) 579-85
- 8) Bohm M, Castellano M, Paul M, Erdmann E: Cardiac norepinephrine, beta-adrenoceptors, and Gi alpha-proteins in prehypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 23 6 (1994) 980-7
- 9) Bohm M, Gierschik P, Knorr A, Larisch K, Weismann K, Erdmann E: Role of altered G-protein expression in the regulation of myocardial adenylate cyclase activity and force of contraction in spontaneous hypertensive cardiomyopathy in rats. *J Hypertens* 10 10 (1992) 1115-28
- 10) Bohm M, La Rosee K, Schwinger RH, Erdmann E: Evidence for reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 25 1 (1995) 146-53
- 11) 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) 248-54

- 12) Bristow MR: Mechanisms of development of heart failure in the hypertensive patient. *Cardiology* 92 Suppl 1 (1999) 3-6; discussion 7-9, 20-1
- 13) Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE, Feldman AM: Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* 92 6 (1993) 2737-45
- 14) Brodde OE: Molecular pharmacology of beta-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 Suppl 4 (1986) S16-20
- 15) Brodde OE: [The role of adrenergic alpha- and beta-receptors in the pathogenesis of hypertension and heart disease]. *Internist (Berl)* 29 6 (1988) 397-413
- 16) Brodde OE: Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43 2 (1991) 203-42
- 17) Brodde OE: Beta-adrenergic receptors in failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2 (1996) 35-40
- 18) Brodde OE, Konschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski HR: Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 101 2 (1998) 471-8
- 19) Brodde OE, Michel MC: [Essential hypertension: also a disease of the adrenoreceptors?]. *Dtsch Med Wochenschr* 115 12 (1990) 473-5
- 20) Brodde OE, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51 4 (1999) 651-90
- 21) Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR: Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30 4 (1995) 570-84

- 22) Brodde OE, Zerkowski HR, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schafer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, Oelert H: Age-dependent changes in the beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 1 (1995) 20-6
- 23) Buchborn E: Gesundheit, Krankheit, Alter, Tod. In: Hierholzer K, Schmidt RF (Hrsg): *Pathophysiologie des Menschen*. VCH, Weinheim, Basel, Cambridge (usw.), 1991 S. 1.1-1.11
- 24) Bucher B, Heitz C, Stoclet JC: Age-related changes of in vivo beta-adrenergic responsiveness in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 102 1 (1984) 31-7
- 25) Cabassi A, Vinci S, Quartieri F, Moschini L, Borghetti A: Norepinephrine reuptake is impaired in skeletal muscle of hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 37 2 Part 2 (2001) 698-702
- 26) Carretero OA, Oparil S: Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101 3 (2000) 329-35
- 27) Cassis LA, Stitzel RE, Head RJ: Hypernoradrenergic innervation of the caudal artery of the spontaneously hypertensive rat: an influence upon neuroeffector mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 234 3 (1985) 792-803
- 28) Castellano M, Beschi M, Rizzoni D, Paul M, Bohm M, Mantero G, Bettoni G, Porteri E, Albertini A, Agabiti-Rosei E: Gene expression of cardiac beta 1-adrenergic receptors during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 11 8 (1993) 787-91
- 29) Castellano M, Bohm M: The cardiac beta-adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension* 29 3 (1997) 715-22
- 30) Cheitlin MD, Zipes DP: Cardiovascular Disease in the Elderly. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P (Eds): *Heart Disease - A Textbook Of Cardiovascular Medicine*. 6th Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York (usw.), 2002 S. 2019-2037
- 31) Cheng Y, Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22 23 (1973) 3099-108

- 32) Covell JW: Neurohumoral control of the circulation. In: West JB (Ed): *Physiological Basis of Medical Practice*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991 S. 276
- 33) Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390 6655 (1997) 88-91
- 34) Davies CH, Ferrara N, Harding SE: Beta-adrenoceptor function changes with age of subject in myocytes from non-failing human ventricle. *Cardiovasc Res* 31 1 (1996) 152-6
- 35) Deutsche-Hochdruckliga: Prävention, Erkennung, Diagnostik und Therapie der arteriellen Hypertonie. In: Medizinische-Medien-Informations-GmbH (Hrsg): *Handbuch Leitlinien*. Medi Media, Neu-Isenburg, 2003 S. 215 - 298
- 36) Distler A, Philipp T: Blutdruck und Blutdruckregulation. In: Hierholzer K, Schmidt RF (Hrsg): *Pathophysiologie des Menschen*. VCH, Weinheim, Basel, Cambridge (usw.), 1991 S. 17.2-17.11
- 37) Docherty JR: Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol Rev* 42 2 (1990) 103-25
- 38) Dong E, Yatani A, Mohan A, Liang CS: Myocardial beta-adrenoceptor down-regulation by norepinephrine is linked to reduced norepinephrine uptake activity. *Eur J Pharmacol* 384 1 (1999) 17-24
- 39) Donohue SJ, Stitzel RE, Head RJ: Time course of changes in the norepinephrine content of tissues from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *J Pharmacol Exp Ther* 245 1 (1988) 24-31
- 40) Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC: CGP 20712 A: a useful tool for quantitating beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 130 1-2 (1986) 137-9
- 41) Dzimir N: Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev* 51 3 (1999) 465-501

- 42) Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD: Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* 93 9 (1996) 1667-76
- 43) Eisenhofer G, Goldstein DS, Ropchak TG, Nguyen HQ, Keiser HR, Kopin IJ: Source and physiological significance of plasma 3,4-dihydroxyphenylglycol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. *J Auton Nerv Syst* 24 1-2 (1988) 1-14
- 44) Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD: Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245 4922 (1989) 1118-21
- 45) Engel G, Hoyer D, Berthold R, Wagner H: (+/-)[125Iodo] cyanopindolol, a new ligand for beta-adrenoceptors: identification and quantitation of subclasses of beta-adrenoceptors in guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317 4 (1981) 277-85
- 46) Esler M, Jackman G, Bobik A, Leonard P, Kelleher D, Skews H, Jennings G, Korner P: Norepinephrine kinetics in essential hypertension. Defective neuronal uptake of norepinephrine in some patients. *Hypertension* 3 2 (1981) 149-56
- 47) Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D, Jennings G: Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol* 80 11A (1997) 7L-14L
- 48) Esler M, Lambert G, Jennings G: Regional norepinephrine turnover in human hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 11 Suppl 1 (1989) 75-89
- 49) Esler M, Skews H, Leonard P, Jackman G, Bobik A, Korner P: Age-dependence of noradrenaline kinetics in normal subjects. *Clin Sci (Lond)* 60 2 (1981) 217-9
- 50) Esler MD, Thompson JM, Kaye DM, Turner AG, Jennings GL, Cox HS, Lambert GW, Seals DR: Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors. *Circulation* 91 2 (1995) 351-8

- 51) Esler MD, Turner AG, Kaye DM, Thompson JM, Kingwell BA, Morris M, Lambert GW, Jennings GL, Cox HS, Seals DR: Aging effects on human sympathetic neuronal function. *Am J Physiol* 268 1 Pt 2 (1995) R278-85
- 52) Featherstone JA, Veith RC, Flatness D, Murburg MM, Villacres EC, Halter JB: Age and alpha-2 adrenergic regulation of plasma norepinephrine kinetics in humans. *J Gerontol* 42 3 (1987) 271-6
- 53) Feldman RD: Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension--physiological and molecular correlates. *Can J Physiol Pharmacol* 65 8 (1987) 1666-72
- 54) Folkow B: Sympathetic nervous control of blood pressure. Role in primary hypertension. *Am J Hypertens* 2 3 Pt 2 (1989) 103S-111S
- 55) Folkow B: Autonomic Nervous System in Hypertension. In: Swales JD (Ed): *Textbook of Hypertension*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (usw.), 1994 S. 427-438
- 56) Francis GS, Cohn JN: The autonomic nervous system in congestive heart failure. *Annu Rev Med* 37 (1986) 235-47
- 57) Frohlich ED: State of the Art lecture. Risk mechanisms in hypertensive heart disease. *Hypertension* 34 4 Pt 2 (1999) 782-9
- 58) Frohlich ED, Tarazi RC: Is arterial pressure the sole factor responsible for hypertensive cardiac hypertrophy? *Am J Cardiol* 44 5 (1979) 959-63
- 59) Furchgott RF: The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E (Eds): *Catecholamines. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Vol. 33 Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1972 S. 283-335
- 60) Goldstein DS: Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension* 5 1 (1983) 86-99

- 61) Goldstein DS, Horwitz D, Keiser HR, Polinsky RJ, Kopin IJ: Plasma l-[3H]norepinephrine, d-[14C]norepinephrine, and d,l-[3H]isoproterenol kinetics in essential hypertension. *J Clin Invest* 72 5 (1983) 1748-58
- 62) Goldstein DS, Lake CR, Chernow B, Ziegler MG, Coleman MD, Taylor AA, Mitchell JR, Kopin IJ, Keiser HR: Age-dependence of hypertensive-normotensive differences in plasma norepinephrine. *Hypertension* 5 1 (1983) 100-4
- 63) Goldstein DS, McCarty R, Polinsky RJ, Kopin IJ: Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension* 5 4 (1983) 552-9
- 64) Grassi G: Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens* 16 12 Pt 2 (1998) 1979-87
- 65) Gray SD: Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate* 45 1 (1984) 25-32
- 66) Greminger P, Vetter W, Siegenthaler W: Blutdruck. In: Siegenthaler W (Hrsg): *Klinische Pathophysiologie*. 8. Aufl. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 2001 S. 651-667
- 67) Harrap SB: Hypertension: genes versus environment. *Lancet* 344 8916 (1994) 169-71
- 68) Harten HU, Nägerl H, Schulte HD: *Statistik für Mediziner*. VCH Weinheim, 1993,
- 69) Head RJ: Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels* 26 1 (1989) 1-20
- 70) Hellige G, Gonska BD, Bretschneider HJ, Kreuzer H: Herz. In: Hierholzer K, Schmidt RF (Hrsg): *Pathophysiologie des Menschen*. VCH, Weinheim, Basel, Cambridge (usw.), 1991 S. 16.1-16.29
- 71) Henrich WL, Levi M: Ontogeny of renal renin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am J Physiol* 260 4 Pt 2 (1991) F530-5

- 72) Heyden S, Schneider KA: Obesity and hypertension: epidemiological aspects of the relationship. *J Hum Hypertens* 4 4 (1990) 431-5
- 73) Himura Y, Felten SY, Kashiki M, Lewandowski TJ, Delehanty JM, Liang CS: Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation* 88 3 (1993) 1299-309
- 74) Hoeldtke RD, Cilmi KM, Reichard GA, Jr., Boden G, Owen OE: Assessment of norepinephrine secretion and production. *J Lab Clin Med* 101 5 (1983) 772-82
- 75) Hoffman BB, Taylor P: Neurotransmission: The Autonomic and Somatic Motor Nervous System. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman LS, Gilman AG (Eds): *Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics*, 10th Edition. Mc Graw-Hill, New York, Chicago, San Francisco (usw.), 2001 S. 115-153
- 76) Hoffmann U, Bollinger A: Periphere Zirkulation. In: Siegenthaler W (Hrsg): *Klinische Pathophysiologie*. 8. Aufl. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 2001 S. 687-722
- 77) Howe PR, Provis JC, West MJ, Chalmers JP: Changes in cardiac norepinephrine in spontaneously hypertensive and stroke-prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1 1 (1979) 115-22
- 78) Iaccarino G, Koch WJ: Therapeutic potential of G-protein coupled receptor kinases in the heart. *Expert Opin Investig Drugs* 8 5 (1999) 545-54
- 79) Iversen LL: Uptake processes for biogenic amines. In: Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH (Eds): *Handbook of Psychopharmacology*. Vol. 3 Plenum Press, New York, 1975 S. 381-442
- 80) Jänig W: Vegetatives Nervensystem. In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg): *Physiologie des Menschen*. 26. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1995 S. 340-369
- 81) Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Jr., Murphy WR, Hockel GM: Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 38 6 Suppl 2 (1976) 21-9

- 82) K-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J: Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 30 2 Pt 1 (1997) 278-87
- 83) Kannel WB, Sorlie P: Left ventricular hypertrophy in hypertension: Prognostic and pathogenetic implications (The Framingham Study). In: Strauer BE (Ed): *The heart in hypertension*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1981 S. 223-242
- 84) Kaplan NM: Systemic Hypertension: Mechanisms and Diagnosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P (Eds): *Heart Disease - A Textbook Of Cardiovascular Medicine*. 6th Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York (usw.), 2002 S. S.941-971
- 85) Karlson P, Doenecke D, Koolmann J: *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Aufl., G.-Thieme, Stuttgart, New York, 1994, S. 60-67
- 86) Keeton TK, Biediger AM: The measurement of norepinephrine clearance and spillover rate into plasma in conscious spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338 4 (1988) 350-60
- 87) Kopin IJ: Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. In: Blaschko H, Muscholl E (Eds): *Catecholamines. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Vol. 33 Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1972 S. 270-282
- 88) Kreutz R, Paul M, Ganten D: Hypertonie. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg): *Die Innere Medizin*. 10. Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 2000 S. 377-399
- 89) Kurtz TW, Montano M, Chan L, Kabra P: Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13 2 (1989) 188-92
- 90) Lais LT, Rios LL, Boutelle S, DiBona GF, Brody MJ: Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 14 5 (1977) 277-84

- 91) Lakatta EG: Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev* 73 2 (1993) 413-67
- 92) Lakatta EG: Heart aging: a fly in the ointment? *Circ Res* 88 10 (2001) 984-6
- 93) Laks MM, Morady F: Norepinephrine--the myocardial hypertrophy hormone? *Am Heart J* 91 5 (1976) 674-5
- 94) Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG, Jr.: Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214 88 (1967) 597-8
- 95) Langer SZ, Lehmann J: Presynaptic receptors on catecholamine neurons. In: Trendelenberg U, Weiner N (Eds): *Handbook of Experimental Pharmacology Vol 90/I: Catecholamines*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1988 S. 419-507
- 96) Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, Coughlin M: Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 69 3 (1991) 714-21
- 97) Leineweber K, Buscher R, Bruck H, Brodde OE: Beta-adrenoceptor polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369 1 (2004) 1-22
- 98) Leineweber K, Klapproth S, Beilfuss A, Silber RE, Heusch G, Philipp T, Brodde OE: Unchanged G-protein-coupled receptor kinase activity in the aging human heart. *J Am Coll Cardiol* 42 8 (2003) 1487-92
- 99) Leineweber K, Seyfarth T, Brodde OE: Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake₁) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. *Br J Pharmacol* 131 7 (2000) 1438-44
- 100) Leineweber K, Wangemann T, Giessler C, Bruck H, Dhein S, Kostelka M, Mohr FW, Silber RE, Brodde OE: Age-dependent changes of cardiac neuronal noradrenaline reuptake transporter (uptake₁) in the human heart. *J Am Coll Cardiol* 40 8 (2002) 1459

- 101) Levick JR: Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems. Johann Ambrosius Barth, Heidelberg, Leipzig, 1998, S.361-373
- 102) Liang CS, Fan TH, Sullebarger JT, Sakamoto S: Decreased adrenergic neuronal uptake activity in experimental right heart failure. A chamber-specific contributor to beta-adrenoceptor downregulation. *J Clin Invest* 84 4 (1989) 1267-75
- 103) Liggett SB: Beta-adrenergic receptors in the failing heart: the good, the bad, and the unknown. *J Clin Invest* 107 8 (2001) 947-8
- 104) Lohse MJ: Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179 2 (1993) 171-88
- 105) Lu D, Yu K, Paddy MR, Rowland NE, Raizada MK: Regulation of norepinephrine transport system by angiotensin II in neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rat brains. *Endocrinology* 137 2 (1996) 763-72
- 106) Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G: Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension* 34 4 Pt 2 (1999) 724-8
- 107) Marker JC, Cryer PE, Clutter WE: Simplified measurement of norepinephrine kinetics: application to studies of aging and exercise training. *Am J Physiol* 267 3 Pt 1 (1994) E380-7
- 108) Meredith IT, Eisenhofer G, Lambert GW, Dewar EM, Jennings GL, Esler MD: Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* 88 1 (1993) 136-45
- 109) Micalizzi ER, Pals DT: Evaluation of plasma norepinephrine as an index of sympathetic neuron function in the conscious, unrestrained rat. *Life Sci* 24 22 (1979) 2071-6
- 110) Michel MC, Brodde OE, Insel PA: Are cardiac G-proteins altered in rat models of hypertension? *J Hypertens* 11 4 (1993) 355-63

- 111) Michel MC, Jager S, Casto R, Rettig R, Graf C, Printz M, Insel PA, Philipp T, Brodde OE: On the role of renal alpha-adrenergic receptors in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 19 4 (1992) 365-70
- 112) Michel MC, Kanczik R, Khamssi M, Knorr A, Siegl H, Beckeringh JJ, Brodde OE: Alpha and beta-adrenoceptors in hypertension. I. Cardiac and renal alpha 1-, beta 1-, and beta 2-adrenoceptors in rat models of acquired hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 3 (1989) 421-31
- 113) Michel MC, Wang XL, Schlicker E, Gothert M, Beckeringh JJ, Brodde OE: Increased beta 2-adrenoreceptor density in heart, kidney and lung of spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 7 1 (1987) 41-51
- 114) Misu Y, Kuwahara M, Kubo T: Some relevance of presynaptic beta-adrenoceptors to development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 287 2 (1987) 299-308
- 115) Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J: Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33 3 (2001) 561-73
- 116) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001, S. 324-329
- 117) Nagaoka A, Lovenberg W: Plasma norepinephrine and dopamine-beta-hydroxylase in genetic hypertensive rats. *Life Sci* 19 1 (1976) 29-34
- 118) Nozawa T, Igawa A, Yoshida N, Maeda M, Inoue M, Yamamura Y, Asanoi H, Inoue H: Dual-tracer assessment of coupling between cardiac sympathetic neuronal function and downregulation of beta-receptors during development of hypertensive heart failure of rats. *Circulation* 97 23 (1998) 2359-67
- 119) Okamoto K, Aoki K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27 (1963) 282-93

- 120) Okamoto K, Nosaka S, Yamori Y, Matsumoto M: Participation of neural factor in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Jpn Heart J* 8 2 (1967) 168-80
- 121) Okamoto K, Yamori Y, Ooshima A, Park C, Haebara H, Matsumoto M: Establishment of the inbred strain of the spontaneously hypertensive rat and genetic factors involved in hypertension. In: Okamoto K (Ed): Spontaneous hypertension, its pathogenesis and complications. Igaku Shoin, Tokyo, 1972 S. 1-8
- 122) Patel KP, Kline RL, Mercer PF: Noradrenergic mechanisms in the brain and peripheral organs of normotensive and spontaneously hypertensive rats at various ages. *Hypertension* 3 6 (1981) 682-90
- 123) Petch MC, Nayler WG: Concentration of catecholamines in human cardiac muscle. *Br Heart J* 41 3 (1979) 340-4
- 124) Pfeifer MA, Weinberg CR, Cook D, Best JD, Reenan A, Halter JB: Differential changes of autonomic nervous system function with age in man. *Am J Med* 75 2 (1983) 249-58
- 125) Philipp T: Arterielle Hypertonie. In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M (Hrsg): *Thiemes Innere Medizin*. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 1999 S. 1445 -1455
- 126) Picotti GB, Carruba MO, Ravazzani C, Bondiolotti GP, Da Prada M: Plasma catecholamine concentrations in normotensive rats of different strains and in spontaneously hypertensive rats under basal conditions and during cold exposure. *Life Sci* 31 19 (1982) 2137-43
- 127) Pierpont GL, Francis GS, DeMaster EG, Olivari MT, Ring WS, Goldenberg IF, Reynolds S, Cohn JN: Heterogeneous myocardial catecholamine concentrations in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 60 4 (1987) 316-21
- 128) Poehlman ET, Gardner AW, Goran MI, Arciero PJ, Toth MJ, Ades PA, Calles-Escandon J: Sympathetic nervous system activity, body fatness, and body fat distribution in younger and older males. *J Appl Physiol* 78 3 (1995) 802-6

- 129) Rapacciuolo A, Esposito G, Caron K, Mao L, Thomas SA, Rockman HA: Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 38 3 (2001) 876-82
- 130) Rettig R, Stauss H, Folberth C, Ganten D, Waldherr B, Unger T: Hypertension transmitted by kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 257 2 Pt 2 (1989) F197-203
- 131) Rho JH, Alexander N: Altered in vitro uptake of norepinephrine by cardiovascular tissues of young spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 33 23 (1984) 3906-9
- 132) Robberecht P, Winand J, Chatelain P, Poloczek P, Camus JC, De Neef P, Christophe J: Comparison of beta-adrenergic receptors and the adenylate cyclase system with muscarinic receptors and guanylate cyclase activities in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 30 4 (1981) 385-7
- 133) Roizen MF, Weise V, Grobecker H, Kopin IJ: Plasma catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase activity in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 17 2 (1975) 283-8
- 134) Rumantir MS, Kaye DM, Jennings GL, Vaz M, Hastings JA, Esler MD: Phenotypic evidence of faulty neuronal norepinephrine reuptake in essential hypertension. *Hypertension* 36 5 (2000) 824-9
- 135) Rutishauser W, Hess O: Herz und Koronarkreislauf. In: Siegenthaler W (Hrsg): *Klinische Pathophysiologie*. 8. Aufl. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 2001 S. 591-649
- 136) Saiz J, Bellido C, Aguilar R, Sanchez A: Age-related changes of norepinephrine content in kidneys of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Pharmacology* 37 6 (1988) 365-9
- 137) Salt PJ, Iversen LL: Catecholamine uptake sites in the rat heart after 6-hydroxydopamine treatment and in a genetically hypertensive strain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 279 4 (1973) 381-6
- 138) Sanchez A, Vidal MJ, Martinez-Sierra R, Saiz J: Ontogeny of renal alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 237 3 (1986) 972-9

- 139) Schafers RF, Poller U, Ponicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC, Brodde OE: Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenaline released by infused tyramine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355 2 (1997) 239-49
- 140) Scholze J: Hypertonie kompakt. Blackwell-Wiss., Berlin, Wien, Boston (usw.), 2002, S.1-5
- 141) Seals DR, Esler MD: Human ageing and the sympathoadrenal system. *J Physiol* 528 Pt 3 (2000) 407-17
- 142) Shah SD, Tse TF, Clutter WE, Cryer PE: The human sympathochromaffin system. *Am J Physiol* 247 3 Pt 1 (1984) E380-4
- 143) Shearman LP, Meyer JS: Norepinephrine transporters in rat placenta labeled with [3H]nisoxetine. *J Pharmacol Exp Ther* 284 2 (1998) 736-43
- 144) Sinz V, Witzleb E: Blutdruckregulationsstörungen. In: Zwiener U (Hrsg): *Allgemeine und klinische Pathophysiologie Teil 1*. G.-Fischer, Jena, Stuttgart, 1993 S. 409-427
- 145) St-Lezin EM, Pravenec M, Kurtz TW: New genetic models for hypertension research. *Trends Cardiovasc Med* 3 (1993) 119-123
- 146) Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, Marmot M: INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension* 14 5 (1989) 570-7
- 147) Starke K: Presynaptic alpha-autoreceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107 (1987) 73-146
- 148) Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2005 S. 115-145

- 149) Starke K: Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl. Spektrum Akademischer Verl., München, Jena, 2005 S. 173-211
- 150) Steinberg SF: The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 85 11 (1999) 1101-11
- 151) Stimpel M: Arterielle Hypertonie - Differentialdiagnose und -therapie. Steinkopff, Darmstadt, 2001, S. 82-99
- 152) Stratton JR, Cerqueira MD, Schwartz RS, Levy WC, Veith RC, Kahn SE, Abrass IB: Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. *Circulation* 86 2 (1992) 504-12
- 153) Swynghedauw B, Baillard C: Biology of hypertensive cardiopathy. *Curr Opin Cardiol* 15 4 (2000) 247-53
- 154) Takata Y, Kato H: Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life Sci* 58 2 (1996) 91-106
- 155) Thomas Jr. JX, Gerdisch MW: Topical Organization of the Cardiac Sympathetic Nervous System. In: Heusch G, Ross Jr. J (Eds): *Adrenergic Mechanisms in Myocardial Ischemia*. Steinkopff, Darmstadt, Springer, New York, 1991 S. 3-8
- 156) Trendelenburg U: The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In: Trendelenburg U, Weiner N (Eds): *Handbook of Experimental Pharmacology Vol 90/I: Catecholamines*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1988 S. 279-319
- 157) Tsunoda M, Takezawa K, Santa T, Ina Y, Nagashima K, Ohmori K, Kobayashi S, Imai K: New approach for measurement of sympathetic nervous abnormality in conscious, spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 83 1 (2000) 39-45
- 158) Tumer N, Houck WT, Roberts J: Upregulation of adrenergic beta receptor subtypes in the senescent rat heart. *Mech Ageing Dev* 49 3 (1989) 235-43

- 159) Urbaszek W, Seipel L: Die Adaptations- und Kompensationsphänomene des gesunden und geschädigten Myokards. In: Zwiener U (Hrsg): Allgemeine und klinische Pathophysiologie Teil 1. G.-Fischer, Jena, Stuttgart, 1993 S. 315-338
- 160) Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM: beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 106 5 (2000) 697-703
- 161) Veith RC, Featherstone JA, Linares OA, Halter JB: Age differences in plasma norepinephrine kinetics in humans. *J Gerontol* 41 3 (1986) 319-24
- 162) Vestal RE, Wood AJ, Shand DG: Reduced beta-adrenoceptor sensitivity in the elderly. *Clin Pharmacol Ther* 26 2 (1979) 181-6
- 163) Vetter W, Bachmann LM: Nebennierenmark. In: Siegenthaler W (Hrsg): *Klinische Pathophysiologie*. 8. Aufl. G.-Thieme, Stuttgart, New York, 2001 S. 345-350
- 164) White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, Port JD, Anderson F, Campbell D, Feldman AM, et al.: Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation* 90 3 (1994) 1225-38
- 165) WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee: 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 17 2 (1999) 151-83
- 166) Winkler H, Fischer-Colbrie F, Weber A: Molecular organization of vesicles storing transmitter: chromaffin vesicles as a model. In: Stjärne L, Hedqvist P, Lagercrantz H, Wennmalm A (Eds): *Chemical Neurotransmission - 75 Years*. Academic Press, London, 1981 S. 57-68
- 167) Witte K, Parsa-Parsi R, Vobig M, Lemmer B: Mechanisms of the circadian regulation of beta-adrenoceptor density and adenylyl cyclase activity in cardiac tissue from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 27 5 (1995) 1195-202

- 168) Xiao RP, Ji X, Lakatta EG: Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47 2 (1995) 322-9
- 169) Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ: Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* 101 6 (1998) 1273-82
- 170) Yamada S, Ishima T, Tomita T, Hayashi M, Okada T, Hayashi E: Alterations in cardiac alpha and beta adrenoceptors during the development of spontaneous hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 228 2 (1984) 454-60
- 171) Yamori Y: Physiopathology of various strains of spontaneously hypertensive rats. In: Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M (Eds): *Hypertension: physiopathology and treatment*. 2. Edit. McGraw-Hill, Montreal, 1983 S. 191-203
- 172) Yamori Y, Swales JD: The Spontaneously Hypertensive Rat. In: Swales JD (Ed): *Textbook of Hypertension*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (usw.), 1994 S. 447-455
- 173) Ziegler MG, Lake CR, Kopin IJ: Plasma noradrenaline increases with age. *Nature* 261 5558 (1976) 333-5

7. Anlagen

Tab.1:

Mittelwerte \pm SEM des systolischen Blutdruckes (mmHg)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	134,9 \pm 5,4	(5)	127,7 \pm 5,1	(4)	n.s.
08	152,4 \pm 7,1	(11)	133,3 \pm 3,7	(14)	p<0,05
12	194,5 \pm 3,5	(11)	130,6 \pm 3,3	(6)	p<0,001
24	203,3 \pm 1,9	(11)	128,1 \pm 3,7	(14)	p<0,001
36	192,7 \pm 2,7	(6)	133,3 \pm 3,1	(15)	p<0,001
52	203,5 \pm 7,2	(10)	132,2 \pm 2,9	(14)	p<0,001

Tab. 2:

Mittelwerte \pm SEM der Körpergewichte (g)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	76,6 \pm 3,9	(11)	80,5 \pm 6,2	(8)	n.s.
08	215,6 \pm 7,5	(8)	229,9 \pm 6,8	(8)	n.s.
12	291,5 \pm 5,0	(13)	304,1 \pm 6,2	(7)	n.s.
24	363,0 \pm 6,8	(6)	369,8 \pm 9,5	(8)	n.s.
36	377,1 \pm 4,0	(10)	388,1 \pm 8,8	(8)	n.s.
52	389,2 \pm 5,3	(9)	380,2 \pm 11,8	(9)	n.s.

Tab. 3:

Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum Körpergewicht (g)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	2,95 \pm 0,05	(12)	3,07 \pm 0,20	(8)	n.s.
08	2,42 \pm 0,09	(8)	2,19 \pm 0,08	(8)	n.s.
12	2,44 \pm 0,05	(10)	2,16 \pm 0,03	(7)	p<0,001
24	2,48 \pm 0,04	(5)	2,09 \pm 0,04	(8)	p<0,001
36	2,59 \pm 0,05	(10)	1,94 \pm 0,05	(8)	p<0,001
52	2,72 \pm 0,05	(10)	2,01 \pm 0,07	(9)	p<0,001

Tab. 4:

Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum gesamten Herzgewicht (mg)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	0,656 \pm 0,01	(12)	0,668 \pm 0,01	(8)	n.s.
08	0,710 \pm 0,01	(8)	0,658 \pm 0,02	(8)	p<0,05
12	0,745 \pm 0,01	(11)	0,704 \pm 0,01	(8)	p<0,01
24	0,760 \pm 0,01	(6)	0,722 \pm 0,01	(7)	p<0,01
36	0,768 \pm 0,01	(10)	0,713 \pm 0,02	(8)	p<0,05
52	0,742 \pm 0,02	(17)	0,688 \pm 0,02	(8)	p<0,05

Tab. 5:

Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses des linken Ventrikelgewichtes (mg) zum rechten Ventrikelgewicht (mg)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	2,94 \pm 0,07	(12)	2,87 \pm 0,16	(8)	n.s.
08	3,58 \pm 0,12	(8)	3,04 \pm 0,13	(8)	p<0,05
12	4,04 \pm 0,21	(17)	3,50 \pm 0,11	(15)	p<0,01
24	4,56 \pm 0,14	(10)	3,90 \pm 0,12	(10)	p<0,01
36	5,04 \pm 0,23	(10)	3,84 \pm 0,17	(7)	p<0,05
52	4,63 \pm 0,17	(10)	3,31 \pm 0,33	(8)	p<0,05

Tab.6:

Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an Noradrenalin-Transportern im rechten Ventrikel (fmol)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	730,53 \pm 221,83	(3)	871,50 \pm 413,28	(3)	n.s.
08	396,80 \pm 108,37	(3)	632,25 \pm 209,60	(4)	n.s.
12	705,13 \pm 134,47	(4)	610,26 \pm 245,62	(3)	n.s.
24	655,51 \pm 224,68	(3)	273,77 \pm 112,11	(3)	n.s.
36	409,83 \pm 137,17	(3)	771,53 \pm 418,40	(3)	n.s.
52	888,67 \pm 449,71	(4)	456,40 \pm 187,08	(3)	n.s.

Tab.7:

Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an Noradrenalin-Transportern im linken Ventrikel (fmol)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	714,46 \pm 436,38	(3)	582,30 \pm 192,39	(3)	n.s.
08	631,10 \pm 299,69	(3)	685,00 \pm 137,13	(4)	n.s.
12	817,18 \pm 185,96	(4)	497,07 \pm 193,11	(3)	n.s.
24	950,17 \pm 345,16	(3)	561,70 \pm 77,48	(3)	n.s.
36	965,87 \pm 159,95	(3)	731,93 \pm 331,79	(3)	n.s.
52	492,50 \pm 154,20	(4)	517,03 \pm 183,43	(3)	n.s.

Tab. 8:

Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an β -AR im rechten Ventrikel (pmol)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	27,41 \pm 3,80	(4)	18,17 \pm 3,78	(3)	n.s.
08	34,68 \pm 4,55	(5)	23,20 \pm 3,44	(4)	n.s.
12	38,16 \pm 4,27	(4)	26,46 \pm 6,55	(3)	n.s.
24	24,25 \pm 5,17	(3)	31,17 \pm 8,81	(3)	n.s.
36	39,99 \pm 7,97	(3)	32,84 \pm 6,28	(4)	n.s.
52	27,72 \pm 7,08	(4)	18,71 \pm 0,53	(3)	n.s.

Tab. 9:

Mittelwerte \pm SEM der K_D -Werte der Radioligand-Bindungsstudie an β -AR im linken Ventrikel (pmol)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	29,24 \pm 4,56	(4)	18,96 \pm 1,35	(3)	n.s.
08	26,13 \pm 4,39	(5)	26,08 \pm 4,59	(4)	n.s.
12	27,01 \pm 4,55	(4)	23,92 \pm 5,05	(3)	n.s.
24	25,53 \pm 6,04	(3)	28,43 \pm 5,47	(3)	n.s.
36	33,51 \pm 13,09	(3)	15,00 \pm 3,06	(4)	n.s.
52	27,27 \pm 4,20	(4)	14,76 \pm 1,96	(3)	n.s.

Tab. 10:Mittelwerte \pm SEM des Anteils der β_1 -AR an der gesamten β -AR-Anzahl im rechten Ventrikel (%)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	61,48 \pm 2,60	(5)	60,80 \pm 2,56	(4)	n.s.
08	52,02 \pm 5,71	(4)	61,45 \pm 4,42	(3)	n.s.
12	58,10 \pm 3,09	(3)	60,36 \pm 1,48	(3)	n.s.
24	53,79 \pm 5,88	(6)	60,77 \pm 2,00	(4)	n.s.
36	58,07 \pm 4,12	(4)	62,57 \pm 2,29	(4)	n.s.
52	50,06 \pm 2,61	(6)	64,98 \pm 1,07	(3)	p<0,01

Tab. 11:Mittelwerte \pm SEM des Anteils der β_1 -AR an der gesamten β -AR-Anzahl im linken Ventrikel (%)

Alter	SHR	(n)	WKY	(n)	Statist. Signifikanz
04	58,74 \pm 1,78	(5)	61,27 \pm 0,68	(4)	n.s.
08	51,44 \pm 5,58	(4)	62,46 \pm 1,78	(3)	n.s.
12	60,92 \pm 1,76	(3)	59,35 \pm 7,02	(3)	n.s.
24	54,54 \pm 7,50	(6)	58,82 \pm 2,32	(4)	n.s.
36	57,07 \pm 4,85	(4)	64,40 \pm 2,50	(4)	n.s.
52	36,91 \pm 5,08	(6)	63,71 \pm 2,60	(3)	p<0,01

8. Thesen

1. Es gibt Gemeinsamkeiten bei strukturellen und funktionellen Veränderungen im kranken und im alten Herzen.
2. Im Alter, bei der arteriellen Hypertonie und bei der Herzinsuffizienz sind ein erhöhter Sympathikustonus, eine verringerte kardiale Noradrenalin-Clearance und eine erhöhte Plasma-Noradrenalin-Konzentration an den Veränderungen des myokardialen, sympatoadrenergen Systems beteiligt.
3. Im Alter und am kranken Herzen ist die Ansprechbarkeit des kardialen β -adrenergen Systems auf Grund von Desensibilisierung und/oder Downregulation vermindert.
4. Veränderungen am alternden Herzen treten am hypertensiven Herzen zum Teil eher und intensiver auf. Dies wurde vor allem bei der Noradrenalin-Clearance sichtbar.
5. Andere Altersveränderungen zeigten sich unabhängig von einer hypertensiven Herzkrankheit und umgekehrt. Dies betrifft unter anderem die Downregulation der β -AR.
6. Es gibt neben den Gemeinsamkeiten Unterschiede zwischen einem alternden und einem kranken Herzen. Ein altes Herz entspricht nicht einem kranken Herzen.

Lebenslauf

Name: Dreßler, Stefan
Geburtsdatum: 30. Dezember 1977
Geburtsort: Halle-Saale
Status: ledig

Schulische Ausbildung und Studium

1984-1991 Grundschole bzw. Oberschole, Krumpa
1991-1996 Georg-Cantor-Gymnasium mit naturwissenschaftlich -
technischer Richtung, Halle-Saale
21.06.1996 Abitur in Halle-Saale
1996-1997 Zivildienst in der „Sozialstation des DRK“,
Braunsbedra
1997-2004 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
04.05.2004 Abschluss des Medizinstudiums mit dem Dritten
Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ausbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin

07/2004 – 04/2005 AIP/Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-,
Visceral- und Unfallchirurgie des Martha-Maria-
Stadtkrankenhauses Halle Dörlau
05/2005 – 11/2006 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin I und II
des Martha-Maria-Stadtkrankenhauses Halle Dörlau

12/2006 – 05/2007

Assistenzarzt in der Klinik für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin im Klinikum Mansfelder Land,
Eisleben

06/2007-08/2007

Hospitation in Allgemeinmedizinischer Praxis, Frau
Dr. med Wasner, Krumpa

09/2007-03/2008

Assistenzarzt in Orthopädischer Praxis, Frau Dr. med
Reitmann, Leipzig

ab 04/2008

Assistenzarzt in Universitätsklinik und Poliklinik für
Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik,
Halle-Saale

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe sowie ohne Benutzung anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Übernommene Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben hatte.

Halle, den

Stefan Dreßler

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Otto-Erich Brodde für die Überlassung dieses herausfordernden Themas, die Bereitstellung der Arbeitsplätze sowie die Möglichkeit zu einer ungehinderten, experimentellen Arbeit.

Weiterhin möchte ich ausdrücklich für ihre herzliche Betreuung und tatkräftige Unterstützung Frau PD Dr. Kirsten Leinweber danken, die mit konstruktiven Anregungen und Hinweisen in unseren zahlreichen Diskussionen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

In diesem Zusammenhang danke ich auch allen Mitarbeitern aus dem Labor des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität für die gute Zusammenarbeit, die Vermittlung von Erfahrungen sowie die Unterstützung bei den Durchführungen der Versuchsreihen.

Mein herzlicher Dank gehört nicht zuletzt meinen Eltern und meiner gesamten Familie, welche mich mit Ihrer Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg stets nach vorne blicken ließen und während der gesamten Arbeit eine ausdauernde Hilfe waren.