

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. K. Schrör

**Zum Mechanismus der NO-vermittelten positiv chronotropen
Wirkung an isolierten Herzpräparaten der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
vorgelegt von

Maria Grandoch

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. H.-M. Raab

Referent: Prof. Dr. Dr. U. Borchard

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. V. Thämer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Präparation und Versuchsaufbau.....	8
2.2. Versuchsablauf.....	9
2.3. Geräte und Substanzen.....	10
3. Ergebnisse.....	11
3.1. Effekte von NO-Donatoren auf die Sinusknotenfrequenz.....	11
3.2. Chronotrope Effekte von L-Arginin auf die Schlagfrequenz..	12
3.3 Chronotrope Effekte von Bradykinin auf die Sinusknotenfrequenz.....	12
3.4. Rolle von cGMP auf die chronotrope Wirkung von NO- Donatoren und Bradykinin.....	15
3.5. Effekt der Blockade des Schrittmacherkanals I_f auf die Wirkung von DEA/NO und Bradykinin.....	22
3.6. Rolle der Acetylcholin-abhängigen K^+ -Kanäle bei dem NO-vermittelten positiv chronotropen Effekt auf den Sinusknoten.....	
3.7. Nebivolol-Versuchsreihe	27
Anhang: Graphik Abb. 22.....	29
4. Diskussion.....	30
5. Zusammenfassung.....	41
6. Literaturverzeichnis.....	42

1. Einleitung

Schon seit einigen Jahren ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator an vielen Prozessen im Körper auf unterschiedlichste Weise beteiligt ist. 1980 wurde der endothelium derived relaxing factor (EDRF) entdeckt und erst 7 Jahre später als NO identifiziert. Die physiologische Bedeutung wurde in zahlreichen Studien untersucht und erstreckt sich weit gefächert über verschiedenste Körperfunktionen. So wurde gezeigt, dass endogenes NO an Prozessen der Immunabwehr, der Regulation des Vasotonus, der Thrombozytenaggregation sowie einer Tonusregulation der glatten Muskulatur in Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt und schließlich an neuronalen Übertragungsprozessen im zentralen und autonomen Nervensystem beteiligt ist (Moncada and Higgs, 1993; Moncada and Higgs, 1991; Nathan and Xi, 1994; Snyder and Brecht, 1992).

Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang war die Entdeckung der NO-Synthase in der Gefäßwand, welche die Freisetzung von NO aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert, wobei als Nebenprodukt Citrullin entsteht (Palmer et al., 1988). In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass ein physiologischer NO-abhängiger vasodilatatorischer Effekt, aufrechterhalten über eine Aktivierung des Endothels durch Scherkräfte und Blutfluss, essentiell beteiligt ist an der Regulation von Blutfluss und -druck (Moncada, 1992). Von besonderem Interesse waren in diesem Kontext die Bedingungen unter einem septischen Schockgeschehen, wo das Endotoxin die NO-Produktion im kardiovaskulären System steigert und eine Vasodilatation und kontraktile Dysfunktion des Myokards verursacht (Gross and Wolin, 1995; Moncada and Higgs, 1993). Ebenso wurde im Zentralnervensystem (ZNS) die Existenz des L-Arginin-NO-Systems nachgewiesen. Hierbei ist NO am Transduktionsprozess der neuronalen Aktivierung des Glutamat- Rezeptors beteiligt (Moncada et al., 1989; Garthwaite, 1991). Auch an der Gedächtnisbildung scheint NO mitzuwirken, wie am Lernverhalten von Ratten und Kaninchen gezeigt wurde (Chapman et al., 1992). NO wurde auch in peripheren Nerven nachgewiesen, wobei es hier zur sensorischen Transmission beizutragen scheint (Duarte et al., 1989) und wohl auch als Transmitter oder Modulator in nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Nerven fungiert (Rand, 1992).

Das von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen produzierte NO erwies sich schließlich als zytotoxisch und zytostatisch und somit als wichtiger Faktor bei der Immunabwehr (Hunt and Goldin, 1992; Sherman et al., 1991). Neben all diesen Bereichen gibt es noch eine grosse

Zahl weiterer Prozesse, an denen NO direkt oder indirekt beteiligt zu sein scheint, was auch Gegenstand gegenwärtiger und zukünftiger Studien ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des Stickstoffmonoxids für die Herzfunktion und insbesondere mit den in jüngster Zeit entdeckten Effekten auf den Sinusknoten, d.h. den Schrittmacher des Herzens. Der Einfluss von NO auf das kardiovaskuläre System ist derzeit Gegenstand intensiver Studien, da schon seit einigen Jahren bekannt ist, dass NO als lipophiles Molekül hier ein wichtiger Mediator ist und demzufolge therapeutisch zum Einsatz kommt. Es wird aus organischen Nitraten und anderen Nitrovasodilatoren wie Nitroprussid-Natrium und Isosorbid-5-mononitrat (ISMN-5) freigesetzt und gilt als pharmakologisch wirksamer Bestandteil dieser Medikamente (Ahlner et al., 1991).

Ein Großteil des gegenwärtigen Wissens über die Effekte exogenen NO auf das kardiovaskuläre System stammt aus Studien mit NO-Donatoren wie DEA/NO (Natrium (Z) - 1 - (N,N-diethylamino) diazen-1-ium-1,2-diolat), SNAP (S-nitroso-N-actyl-D,L-Penicillamin) oder SIN-1 (3-morpholinonydnominin). Hauptangriffspunkt im kardiovaskulären System scheint die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zu sein (Ahlner et al., 1991), jedoch können auch andere zelluläre Strukturen wie transmembranäre Ionenkanäle unter Umgehung der sGC Angriffspunkte sein (Bolotina et al., 1994; Xie et al., 1996). Daraus ließ sich herleiten, dass es sowohl einen cGMP

(zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat)-abhängigen wie auch cGMP-unabhängigen Signaltransduktionsweg für NO zu geben scheint (Hu et al., 1997; Xie et al. 1996). Gerade in bezug auf den inotropen Effekt ist dieser Befund Gegenstand vieler Studien gewesen. Hierbei wurde neben den unterschiedlichen Signalwegen auch eine Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten NO-Donatoren sichtbar. Mediatoren waren sowohl cGMP als auch direkt NO, nachfolgende zelluläre Angriffspunkte die cGMP-inhibierbaren cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat)-Phosphodiesterase, eine cGMP-abhängige Proteinkinase und direkt der L-Typ Calcium-Kanal. Ergebnis war ein positiv inotroper Effekt über einen erhöhten cAMP -Spiegel im Kardiomyozyten (Kirstein et al., 1995; Kojda et al., 1996; Méry et al., 1993), eine negative Inotropie über eine Inhibition mitochondrialer Enzyme (Xie et al.; 1996) bzw. Inhibition spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle über eine cGMP-abhängige Proteinkinase (Ono and Trautwein, 1991; Levi et al., 1989; Clementi and Meldolesi, 1997) sowie über direkten Angriff am L-Typ Ca²⁺-Kanal (Hu et al., 1997).

Endogene Bildung von NO, wichtig für eine ganze Reihe physiologischer Prozesse wie oben aufgezeigt, erfolgt durch die NO-Synthase (NOS), von der 3 Isoformen bekannt sind: 2 konstitutive Formen, die endotheliale und neuronale NOS (eNOS bzw. nNOS) sowie eine induzierbare (iNOS), welche in Studien nur nach vorausgehender Stimulation der Zellen mit Lipopolysacchariden von *E.coli*, Zytokinen wie Interferon γ oder dem Tumornekrosefaktor α exprimiert wird (Nathan and Xie, 1994). In Herzmuskelzellen ließ sich die Existenz von 2 der 3 bekannten NO-Synthasen nachweisen. Während in unbehandelten gesunden Herzmuskelzellen nur die eNOS, gefunden wurde, zeigte sich nach einer Stimulation mit Zytokinen auch eine Expression der iNOS, welche deutliche Unterschiede zur eNOS aufweist. So bildet die induzierbare Isoform mikromolare Mengen NO und ist vom cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel unabhängig, wohingegen die konstitutiv exprimierte endotheliale NOS streng abhängig von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration arbeitet und NO in nanomolaren Mengen produziert (Balligand et al., 1994; Brady et al., 1992).

Der Einfluss von NO auf die myokardiale Kontraktion war Gegenstand vieler Studien mit zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen. In früheren Studien an isolierten Kardiomyozyten hatte die eNOS-Aktivität keinen Einfluss auf die elektrisch stimulierte kontraktile Funktion (Brady et al., 1992; Balligand et al., 1993). Hare et al. zeigten 1995 am Hundeherz *in vivo*, dass der eNOS-Inhibitor L-NMMA (N^G -Monomethyl-L-Arginin) keinen Einfluss auf die Maximalgeschwindigkeit des Druckanstiegs hatte. Im Unterschied hierzu gibt es Beobachtungen, dass Nitrovasodilatoren einen positiven Effekt auf die myokardiale Kontraktion haben. Schon frühe Studien zeigten, dass Glyceroltrinitrat, welches zu NO bioaktiviert wird (Feelisch u.Noack, 1987), die Kontraktion des linken Ventrikels *in vivo* am Hund verbessert (Raff et al., 1970). Der isolierte Papillarmuskel der Katze (Diamond et al., 1977) zeigt diesen Effekt ebenfalls. In Versuchen mit spontan schlagenden oder frequenzstimulierten multizellulären Präparaten führte die Hemmung der eNOS mittels L-NMMA zu einer deutlichen Verminderung der myokardialen Kontraktilität, sowohl im Rattenherz *in vitro* (Kojda et al., 1997) als auch im Hundeherz *in vivo* (Lechevalier et al., 1994; Zappellini et al., 1997). Stamler zeigte schließlich 1994, dass der Einsatz von L-NMMA am Menschen zu einer Verminderung des Herzzeitvolumens führt, was nicht durch eine Blutdrucksteigerung erklärt werden kann.

In neuerer Zeit konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass NO auf das Myokard in normalen Konzentrationen einen positiv inotropen Effekt hat, der wahrscheinlich cAMP-

abhängig ist, und sich bei sehr hohen Konzentrationen in einen negativ inotropen Effekt umkehrt, wahrscheinlich vermittelt über eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase, die zur Einschränkung der Kontraktilität des Herzens führt (Kojda et al., 1996).

Neben diesen Einflüssen von NO auf die myokardiale Kontraktion wurden Untersuchungen bekannt, welche auch einen kardial chronotropen Effekt vermuten ließen. Verschiedene Methoden und Untersuchungen, unter anderem an eNOS-knockout Mäusen, bestätigten, dass endogenes und exogenes NO zu einer positiven Chronotropie führen.

Erste Berichte zur cGMP-abhängigen Regulation der Herzfrequenz stammten aus Untersuchungen mit neonatalen Kardiomyozyten der Ratte. Krause et al. zeigten 1972, dass hohe Konzentrationen eines cGMP-Analogons zu einer Reduktion der Herzfrequenz um 15% führten. Andererseits wurde gezeigt, dass niedrige Konzentrationen von Nitroprussid-Natrium im isolierten Rattenherz die Herzfrequenz um 20% erhöhte (Pabla and Curtis, 1995) und auch beim herztransplantierten Patienten wurde bereits vor der Reinnervation, d.h. unabhängig vom Baroreflex eine Steigerung der Herzfrequenz beobachtet (Levine et al., 1986; De Marco et al., 1995). 1997 wurde der Mechanismus dieser positiven Chronotropie auch an isolierten Meerschweinchen-Präparaten untersucht (Musialek et al.; 1997). Es zeigte sich hierbei, dass NO-Donatoren den Sinusknoten unabhängig vom arteriellen Baroreflex stimulieren. Entsprechend des Einflusses auf die myokardiale Kontraktilität zeigte sich auch in bezug auf die Herzfrequenz ein biphasischer Effekt. Während niedrige Konzentrationen von Stickstoffmonoxid die Schlagfrequenz steigerten, kehrte sich dieser Effekt bei hohen Konzentrationen um und die Herzfrequenz nahm ab. Eine Guanylatzyklase/cGMP abhängige Stimulation des Schrittmacherkanals I_f des Sinusknotens scheint hieran maßgeblich beteiligt zu sein. Im Jahr 2000 erschien eine Arbeit von Musialek et al., welche den Signalweg der NO - Guanylatzyklase/cGMP-abhängigen Stimulation des I_f -Kanals mit Steigerung der Schlagfrequenz der Sinusknotenzellen am isolierten Meerschweinchenvorhof nachwies. Dieser Effekt konnte sowohl durch spezifische I_f -Blocker als auch durch Hemmstoffe der Guanylatzyklase inhibiert werden. Ein solcher Mechanismus scheint auch bei einer Sinustachykardie unter pathologischen Bedingungen, verbunden mit einem Anstieg der myokardialen NO-Produktion, beteiligt zu sein. Dennoch ist noch nicht vollständig geklärt, ob chronotrope Effekte von exogenem NO auch in einem Herzen, welches unter autonomer Kontrolle schlägt, von Bedeutung ist.

Neuere Berichte zum Einfluss von endogenem NO auf die Herzfrequenz erschienen 1993 (Balligand et al., 1993) und basierten auf Versuchen an neonatalen Rattenkardiomyozyten. Eingesetzt wurden der NOS-Inhibitor L-NAME (N ω -Nitro-L-argininmethylester), der zu einem deutlichen Abfall der Herzfrequenz im konstant perfundierten isolierten Rattenherz führte, und L-Arginin, welches als NOS-Substrat einen kleinen positiv chronotropen Effekt induzierte. Ebenso führte auch längere orale Gabe von L-NAME zu einem deutlichen Abfall der Herzfrequenz (Krege et al., 1995). Insgesamt scheint es aber so zu sein, dass beide konstitutiven NOS-Isoformen die Herzfrequenz erhöhen, wobei der eNOS aber die weitaus wichtigere Rolle zukommt.

Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Rolle von Bradykinin in Bezug auf die endogene NO-Produktion. Schon 1998 erschien eine Arbeit über den Bradykinin B₂-Rezeptor-vermittelten positiv chronotropen Effekt im isolierten Rattenvorhof, welcher unabhängig von den Adrenozeptoren war. NO jedoch schien für diesen Effekt als Mediator keine Rolle zu spielen. Daneben ist es allgemein bekannt, dass Acetylcholin und Bradykinin an ihre Rezeptoren im vaskulären Endothel binden und vasodilatative Substanzen wie NO (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987) und Prostaglandine (Moncada and Vane, 1979) freisetzen. Das Ergebnis einer Untersuchung von Perrson and Andersson von 1998 war, dass NO verantwortlich ist für die Bradykinin-induzierte Vasodilatation von Arterien, ungeachtet ihrer Grösse. Auch an isolierten spontan schlagenden Rattenvorhöfen wurden die Bradykinin-Effekte genauer untersucht (Li et al., 1998). Das Ergebnis war ein konzentrationsabhängiger positiv chronotroper Effekt von Bradykinin, wobei die Kontraktionskraft unbeeinflusst blieb. Mittels Applikation der selektiven B₁- und B₂-Rezeptorantagonisten Lys [Leu⁸] Des - Arg - bradykinin und HOE 140 konnte der für die positive Chronotropie verantwortliche Rezeptorsubtyp klassifiziert werden. Nur der B₂-Rezeptorantagonist HOE 140 inhibierte den Bradykinin-induzierten Effekt, während Vorinkubation mit dem B₁-Antagonisten keinen Einfluss auf die Schlagfrequenz hatte. Auch Harada et al. zeigten 2000 in einer Studie, dass die Bradykinin-vermittelte Vasodilatation mit NO als Mediator über einen endothelialen B₂-Rezeptor vermittelt wird, während vaskuläre Kontraktionen über B₁- und B₂-Rezeptoren im glatten Gefässmuskel induziert werden. L-NMMA als Hemmstoff der eNOS hemmte diese Vasodilatation, so dass von einer Beteiligung von NO am Transduktionsweg ausgegangen werden kann Tesfamariam et al. 1995 in einer Arbeit postulierten. Da Indomethacin und L-NMMA am isolierten Vorhof des Meerschweinchens keinen Effekt zu haben schienen, ging

man davon aus, dass Cyclooxygenaseprodukte und NO keine Rolle bei der Vermittlung positiv chronotroper Effekte spielen.

Neben dieser vasodilatatorischen Aktivität kann Bradykinin die Funktion des Herzens modulieren, insbesondere unter pathologischen Bedingungen, z.B. im hämorrhagischen Schock oder bei myokardialer Ischämie (Kimura et al., 1973). Unter physiologischen Bedingungen jedoch sind die Plasmaspiegel wahrscheinlich zu niedrig um einen Effekt auf die Herzfrequenz ausüben zu können.

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der NO-Modulation an isolierten Sinusknoten-Präparaten der Maus auseinander. Die Untersuchungen an Mäusen erwiesen sich als vorteilhaft, da hier die endotheliale NO-Synthese an der Frequenzregulation beteiligt ist und sich genetisch ausschalten lässt (eNOS-knock-out-Mäuse). Alle Versuche wurden an spontan schlagenden rechten Vorhöfen durchgeführt.

3 Fragestellungen stehen im Vordergrund: 1.) Lässt sich durch exogenes Stickstoffmonoxid die Herzfrequenz am isolierten, spontan schlagenden rechten Vorhof des Mäuseherzens modulieren und wenn ja, über welchen Mechanismus geschieht dies? 2.) Kann man über eine endogene NO-Hemmung die Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Frequenzregulation des Sinusknotens nachweisen? Und 3.) In wie weit ist Bradykinin an diesen chronotropen Effekten beteiligt und über welchen Weg geschieht dies im Gewebe?

Zusätzlich wurde untersucht, ob der β_1 -selektive-Blocker Nebivolol, der eine NO-modulierende Wirkung besitzen soll, eine direkte Wirkung auf die Schrittmacherfrequenz ausübt. Gao et al. fanden 1991 heraus, dass Nebivolol endothelabhängig die Koronararterienringe des Kaninchens relaxierte, was im Gegensatz zu den Befunden anderer β -Rezeptor-Antagonisten stand. 1995 wurde von Cockcroft et al. die vasodilatierende Wirkung von Nebivolol auf die Unterarmgefäße des Menschen, vermittelt über einen L-Arginin-/NO-abhängigen Mechanismus, untersucht. Ergebnis war, dass Nebivolol im Gegensatz zu anderen β -Adrenozeptorantagonisten endothelabhängig die Widerstandsgefäße im Unterarm relaxierte. Dieser Mechanismus fand wohl unter der Vermittlung von NO statt, da sich die induzierte Vasodilatation durch L-NMMA antagonisieren liess, während Applikation von L-Arginin diesen Effekt wieder aufhob. Der Mechanismus jedoch, über den Nebivolol den L-Arginin-/NO-Stoffwechselweg aktiviert, ist nicht bekannt. Ausgehend von

dieser Datenlage stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob die Applikation von Nebivolol einen chronotropen Effekt am Sinusknoten der Maus induziert, und wenn ja, über welchen Signaltransduktionsweg dies geschieht.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation und Versuchsaufbau

Die Versuche wurden an rechten Vorhöfen von Mäuseherzen (Stamm: C57 black 6) durchgeführt. Die Tiere mit einem Gewicht von etwa 30 g wurden durch CO₂-Begasung getötet. Anschließend wurde die Arteria carotis communis beidseitig durchtrennt. Nach Eröffnung des Thorax und Freilegung des Herzens wurde die Herzspitze abgetrennt, was die Bildung von Thromben verhinderte. Dann erfolgte die Durchtrennung der Aorta sowie der V. cava sup. und inf. wenig distal des Herzens. Dieses wurde dann in weniger als 3 Minuten nach Tötung des Tieres in ein Gefäß mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (in mmol/l NaCl: 118.5; KCl: 4.7; MgCl₂: 0.6; CaCl₂: 1.8; NaH₂PO₄:1.2; NaHCO₃: 25.0; Glucose: 10.1; Pyruvat: 2.0; pH 7.4) überführt und dort präpariert.

Der rechte Vorhof wurde unter Schonung des Sinusknotens vom Herzen abgetrennt und das Präparat an der Basis auf einem Elektrodenhalter fixiert. Anschließend wurde dieser Elektrodenhalter in ein 10 ml-Organbad überführt und fixiert (s. Abb. 1). Das Organbad wurde mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt, auf 31°C temperiert und kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂; 5% CO₂) begast. Ein thermostatgesteuerter Wärmeaustauscher, der an das doppelwandige Organbad angeschlossen war, hielt die Temperatur konstant. Die Frequenz der spontan schlagenden Vorhöfe wurde über einen digitalen Frequenzmesser bestimmt. Die Signale, über einen Verstärker amplifiziert, wurden kontinuierlich auf einem Schreiber registriert, so dass nach Versuchsende die Frequenzbestimmung zusätzlich anhand des Schreiberprotokolls vorgenommen werden konnte.

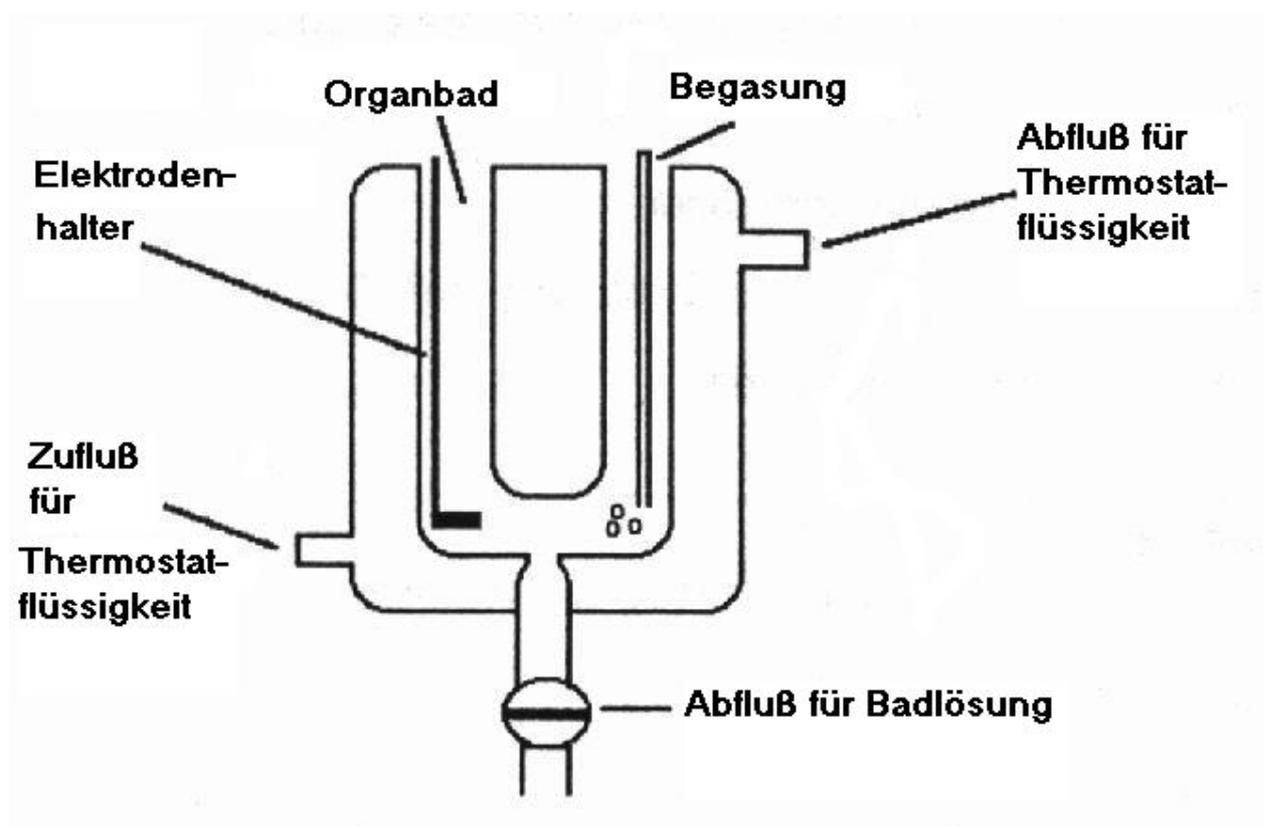


Abb. 1: Schematische Darstellung des Organbades

2.2. Versuchsablauf

Nach Überführung der rechten Vorhöfe in die Organbäder wurde ein steady state (definiert anhand einer konstanten Schlagfrequenz) abgewartet und nach Registrierung der Ausgangsfrequenz mit der Versuchsdurchführung begonnen. Um den Einfluss des Sympathikus bzw. Parasympathikus über präsynaptische Noradrenalin- sowie Acetylcholin (ACh) -Ausschüttung auszuschliessen, wurden die Präparate mit Propranolol ($0.1 \mu\text{M}$) und Atropin ($1 \mu\text{M}$) vorbehandelt (eine Ausnahme bildeten die Versuche mit Nebivolol, welche ohne Arzneistoffvorinkubation abliefen).

Die Prüfsubstanzen wurden bis zu den gewünschten Endkonzentrationen kumulativ zugegeben und die induzierten Frequenzänderungen aufgezeichnet. Nach Erreichen der maximal sichtbaren Effekte wurde mit substanzfreier Badlösung gewaschen. Nachdem die Präparate wieder eine stabile Frequenz erreicht hatten, konnten weitere Substanzen zugefügt und auf ihre Wirkung hinsichtlich der Schrittmacherfrequenz untersucht werden.

2.3. Verwendete Geräte und Substanzen:

Organbäder	Konstruktion der Fa. Beyer
Thermostat	Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ
Elektrodenhalter	Eigenbau der feinmechanischen Werkstatt des pharmakologischen Institutes, Universität Düsseldorf
Messverstärker	DCB 4B, IFD Mescher
Frequenzmesser	FET 1 BN 4736-2, Rohde
Wärmebad	Type 1002, GFL, Burgwedel
Papiersreiber	Recomed; Hellige/Gould, Brush 220

Substanzen

Auflistung der eingesetzten Substanzen mit ihren Herstellern:

- Atropinsulfat (Sigma)
- Propranololhydrochlorid (Rhein-Pharma)
- Captopril (v. Heyden GmbH)
- Zatebradin = UL-FS 49 (Kali-Chemie Pharma Hannover)
- L-NMMA = N^G-Monomethyl-L-Arginin (Alexis)
- DEA/NO = Natrium(Z)-1-(N,N-diethylamino)diazene-1-ium-1,2-diolate (Alexis)
- Bradykinin (Aventis)
- ODQ = 1H-(1,2,4)oxadiazolol(4,3-*a*)quinoxalin-1-one (Sigma)
- Rp-8-Bromo-PET-cGMPs = 8-bromo-β-phenyl-1,N²-etheno-guanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate (BIOLOG Life Science Institute)
- LY 83583 = 6-anilino-5,8-quinolinedione (Alexis)
- Nebivolol (Berlin-Chemie)
- HMR 1766 (Aventis)
- HOE 140 = (D-arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]bradykinin (Aventis)

Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurde der gepaarte t-Test verwendet. Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen (p < 0,05).

3. Ergebnisse

Nach Präparation des rechten Vorhofs wurde den Präparaten eine Phase der Stabilisierung von 60 min gewährt. In dieser Zeit erfolgte eine Vorbehandlung mit Atropin (1 μM) und Propranolol (100 nM). Die Schlagfrequenz betrug im Mittel $273,5 \pm 6,7$ Schläge/min ($n=52$).

3.1. Effekte von NO-Donatoren auf die Sinusknotenfrequenz

DEA/NO als exogener NO-Donator induzierte in einer Konzentration von 10 μM einen Anstieg der Herzfrequenz um bis zu 7,4% in bezug auf den Ausgangswert.

L-NMMA, ein NO-Synthase-Inhibitor, zeigte als Eigeneffekt in einer Konzentration von 3 mM einen leichten Abfall der Schlagfrequenz um 3,3% von 254,7 auf 245,2 Schläge/min., welcher jedoch in bezug auf den Ausgangswert nicht signifikant war. Nach Zugabe von DEA/NO (10 μM) unter Vorinkubation mit 3 mM L-NMMA wurde der vorher induzierbare positiv chronotrope Effekt des NO-Donators verringert und der Anstieg der Herzfrequenz betrug nur noch max. 3,8% bezogen auf den Ausgangswert (s. Abb. 2).

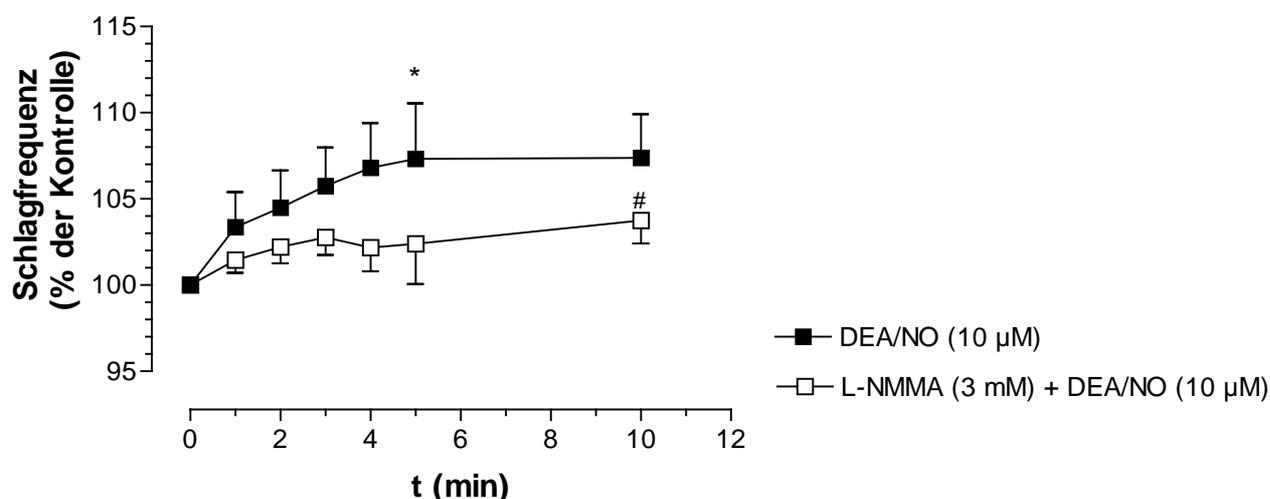


Abb. 2: Effekt von DEA/NO (10 μM) allein und in Anwesenheit von L-NMMA (3 mM). 10 μM DEA/NO induziert einen maximalen Frequenzanstieg um 7,4% ($n = 15$). In Anwesenheit von 3 mM L-NMMA wurde dieser Effekt geringer und die Schlagfrequenz betrug maximal nur noch 3,8% bezogen auf die Kontrolle.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM) und Propranolol (100 nM):

100% $\cong 267,0 \pm 12,8$ Schläge/min ($n=15$)

Kontrollwert nach Waschen von DEA/NO und Gabe von Atropin (1 μM) und Propranolol (100 nM):

100% $\cong 254,7 \pm 11,72$ Schläge/min ($n=15$)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM), Propranolol (100 nM) und L-NMMA (3 mM):

100% $\cong 245,2 \pm 10,4$ Schläge/min ($n=15$)

* $p < 0,05$ DEA/NO (10 μM) vs. Kontrolle

$p < 0,05$ L-NMMA (3 mM) + DEA/NO (10 μM) vs. Kontrolle

3.2.Chronotrope Effekte von L-Arginin auf die Herzfrequenz

Zur Untersuchung einer möglichen Modulation der Herzfrequenz durch L-Arginin als Ausgangssubstrat der endogenen NO-Synthese, wurde die Substanz erst allein in einer Konzentration von 3 mM und anschließend nach 15minütiger Vorinkubation mit L-NMMA (3 mM), welches alleine zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Frequenzabfall bezogen auf den Ausgangswert führte, appliziert (s. Abb. 3).

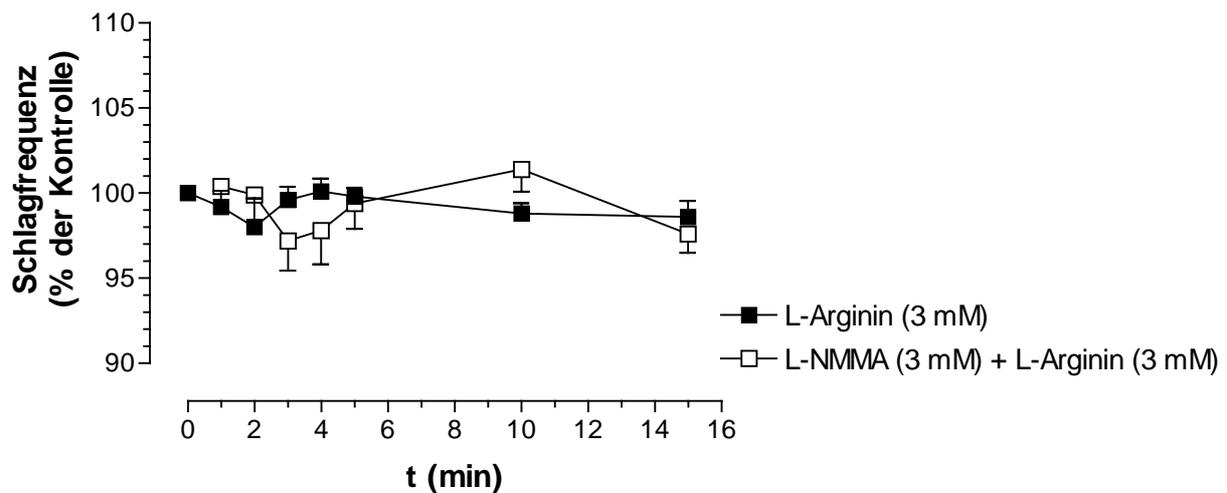


Abb. 3: Chronotrope Effekte von L-Arginin. Applikation von L-Arginin (3 mM) führte zu keiner signifikanten Änderung der Herzfrequenz. Auch vorhergehende Inkubation mit L-NMMA (3 mM) und anschließende L-Arginin –Applikation hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Schrittmacherfrequenz.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 225,1 \pm 14,7 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und L-NMMA (3 mM):

100% \cong 215,2 \pm 16,8 Schläge/min (n=6)

3.3.Chronotrope Effekte von Bradykinin auf die Sinusknotenfrequenz

Bradykinin wurde bei gleichzeitiger Antagonisierung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) mittels Captopril (300 nM) appliziert, wobei der ACE-Hemmer selbst die basale Schlagfrequenz nicht beeinflusste und den Bradykininabbau hemmte. Bradykinin in Konzentrationen von 0,1 bis 1000 nM zeigte einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt (s. Abb. 4). Konzentrationen oberhalb von 1000 nM bewirkten keinen weiteren Frequenzanstieg. Die EC 50 betrug 19,38 nM.

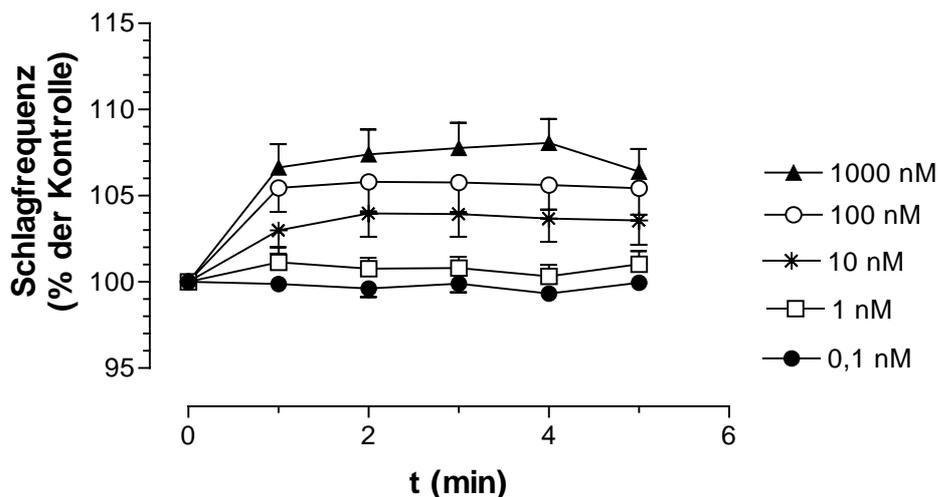


Abb. 4: Einfluss von Bradykinin auf die Schlagfrequenz. Bradykinin zeigte einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt (Bradykinin 0,1 – 1000 nM; $p < 0,05$).
Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):
100% \cong 274,1 \pm 0,6 Schläge/min (n=15)

In Gegenwart von L-NMMA (3 mM) wurde der positiv chronotrope Effekt nach Zugabe von Bradykinin in steigenden Konzentrationen von 0,1 bis 1000 nM um ca. 2 % reduziert (s. Abb. 5).

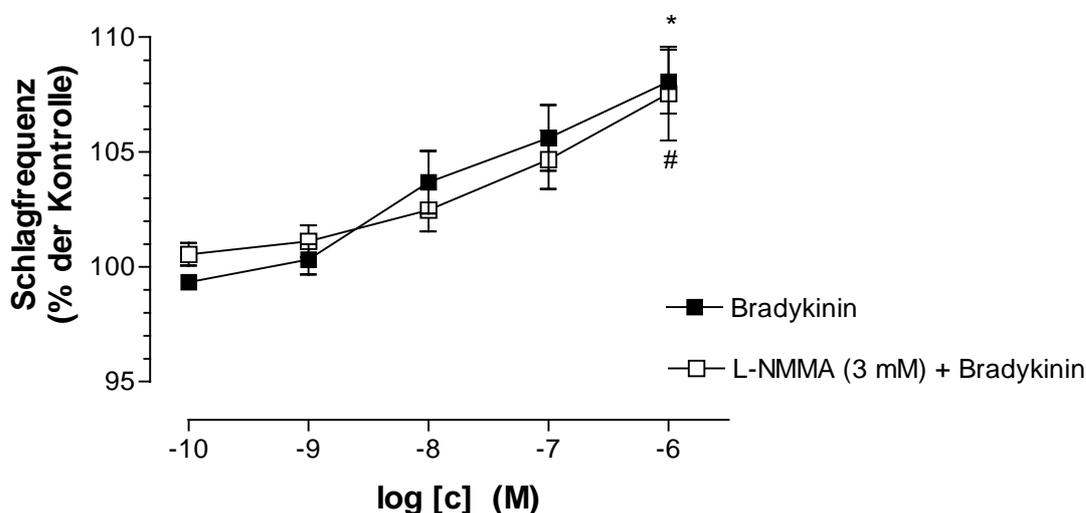


Abb. 5: Vergleich der Effekte von Bradykinin in verschiedenen Konzentrationen allein sowie in Gegenwart von L-NMMA 3 mM (Bradykinin 0,1 – 1000 nM).
In Anwesenheit von L-NMMA schwächte sich der positiv chronotrope Effekt von Bradykinin in Konzentrationen von 10 bis 1000 nM um knapp 2% ab.
Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM) :
100% \cong 274,1 \pm 0,6 Schläge/min (n=15)
Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und L-NMMA (3 mM): 100% \cong 260,9 \pm 3,8 Schläge/min (n=15)
* $p < 0,05$ Bradykinin vs. Kontrollwert
$p < 0,05$ Bradykinin + L-NMMA (3 mM) vs. Kontrollwert

HOE 140 (Icatibant), ein Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonist, zeigte nach Applikation in einer Konzentration von 10 nM als Eigeneffekt einen leichten, jedoch in bezug auf den Ausgangswert nicht signifikanten Anstieg der Sinusknotenfrequenz um 1,4% von 287,2 auf 288,4 Schläge/min. Bei Vorinkubation mit HOE 140 (Icatibant) in einer Konzentration von 10 nM und anschliessender Bradykinin-Applikation wurde der vorher beobachtbare Anstieg der Herzfrequenz nahezu vollständig unterdrückt (s. Abb. 6).

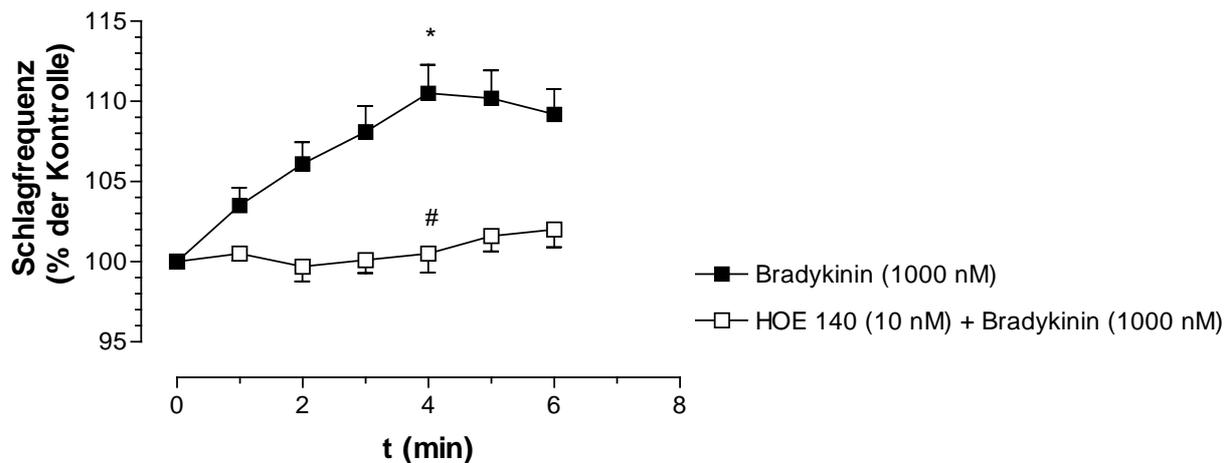


Abb. 6: Chronotroper Effekt von Bradykinin (1000 nM) in Anwesenheit von Captopril (300 nM) sowie nach Vorinkubation mit HOE 140 in einer Konzentration von 10 nM. Der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonist HOE 140 hob den Bradykinin-induzierten Anstieg der Schrittmacherfrequenz von 10,5% fast vollständig auf, so dass nur noch eine Steigerung um 2,8% eintrat.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 285,5 \pm 18,8 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und HOE 140 (10 nM):

100% \cong 287,2 \pm 17,4 Schläge/min (n=6)

* p < 0,05 Bradykinin (1 μ M) vs. Kontrolle

p < 0,05 Bradykinin (1 μ M) vs. HOE 140 (10 nM) + Bradykinin (1 μ M)

3.4. Rolle von cGMP auf die chronotrope Wirkung von NO-Donatoren und Bradykinin

LY 83583 (10 μ M; 30 min Vorinkubation), ein Guanylatzyklase-Hemmer, verursachte als Eigeneffekt einen nicht signifikanten Abfall der Spontanfrequenz von 245,4 auf 236,5 Schläge/min (1,3%) bezogen auf den Ausgangswert mit Erreichen eines steady state nach 30 min, zeigte jedoch auf den positiv chronotropen Effekt von DEA/NO keinen Einfluss. Dagegen fiel der Anstieg der Schlagfrequenz durch Bradykinin (1000 nM) bei Vorinkubation mit LY 83583 von 118,3% auf 109,9% des Ausgangswertes (s. Abb. 7).

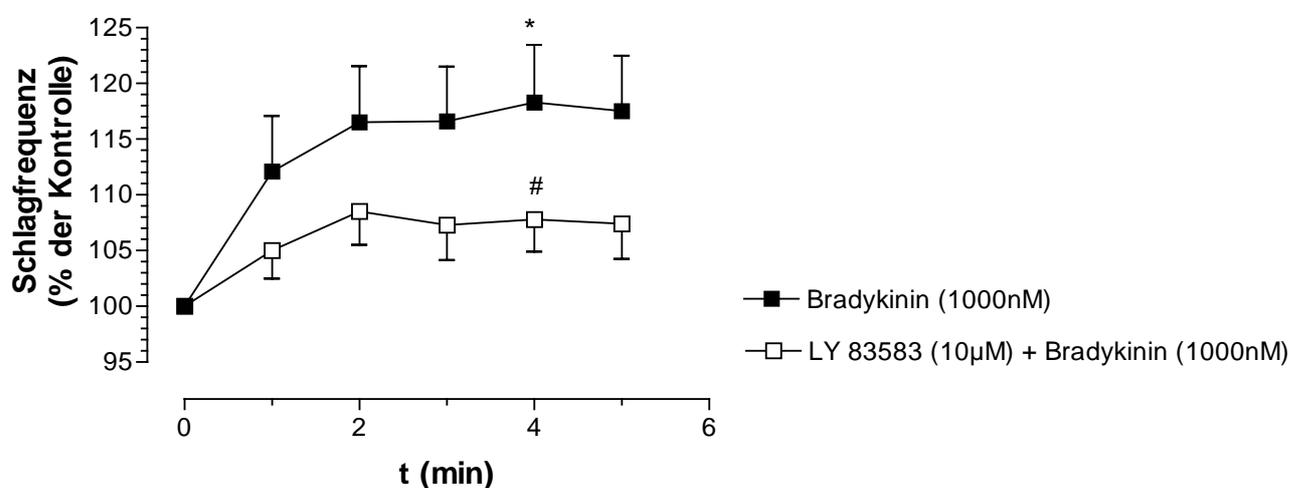


Abb. 7: Bradykinin-induzierter Anstieg der Schrittmacherfrequenz allein sowie nach Vorinkubation mit LY 83583. Vorbehandlung mit LY 83583 (10 μ M) bewirkte eine deutliche Abnahme des durch Bradykinin (1000 nM) induzierten Anstiegs der Schlagfrequenz von maximal 18,3 % auf nur noch 9,9% in Anwesenheit des Guanylatzyklasehemmers.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 222,7 \pm 13,6 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Waschen von Bradykinin und Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 245,4 \pm 16,9 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und LY 83583 (10 μ M): 100% \cong 242,3 \pm 18,1 Schläge/min (n=12)

* p < 0,05 Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

p < 0,05 LY 83583 (10 μ M) + Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

In Anwesenheit eines anderen Guanylatzyklase-Hemmstoffs, ODQ (10 μ M; 20 min Vorinkubation; n = 12), welcher bei alleiniger Applikation zu einer nicht signifikanten Senkung der Sinusknotenfrequenz um maximal 0,7% von 253,5 auf 251,8 Schläge/min führte, wurde der DEA/NO-induzierte Anstieg der Frequenz von maximal 8,5% (alleinige DEA/NO-Applikation) auf einen maximalen Frequenzanstieg von 4,1 % (ODQ-Vorinkubation und nachfolgende DEA/NO-Applikation) gesenkt (s. Abb. 8).

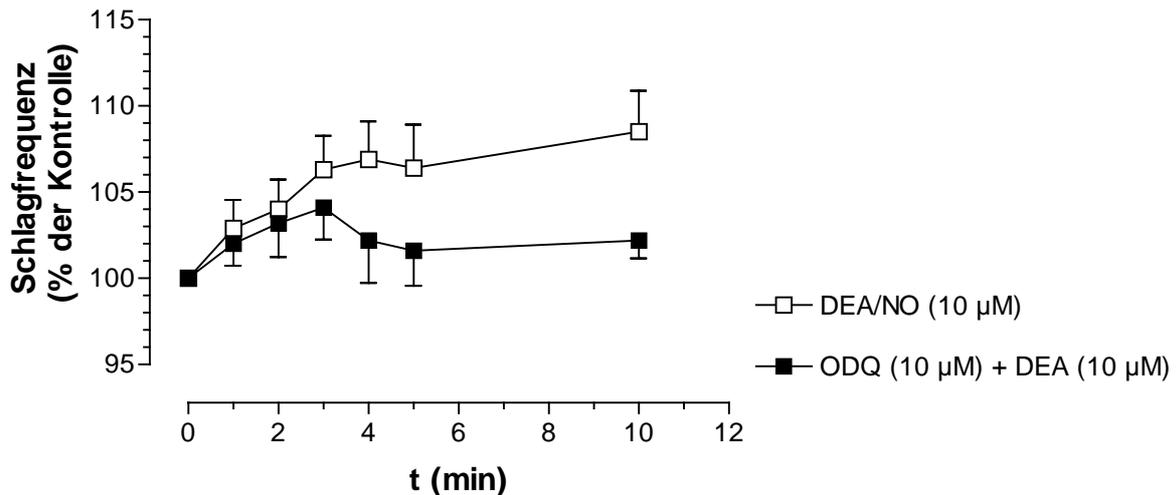


Abb. 8: Einfluss von ODQ (10 μ M) auf den chronotropen Effekt von DEA/NO. Nach 20minütiger Vorinkubation mit ODQ (10 μ M) fiel die DEA/NO-induzierte Steigerung der Schlagfrequenz weniger ausgeprägt aus als ohne den Guanylatzyklase-Hemmer. So erfolgte nach alleiniger Gabe von DEA/NO (10 μ M) ein Frequenzanstieg um 8,5%, nach vorangegangener Inkubation mit 10 μ M ODQ betrug der Anstieg dagegen nur noch 4,1%.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 247,5 \pm 15,2 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Waschen von DEA/NO und Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 252,5 \pm 14,7 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und ODQ (10 μ M):

100% \cong 251,8 \pm 16,7 Schläge/min (n=12)

Dagegen wurde bei Einsatz von Bradykinin in einer Konzentration von 1000 nM ein gegenläufiger Effekt sichtbar. Statt, wie eigentlich zu erwarten, einen weniger ausgeprägten Anstieg der Schrittmacherfrequenz nach Vorinkubation mit dem Guanylatzyklasehemmer ODQ (10 μ M) und nachfolgender Bradykinin-Gabe (Bradykinin 1000 nM) zu beobachten, fiel der Bradykinin-induzierte positiv chronotrope Effekt sogar stärker aus als ohne vorhergehende Behandlung mit ODQ (11,0% vs 14,9%) (s. Abb. 9). Jedoch war dieser Effekt statistisch nicht signifikant.

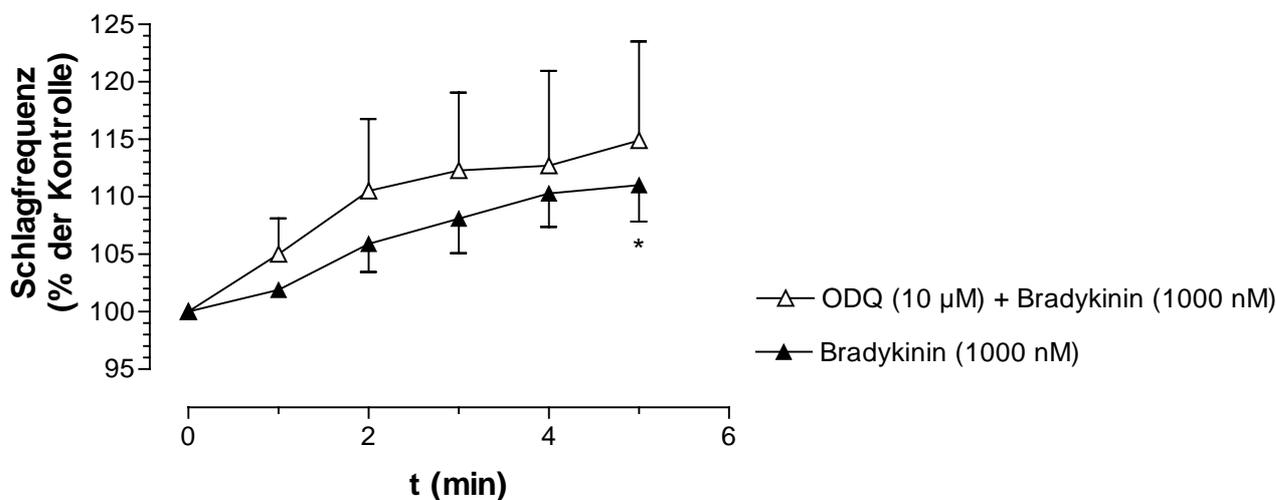


Abb.9: Bradykinin-Wirkung auf die Schrittmacherfrequenz in An- und Abwesenheit von ODQ (10 μ M). Während Bradykinin-Gabe in einer Konzentration von 1000 nM einen Anstieg der Schlagfrequenz um 11,0% bewirkte, fiel dieser Anstieg nach Vorinkubation mit ODQ (10 μ M) mit maximal 14,9% deutlich ausgeprägter aus.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 253,4 \pm 13,9 Schläge/min (n = 5)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und ODQ (10 μ M):

100% \cong 253,0 \pm 10,1 Schläge/min (n= 5)

* p < 0,05 Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

Weiterhin wurde die Wirkung eines Guanylatzyklase-Aktivators, HMR 1766 (3 μ M), untersucht. Eine Vorinkubation mit dieser Substanz für 40 min steigerte die Schrittmacherfrequenz um 5,9% (n = 6). Schließlich wurde noch der selektive Phosphodiesterase V-Hemmer Sildenafil (1 μ M) eingesetzt, welcher bei alleiniger Applikation zu einer signifikanten Schlagfrequenzsteigerung um 8,7% von 310,3 auf 337,3 Schläge/min führte. Wurde erst mit Sildenafil (1 μ M) vorinkubiert und anschließend HMR 1766 zugegeben, so führte dies nicht zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Schrittmacherfrequenz. Dagegen führte eine Vorbehandlung mit ODQ (10 μ M) und Applikation des Guanylatzyklase-Aktivator HMR 1766 (3 μ M) zu einer Abnahme der Schlagfrequenz um 2,4% (s. Abb.10).

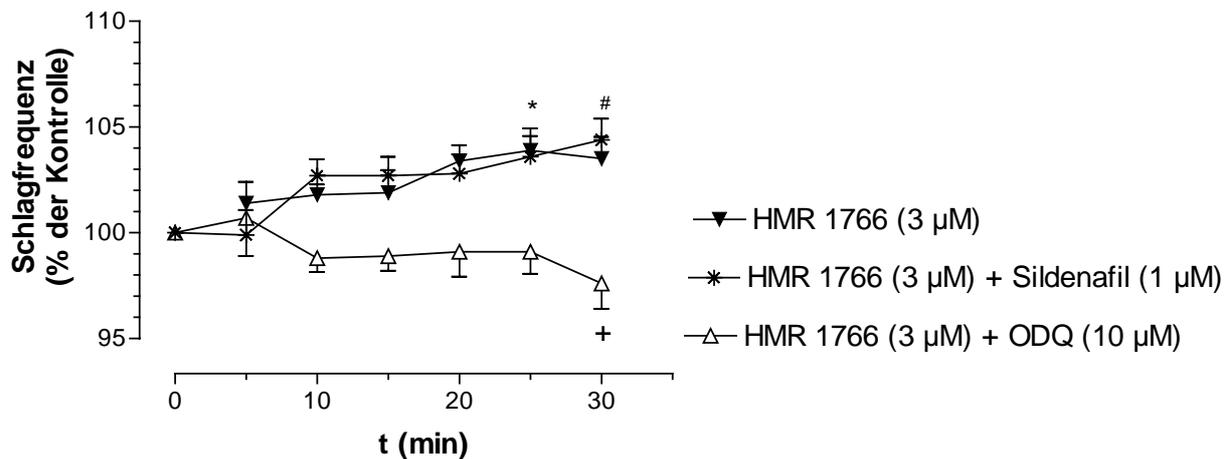


Abb.10: Einfluss des Guanylatzyklase-Aktivators HMR 1766 auf die Schrittmacherfrequenz. Vorinkubation mit HMR 1766 (3 μ M) allein sowie in Kombination mit Sildenafil steigerte die Schlagfrequenz um rund 5%, wohingegen Gabe von ODQ (10 μ M) und HMR 1766 die Frequenz um 2,4% senkte.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 301,3 \pm 8,87 Schläge/min (n = 6)

Kontrollwert nach Waschen von HMR 1766 und Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 310,3 \pm 5,5 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Sildenafil (1 μ M):

100% \cong 337,3 \pm 6,2 Schläge/min (n = 6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und ODQ (10 μ M):

100% \cong 343,5 \pm 13,6 Schläge/min (n = 6)

* p < 0,05 HMR 1766 (3 μ M) vs. Kontrolle

p < 0,05 HMR 1766 (3 μ M) + Sildenafil (1 μ M) vs. Kontrolle

+ p < 0,05 HMR 1766 (3 μ M) + ODQ (10 μ M) vs. HMR 1766 (3 μ M)

Bei vorheriger Blockade der cGMP-abhängigen PDE V mittels Sildenafil (1 μ M) stieg der DEA/NO (10 μ M)- induzierte positiv chronotrope Effekt auf max. 16% im Vergleich zur Ausgangsfrequenz an, während der Anstieg ohne Zugabe von Sildenafil nur rund 7% ausmachte.

Dagegen bewirkte DEA/NO (10 μ M) bei gleichzeitiger Gabe von 1 μ M Sildenafil, welches schon als Eigeneffekt einen signifikanten Frequenzanstieg von 5,8% bezogen auf den Ausgangswert aufwies, und 10 μ M ODQ, welches bei alleiniger Applikation nur zu einer nicht signifikanten Frequenzsenkung führte, nun nur noch eine Frequenzsteigerung um maximal 3,9% (s. Abb.11).

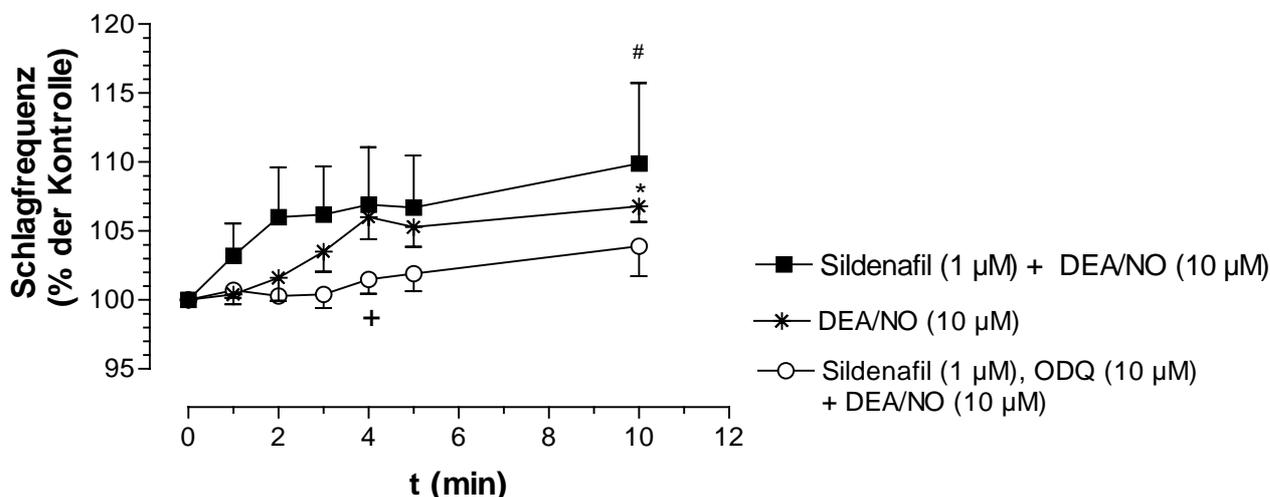


Abb.11: Effekt von DEA/NO in Anwesenheit von Sildenafil bzw. Sildenafil und ODQ. DEA/NO (10 μ M) allein bewirkte eine Frequenzsteigerung um maximal 7%, in Gegenwart von Sildenafil (1 μ M) verstärkte sich der Effekt auf 16%. Bei gleichzeitiger Vorbehandlung mit Sildenafil (1 μ M) und ODQ (10 μ M) dagegen schwächte sich der Effekt auf 3,9 % ab.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 260,2 \pm 6,4 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Waschen von DEA/NO und Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 248,1 \pm 11,2 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Sildenafil (1 μ M):

100% \cong 255,1 \pm 10,1 Schläge/min (n = 6)

Kontrollwert nach Waschen von Sildenafil und DEA/NO und Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM):

100% \cong 276,2 \pm 8,1 Schläge/min (n=6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und ODQ (10 μ M):

100% \cong 274,2 \pm 13,1 Schläge/min (n=6)

* p < 0,05 DEA/NO (10 μ M) vs. Kontrolle

p < 0,05 DEA/NO (10 μ M) + Sildenafil (1 μ M) vs. Kontrolle

+ p < 0,05 DEA/NO (10 μ M), Sildenafil (1 μ M) + ODQ (10 μ M) vs. DEA/NO (10 μ M)

Im Gegensatz hierzu kam es bei Kombination von Bradykinin (1000 nM) und Sildenafil (1 μ M) zu einem weit weniger stark ausgeprägten positiv chronotropen Effekt des Bradykinins als ohne Vorbehandlung mit dem PDE V-Hemmer. Bei vorausgehender Inkubation mit Sildenafil (1 μ M) und ODQ (10 μ M), wobei hier als Eigeneffekt der beiden Substanzen ein signifikanter Frequenzstieg von 4,3% (Steigerung von 317,6 auf 331,0 Schläge/min) bezogen auf den Ausgangswert beobachtet werden konnte; fiel der Bradykinin-induzierte Anstieg der Schlagfrequenz dagegen weniger stark aus (s. Abb.12).

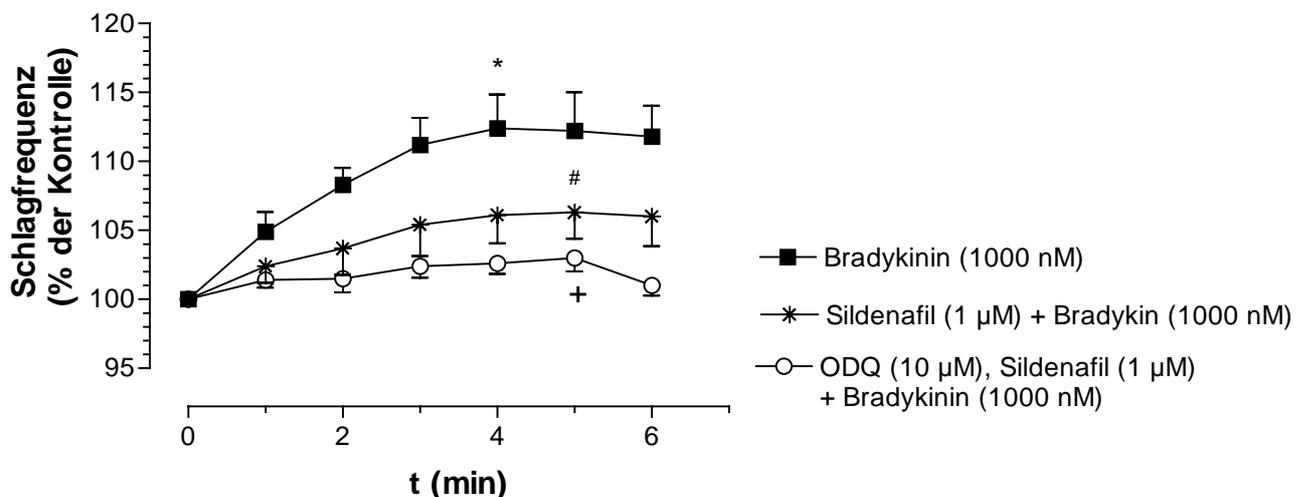


Abb.12: Effekte von Bradykinin (1000 nM) in Gegenwart von Sildenafil (1 μ M) und ODQ (10 μ M).

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 282,8 \pm 13,1 Schläge/min (n = 12).

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und Sildenafil (1 μ M):

100% \cong 305,0 \pm 11,9 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Waschen von Bradykinin und Sildenafil und Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM):

100% \cong 317,6 \pm 10,54 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM), Sildenafil (1 μ M) und ODQ (10 μ M):

100% \cong 331,0 \pm 11,2 Schläge/min (n=12)

* p < 0,05 Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

p < 0,05 Sildenafil (1 μ M) + Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

+ p < 0,05 ODQ (10 μ M), Sildenafil (1 μ M) + Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

Bei alleinigem Einsatz von Rp-8-Bromo-PET-cGMPs (100 nM), einem kompetitiven Hemmstoff der cGMP-abhängigen Proteinkinase G1 β , zeigte sich keine signifikante Wirkung auf die Schrittmacherfrequenz. Dagegen war nach 40minütiger Vorinkubation mit Rp-8-Bromo-PET-cGMPs und Zugabe von 10 μ M DEA/NO ein Anstieg der Schlagfrequenz um 8% zu beobachten. Dagegen führte DEA/NO (10 μ M) alleine nur zu einem Frequenzanstieg von 5,2% (s. Abb. 13).

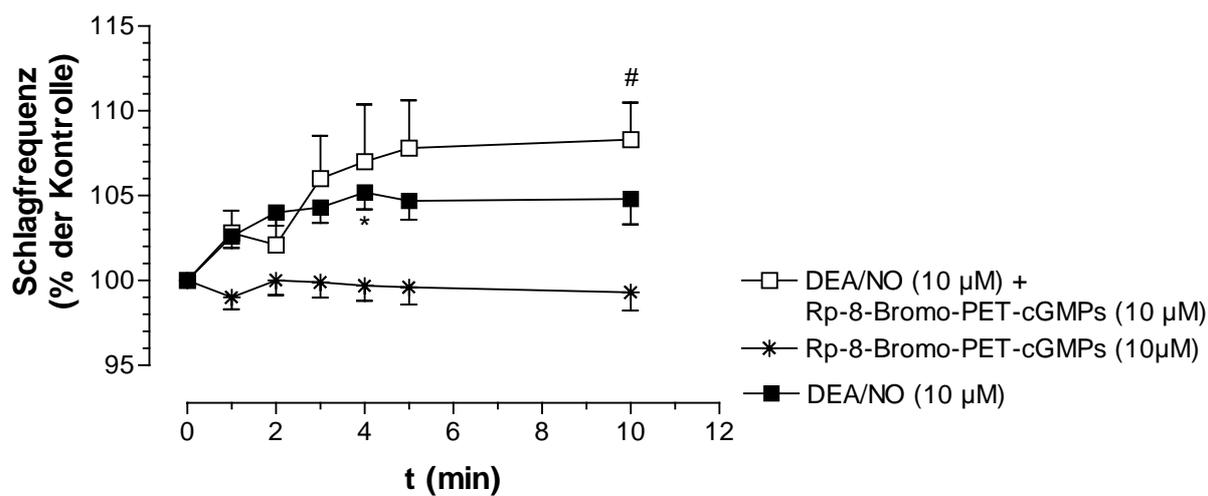


Abb. 13: Effekt von DEA/NO (10 μ M) nach Vorinkubation mit Rp-8-Bromo-PET-cGMPs (100 nM). Alleinige Hemmung der cGMP-abhängigen Proteinkinase 1 β führte zu keiner signifikanten Steigerung der Schlagfrequenz. Nach alleiniger DEA/NO-Gabe stieg die Schrittmacherfrequenz um maximal 5,2%, während der Anstieg nach vorausgehender Inkubation mit Rp-8-Bromo-PET-cGMPs maximal 8,3% betrug.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 298,3 \pm 10,6 Schläge/min (n = 12)

Kontrollwert nach Waschen von DEA/NO und Gabe von Atropin (1 μ M) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 287,3 \pm 6,44 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μ M), Propranolol (100 nM) und Rp-8-Bromo-PET cGMPs (100 nM):

100% \cong 284,9 \pm 11,3 Schläge/min (n = 12)

* p < 0,05 DEA/NO (10 μ M) vs. Kontrolle

p < 0,05 DEA/NO (10 μ M) + Rp-8-Bromo-PET cGMPs (10 μ M) vs. Kontrolle

3.5.Effekt der Blockade des Schrittmacherkanals I_f auf die chronotrope Wirkung von DEA/NO und Bradykinin

Untersucht wurde die Bedeutung des I_f -Kanals für die positiv chronotropen Effekte von DEA/NO und Bradykinin. Die Blockade dieses Kanals erfolgte durch Zatebradin in einer Konzentration von 3 μM . Nach einer 40minütigen Vorinkubation in der es zu einer Frequenzsenkung auf 85% des Ausgangswertes kam, blieb nach Zugabe von 1000 nM Bradykinin bzw. 10 μM DEA/NO deren positiv chronotroper Effekt aus (s. Abb. 14 und 15). Möglicherweise war aber auch der Zatebradin-Effekt nach 40 Minuten noch nicht im steady state, so dass der Bradykinin- bzw. DEA/NO-induzierte Frequenzanstieg dadurch unterbunden wurde.

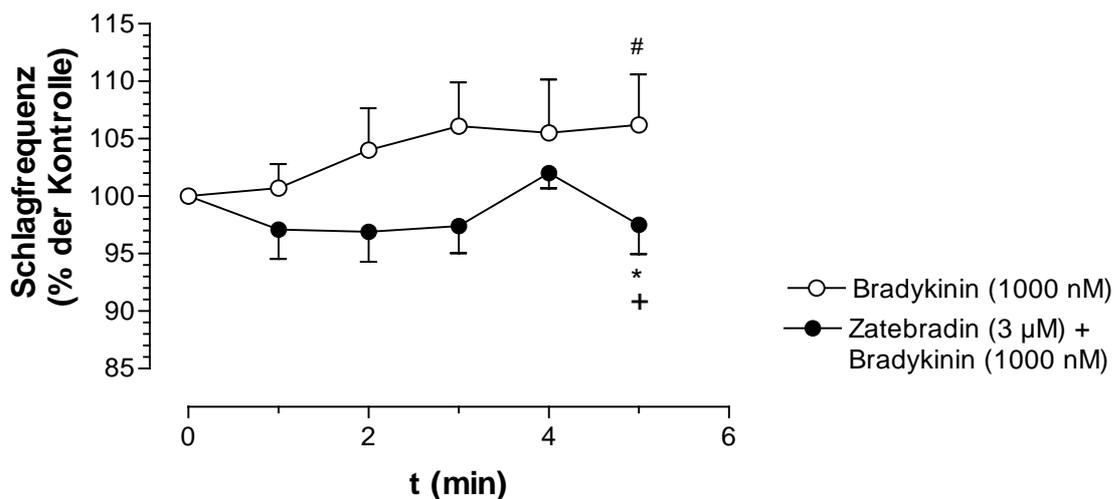


Abb. 14: Einfluss der Blockade des I_f -Kanals auf den Bradykinin-induzierten positiv chronotropen Effekt. Vorinkubation mit Zatebradin (3 μM) für 40 Minuten blockierte die vorher durch Bradykinin (1000 nM) auslösbare Steigerung der Schlagfrequenz von 6,2% fast vollständig, so dass nur noch 2% Frequenzanstieg erreicht wurden.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM), Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 220,0 \pm 17,4 Schläge/min (n = 6)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM), Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und Zatebradin (3 μM): 100% \cong 173,3 \pm 22,7 Schläge/min (n = 6)

p < 0,05 Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

* p < 0,05 Zatebradin (3 μM) + Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

+ p < 0,05 Zatebradin+ Bradykinin vs. Bradykinin

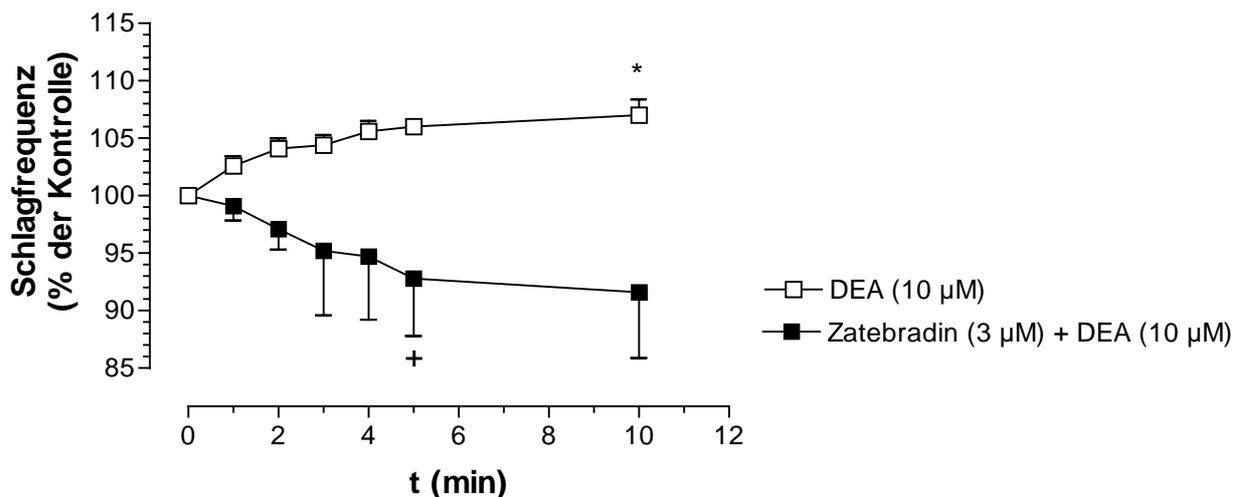


Abb. 15: Einfluss einer I_f -Kanal-Blockade mittels Zatebradin auf den DEA/NO-induzierten positiv-chronotropen Effekt. 3 μM des I_f -Kanal-Blockers Zatebradin unterdrückten den DEA/NO-induzierten Anstieg der Schlagfrequenz von 7% völlig und es kam sogar zu einem Rückgang der Frequenz auf 91,6% des Ausgangswertes, was jedoch auch auf die Möglichkeit zurückzuführen sein könnte, dass sich der Zatebradin-Effekt noch nicht im steady state befand.

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM) und Propranolol (100 nM):

100% \cong 280,1 \pm 14,6 Schläge/min (n = 8)

Kontrollwert nach Gabe von Atropin (1 μM), Propranolol (100 nM) und Zatebradin (3 μM):

100% \cong 234,4 \pm 9,5 Schläge/min (n= 8)

* $p < 0,05$ DEA/NO (10 μM) vs. Kontrolle

+ $p < 0,05$ Zatebradin (3 μM) + DEA/NO (10 μM) vs. DEA/NO (10 μM)

3.6. Rolle der Acetylcholin (ACh)-abhängigen K^+ -Kanäle bei dem NO-vermittelten positiv chronotropen Effekt auf den Sinusknoten

Um die Rolle der K^+ -Kanäle bei dem NO-induzierten Anstieg der Herzfrequenz zu untersuchen, wurden zum einen Carbachol (Carbaminoylcholin), ein Aktivator der ACh-abhängigen Kaliumkanäle, zum anderen N-Ethyl-Maleimid (N-EM), ein Inhibitor dieser Kanäle, eingesetzt.

Bei Vorinkubation mit Carbachol, einem direkten Parasympathomimetikum, in einer Konzentration von 600 nM zeigte sich ein stark ausgeprägter negativ chronotroper Effekt. Die Schrittmacherfrequenz fiel auf 58% des Ausgangswertes. Wurden anschließend 10 μ M DEA/NO appliziert, so führte dies nicht zu einem Anstieg der Spontanfrequenz, sondern die Frequenz sank um 8 % in Bezug auf den Ausgangswert, anstatt wie sonst um 6-7% zu steigen. Ebenso führte auch Applikation von Bradykinin (1000 nM) nach einer Vorinkubation mit Carbachol (600 nM) zu keiner signifikanten Steigerung der Frequenz (s. Abb. 16 und 17).

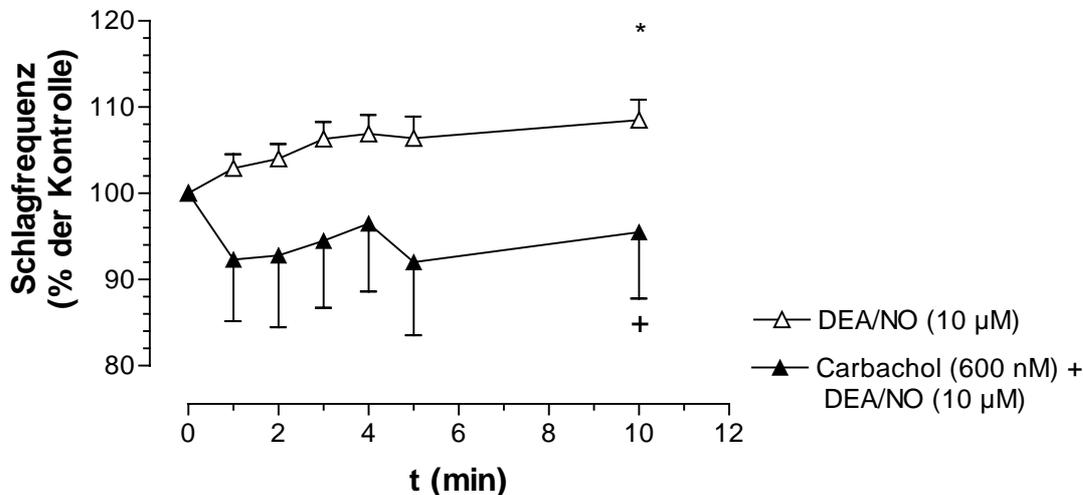


Abb. 16: Einfluss der Aktivierung der K^+ -Kanäle mittels Carbachol auf die positiv chronotropen Effekte von DEA/NO. DEA/NO (10 μ M) alleine führte zu einem Frequenzanstieg um maximal 8,5%. Wurde jedoch vor Gabe von DEA/NO 10 Minuten mit Carbachol (600 nM) zur Aktivierung der K^+ -Kanäle vorinkubiert, so blieb der DEA/NO-induzierte Anstieg aus und die Herzfrequenz fiel stattdessen bis auf 94,5% des Ausgangswertes.

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM):

100% \cong 247,5 \pm 15,2 Schläge/min (n = 8)

Kontrollwert nach Waschen von DEA/NO und Gabe von Propranolol (100 nM):

100% \cong 268,6 \pm 15 (n=8)

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM) und Carbachol (600 nM):

100% \cong 152,3 \pm 22,4 Schläge/min (n=8)

* $p < 0,05$ DEA/NO (10 μ M) vs. Kontrolle

+ $p < 0,05$ Carbachol (600 nM) + DEA/NO (10 μ M) vs. DEA/NO (10 μ M)

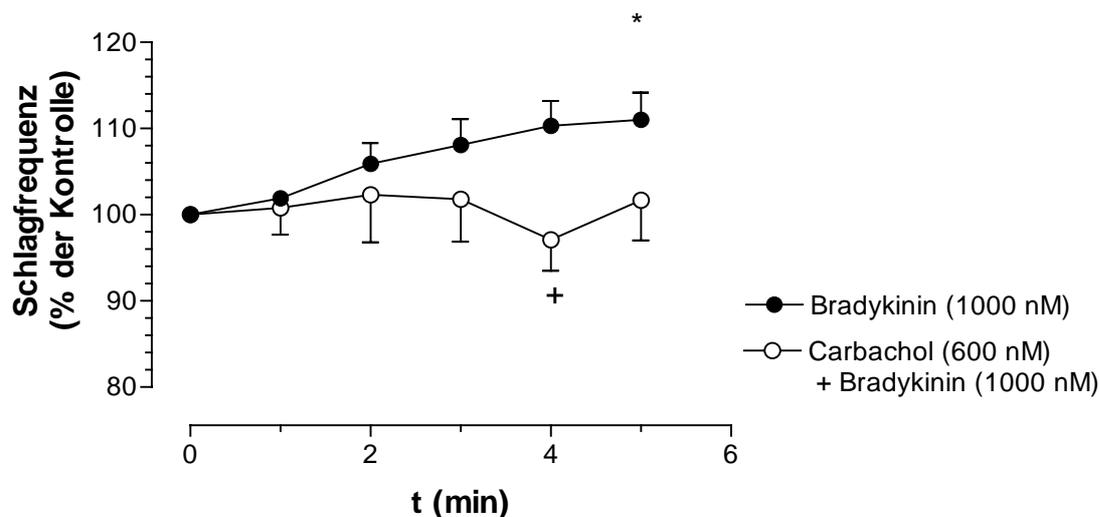


Abb. 17: Beeinflussung der Bradykinin-vermittelten Frequenzsteigerung durch Carbachol. Inkubation mit Bradykinin (1000 nM) bewirkte eine Frequenzsteigerung am Sinusknoten von 11%, während eine 10minütige Vorinkubation mit Carbachol (600 nM) diesen Anstieg nahezu komplett unterdrückte, wobei die Frequenz nur noch um maximal 2,3% stieg.

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 253,4 \pm 13,9 Schläge/min (n = 5).

Kontrollwert nach Waschen von Bradykinin und Gabe Propranolol (100 nM) und Captopril (300 nM):

100% \cong 280,4 \pm 21,91 Schläge/min (n=5)

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM), Captopril (300 nM) und Carbachol (600 nM):

100% \cong 107,64 \pm 9,8 Schläge/min (n=5)

* $p < 0,05$ Bradykinin (1000 nM) vs. Kontrolle

+ $p < 0,05$ Carbachol (600 nM) + Bradykinin (1000 nM) vs. Bradykinin (1000 nM)

Bei Vorinkubation mit N-EM (n=11) ließ sich ein konzentrationsabhängiger positiv chronotroper Effekt nachweisen. Während eine Konzentration von 1 μ M nahezu keinen Einfluss auf die Schrittmacherfrequenz hatte, stieg diese bei 3 μ M um 2%, bei 10 μ M um 7% bezogen auf den Ausgangswert (s. Abb.18). Weiterhin ließ sich nach Applikation von DEA/NO (10 μ M) in Gegenwart von 10 μ M N-EM ein positiv chronotroper Effekt mit einer maximalen Zunahme der Schlagfrequenz um 9,2% bezogen auf den Ausgangswert erzielen (s. Abb. 19).

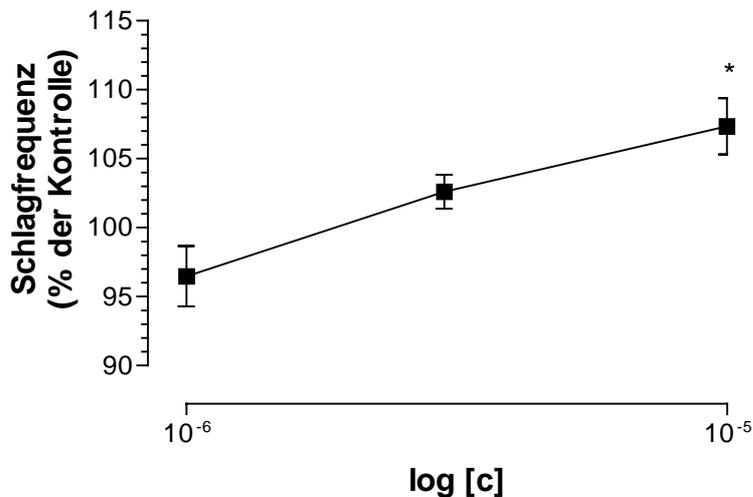


Abb. 18: Chronotrope Effekte von N-EM. Applikation von N-EM in aufsteigenden Konzentrationen bewirkte eine Frequenzzunahme um bis zu 7% bezogen auf den Ausgangswert (* $p < 0,05$ N-EM 1, 3 und 10 μ M vs Kontrolle).

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM):

100% $\cong 289,5 \pm 11,1$ Schläge/min (n = 12)

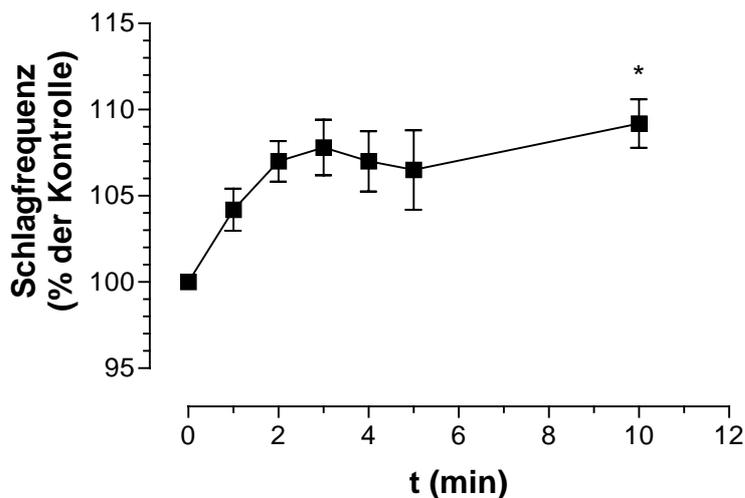


Abb. 19: Positiv chronotroper Effekt von DEA/NO (10 μ M) unter der Einwirkung von N-EM. Nach Vorbehandlung mit N-EM (10 μ M; Frequenzanstieg nach alleiniger N-EM – Applikation = 7%) und nachfolgender Applikation von DEA/NO (10 μ M) stieg die Frequenz um maximal 9% bezogen auf die Kontrollfrequenz (* $p < 0,05$ DEA/NO (10 μ M) vs. N-EM (10 μ M)).

Kontrollwert nach Gabe von Propranolol (100 nM) und N-EM (10 μ M):

100% $\cong 317,7 \pm 11,0$ Schläge/min (n=9)

3.8.Nebivolol-Versuchsreihe

Untersucht wurden der Einfluss des β -Blockers Nebivolol auf die Schrittmacherfrequenz sowie eine mögliche Modulation desselben durch DEA/NO und L-NMMA. Eingesetzt wurde der β -Blocker in Konzentrationen von 10, 30, 100 und 300 nM wobei die Frequenz jeweils über insgesamt 16 min alle 2 min registriert wurde. Der gleiche Versuch wurde nach 15minütiger Vorinkubation mit L-NMMA (3 mM) durchgeführt, welches alleine zu keinem signifikanten chronotropen Effekt führte, ebenfalls mit 2minütiger Registrierung, wobei jedoch keine signifikante Änderung der Spontanfrequenz induziert wurde (s. Abb. 20). Der Abfall der Schlagfrequenz ist bei diesem Versuch wohl auf die lange Versuchsdauer sowie diverse Waschvorgänge zurückzuführen.

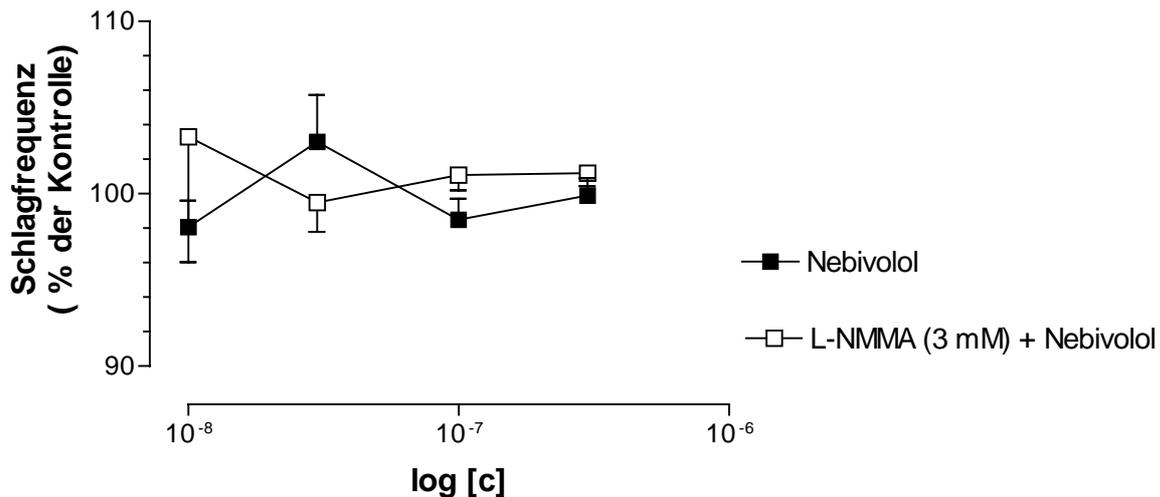


Abb. 20: Einfluss von Nebivolol auf die Sinusknotenfrequenz. Alleinige Applikation von Nebivolol induzierte keine signifikante Änderung der Schrittmacherfrequenz. Auch vorhergehende Behandlung mit L-NMMA (3 mM) und anschließende Applikation von Nebivolol in aufsteigenden Konzentrationen von 10 – 300 nM brachten keinen signifikanten chronotropen Effekt.

Kontrollwert:

100% \cong 259,0 \pm 15,3 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Waschen von Nebivolol:

100% \cong 210,9 \pm 11,54 Schläge/min (n=12)

Kontrollwert nach Gabe von L-NMMA (3 mM):

100% \cong 207,2 \pm 25,9 Schläge/min (n=12)

Der DEA/ NO-induzierte Anstieg der Schlagfrequenz nach Vorinkubation mit Nebivolol (10 μ M) und L-NMMA (3 mM) betrug maximal 5% bezogen auf den Kontrollwert, zeigte also keine Veränderung gegenüber dem positiv chronotropen Effekt von DEA/NO unter L-NMMA in Abwesenheit des β -Blocker Nebivolol (s. Abb. 21 und Abb.2).

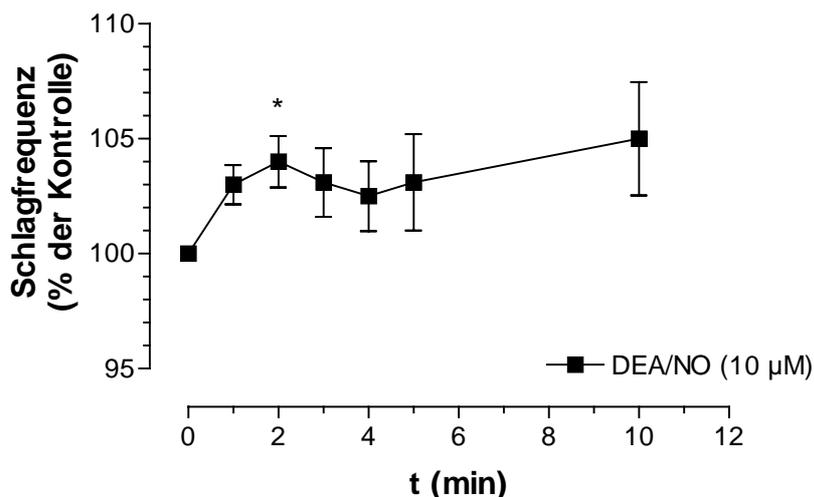


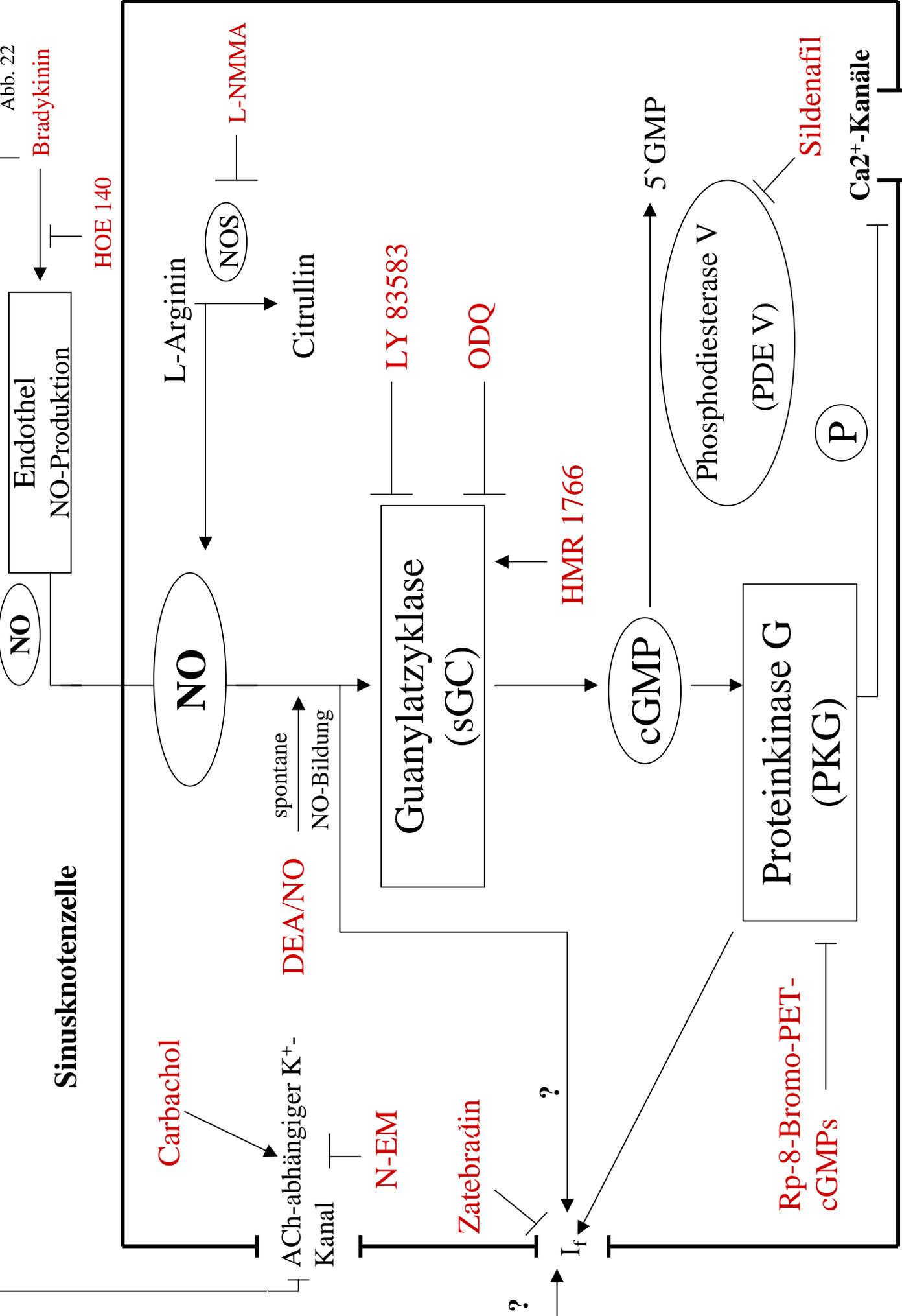
Abb.21: Positiver chronotroper Effekt von DEA/NO (10 μ M) nach Vorinkubation mit L-NMMA (3 mM) und Nebivolol (10 μ M). Applikation von DEA/NO nach einer Vorbehandlung mit L-NMMA und Nebivolol bewirkte einen Anstieg der Schrittmacherfrequenz um 5%.

Kontrollwert nach Gabe von L-NMMA (3 mM) und Nebivolol (10 nM):

100 % \cong 207,2 \pm 25,9 Schläge/min (n=9)

* $p < 0,05$ DEA/NO (10 μ M) vs L-NMMA (3 mM) + Nebivolol (10 nM)

Sinusknotenzelle



4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den chronotropen Wirkungen von Stickstoffmonoxid am isolierten Sinusknotenpräparat der Maus. Die Versuche zeigten, dass exogene NO-Donatoren einen Anstieg der Herzfrequenz um rund 7,5% induzierten. L-NMMA als Inhibitor der endothelialen NO-Synthase konnte den Effekt zwar um 4% im Vergleich zum Ausgangswert abschwächen, jedoch nicht völlig unterdrücken. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der positiv chronotrope Effekt am isolierten Vorhofpräparat aus 2 Komponenten besteht (s. Abb.22): Zum einen aus der direkten Wirkung des exogen zugeführten NO, welches aus dem NO-Donator DEA/NO spontan freigesetzt wird, und zum anderen aus einer Komponente, die auf die endogene NO-Bildung mittels der eNOS zurückzuführen ist. Über letzteren Mechanismus lässt sich der verminderte Anstieg der Herzfrequenz durch NO nach Vorinkubation mit L-NMMA erklären (vgl. Abb. 22).

In ersten Untersuchungen zur Wirkung von endogenem NO an neonatalen Kardiomyozyten von Ratten hatte der NOS-Inhibitor L-NMMA keinen Einfluss auf die basale Schlagfrequenz (Balligand et al., 1993). Zwar beobachteten Kojda et al. (1997) am flusskonstant perfundierten Rattenherzen bei Applikation von L-NOARG und Methylenblau einen negativ chronotropen Effekt, dagegen veränderten auch höhere Konzentrationen von L-NMMA die Herzfrequenz nicht. Beim Einsatz des NOS-Inhibitors L-NAME wurde am isolierten Herzen der Ratte eine deutliche Reduktion der Herzfrequenz beobachtet (Pabla et al., 1995). Umgekehrt konnte bei Tieren ohne eNOS-Gen eine signifikante Bradykardie beobachtet werden, die durch orale Gabe eines NO-Synthaseinhibitors noch verstärkt wurde (Sheseley et al., 1996).

Um den Signaltransduktionsweg von NO, welcher zur positiv chronotropen Wirkung führt, genauer zu untersuchen, wurden Inhibitoren der löslichen Guanylatzyklase wie ODQ und LY 83583 eingesetzt (s. Abb. 22). Studien mit LY 83583 zeigten, dass die Substanz den cGMP-Spiegel über einen unbekanntem Mechanismus senkte (Schmidt et al., 1985; Diamond and Chu, 1985; MacLeod et al., 1987). Mülsch et al. wiesen nach, dass LY 83583 seine Wirkung über eine Inhibition der sGC vermittelt. In den vorliegenden Versuchen zeigte LY 83583 als Eigeneffekt eine leichte Senkung der Spontanfrequenz um 1,3%, war jedoch ohne Wirkung auf den DEA/NO-induzierten positiv chronotropen Effekt. Eventuell könnten auch anderweitige Effekte von LY 83583 eine Rolle spielen, wie beispielsweise der Freisetzung

von Sauerstoffradikalen, welche den NO-abhängigen Signaltransduktionsweg beeinflussen könnten. Der Effekt nach ODQ-Applikation dagegen war eindeutig: DEA/NO induzierte einen Anstieg der Schrittmacherfrequenz um max. 8,5%, nach Vorinkubation mit ODQ dagegen nur noch um max. 4,1%. Da die Inhibition der Guanylatzyklase eine deutliche Abschwächung des NO-induzierten positiv chronotropen Effektes bewirkte, dürfte cGMP am Signalweg unmittelbar beteiligt sein. Es scheint jedoch noch weitere beteiligte Mechanismen zu geben, da der NO-Effekt durch ODQ nicht komplett unterdrückt werden konnte. Der gezeigte Einfluss von ODQ steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer Untersuchung, bei welcher ODQ am flusskonstant perfundierten Rattenherz keinen Effekt auf die Herzfrequenz zeigte, so dass eine Beteiligung der sGC mit nachfolgender Produktion von cGMP fragwürdig erschien (Kojda et al. 1997). Dagegen wiesen Musialek et al. (1997) eine solche Beteiligung der sGC an dem positiv chronotropen Effekt von NO am isolierten Meerschweinchenvorhof mittels Applikation der sGC-Inhibitoren ODQ und LY 83583 sowie des NO-Donors SIN-1 nach.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit ein Guanylatzyklase-Aktivator, HMR 1766, eingesetzt, um den Guanylatzyklase/ cGMP-Einfluss auf die Spontanfrequenz des Sinusknotens zu untersuchen (vgl. Abb. 22). Inkubation mit HMR 1766 steigerte die Schlagfrequenz um 5,9%. Eine gleichzeitige Applikation von Sildenafil zur Hemmung der PDE V konnte diesen positiv chronotropen Effekt nicht zusätzlich steigern. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Vorbehandlung mit ODQ (Hemmung der GC) und nachfolgender Applikation von HMR 1766 keine Frequenzsteigerung mehr. Der vorher induzierbare positiv chronotrope Effekt des Guanylatzyklase-Aktivators wurde komplett unterdrückt und die Schlagfrequenz sank sogar signifikant um 2,4%. Dies weist auf die Beteiligung der Guanylatzyklase an der Frequenzregulation hin. Eine zusätzliche Hemmung der PDE V mittels Sildenafil führte möglicherweise deshalb zu keinem weiteren Frequenzanstieg, weil bereits ein maximaler regulärer cGMP-Pool vorlag, so dass ein Inhibitor der PDE V und somit ein hemmender Einfluss auf den Abbau von cGMP zu 5`GMP (5`Guanosinmonophosphat) keine zusätzliche Wirkung auf die Schrittmacherfrequenz ausüben konnte. Dagegen hob ODQ die Aktivierung der Guanylatzyklase mittels HMR 1766 nicht nur auf, sondern zeigte eine zusätzliche Inhibition, so dass die Frequenz um 2,4% sank.

Ferner wurde Rp-8-Bromo-PET-cGMPs zur kompetitiven Hemmung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G1 β eingesetzt. Diese Substanz erwies sich als gut geeignet zur Untersuchung

der Rolle der PKG in intaktem Gewebe (Butt et al., 1994), und ist einer der potentesten und selektivsten Inhibitoren der PKG, wodurch sie sich besonders gut zur Unterscheidung der cGMP- und cAMP-abhängigen Signalwege eignet (Butt et al. 1995). Die cGMP-abhängige PKG ist eines von verschiedenen cGMP-regulierten Proteinen zur Vermittlung der intrazellulären Effekte von cGMP (Walter, 1989; Lincoln and Cornwell, 1993; Butt et al., 1993). Es ist denkbar, dass exogen zugeführtes NO die Guanylatzyklase aktiviert und dies über eine gesteigerte cGMP-Produktion zu einer Aktivierung der PKG führt. Bei alleiniger Applikation von Rp-8-Bromo-PET-cGMPs ließ sich in den Versuchen dieser Arbeit keine signifikante Modulation der Schrittmacherfrequenz beobachten. Erst nach anschließender Applikation von DEA/NO zeigte sich, dass durch Rp-8-Bromo-PET-cGMPs der DEA/NO-induzierte Anstieg der Schlagfrequenz noch um weitere 2,8% signifikant gesteigert werden konnte. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Vermutung, dass eine cGMP-abhängige Proteinkinase zu einer Umsetzung der intrazellulären Effekte von cGMP beitragen soll. Möglich wäre, dass cGMP bei der Vermittlung der positiv chronotropen Effekte von NO auf anderem Wege als über die genannte Proteinkinase wirksam wäre, so z.B. über einen direkten Angriff am I_f -Kanal.. Dass cGMP als Mediator für den NO-induzierten Anstieg der Herzfrequenz eine Rolle spielen könnte, ist bereits seit einigen Jahren Gegenstand verschiedener Studien. Eine Untersuchung am isolierten Sinusknoten des Meerschweinchens zeigte, dass niedrige Konzentrationen (10 nM bis 10 μ M) von NO-Donatoren wie SNAP, SNP und SIN-1 die Schlagfrequenz um 30% steigerten, dagegen höhere Konzentrationen zu einem negativ chronotropen Effekt führten (Musialek et al., 1997). Beide Effekte waren cGMP abhängig, was eine Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase bei der Regulation der Herzfrequenz vermuten liess. Weitere Experimente dieser Studie mittels Patch-clamp-Technik zeigten, dass der positiv chronotrope Effekt von NO durch Stimulation des I_f -Kanals vermittelt wird. Musialek et al. (2000) untersuchten den cGMP- I_f -vermittelten positiv chronotropen Effekt von exogenem NO genauer. Unter einer Inhibition der Phosphodiesterase III (PDE III) mittels Milrinon bzw. Trequinsin sowie der Proteinkinase A (PKA) mittels KT 5720 bzw. H-89 führte der NO-cGMP-Signalweg zu einem I_f -vermittelten positiv chronotropen Effekt. Der Einfluss auf I_f erfolgte zum einen durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, zum anderen durch vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Somit stehen die Ergebnisse der vorliegende Arbeit, die eine Beteiligung der Guanylatzyklase und von cGMP bei der Vermittlung des positiv chronotropen Effektes von NO wahrscheinlich erscheinen lassen, im Einklang mit den Ergebnissen der in letzter Zeit publizierten Studien.

Da sich jedoch über Inhibitoren der sGC die NO-induzierten positiv chronotropen Effekte nicht vollständig unterdrücken ließen, ist anzunehmen, dass ein weiterer, von cGMP unabhängiger Mechanismus an der Frequenzmodulation beteiligt ist. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit die sGC-Inhibitoren LY 83583 und ODQ jeweils nur in einer Konzentration eingesetzt wurden, so dass die Guanylatzyklase bei dieser Konzentrationsstufe evtl. nicht komplett gehemmt wurde.

Zur Untersuchung eines möglichen weiteren Signaltransduktionsweges wurde der Einfluss von DEA/NO auf den Schrittmacherkanal I_f untersucht, der eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Sinusknotenaktivität (Denyer and Brown, 1990; Irisawa et al., 1993; Di Francesco, 1995) sowie bei der Vermittlung der chronotropen Antwort bei autonomer Aktivierung (Di Francesco et al., 1995) spielt (vgl. Abb. 22). Inhibition dieses Kanals und nachfolgende Applikation von DEA/NO zeigte, dass kein positiv chronotroper Effekt mehr über den NO-Donator induzierbar war. Die Schrittmacherfrequenz sank sogar um max. 8,4% verglichen mit dem Ruhewert. Möglich wäre auch, dass der Zatebradin-Effekt noch nicht im steady state war und der DEA/NO-Effekt so unterbunden wurde. Jedoch scheint die positive Chronotropie von NO z.T. sicherlich über den I_f -Kanal vermittelt zu werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Studie von Musialek et al. (1997). Auch hier wurde die Rolle des I_f -Kanals beim NO-vermittelten Anstieg der Herzfrequenz an isolierten Meerschweinchenvorhöfen untersucht. Blockade des I_f mittels ZD 7288 und Cs^+ verhinderten den positiv chronotropen Effekt der NO-Donatoren SNP und SIN-1, so dass in dieser Studie der Schluss gezogen wurde, dass der NO-vermittelte positiv chronotrope Effekt zum einen auf einer Modulation von I_f beruht und zum anderen für beide NO-Donatoren gleich zu sein scheint. Beim Einsatz eines membranlöslichen cGMP-Analogons (8-Bromo-cGMP) konnte in steigenden Konzentrationen ein positiv chronotroper Effekt nachgewiesen werden. Di Francesco (1995) demonstrierte ebenfalls, dass I_f durch cGMP konzentrationsabhängig stimuliert wird. Diese Ergebnisse untermauern die Annahme, dass Aktivierung des NO-cGMP- I_f -Transduktionsweges für die chronotropen Effekte von NO-Donatoren verantwortlich ist und steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Möglich ist, dass NO zumindest zum Teil direkt am I_f -Kanal angreift, d.h. ohne Beteiligung weiterer Signaltransduktionskomponenten und parallel zu der cGMP-vermittelten Modulation des I_f -Kanals.

Schließlich wurde untersucht, ob sich der positiv chronotrope Effekt von NO durch die Modulation Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanäle (I_{KACH}) beeinflussen lässt. Diesen Kanälen wird nach Aktivierung durch Acetylcholin eine hyperpolarisierende Wirkung sowie ein negativ chronotroper Effekt zugeschrieben. Die Bradykardie nach ACh-Applikation in niedrigen Konzentrationen ist zusätzlich auf eine Inhibition des I_f über eine Abnahme der Adenylatzyklaseaktivität und nachfolgende Inhibition der cAMP-Produktion zurückzuführen (DiFrancesco 1995). Um diesen Transduktionsweg nach Applikation von NO-Donatoren zu untersuchen, wurde Carbachol als Aktivator dieser K^+ -Kanäle eingesetzt. Bei Vorinkubation mit dieser Substanz zeigte sich ein stark ausgeprägter negativ chronotroper Effekt mit einem Abfall der Schlagfrequenz auf bis zu 58% des Ausgangswertes, wobei sich nach 10 Minuten ein steady state einstellte. Nachfolgende Applikation von DEA/NO führte nun nicht mehr zu einem Anstieg der Schrittmacherfrequenz, sondern die Frequenz sank weiter um max. 8% bezogen auf den Kontrollwert. Der durch das Carbachol aktivierte I_{KACH} und die daran gekoppelte Hyperpolarisation der Schrittmacherzelle erschwerten die I_f -abhängige diastolische Depolarisation der Sinusknotenzelle über den NO – cGMP - Signaltransduktionsweg, so dass jetzt kein positiv chronotroper Effekt sichtbar wurde. Dagegen führte Applikation von N-EM als Inhibitor des I_{KACH} mit nachfolgender Steigerung der diastolischen Depolarisationsgeschwindigkeit schon bei alleiniger Inkubation zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Herzfrequenz um bis zu 7%. Zusätzliche Applikation von DEA/NO konnte diesen Effekt nur minimal weiter steigern (Anstieg der Herzfrequenz um bis zu 9,2% des Ausgangswertes). Ursache hierfür könnte sein, dass die Kalium-Kanäle durch die Vorinkubation mit N-EM bereits so weit aktiviert wurden, der Maximalwert somit bereits erreicht war, dass keine weitere Schrittmacheraktivierung durch das DEA/NO mehr möglich war.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass exogenes NO zu einem Anstieg der Spontanfrequenz führt. Darüber hinaus wirkt die Hemmung der endogenen NO-Produktion mit dem eNOS-Inhibitor L-NMMA negativ chronotrop. Um zu überprüfen, inwieweit vom Endothel freigesetztes NO an der endogenen NO-Produktion teilnimmt, wurde Bradykinin eingesetzt, welches schon seit Jahren aufgrund seiner Vasodilatation, vermittelt über die endothelabhängige Freisetzung von NO und Prostacyclinen unter Aktivierung des B_2 -Rezeptors, Gegenstand von Untersuchungen ist (Sung et al., 1988) (s. Abb. 22). Bradykinin-Wirkungen können mit Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms, das für den proteolytischen Abbau von Bradykinin sorgt, verstärkt werden. Die Freisetzung von

Bradykinin erfolgt u.a. im ischämischen Myokard und verringert die Arrhythmieeigung (Kimura et al., 1973; Linz et al., 1990; Chahine et al., 1993). Die kardioprotektiven Effekte werden einer Verbesserung der Herzfunktion, einem Anstieg des Blutflusses und/oder einer Modulation der Noradrenalin Freisetzung, vermittelt über eine Aktivierung des Bradykinin B₁-Rezeptors, zugeschrieben (Chahine et al., 1993).

Bereits frühere Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss von Bradykinin auf die Herzfrequenz. So wurde gezeigt, dass intravenöse oder lokale Applikation der Substanz am Epikard des Kaninchenherzens zu einem Anstieg der Schlagfrequenz führten (Nakamo et al., 1965; Staszewska-Barczak et al., 1976), was im Einklang mit Untersuchungen von Nakashima et al. aus dem Jahre 1982 am isolierten Meerschweinchenvorhof steht. Andererseits gab es auch Berichte, denen zufolge eine intrakoronare Injektion von Bradykinin zu einem Abfall der Herzfrequenz an autonom blockierten und anästhesierten Hunden führte (Neto et al., 1974; Ribout et al., 1993). Demnach sind die chronotropen Effekte von Bradykinin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* kontrovers.

Schon vor einigen Jahren wurden 2 Bradykinin-Rezeptor-Subtypen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften identifiziert (Regoli und Barabé., 1980; Hall, 1992). So wird dem B₂-Rezeptor die Vermittlung von Vasodilatation, Schmerz, Bronchokonstriktion und Entzündung zugeschrieben, wohingegen der B₁-Subtyp in pathophysiologische Prozesse chronischer Entzündungen einbezogen zu sein scheint. Die gut untersuchten vasodilatatorischen Effekte sind klar endothelabhängig und basieren auf einer B₂-Rezeptor-Aktivierung mit nachfolgender NO- oder Prostazyklinfreisetzung (Sung et al. 1988). Li et al. beschäftigten sich 1998 ebenfalls mit chronotropen Effekten von Bradykinin und konnten in ihrer Arbeit einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Schlagfrequenz am isolierten Rattenvorhof nachweisen, ohne dass die Kontraktionskraft beeinflusst zu werden schien. Mittels selektiver Inhibitoren der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen identifizierten sie den Bradykinin B₂-Rezeptor als verantwortlich für die positive Chronotropie.

Auch in der vorliegenden Arbeit ging es um die chronotropen Effekte von Bradykinin, speziell vor dem Hintergrund, dass eine endothelabhängige Stimulation der endogenen NO-Produktion durch Bradykinin bei der Modulation der Sinusfrequenz zu berücksichtigen ist. Um einen zu schnellen Abbau zu vermeiden, wurde Bradykinin erst nach Vorinkubation mit dem ACE-Hemmer Captopril appliziert. Captopril alleine führte zu keiner Modulation der

Herzfrequenz. Bradykinin bewirkte einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt. Dies steht im Einklang mit vielen früheren Studien (Nakashima et al., 1982; Tesfamariam et al., 1995).

Auch am isolierten Vorhof der Maus konnte in der vorliegenden Arbeit der Bradykinin B₂-Rezeptor als relevant für den positiv chronotropen Effekt nachgewiesen werden. Während es nach alleiniger Applikation von Bradykinin zu einem Anstieg der Schlagfrequenz um 10,5% kam, wurde dieser Effekt nach Vorbehandlung mit dem B₂-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 nahezu komplett unterdrückt. Eine Vorbehandlung mit L-NMMA und nachfolgende Bradykinin-Applikation zeigte hingegen, dass der Bradykinin-induzierte Anstieg der Herzfrequenz nur zum Teil über eine endogene NO-Produktion der eNOS vermittelt wird, da der Effekt durch L-NMMA als Inhibitor dieses Enzyms nur zu einer Abschwächung des Herzfrequenzanstiegs um 2% führte. Genau dieses Fehlen eines signifikanten Einflusses eines NO-Synthase-Hemmers (in diesem Fall L-NAME) führten auch Li et al. 1998 zu der Vermutung, dass NO bei dem Bradykinin-induzierten positiv chronotropen Effekt keine Rolle spiele. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Tesfamariam et al. 1995, da Indomethacin und L-NMMA keinen Einfluss auf die positive Chronotropie von Bradykinin am isolierten Meerschweinchen-Vorhof hatten. Demgegenüber schienen vasoaktive Peptide wie Substanz P und Calcitonin gene-related peptide (CGRP), die nach einer Studie von Geppetti et al. (1993) durch Bradykinin freigesetzt werden, an der Vermittlung des positiv chronotropen Effektes von Bradykinin beteiligt zu sein. CGRP induziert im Meerschweinchenvorhof einen positiv chronotropen Effekt (Franco-Cereceda et al., 1985).

Die vorliegende Arbeit lässt zwar auch nur einen minimalen Einfluß des eNOS-Inhibitors L-NMMA auf die positive Chronotropie von Bradykinins erkennen, doch ist die Beteiligung von NO und dem Guanylatzyklase-Weg nicht völlig ausgeschlossen. So wurde geprüft, ob der Guanylatzyklase-Weg bei der Bradykinin-induzierten Steigerung der Schlagfrequenz eine Rolle spielt. Wiederum kamen Inhibitoren der löslichen GC wie ODQ und LY 83583 zum Einsatz. Das Ergebnis war jedoch nicht eindeutig. Eine vorangehende Inkubation mit LY 83583 schwächte die durch nachfolgende Bradykinin-Applikation induzierte Frequenzsteigerung (ohne LY 83583 um 18,3%) signifikant ab. Somit scheint LY 83583 als Inhibitor der sGC die positiv chronotrope Wirkung von Bradykinin abzuschwächen, was eine Beteiligung von cGMP als Mediator wahrscheinlich macht.

Anders das Ergebnis nach Vorbehandlung mit ODQ. Hier ließ sich durch die nachfolgende Bradykinin-Applikation ein weiterer Anstieg der Frequenz um zusätzlich 3,9% beobachten. Warum ODQ, anders als bei den Versuchen mit DEA/NO als exogenem NO-Donator eine Frequenzsteigerung bewirkte, ist zur Zeit unklar.

Bradykinin aktiviert nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über den Bradykinin B₂-Rezeptor die NO-Produktion im Gefäßendothel, welche dann wiederum in der Sinusknotenzelle zum Teil über den cGMP- Guanylatzyklase-Weg zu einer positiven Chronotropie führt, wobei auch eine direkte Schrittmacheraktivierung durch Bradykinin nicht ausgeschlossen scheint.

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine selektive Inhibition der PDE V einen Einfluss auf die Frequenzsteigerung durch Bradykinin hat. Aus diesem Grund wurde erst mit Sildenafil für die Dauer von 15 min vorinkubiert und anschließend Bradykinin appliziert. Sildenafil allein zeigte schon während der Vorinkubation eine signifikante Frequenzsteigerung von 282,8 auf 305,0 Schläge/min (7,9%). Ausgehend von diesem erhöhten Ausgangsniveau konnte keine weitere Steigerung durch Bradykinin erreicht werden. Stattdessen sank der Anstieg von 112,4% der Kontrolle in Abwesenheit von Sildenafil auf 106,3% in Gegenwart von Sildenafil. Wiederum muss bei der Interpretation dieses Ergebnisses das höhere Ausgangsniveau nach der Vorinkubation mit Sildenafil beachtet werden. Vor diesem Hintergrund darf der weniger stark ausgeprägte positiv chronotrope Effekt von Bradykinin nicht unterschätzt werden.: Die Sinusknotenfrequenz wird durch den PDE V- Hemmer schon so deutlich erhöht, dass der potentielle Frequenzanstieg durch Bradykinin geringer ausfällt.

Nach Inkubation mit Sildenafil und ODQ sowie nachfolgender Bradykinin-Applikation wurde der positiv chronotrope Effekt von Bradykinin nahezu vollständig aufgehoben. Allerdings zeigte sich nach Vorinkubation mit Sildenafil und ODQ ein noch stärkerer Anstieg der Spontanfrequenz ausgehend von der Ausgangsfrequenz von 317,6 Schlägen/min auf 331,0 Schläge/min als nach alleiniger Sildenafil-Applikation auf 305,0 Schläge/min. Die Sinusknotenfrequenz war vor der nachfolgenden Bradykinin-Applikation schon so stark angestiegen, das Ausgangsniveau somit schon so viel höher, dass der Bradykinin-induzierte positiv chronotrope Effekt evtl. maskiert wurde. Dennoch weisen auch diese Ergebnisse darauf hin, dass cGMP an der Signaltransduktion beim Bradykinin-induzierten positiv chronotropen Effekt beteiligt ist, auch wenn der Bradykinin-Effekt aufgrund der vorausgegangenen Steigerung der Spontanfrequenz nicht so deutlich hervortrat

Um die Rolle des I_f -Kanals für den Bradykinin-Effekt genauer zu beurteilen, wurde analog zu den Versuchen mit exogenen NO-Donatoren Zatebradin als Inhibitor des Schrittmacherkanals eingesetzt (s. Abb. 22). Ähnlich wie bei den Versuchen mit DEA/NO ließ sich auch hier nach Vorinkubation mit Zatebradin eine nahezu vollständige Inhibition des positiv chronotropen Effektes von Bradykinin beobachten. Somit steht dieses Ergebnis im Einklang mit den vorher beschriebenen Versuchen, die auf eine direkte Schrittmacherkanal-Stimulation von Bradykinin hindeuten.

Neben diesen 3 Komponenten, welche sich als maßgeblich an der Vermittlung des Bradykinin-induzierten Anstieges der Herzfrequenz beteiligt erwiesen, nämlich die Stimulation der eNOS (allerdings nur in einem sehr beschränkten Umfang), die Aktivierung der sGC mit nachfolgender cGMP-Produktion sowie der direkte Angriff am Schrittmacherkanal I_f , scheint es noch weitere beteiligte Strukturen zu geben, da sich der positiv chronotrope Effekt durch selektive Ausschaltung der einzelnen Komponenten nie völlig unterdrücken ließ.

Um zu prüfen, ob die positiv chronotrope Wirkung von Bradykinin mit der Modulation atrialer K^+ -Kanäle in Verbindung steht, wurden Versuche durchgeführt, in denen Carbachol als Aktivator der ACh-abhängigen K^+ -Kanäle eingesetzt wurde. Ähnlich wie bei Applikation von DEA/NO fand sich auch bei Bradykinin-Applikation nach vorausgegangener Inkubation mit Carbachol ein weitaus geringerer Anstieg der Schlagfrequenz, nämlich statt 11% nur noch 2,3% bezogen auf den Kontrollwert. Die Sinusknotenzellen exprimieren den Einwärtgleichrichter- K^+ -Kanal ($I_{K_{ACh}}$), der durch Bindung von Carbachol an muskarinische M_2 -Rezeptoren aktiviert wird, was zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer führt. Zusätzlich kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellen über einen gesteigerten K^+ -Ausstrom aus den Zellen (Tristani et al., 2001). Zur Wirkung von Bradykinin an diesen Kanälen erschien 1998 eine Arbeit von Sakamoto et al.. Versuche am isolierten Meerschweinchenvorhof zeigten, dass Bradykinin in Übereinstimmung mit früheren Studien (Iven et al., 1980; Nakashima et al., 1982; Tesfamariam et al., 1995) einen positiv inotropen und chronotropen Effekt induzierte. Speziell in bezug auf die Steigerung der Herzfrequenz konnte gezeigt werden, dass Bradykinin den Carbachol- und Adenosin-aktivierten $I_{K_{ACh}}$ inhibierte. Dieser hemmende Effekt konnte nach Vorinkubation mit HOE 140 als selektivem Bradykinin- B_2 -Rezeptor-Antagonisten nicht mehr beobachtet werden. So erscheint es wahrscheinlich, dass der inhibitorische Effekt über eine B_2 -Rezeptorstimulation vermittelt

wird. Auch die Proteinkinase C-Aktivierung und evtl. eine Tyrosinkinase-Aktivierung könnten demnach bei der B_2 -vermittelten $I_{K_{ACH}}$ -Inhibierung eine Rolle spielen. Vor diesem Hintergrund betrachtet entsprechen auch die Ergebnisse dieser Arbeit den Überlegungen zum Wirkmechanismus von Bradykinin an den K^+ -Kanälen: Bradykinin inhibiert über Bindung an den Bradykinin- B_2 -Rezeptor den durch Carbachol aktivierten $I_{K_{ACH}}$. Da nur eine, zudem sehr hohe Carbachol-Konzentration eingesetzt wurde, fällt der positiv chronotrope Effekt von Bradykinin nur sehr gering aus.

Neben diesen Versuchen zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von exogenem und endogenem NO auf die Herzfrequenz wurde in der vorliegenden Arbeit der frequenzmodulierende Effekt des β -Blockers Nebivolol in Hinblick auf die Aktivierung des NO-Stoffwechselweges untersucht. Eine Arbeit aus dem Jahre 1995 zeigte einen vasodilatierenden Effekt von Nebivolol auf die Unterarmgefäße durch den L-Arginin-/Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweg auf (Cockcroft et al., 1995). In den Versuchen dieser Arbeit zeigte Vorinkubation mit dem β_1 -selektiven Adrenozeptorantagonisten Nebivolol in Bezug auf eine mögliche Modulation der Herzfrequenz keine signifikanten Änderungen. Auch Vorinkubation mit L-NMMA und nachfolgende Nebivolol-Applikation erbrachte keine Hinweise auf einen Frequenzeinfluss des β -Blockers. Weiterhin brachte auch eine DEA/NO-Applikation nach vorangegangener Inkubation mit Nebivolol keinen frequenzmodulierenden Effekt als die normale DEA/NO-induzierte positive Chronotropie. Somit konnte den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge kein frequenzmodulierender Effekt von Nebivolol über eine Beteiligung des NO-Stoffwechselweges nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der NO-Modulation an isolierten, spontan schlagenden Sinusknoten-Präparaten der Maus mit ihrem Einfluss auf die Herzfrequenz sowie der Mechanismus, über welchen diese Effekte vermittelt werden. Dabei wurden sowohl exogene NO-Donatoren wie DEA/NO eingesetzt als auch die Hemmung der endogenen NO-Produktion zur Untersuchung und Differenzierung dieser Effekte herangezogen. In diesem Zusammenhang spielte Bradykinin eine Rolle, da auch bei Applikation dieser Substanz eine positive Chronotropie zu beobachten war und eine Beteiligung des NO-Signaltransduktionsweges möglich erschien.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kommen zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Durch exogenes NO, appliziert in Form des NO-Donators DEA/NO, lässt sich am isolierten, spontan schlagenden rechten Vorhof der Maus die Sinusknotenfrequenz steigern. Der Mechanismus, über welchen dieser Effekt vermittelt wird, ist a) eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit nachfolgender Steigerung der cGMP-Produktion, und b) ein direkter Angriff am I_f -Kanal. Dazu kommt noch eine indirekte Beeinflussung des Effektes über den I_{KACH} .
- 2.) L-NNMA führte in den vorliegenden Versuchen zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der Sinusknotenfrequenz. Möglicher Grund hierfür ist evtl. eine schon basal sehr geringe endogene NO-Bildung, so dass Applikation des NOS-Inhibitors L-NNMA zu keinem signifikanten chronotropen Effekten führen kann.
- 3.) L-Arginin als Ausgangssubstrat der endogenen NO-Synthese führte nach Applikation zu keiner signifikanten Änderung der Sinusknotenfrequenz. Ein Grund hierfür könnte eine schon vorher bereits erreichte Substratsättigung sein.
- 4.) Der β - Rezeptorenblocker Nebivolol zeigte in den vorliegenden Arbeit keinerlei frequenzmodulierende Eigenschaften. Eine Aktivierung des NO-cGMP-Systems konnte nicht nachgewiesen werden.
- 5.) Bradykinin zeigt ebenso wie exogene NO-Donatoren eine positiv chronotrope Wirkung am isolierten spontan schlagenden rechten Mäusevorhof, die über Bindung an den endothelialen Bradykinin- B_2 -Rezeptor induziert wird. Die Vermittlung dieses Effektes erfolgt wahrscheinlich zum einen über eine Stimulation der endogenen NO-Produktion der eNOS (evtl. spielen hier auch andere NOS-Isoformen eine Rolle) und

zum anderen über eine Inhibierung des $I_{K_{ACh}}$. Aber auch eine direkte Aktivierung des I_f ist nicht auszuschliessen.

- 6.) Sildenafil, ein selektiver Inhibitor der cGMP-abhängigen PDE V, steigerte die Schrittmacherfrequenz bei alleiniger Applikation signifikant und verstärkte auch den DEA/NO-induzierten positiv chronotropen Effekt, was eine Beteiligung von cGMP am NO-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich erscheinen lässt.
- 7.) Carbachol als Aktivator der ACh-abhängigen Kalium-Kanäle führte in den vorliegenden Versuchen zu einem ausgeprägtem negativ chronotropen Effekt, welcher auch nach DEA/NO- Applikation blieb, da die Hyperpolarisation nach Carbachol-Inkubation zu ausgeprägt war um eine Depolarisation der Schrittmacherzelle über den NO-cGMP-Signaltransduktionsweg zu ermöglichen.
- 8.) Zatebradin als Inhibitor der Schrittmacherkanals I_f führte bei alleiniger Applikation zu einer ausgeprägten Frequenzsenkung, welche sich auch durch nachfolgende Gabe von DEA/NO bzw. Bradykinin nicht aufheben liess.

5. Literaturverzeichnis

AHLNER, J.; R. G. G. ANDERSSON; TORFGÅRD, K.; AXELSSON, K.L. (1991).

Organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol. Rev.* 43: 351 – 423

BALLIGAND, J. – L.; KELLY, P. A.; MARSDEN, P. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. (1993)

Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 347 - 351

BALLIGAND, J. – L.; UNGUREANU – LONGROIS, D.; SIMMONS, W. W.; PIMENTAL, D.; MALINSKI, T. A.; KAPTURCZAK, M.; TAHA, Z.; LOWENSTEIN, C. J.; DAVIDOFF, A. J.; KELLY, R. A.; SMITH, T.W.; MICHEL, T. (1994)

Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269: 27580 – 27588

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R.A. (1994)

Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850 – 853

BRADY, A.J.B.; POOLE-WILSON, P.A.; HARDING, S.E.; WARREN, J.B. (1992)

Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 263: H 1963 - 66

BUTT, E.; GEIGER, J.; JARCHAU, T.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. (1993)

The cGMP-dependent protein kinase-gene, protein and function. *Neurochem. Res.* 18: 27 - 42

BUTT, E.; ABEL, K.; KRIEGER, M.; PALM, D.; HOPPE, J.; WALTER, U. (1994)

(Rp)-8-pCPT-cGMPs, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur. J.Pharmacol.* 269: 265 - 268

BUTT, E.; PÖHLER, D.; GENIESER, H. G.; HUGGINS, J. P.; BUCHER, B. (1995)

Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. *Brit. J. Pharm.* 116: 3110 - 3116

CHAHINE, R.; ADAM, A.; YAMAGUCHI, N.; GASPO, R.; REGOLI, D.; NADEAU, R. (1993)

Protectic effects of bradykinin on the ischemic heart: implication of the B₁-receptor. *Br. J. Pharmacol.* 108: 318

CHAPMAN, P.F.; ATKINS, C.M.; ALLEN, M.T.; HALEY, J.E.; STEINMETZ, J.E. (1992)
Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3: 567 - 70

CLEMENTI, E.; MELDOLESI, J. (1997)

The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: A story with a complex past and a promising future. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 266 – 69

COCKCROFT, R.; CHOWIENCZYK, P. J.; BRETT, S. E.; CHEN, C. PL. – H.; DUPONT, A. G.; VAN NUETEN, L.; WOODING, S. J.; RITTER, J. M. (1995)

Nebivolol dilates human forearm vasculature: Evidence for an L-Arginine/NO-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 274:1067 - 1071

DE MARCO, T.; DAE, M.; YUEN-GREEN, M.S.F.; KUMAR, S.; ET AL. (1995)

Iodine123 metaiodobenzylguanidine scintigraphic asesment of the transplanted human heart: evidence for late reinnervation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25: 927 - 31

DENYER, JC; BROWN, HF. (1990)

Pacemaking in rabbit isolated sino-atrial node cells during Cs⁺ block of the hyperpolarization-activated current I_f. *J. Physiol. (Lond).* 429: 401 - 409

DI FRANCESCO, D. (1995)

The onset and autonomic regulation of pacemaker activity: relevance of the f current. *Cardiovasc. Res.* 29: 449 – 456.

DIAMOND, J.; TEN EICK, R. E.; TRAPANI, A. J. (1977)

Are increases in cyclic GMP levels responsible for the negative inotropic effects of acetylcholine in the heart? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 912 - 918

DIAMOND, J.; CHU, E. (1985)

A novel cyclic GMP-lowering agent, LY 83583, blocks carbachol-induced cyclic GMP elevation in rabbit atrial strips without blocking the negative inotropic effect of carbachol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63: 908 - 11

DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. (1990)

Acetylcholine induces Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide- cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 289-293

FEELISCH, M.; NOACK, E. (1987)

Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139: 19-30

FRANCO-CERECEDA, A.; LUNDBERG, J.M. (1985)

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of the heart contractile rate and force. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 331, 146

GAO, Y.; NAGAO, T.; BOND, R.A.; JANSSENS, W.J.; VANHOUTTE, P. (1991)

Nebivolol induces endothelium-dependent relaxation of canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7: 964 - 69

GARTHWAITE, J. (1991)

Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in nervous system. *Trends Neurosci.* 14: 60 - 67

GEPPETTI, P. (1993)

Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.* 47, 1

GROSS, S S; WOLIN, M. S. (1995)

Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737 - 769

HALL, J.M. (1992)

Bradykinin-receptors: pharmacological properties and biological roles [Review] *Pharmacol. Ther.*, Nov. 1992, 56(2): 131 - 90

HARADA, Y.; IKEDA, M.; MURASATO, Y.; ET AL. (2000)

Integrative effects of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor induced by acetylcholine and bradykinin in rat hindquarter perfusion. *Nitric oxide (United States)* 4(4): 354 - 62

HARE, J. M.; KEANEY, J. F. JR.; BALLINGAND, J. L.; LOSCALZO, J.; SMITH, T. W.; COLUCCI, W. S. (1995)

Role of nitric oxide in parasympathetic modulation of beta-adrenergic myocardial contractility in normal dogs. *J. Clin. Invest.* 95: 360-366

HU, H.; CHIAMVIMONVAT, N.; YAMAGISHI, T.; MARBAN, E. (1997)

Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca^{2+} channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ. Res.* 81: 742 - 52

HUNT, N.C.A.; GOLDIN, R.A. (1992)

Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 14: 146 - 50

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. (1987)

Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265-9269

IRISAWA, H.; BROWN, H.F.; GILES, W. (1993)

Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol. Rev.* 73: 197 - 227

IVEN, H.; PURSCHE, R.; ZETLER, G. (1980)

Field-stimulus response of guinea-pig atria as influenced by the peptides angiotensin, bradykinin and substance P. *Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 312(1): 63 - 68

KIMURA, E.; HASHIMOTO, K.; FURUKAWA, S.; HAYAKAWA, S. (1973)

Changes in bradykinin level in coronary sinus blood after the experimental occlusion of a coronary artery. *Am. Heart J.* 85: 635

KIRSTEIN, M.; RIVET-BASTIDE, M.; HATEM, S.; BÉNARDEAU, A.; ET AL. (1995)

Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human myocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 794 - 802

KOJDA, G.; KOTTENBERG, P.; NIX, P.; SCHLÜTER, K. D.; PIPER, H. M.; NOACK, E. (1996)

Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78: 91-101

KOJDA, G.; LAURSEN, J. B.; RAMASAMY, S.; KENT, J. D.; KURZ, S.; SHESELY, E. G.; SMITHIES, O.; HARRISON, D. G. (1997)

Disruption of the eNOS-gen causes hypersensitivity of mouse aorta to vasoconstrictors and glyceryl trinitrate. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355: R 41

KRAUSE, E.G.; HALLE, W.; WOLLENBERGER, A. (1972)

Effect of dibutyryl cyclic GMP on cultured beating rat heart cells. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1: 301 - 305

KREGE, J. H.; HODGIN, J. B.; HAGAMAN, J. R.; SMITHIES, O. (1995)

A noninvasive computerized tail cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25: 1111-15

LECHEVALIER, T.; DOURSOUT, M. F.; CHELLY, J. E.; KILBOURN, R. E. (1994)

Cardiovascular effects of N^G-methyl-L-arginine in chronically instrumented conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 77: 471-475

LEVI, R. C.; ALLOATTI, G.; FISCHMEISTER, R. (1989)

Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 413: 685-87

LEVINE, T.B.; OLIVARI, M.T.; COHN, J.N. (1986)

Effects of orthotopic heart transplantation on sympathetic control mechanisms in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 58: 1035 - 40

LI, Q.; ZHANG, J. ; LORO, J. F.; PFAFFENDORF, M.; VAN-ZWIETEN, P. A. (1998)

Bradykinin B₂-rezeptor-mediated positive chronotropic effect of bradykinin in isolated rat atria. *Card. Pharm. J.* 32: 452-56

LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L. (1993)

Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7: 328 - 38

LINZ, W.; MARTORANA, A.; SCHOLKENS, B.S. (1990)

Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 (Suppl. 66) S99

MAC LEOD, K.M.; NG, D.D.; HARRIS, K.H.; DIAMOND, J. (1987)

Evidence that cGMP is the mediator of endothelium-dependent inhibition of contractile responses of rat arteries to alpha-adrenoceptor stimulation. *Mol. Pharmacol. (United States)* 32(1): 59 - 64

MÉRY, P. F.; PAVOINE, C.; BELHASSEN, L.; PECKER, F.; FISCHMEISTER, R. (1993)

Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 268: 26286-26295

MONCADA, S.; VANE, J. (1979)

Prostacyclin formation and effects. In: *Chemistry and Pharmacology of Prostanoids* (S.M. Roberts and F. Scheinmann, Eds.), pp 258 – 273. Pergamon, Oxford

MONCADA, S.; PALMER, R.J.M.; HIGGS, E.A. (1989)

Biosynthesis of nitric oxide from L-Arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38:1709 – 15

MONCADA, S.; HIGGS, A. (1991)

Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* 21: 361 - 74

MONCADA, S. (1992)

The L-Arginine : nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145: 201 - 27

MONCADA, S.; HIGGS, A. (1993)

Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002 - 2012

MÜLSCH, A.; BUSSE, R.; LIEBAU, S.; FÖRSTERMANN, U. (1988)

LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247/1: 283-287

MUSIALEK, P.; LEI, M.; BROWN, HF; PATERSON, DJ; CASADEI, B. (1997)

Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current I_f .
Circ. Res. 81: 60 - 68

MUSIALEK, P.; NASH, M.; THORNTON, J.; CASADEI, B.; PATERSON, DJ. (2000)

The nitric oxide donor sodium nitroprussid increases heart rate in the absence of changes in arterial blood pressure when applied topically to the sino-atrial node in the anaesthetised pig. *J. Physiol.Lond.* 523 P: 267 - 268

NAKAMO, J. (1965)

Effects of synthetic bradykinin on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 157, 1 - 13

NAKASHIMA, A.; ANGUS, J.A.; JOHNSTON, C.I. (1982)

Chronotropic effects of angiotensin I, angiotensin II, bradykinin and vasopressin in guinea pig atria.
Eur. J. Pharmacol. 81, 479 - 85

NATHAN, C.; XIE, Q. (1994)

Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915 - 18

NETO, F.R.; BRASIL, J.F.C.; ANTONIO, A. (1974)

Bradykinin-induced coronary chemoreflex in the dog. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 283 (2): 135 - 42

ONO, K.; TRAUTWEIN, W. (1991)

Potentialiation by cGMP of β -adrenergic effect on Ca^{2+} current in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)* 443: 387-404

PABLA, R.; CURTIS, M. J. (1995)

Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ. Res.* 77: 9984 - 992

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. (1987)

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. (1988)

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666

PERRSON, K.; Andersson, R.G. (1998)

Biphasic response to bradykinin in isolated porcine iliac arteries is mediated by bradykinin B₁ and B₂ receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 306 - 313

RAFF, W. K.; DRECHSLER, J.; SCHOLTHOLT, J.; LOCHNER, W. (1970)

Herzwirkung des Nitroglycerins. *Pflügers Arch.* 317:336-343

RAND, M.J. (1992)

Nitroergic transmission : nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic, neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19: 147 - 69

REGOLI, D.; BARABÉ, J. (1980)

Kinin receptors. *Methods Enzymol.* 163, 210

RIBOUT, C.; GODIN, D.; COUTURE, R.; REGOLI, D.; NADEAU, R. (1993)

In vivo B₂-receptor-mediated negative chronotropic effect of bradykinin in canine sinus node. *Am. J. Physiol.* 265, H 876; 76 - 79

SAKAMOTO, N.; UEMURA, H.; HARA, Y.; SAITO, T.; MASUDA, Y.; NAKAYA, H. (1998)

Bradykinin B₂-receptor-mediated modulation of membrane currents in guinea-pig cardiomyocytes. *Brit. J. Pharm.* 125: 283 – 292

SCHMIDT, M.J.; SAWYER, B.D., TRUEX, L.L.; ET AL. (1985)

LY 83583: an agent that lowers intracellular levels of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(2): 764 - 69

SHERMAN, M.P.; LORO, M.L.; WONG, V.Z.; TASHKIN, D.P. (1991)

Cytokine- and Pneumocystis carinii-induced L-Arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J. Protozool.* 38: 234S – 236S

SHESELEY, E. G.; MAEDA, N.; KIM, H. S.; DESAI, H. M.; KREGE, J. H.; LAUBACH, V. E.; SHERMAN, P. A.; SESSA, W. C.; SMITHIES, O. (1996)

Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13176-13181

SNYDER, S.H.; BREDET, D.S. (1992)

Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 266: 68 - 77

STAMLER, J.S. (1994)

Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936

STASZEWSKA-BARCZAK, J.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. (1976)

An excitatory nociceptive cardiac reflex elicited by bradykinin and potentiated by prostaglandines and myocardial ischemia. *Cardiovasc. Res.* 10, 314 - 27

SUNG, C.P.; ARLETH, A.J.; SHIKANO, K.; BERKOWITZ, B.A. (1988)

Characterization and function of BK receptors in vascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 8

TESFAMARIAM, B.; ALLEN, G. T.; POWELL, J. R. (1995)

Bradykinin B₂ receptor-mediated chronotropic effect of bradykinin in isolated guinea pig atria. *Eur. J. Pharm.* 281: 17-20

TRISTANI-FIROUZI, M.; CHEN, J.; MITCHESON, J. S.; SANGUINETTI, M. C. (2001)

Molecular biology of K⁺ channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am. J. Med.* 110: 50-59

WALTER, U. (1989)

Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113; 41 - 88

XIE, Y.W.; SHEN, W.Q.; ZHAO, G.; XU, X.B.; ET AL. (1996)

Role of endothelium-derived nitric-oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro – implications for the development of heart failure. *Circ. Res.* 79: 381 – 87

ZAPPELLINI, A.; MORENO, H.JR.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. (1997)

Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anaesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29: 45 - 48

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. U. Borchard für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, besonders Frau Renate Gelhaar und Karin Stöcker, die mich in die Technik der Präparation und des Versuchsaufbaus einführten und mir bei der Präparation der Tiere behilflich waren.

Herrn Dr. D. Hafner danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsdaten und Lösung der damit verbundenen EDV-Probleme.

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Maria Grandoch
Gebdatum/ -ort: 07.06.1978/ Bottrop
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Vater: Dr. med. Gregor Grandoch
Facharzt für Allgemeinmedizin
Mutter: Theodora Grandoch
Apothekerin

Schullaufbahn

1984 – 1988 Konrad-Grundschule Bottrop
1988- 1997 Josef-Albers-Gymnasium Bottrop
Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

Herbst 1997 – Frühjahr 1999 Studium der Zahnmedizin an der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Vorphysikum Frühjahr 1998
Frühjahr 1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Frühjahr 2000 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Frühjahr 2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(1. Staatsexamen)
Frühjahr 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(2. Staatsexamen)
Frühjahr 2004 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
(3. Staatsexamen)

Promotion

07/2000 – 03/ 2004 Erstellung der vorliegenden Arbeit am
Pharmakologischen Institut der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Zum Mechanismus der NO-vermittelten positiv chronotropen Wirkung an isolierten Herzpräparaten der Maus

Medizinische Dissertation von *Maria Grandoch*, 2004

Schon seit einigen Jahren werden die Effekte von Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator an den unterschiedlichsten Prozessen im Körper untersucht. Zunehmend rückt der Einfluss von NO auf die Herzfrequenz neben dem ausgiebig untersuchten modulierenden Effekt auf die myokardiale Kontraktion ins Interesse wissenschaftlicher Studien, wobei sowohl exogene NO-Donatoren als auch Modulatoren der endogenen NO-Synthase (eNOS) eingesetzt werden. Ziel der Untersuchungen war es, an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von Mäuseherzen (Stamm: C 57 black 6) einerseits einen frequenzmodulierenden Effekt durch exogenes NO sowie den dafür verantwortlichen Mechanismus zu untersuchen, andererseits aber auch über eine Modulation der endogenen NO-Produktion eine Beteiligung von NO an der Frequenzregulation am Sinusknoten nachzuweisen. Zusätzlich wurden der Einfluss von Bradykinin, einem Stimulator der endothelialen NOS, auf die Spontanfrequenz des Sinusknotens sowie der zugrunde liegende Signaltransduktionsweg untersucht. Darüber hinaus wurde geprüft, ob der β_1 -selektive-Betarezeptorenblocker Nebivolol, der die glatte Gefäßmuskulatur über eine Stimulation der NO-Produktion dilatieren soll, am Sinusknoten die Schrittmacheraktivität steigert.

Die rechten Vorhöfe wurden hierzu in Organbäder überführt, die spontane Schlagfrequenz registriert und ein steady state im Sinne einer konstanten Schlagfrequenz abgewartet. Dann wurden die Prüfsubstanzen bis zu den gewünschten Endkonzentrationen kumulativ zugegeben und die so induzierten Frequenzänderungen registriert.

Durch exogenes NO (Applikation des NO-Donators DEA/NO) liess sich ein positiv chronotroper Effekt auf die isolierten Sinusknotenpräparate nachweisen, welcher einerseits über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und somit einer Steigerung der Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), zum anderen über einen direkten Angriff am Schrittmacherkanal I_f vermittelt zu werden scheint. Der eNOS-Inhibitor L-NMMA führte zu einer nur geringen Abnahme der Sinusknotenfrequenz, evtl. aufgrund einer schon basal nur sehr geringen endogenen NO-Produktion, so dass die Inhibition nicht signifikant war. Bradykinin zeigte einen über den Bradykinin- B_2 -Rezeptor vermittelten positiv chronotropen Effekt auf den Sinusknoten, wobei eine Stimulation der endogenen NO-Produktion über die eNOS und eine I_{KACH} -Hemmung bei der Vermittlung dieses Effektes eine Rolle spielen dürfte. Ein frequenzmodulierender Effekt von Nebivolol mit Beteiligung des NO-Signaltransduktionsweges konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.