

Aus dem Zentrum für Operative Medizin I
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. E. Gams

**Einfluss der Endothelinrezeptorblockade auf kardiale Funktion und Infarktgröße
im akuten Ischämie-Reperusionsmodell am Kaninchenherzen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Schmidt

2005

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

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schipke

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Picker

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Erklärung der Abkürzungen	8
1. Einleitung	11
2. Material und Methodik	16
2.1 Experimenteller Versuchsaufbau	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 In vivo Präparation	16
2.1.3 Messung der Infarktgröße	17
2.2 Experimentelles Protokoll	17
2.2.1 Messgrößen	17
2.2.2 Ausschlusskriterien	18
2.2.3 Versuchsprotokoll	18
2.3 Pharmakologische Substanzen	19
2.4 Datenerhebung und Statistik	19
3. Ergebnisse	21
3.1. Herzfrequenz	21
3.2. Systolische Größen	22
3.2.1. Maximaler linksventrikulärer Druck	22
3.2.2. Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit	23
3.2.3. Aortenfluss	24
3.2.4. Schlagvolumen	25
3.2.5. Externe Herzarbeit	26

3.3 Diastolische Größen	26
3.3.1. Minimaler linksventrikulärer Druck	26
3.3.2. Minimale Druckänderungsgeschwindigkeit	27
3.4 Kreislaufgrößen	28
3.4.1. Aortendruck	28
3.4.2. Totaler peripherer Widerstand	28
3.5 Infarktgrößen	29
4. Diskussion	31
4.1. Methodenkritik	31
4.2. Einflüsse auf die ventrikuläre Funktion	32
4.2.1. Normoxische Herzen	32
4.2.2. Postischämische Herzen	33
4.3. Einflüsse auf die Hämodynamik und das koronare und periphere Gefäßsystem	34
4.4. Einflüsse auf die Infarktgröße	37
5. Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	43
Danksagung	59
Lebenslauf	60
Abstract	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Modulation der Endothelinbiosynthese und Einfluss von Endothelin auf glatte Muskelzellen	12
Abb. 2:	Signaltransduktion der durch Endothelin vermittelten Kontraktion in glatten Muskelzellen	13
Abb. 3:	Schematische Darstellung der vier Versuchsprotokolle	19
Abb. 4:	Darstellung der Größe der gefährdeten Bereiche und der Infarkte in den gefährdeten Bereichen der einzelnen Versuchsgruppen	30

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Herzfrequenz	22
Tab. 2:	Maximaler linksventrikulärer Druck	23
Tab. 3:	Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit	23
Tab. 4:	Aortenfluss	25
Tab. 5:	Schlagvolumen	25
Tab. 6:	Externe Herzarbeit	26
Tab. 7:	Minimaler linksventrikulärer Druck	27
Tab. 8:	Minimale Druckveränderungsgeschwindigkeit	27
Tab. 9:	Aortendruck	28
Tab.10:	Totaler peripherer Widerstand	29
Tab.11:	Infarktgrößen	29

Erklärung der Abkürzungen

A_i	Infarktgröße
AoF	Aortenfluss
AoP	Aortendruck
AT ₁	Angiotensinrezeptor Subtyp 1
Ca ²⁺	Kalzium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
[Ca ²⁺] _{SR}	Kalziumkonzentration des sarkoplasmatischen Retikulums
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerol
dP/dt	Druckänderungsgeschwindigkeit
dP/dt _{max}	maximale Druckänderungsgeschwindigkeit
dP/dt _{min}	minimale Druckänderungsgeschwindigkeit
ECE	Endothelin Converting Enzyme
ET	Endothelin
ET _A	Endothelinrezeptortyp A
ET _{A1}	Endothelinrezeptortyp A Subtyp 1
ET _{A2}	Endothelinrezeptortyp A Subtyp 2
ET _B	Endothelinrezeptortyp B
ET _{B1}	Endothelinrezeptortyp B Subtyp 1
ET _{B2}	Endothelinrezeptortyp B Subtyp 2
ET _C	Endothelinrezeptortyp C
ET-1	Endothelin Isoform 1
ET-2	Endothelin Isoform 2
ET-3	Endothelin Isoform 3
ET-4	Endothelin Isoform 4
HF	Herzfrequenz

i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LVP _{max}	maximaler linksventrikulärer Druck
LVP _{min}	minimaler linksventrikulärer Druck
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit
PIP ₂	Phosphoinositolbiphosphat
PLC	Phospholipase C
ppET-1	Pre-Pro-Endothelin Isoform 1
SMIF	Smooth muscle derived inhibitory factor
SV	Schlagvolumen
TPR	totaler peripherer Widerstand
W	Externe Herzarbeit



1. Einleitung

Seit der Erstbeschreibung 1988 durch Yanagisawa et al. (1) ist das vasoaktive Peptid Endothelin (ET) Gegenstand intensiver Forschung. Bis heute sind vier verschiedene Isoformen bekannt: ET-1, ET-2, ET-3 (2) und ET-4 (vasoaktiver intestinaler Faktor; (3)). Im Tiermodell wie auch beim Menschen scheint ET-1 die bedeutendste Isoform zu sein. In Gefäßendothelzellen wird mit Hilfe spezifischer Endopeptidase aus Pre-Pro-Endothelin zuerst Big-Endothelin und schließlich mit Hilfe von Endothelin Converting Enzyme (ECE) Endothelin synthetisiert. Die Abgabe von Endothelin erfolgt zu ca. 80 % abluminal an das angrenzende Gewebe (1;4).

Endothelin bindet hauptsächlich an zwei spezifische Rezeptoren, welche von Maggi et al. als ET_A (A für Aorta) und ET_B (B für Bronchus) definiert wurden (5). ET_A -Rezeptoren lassen sich durch kompetitive Hemmung mit dem spezifischen ET_A -Rezeptorblocker BQ123 weiter in ET_{A1} - und ET_{A2} -Rezeptoren unterscheiden (6). ET_A -Rezeptoren kommen größtenteils in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten vor (7). ET_B -Rezeptoren lassen sich hingegen überwiegend in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen finden (8). Auch ET_B -Rezeptoren lassen sich weiter unterteilen: ET_{B1} -Rezeptoren führen durch Freisetzung von NO zu einer Vasodilatation und ET_{B2} -Rezeptoren lösen eine Vasokonstriktion aus (9). Einen in Hautdrüsen von afrikanischen Fröschen (*Xenopus laevis*) gefundenen spezifischen Endothelinrezeptortyp bezeichnet man als ET_C (10). Seine Funktion ist bis heute unbekannt. Über ET_A - und ET_B -Rezeptoren beteiligt sich Endothelin an der Aufrechterhaltung des vasomuskulären Grundtonus (11). Hierbei werden über ET_B -Rezeptoren des Gefäßendothels die Vasodilatation und über ET_A - und ET_B -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskelzellen die Vasokonstriktion gesteuert ((12); Abb. 1).

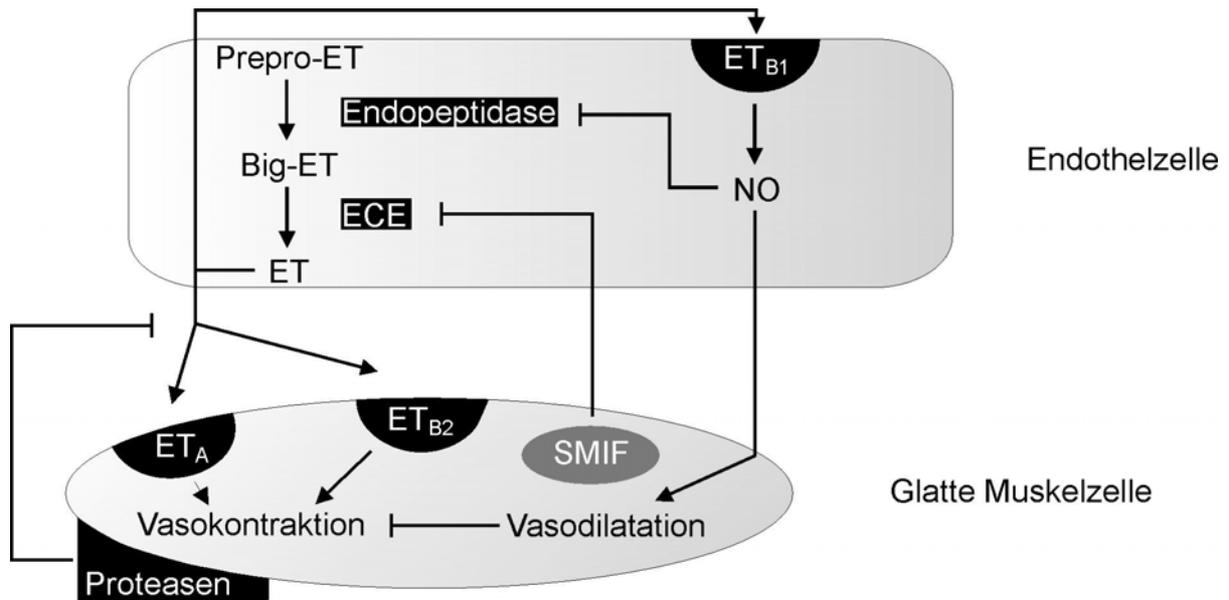


Abb. 1: Modulation der Endothelinbiosynthese und Einfluss von Endothelin auf glatte Muskelzellen. Von glatten Muskelzellen produzierte diffusionsfähige Stoffe hemmen die Konversion von Pre-Pro-ET zu Big-ET („smooth muscle derived inhibitory factor“, SMIF). Zusätzlich können Proteasen, welche mit der Zelloberfläche der glatten Muskelzellen assoziiert sind, abluminal freigesetztes Endothelin abbauen. Das durch Aktivierung von ET_{B1}-Rezeptoren in Endothelzellen produzierte Stickstoffmonoxid (NO) inhibiert die Konversion von Pre-Pro-ET zu Big-ET oder führt in glatten Muskelzellen zu einer Dilatation, welche der über ET_A- und ET_{B2}-Rezeptoren endothelinvermittelten Kontraktion entgegenwirkt. Synthese von Endothelin siehe Text. In Anlehnung an Rubanyi G. et al. (13).

Endothelin gehört zu den stärksten bekannten Vasokonstriktoren (1) und führte, bei Hunden als Bolus gegeben, zunächst zu einer vorübergehenden Dilatation der kleinen und großen Koronararterien, welcher eine anhaltende Vasokonstriktion folgte (14). Im Gegensatz dazu löste die kontinuierliche Gabe von Endothelin nur eine Vasokonstriktion aus (14). In eigenen Versuchen am offenen Kaninchenherzen führte die Bolusgabe von ET-1 zu einer ET_A-Rezeptor vermittelten peripheren Vasokonstriktion (15). Beim Menschen wird eine Konstriktion der Koronargefäße durch Endothelin fast ausschließlich durch ET_A-Rezeptoren vermittelt (16;17). Endothelin aktiviert über ET_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche Ca²⁺-Kanäle (1;18). Die Folge ist ein vermehrter, vom extrazellulären Ca²⁺-Gehalt abhängiger, Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Hieraus resultiert eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration.

Des Weiteren kommt es, vermittelt durch die ET_A -Rezeptoren, zu einer G-Protein assoziierten Aktivierung von Phospholipase C. Hierdurch wird aus Phosphoinositolbiphosphat 1,4,5-Inositoltriphosphat und Diacylglycerol gebildet (19-24). Ca^{2+} wird aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt und Proteinkinase aktiviert (25-28). Am Ende dieser Aktivierungskaskade steht die weitere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Kontraktion der Zelle (Abb. 2). Zusätzlich wächst durch Endothelin die myofibrilläre Ca^{2+} -Sensibilität (9).

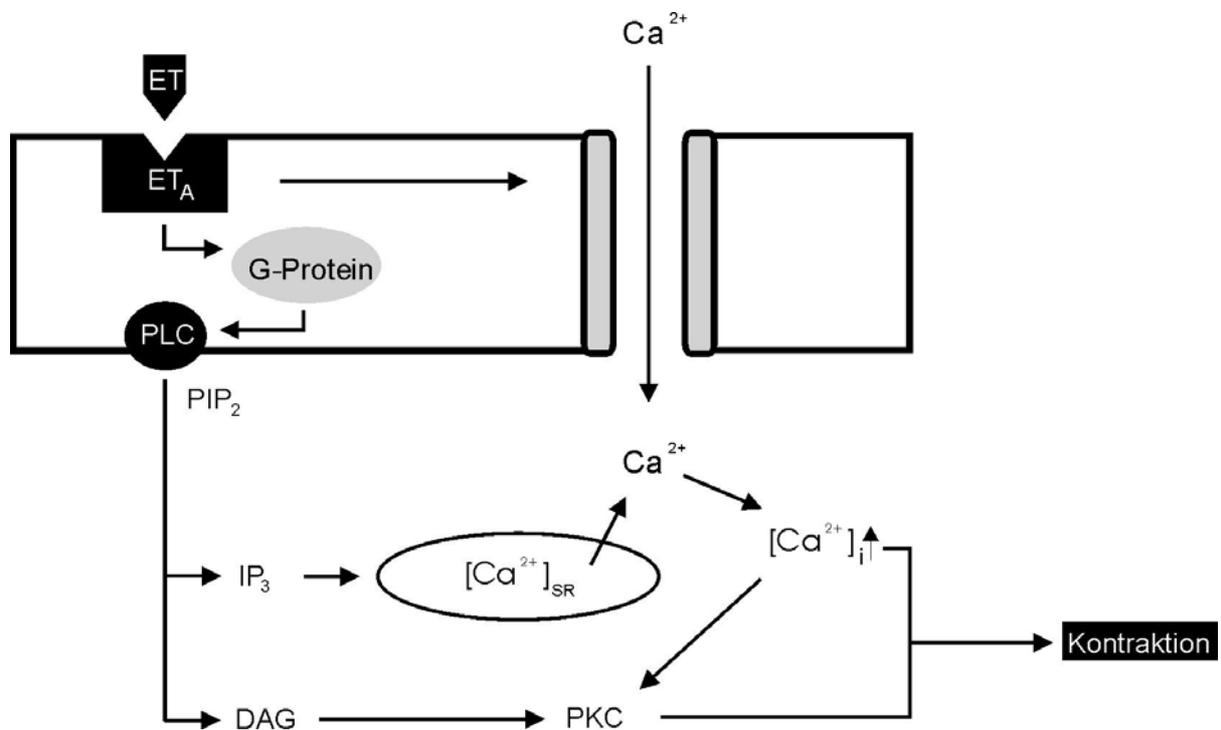


Abb. 2: Signaltransduktion der durch Endothelin vermittelten Kontraktion in glatten Muskelzellen. Nach Bindung von ET-1 an ET_A -Rezeptoren kommt es zur Aktivierung von transmembranösen Ca^{2+} -Kanälen und Phospholipase C (PLC). Durch die aktivierte PLC wird aus Phosphoinositolbiphosphat (PIP_2) vermehrt 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{SR}$) wird aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt und erhöht zusammen mit dem durch die geöffneten Ca^{2+} -Kanäle einströmenden Ca^{2+} die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Zusammen mit der durch DAG aktivierten Phosphokinase führt dies zu einer vermehrten Kontraktion der Muskelzelle (näheres siehe Text). In Anlehnung an Rubanyi et al. (13).

Endothelin wirkt nicht nur vasoaktiv, sondern beeinflusst noch eine Reihe von anderen Prozessen. Endothelin moduliert Wachstumsprozesse (29-31) und spielt eine Rolle bei der Thrombogenese und Neutrophilen-Adhäsion (32-35). Des Weiteren beeinflusst es neben der vaskulären Permeabilität (36;37) auch die Nozizeption (38) und wirkt bronchokonstriktorisch (39). Am Herzen sind positiv inotrope, negativ chronotrope (40;41) sowie negativ lusitrope Effekte (42) beschrieben. In Bezug auf die Inotropie sind die Resultate widersprüchlich. Während in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien positiv inotrope Effekte nachgewiesen wurden (15;43-47), berichten andere Studien negativ inotrope Reaktionen (48-50). Es ist anzunehmen, dass die durch Endothelin vermittelte Wirkung sowohl vom physiologischen und pathologischen Zustand des Herzens als auch von der vorliegenden Dosis abhängig ist (51;52).

Entsprechend dem Wirkungsspektrum von Endothelin werden spezifische Rezeptoren außer in glatten Muskelzellen und Endothelzellen auch in verschiedenen anderen Effektororganen gefunden, wie zum Beispiel in Niere, Nebenniere, Herz, ZNS und Lunge. In der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wurde Endothelin als wichtige Mediatorsubstanz erkannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasma-Endothelin-Spiegel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt deutlich erhöht sind (53-57). Omland et al beobachteten eine positive Korrelation von erhöhten Plasmaendothelinwerten und Patientenmortalität 1 Jahr nach erlittenem Myokardinfarkt (58). In Ischämie-Reperusionsmodellen an Hunden (59) und Kaninchen (60) waren die gemessenen Endothelinwerte ebenfalls signifikant erhöht. Um die Rolle von Endothelin während eines akuten Myokardinfarktes und der anschließenden Reperfusion weiter zu untersuchen, wurde eine Vielzahl tierexperimenteller Versuche durchgeführt, bei denen Koronararterien okkludiert und anschließend die Herzen über unterschiedliche Zeiträume reperfundiert wurden. In Studien, welche die Größe eines aus einem Ischämie-Reperusionsmodell resultierenden Infarktes bestimmten, wurden spezifische Endothelinrezeptor-Antagonisten (61;62) oder Antikörper gegen Endothelin verwendet

(54). Aufgrund der komplexen Wirkungen von Endothelin ist es schwer zu entscheiden, ob erhöhte Endothelinwerte gut oder schädlich sind (63). Einige Studien weisen auf eine Beteiligung von ET-1 bei Heilungsprozessen nach einem Herzinfarkt hin (64;65). Anders als andere Peptide, welche bei Bedarf sofort wirken und anschließend abgebaut werden, scheint das Endothelinsystem möglicherweise nicht als Akutsubstanz zu wirken. Hierfür spricht, dass die ppET-1 mRNA nach einem akuten Myokardinfarkt erst 7 Tage später maximal hochreguliert wird (66). Es ist denkbar, dass Endothelin aufgrund seiner inotropen Eigenschaften die funktionellen Konsequenzen eines Myokardinfarktes positiv beeinflusst (15). Andere Studien berichten dagegen von einer negativen Endothelinwirkung auf Ischämie-Reperfusionsschäden oder die Ausdehnung des Infarktgebietes (60;67). Somit ist die Bedeutung der Aktivierung des gesamten Endothelinsystems nach einer Myokardischämie unklar. Auch in Bezug auf den Zeitpunkt und die Folgen einer ET-1-Rezeptorblockade nach einem Myokardinfarkt sind die Studienergebnisse widersprüchlich. Es ist noch nicht geklärt, ob eine ET-1-Blockade vor oder nach einer myokardialen Ischämie förderlich oder schädlich ist und welcher Rezeptor diese Effekte vermittelt. Die Antworten auf diese Fragen könnten nicht nur für die akute Ischämiebehandlung, sondern insbesondere für die Behandlung von Patienten mit chronischem Herzversagen von Bedeutung sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den optimalen Zeitpunkt einer ET-1 Antagonisierung und die kurzfristigen Auswirkungen auf die Hämodynamik und den Infarktbereich zu ermitteln. Hierfür wurde ein etabliertes Ischämie-Reperusionsmodell an New-Zealand-White-Kaninchen gewählt, bei dem in vivo ein großer Ast der linken Koronararterie für 60 min okkludiert und anschließend für 180 min reperfundiert wurde. Um zwischen ET_A- und ET_B-vermittelten Wirkungen unterscheiden zu können, wurden in unseren Versuchen ein spezifischer ET_A-Rezeptorblocker (LU135252) und ein spezifischer ET_B-Rezeptorblocker (BQ788) verwendet. Um den optimalen Zeitpunkt der Endothelinblockade zu ermitteln, wurden die Rezeptorblocker in unterschiedlichen Zeitintervallen appliziert.

2. Material und Methodik

2.1 Experimenteller Versuchsaufbau

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an insgesamt 46 New-Zealand-White-Kaninchen durchgeführt. Die Tiere wurden entsprechend den Bestimmungen nach § 8, Abs. 1 des Tierschutzgesetzes behandelt.

2.1.2 In vivo Präparation

Die Anästhesie der Kaninchen (n=46; 2500-3720 g) erfolgte mit einer Kombination aus Ketavet[®] (25 mg kg⁻¹ Ketaminhydrochlorid i.m.) und Rompun[®] (5 mg kg⁻¹ Xylazin i.m.). Anschließend wurde die Narkose über einen venösen Zugang in der Ohrtrandvene mittels Nembutal[®] i.v. (15-20 mg kg⁻¹h⁻¹ Pentobarbital in 0,9% NaCl) aufrechterhalten. Nach Tracheotomie und Intubation wurden die Tiere mit Pancuronium[®] (0,4 mg kg⁻¹ Pancuroniumbromid, i.v.) relaxiert und über einen Respirator (Ugo Basile, Biological Research Apparatus) mit einem Gemisch aus Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) und Raumluft ventiliert (Atemfrequenz 35 min⁻¹, Atemzugvolumen 20-30 ml). Die Körpertemperatur wurde überwacht und durch eine Heizdecke bei ca. 37 °C konstant gehalten. Die linke A. carotis wurde kanüliert, um den arteriellen Druck zu bestimmen und Blutproben zu entnehmen. Medikamente und Vehikel (0,9 % NaCl) wurden über die linke V. jugularis verabreicht, die zu diesem Zweck ebenfalls kanüliert wurde. Um den Aortenfluss zu messen, wurde nach einer medianen Sternotomie und Pericardiotomie ein Flussmesskopf (4SB256, Transonic Systems) um die Aorta ascendens plaziert und mit einem Flussmessgerät (T206 2-channel, Transonic Systems) verbunden. Die Messung des linksventrikulären Druckes erfolgte mit einem 3F-Nadeltip-Manometer (Millar), welches in die Spitze des linken Ventrikels eingeführt wurde. In jeder Gruppe wurde ein großer Ast der linken Koronararterie unterhalb des oberen Drittels zwischen der atrioventrikulären Furche und der Herzspitze mit einer Schlinge aus chirurgischen Naht-

material (6-0, Prolene) okkludiert. Nach einer 60-min Ischämie wurde die Schlinge gelöst, und es folgte eine 180 min Reperfusion.

2.1.3 Messung der Infarktgröße

Am Ende der Reperfusion wurde die Arterie reokkludiert und 4 ml einer 10 %igen Evans Blau Lösung als Bolus solange in die linke V. jugularis injiziert, bis die Augen des Kaninchens sich blau färbten. Die Kaninchen wurden anschließend getötet und die Herzen entfernt und bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren. Danach wurden alle Herzen parallel zur atrio-ventrikulären Furche in 5 bis 6 gleich dicke transversale Scheiben geschnitten. Der gefährdete Myokardbereich konnte durch die fehlende Blaufärbung bestimmt werden. Die Gewebescheiben wurden in einer 1 %igen TTC-Lösung in isotonischem Phosphatpuffer (pH 7,4) bei einer Temperatur von 37 °C für 15 min inkubiert. Hiernach zeigte nekrotisches Myokard eine graue, durchblutetes Myokard eine blaue und gefährdetes myokardiales Gewebe eine rote Farbe. Der gefährdete Bereich sowie das Infarktareal wurden für jede Gewebescheibe unter Verwendung einer Bild-Analyse-Software (MS Autosketch) mittels Planimetrie berechnet.

2.2 Experimentelles Protokoll

2.2.1 Messgrößen

Bei allen Versuchen wurden folgende Variablen unter Verwendung eines Acquisitions- und Analyseprogrammes (Powerlab[®]) kontinuierlich aufgezeichnet und gleichzeitig für die spätere Analyse digital gespeichert:

- Aortenfluss (AoF, ml min⁻¹)
- Aortendruck (AoP, mmHg)
- Max. linksventrikulärer Druck (LVP_{max}, mmHg)
- Min. linksventrikulärer Druck (LVP_{min}, mmHg)

Von letzterem Signal wurden folgende Variable abgeleitet:

- Herzfrequenz (HF)
- Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt , mmHg · s⁻¹)

Folgende Variablen wurden berechnet:

- Schlagvolumen ($SV = AoF / HF$, ml)
- Externe Herzarbeit ($W = SV \cdot LVP_{max}$, mmHg · ml)
- Totaler peripherer Widerstand ($TPR = AoF \cdot AoP$, ml · min⁻¹ · mmHg)

2.2.2 Ausschlusskriterien

Tiere, welche durch Arrhythmien oder Herzversagen vor Abschluss des Protokolles verstarben, wurden ausgeschlossen. Demzufolge wurden von den insgesamt 46 New-Zealand-White-Kaninchen 14 Tiere in die Auswertung nicht einbezogen.

2.2.3 Versuchsprotokoll

Die in vivo Präparation der Kaninchen dauerte im Durchschnitt 30 min. Alle Tiere konnten sich anschließend 30 min hämodynamisch stabilisieren, bevor sie einer der folgenden vier Gruppen zugeordnet wurden. Die Kaninchen der Kontrollgruppe (n=9) erhielten keine ET-Rezeptorantagonisten. Auf die Gabe des Lösungsmittels NaCl wurde verzichtet, da in Vorversuchen keine Beeinflussung der funktionellen Größen oder der Infarktgröße beobachtet wurde. Den Tieren der BQ788-Gruppe (n=7) wurde der spezifische ET_B-Rezeptorantagonist BQ788 10 min vor Beginn bis zum Ende der 60-min Ischämiephase in einer Dosierung von 4,5 mg/kg verabreicht. Die Tiere der LU-früh-Gruppe (n=9) erhielten anstelle von BQ788 den spezifischen ET_A-Rezeptorantagonisten LU135252 in einer Dosierung von 1 mg/KG. Im Gegensatz hierzu wurde den Tieren der LU-spät-Gruppe (n=7) LU135252 erst

zu Beginn der Reperfusion gegeben. LU135252 wurde in dieser Gruppe über 180 min in einer Dosierung von insgesamt 1 mg/kg kontinuierlich verabreicht (Abb. 3).

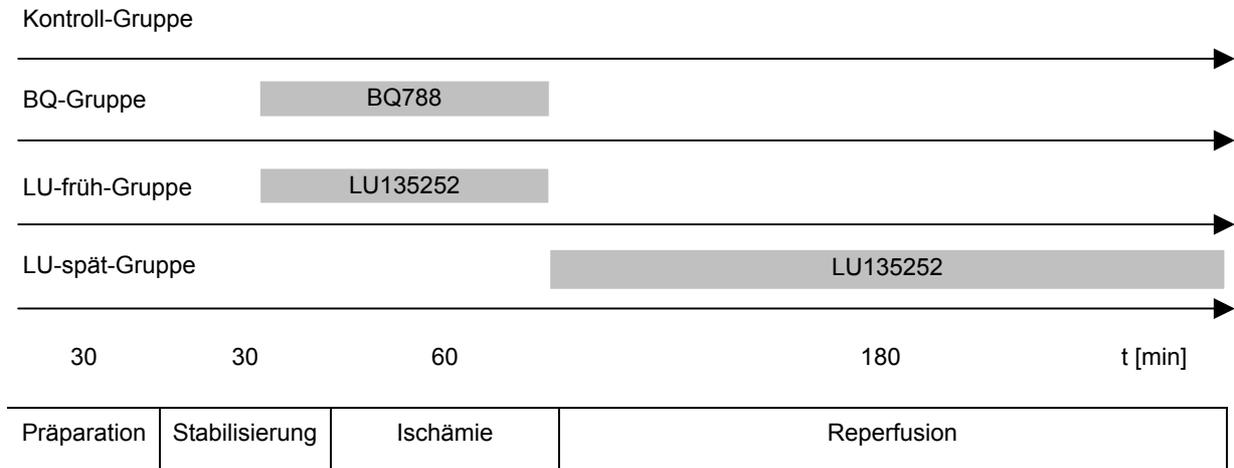


Abb. 3: Schematische Darstellung der vier Versuchsprotokolle. Zeitintervalle in Minuten.

2.3 Pharmakologische Substanzen

Folgende Substanzen wurden in einer 0,9 % NaCl-Lösung gelöst:

- BQ788 (N- cis- 2,6- dimethylpiperidinocarbonyl- L- γ MeLeu-D-Trp(COOMe)-DNLe- Ona) (Alexis Co, San Diego, CA, USA)
- LU 135252 ((+)-(S)-2-(4,6-dimethoxypyrimidin- 2-yloxy)-3- methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid) (Knoll AG, Ludwigshafen)

2.4 Datenerhebung und Statistik

Zur Analyse der hämodynamischen Daten wurde das Powerlab[®] Programm verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde mit einem statistischen Software Packet (SPSS) ausgeführt. Um die Effekte der Medikamente zu testen, wurde für jede Tiergruppe eine Ein-Weg-Varianzanalyse mit anschließendem post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Als Signifikanz-

schranke wurde $p < 0,05$ gewählt. Die Daten wurden nach 30 min Stabilisation, am Ende der Ischämie und nach 30 und 180 min Reperfusion erfasst.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe der Endothelinrezeptor-Antagonisten BQ788 und LU135252 wurde die Rolle von Endothelin während und nach einer myokardialen Ischämie untersucht. Neben der Veränderung der Infarktgröße waren Einflüsse auf die Ventrikelfunktion und die Hämodynamik von besonderem Interesse.

Die Ergebnisse werden in Tabellen (Mittelwerte \pm Standardabweichung) oder in Säulendiagrammen dargestellt. Von den insgesamt 46 Tieren verstarben 14 vor Ablauf des Protokoll. In der Kontrollgruppe starben vier Tiere während der Ischämie an Arrhythmien. In der BQ788-Gruppe zeigten zwei Tiere Kammerflimmern, so dass das Protokoll nicht beendet werden konnte. Ein Tier verstarb während der Ischämie und eines nach 2 h Reperfusion. In der LU-früh-Gruppe verstarben insgesamt drei Tiere an Kammerflimmern, Ein Tier verstarb noch in der Erholung nach der Präparation, ein Anderes nach 2 h und das Dritte nach 2,5 h Reperfusion. In der LU-spät-Gruppe fielen vier Tiere aufgrund von Kammerflimmern aus. Drei davon noch während der Ischämie und eines in der Reperfusion. Ein Tier verstarb in der Ischämie aufgrund eines großen Blutverlustes mit konsekutivem Pumpversagen. Somit waren allen Gruppen etwa im gleichen Umfang von Ausfällen betroffen.

3.1. Herzfrequenz

Zu Beginn des Protokoll unterschied sich die Herzfrequenz in allen vier Gruppen nicht wesentlich voneinander. In der Kontrollgruppe stieg sie bis zur Beendigung des Versuches kontinuierlich an (+31 %). Ebenso erhöhten sich die Werte in der BQ788-Gruppe bis 30 min nach Reperfusionbeginn kontinuierlich (+32 %). Bis zum Ende des Versuches kam es nur noch zu geringfügigen Änderungen. Die LU-früh-Gruppe zeigte bis zum Reperfusionsende eine stetig ansteigende Herzfrequenz (+43 %). In der LU-spät-Gruppe entwickelte sich die

Herzfrequenz ähnlich wie in der Kontrollgruppe. Nach dem kontinuierlichen Anstieg erreichte sie ihr Maximum 180 min nach Beginn der Reperfusion (+34 %, Tab.1).

Tab.1: Herzfrequenz (HF); Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	HF [min^{-1}]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	177 \pm 25		192 \pm 38	206 \pm 45	227 \pm 53
BQ788	193 \pm 65	222 \pm 51	232 \pm 33	241 \pm 43	232 \pm 61
LU-früh	177 \pm 32	210 \pm 30	232 \pm 37	244 \pm 45	247 \pm 54
LU-spät	178 \pm 42		207 \pm 43	221 \pm 29	226 \pm 50

3.2. Systolische Größen

3.2.1. Maximaler linksventrikulärer Druck

In der Kontrollgruppe sank der maximale linksventrikuläre Druck (LVP_{max}) bis zum Ende der Ischämie um 16 %. Während der anschließenden Reperfusion stieg er kontinuierlich und erreichte gegen Ende des Protokolles ähnliche Werte wie zum Zeitpunkt der Kontrolle. Die BQ788- Gruppe zeigte den gleichen Abfall von LVP_{max} bis zum Ischämieende. Im Verlauf der Reperfusion kam es hier nach 30 min erst zu einem leichten (+4 %) und nach 180 min schließlich zu einem deutlichen Anstieg (+21 %) der Werte, so dass LVP_{max} bei Versuchsende um 9 % gegenüber dem Ausgangswert erhöht war. LVP_{max} der LU-früh-Gruppe fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe bis zum Ischämieende etwas stärker ab (-25 %). In den ersten 30 min der Reperfusion sanken die Werte um weitere 5 % und stiegen nur noch gering bis zum Versuchsende (+3 %). Auch in der LU-spät-Gruppe sank LVP_{max} bis zum Ende der Ischämie deutlicher als in der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf reduzierten sich die Werte im Gegensatz zu den anderen Gruppen kontinuierlich bis zum Versuchsende um weitere 13 % und lagen bei Beendigung des Protokolles signifikant unter denen der Kontroll- und BQ788-Gruppe (Tab. 2).

Tab.2: Maximaler linksventrikulärer Druck (LVP_{max}); Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe und BQ788-Gruppe.

Gruppe	LVP _{max} [mmHg]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	88 \pm 13		73 \pm 16	77 \pm 9	82 \pm 11
BQ788	84 \pm 17	80 \pm 11	68 \pm 11	72 \pm 6	86 \pm 35
LU-früh	94 \pm 17	85 \pm 17	67 \pm 15	63 \pm 13	67 \pm 19
LU-spät	94 \pm 15		70 \pm 16	65 \pm 13	58 \pm 5*

3.2.2. Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Zum Kontrollzeitpunkt lag die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) der Kontroll- und der BQ788-Gruppe signifikant (+25 %) über dem Wert der LU-früh- und LU-spät-Gruppe. DP/dt_{max} fiel in der Kontrollgruppe bis zum Ende der Ischämie um 24 %. Während der anschließenden Reperfusion stiegen die Werte wieder leicht an. In der BQ788-, der LU-früh- und der LU-spät-Gruppe verschlechterte sich dP/dt_{max} bis zum Ischämieende wie in der Kontrollgruppe. Ähnlich wie in der Kontrollgruppe wurde in der BQ788-Gruppe ein leichter Anstieg von dP/dt_{max} beobachtet. Hierbei erhöhten sich die Werte nach 30 min erst um 4 % und nach 180 min um weitere 10 %. In der LU-früh-Gruppe war dieser Anstieg geringer ausgeprägt (+3 %). In der LU-spät-Gruppe kam es nach 30 min (-4 %) und nach 180 min (-9 %) zu einem signifikanten Abfall von dP/dt_{max} . (Tab. 3).

Tab. 3: Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}). Mittelwerte \pm Standardabweichung, ° $p < 0,05$ vs Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe und BQ788-Gruppe.

Gruppe	dP/dt_{max} [mmHg/s]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	1732 \pm 380		1305 \pm 330	1202 \pm 262	1442 \pm 306
BQ788	1746 \pm 179	1578 \pm 218	1261 \pm 184	1328 \pm 184	1503 \pm 570
LU-früh	1293 \pm 239°	1178 \pm 199	974 \pm 160	1024 \pm 330°	1012 \pm 281
LU-spät	1313 \pm 128°		974 \pm 216	941 \pm 275*°	822 \pm 163*°

3.2.3. Aortenfluss

Die Ausgangswerte des Aortenflusses der BQ788-Gruppe lagen bei Kontrolle geringfügig unter denen der anderen drei Gruppen. Der Aortenfluss sank in der Kontrollgruppe bis zum Ischämieende um 20 %. In der Reperfusion stiegen die Werte über 180 min wieder leicht an (+9 %) blieben aber unter dem Ausgangsniveau. Die BQ788-Gruppe zeigte während des Protokolles eine ähnliche Entwicklung. Zuerst fiel der Aortenfluss während der Stabilisierung und der folgenden Ischämie kontinuierlich ab (-18 %), stieg aber nach 30 min Reperfusion (+7 %) wieder an. Bis zum Versuchsende stagnierten die Werte dann auf diesem Niveau. In der LU-früh-Gruppe sank der Aortenfluss während der Stabilisierung um 14 %. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe stiegen die Werte während der Ischämie (+9 %) und fielen dann innerhalb der Reperfusion (-8 %). Der Aortenfluss der LU-spät-Gruppe zeigte einen von der Kontrollgruppe nur geringfügig abweichenden Verlauf (Tab. 4).

Tab. 4: Aortenfluss (AoF). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	AoF [ml/min]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	237 \pm 38		194 \pm 36	203 \pm 49	216 \pm 60
BQ788	204 \pm 27	188 \pm 26	164 \pm 21	178 \pm 28	177 \pm 51
LU-früh	248 \pm 76	222 \pm 81	235 \pm 80	217 \pm 81	208 \pm 119
LU-spät	260 \pm 17		195 \pm 41	210 \pm 41	220 \pm 30

3.2.4. Schlagvolumen

Das Schlagvolumen der einzelnen Gruppen unterschied sich bei Kontrolle nur unwesentlich voneinander. In der Kontrollgruppe verringerte sich das Schlagvolumen bis zur Beendigung der Ischämie deutlich (-23 %). In der Reperfusion verschlechterten sich die Werte nur noch marginal. Die BQ788-Gruppe zeigte einen ähnlichen Abfall des Schlagvolumens bis zum Ischämieende (-22 %) und nur noch unwesentliche Veränderungen in der Reperfusion. In der LU-früh-Gruppe war der gleiche Verlauf wie in der Kontrollgruppe zu beobachten. In der LU-spät-Gruppe veränderte sich das Schlagvolumen ähnlich wie in der Kontrollgruppe, wobei der initiale geringfügig stärkere Abfall (-35 %) und der nach 180 min stattfindende Anstieg (+3 %) abwichen (Tab. 5).

Tab. 5: Schlagvolumen (SV). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	SV [ml]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	1,36 \pm 0,28		1,02 \pm 0,13	1,00 \pm 0,18	0,87 \pm 0,18
BQ788	1,13 \pm 0,32	0,87 \pm 0,15	0,73 \pm 0,17	0,76 \pm 0,19	0,78 \pm 0,29
LU-früh	1,44 \pm 0,54	1,10 \pm 0,41	1,03 \pm 0,36	0,92 \pm 0,38	0,89 \pm 0,58
LU-spät	1,54 \pm 0,37		1,01 \pm 0,45	0,94 \pm 0,21	1,07 \pm 0,35

3.2.5. Externe Herzarbeit

Die externe Herzarbeit (W) verschlechterte sich in der Kontrollgruppe bis zum Ende der Ischämie deutlich (-35 %) und veränderte sich in der anschließenden Reperfusion nur unwesentlich. Die BQ788-Gruppe zeigte eine kontinuierliche Reduktion von W (-42 %) bis zum Ende der Ischämie. In der nachfolgenden Reperfusion stiegen die Werte nur um 7 % wieder an. Die kontinuierliche Verschlechterung der Werte bis zum Ischämieende um 37 % fand sich auch in der LU-früh-Gruppe. In der Reperfusion fielen die Werte um weitere 30 %. In der LU-spät-Gruppe war der Abfall der Werte bis zum Ende der Ischämie am stärksten ausgeprägt (-51 %). Anschließend veränderten sich die Werte nur noch geringfügig und waren bis zum Versuchsende um weitere 7 % gesunken (Tab. 6).

Tab. 6: Externe Herzarbeit (W). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	W [mmHG • ml]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	120 \pm 31		74 \pm 16	76 \pm 13	73 \pm 21
BQ788	96 \pm 38	69 \pm 17	50 \pm 18	54 \pm 16	67 \pm 42
LU-früh	140 \pm 64	96 \pm 42	70 \pm 30	55 \pm 26	58 \pm 50
LU-spät	148 \pm 75		75 \pm 53	63 \pm 24	62 \pm 22

3.3 Diastolische Größen

3.3.1. Minimaler linksventrikulärer Druck

Bei Kontrolle unterschied sich der minimale linksventrikuläre Druck (LVP_{\min}) der vier Gruppen nicht voneinander. In allen Gruppen kam es während des Protokolles zu einem deutlichen Anstieg von LVP_{\min} . In der Kontrollgruppe stieg LVP_{\min} kontinuierlich bis zum Protokollende (+70 %). In der BQ788-Gruppe stieg LVP_{\min} während der Stabilisierung (+85 %) und der Ischämie (+63 %) zuerst an. Anschließend fielen die Werte nach 30 min Reperfusion (-15 %) und nahmen nach 180 min Reperfusion erneut zu (59 %). LVP_{\min} verhielt sich in der LU-früh-Gruppe wie in der BQ788-Gruppe, wies aber statt des Rückganges der Werte in den ersten

30 min der Reperfusion einen dezenten Anstieg auf (+7 %). In der LU-spät-Gruppe erhöhte sich LVP_{min} absolut weniger stark war aber am Ende der Ischämie und während der Reperfusion um 97 % gegenüber dem Ausgangswert gestiegen (Tab 7).

Tab. 7: Minimaler linksventrikulärer Druck (LVP_{min}). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	LVP_{min} [mmHg]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	7 ± 5		10 ± 7	12 ± 6	14 ± 7
BQ788	5 ± 5	11 ± 5	14 ± 6	13 ± 4	17 ± 4
LU-früh	8 ± 5	11 ± 7	13 ± 7	14 ± 7	17 ± 8
LU-spät	6 ± 5		11 ± 4	11 ± 5	11 ± 5

3.3.2. Minimale Druckänderungsgeschwindigkeit

Die Werte für die minimale Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) unterschieden sich bei Kontrolle innerhalb der vier Gruppen nicht voneinander. Bis Ende der Ischämie stieg dP/dt_{min} in der Kontrollgruppe deutlich an (+31 %) und fiel dann während der Reperfusion wieder leicht (-16 %). Der Verlauf von dP/dt_{min} entsprach in den Gruppen BQ788 und LU-früh dem der Kontrollgruppe. In der LU-spät-Gruppe stieg die dP/dt_{min} zuerst deutlich bis Ischämieende (+29 %) und dann während der 180 min Reperfusion weiter dezent an (+7 %, Tab. 8).

Tab. 8: Minimale Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	dP/dt_{min} [mmHg/s]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	-1480 ± 313		-1004 ± 223	-1082 ± 238	-1214 ± 252
BQ788	-1571 ± 329	-1349 ± 247	-998 ± 232	-1106 ± 174	-1149 ± 289
LU-früh	-1255 ± 280	-1161 ± 313	-880 ± 191	-930 ± 205	-941 ± 222
LU-spät	-1321 ± 179		-941 ± 188	-925 ± 205	-852 ± 138

3.4 Kreislaufgrößen

3.4.1. Aortendruck

Die Aortendrücke unterschieden sich innerhalb der vier Gruppen bei Kontrolle nicht voneinander. In der Kontrollgruppe fiel der Aortendruck bis zum Ende der Ischämie ab (-23 %) und änderte sich während der Reperfusion nur noch marginal. In der BQ788-Gruppe sank der Aortendruck ebenfalls deutlich bis zum Ischämieende (-34 %). Nach 30 min Reperfusion war der Aortendruck wieder leicht angestiegen (+6 %) und veränderte sich bis zum Versuchsende nur noch marginal. In der LU-früh-Gruppe sank der Aortendruck kontinuierlich. Bis zum Ende der Ischämie hatte er 22 % und nach 180 min Reperfusion 36 % gegenüber seinem Ausgangswert verloren. In der LU-spät-Gruppe setzte sich dieser Trend fort und führte nach 180 min Reperfusion zu einer Reduktion um 46 %. Hiermit war der AoP zum Ende der Reperfusion in der LU-spät-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant stärker abgefallen. (Tab. 9).

Tab. 9: Aortendruck (AoP). Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe und LU-spät-Gruppe.

Gruppe	AoP [mmHg]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	71 \pm 17		54 \pm 12	52 \pm 15	56 \pm 18
BQ788	79 \pm 14	64 \pm 16	52 \pm 16	55 \pm 17	57 \pm 22
LU-früh	78 \pm 24	64 \pm 11	55 \pm 15	49 \pm 14	45 \pm 9
LU-spät	80 \pm 12		55 \pm 13	53 \pm 17	44 \pm 11*

3.4.2. Totaler peripherer Widerstand

Der totale periphere Widerstand (TPR) in der LU-spät-Gruppe lag bei Kontrolle deutlich über denen der übrigen Gruppen. In der Kontrollgruppe fiel TPR bis 30 min nach Reperfusionbeginn kontinuierlich ab (-14 %). In der restlichen Reperfusion veränderte sich TPR nicht.

Die BQ788-Gruppe zeigte ebenfalls einen moderaten kontinuierlichen Abfall von TPR bis zum Versuchsende (-21 %). In der LU-früh-Gruppe veränderte sich TPR nur marginal und war bei Versuchsende um 6 % gegenüber seinem Ausgangswert gesunken. Der TPR der LU-spät-Gruppe verringerte sich gleichmäßig bis zum Ende des Versuches (-26 %, Tab. 10).

Tab. 10: Totaler peripherer Widerstand (TPR). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe	TPR [$\text{ml min}^{-1} \text{mmHg}$]				
	Kontrolle	Blocker	Ischämie	Rep30	Rep180
Kontrolle	$0,30 \pm 0,06$		$0,28 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,04$
BQ788	$0,34 \pm 0,13$	$0,30 \pm 0,12$	$0,29 \pm 0,13$	$0,30 \pm 0,18$	$0,27 \pm 0,17$
LU-früh	$0,33 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,22$	$0,33 \pm 0,35$	$0,32 \pm 0,33$	$0,31 \pm 0,20$
LU-spät	$0,65 \pm 0,14$		$0,56 \pm 0,17$	$0,53 \pm 0,18$	$0,48 \pm 0,20$

3.5 Infarktgrößen

Der ischämiebedingt gefährdete Myokardbereich unterschied sich in allen vier Gruppen nicht wesentlich voneinander (Tab. 11 und Abb. 4).

Tab. 11: Infarktgrößen (AI). Mittelwerte \pm Standardabweichung.

A _I [%]	Gruppe			
	Kontrolle	BQ788	LU-früh	LU-spät
gefährdeter Bereich des linken Ventrikels	47 ± 16	52 ± 9	50 ± 12	52 ± 13
Infarktbereich im gefährdeten Bereich	60 ± 30	57 ± 23	69 ± 28	76 ± 23

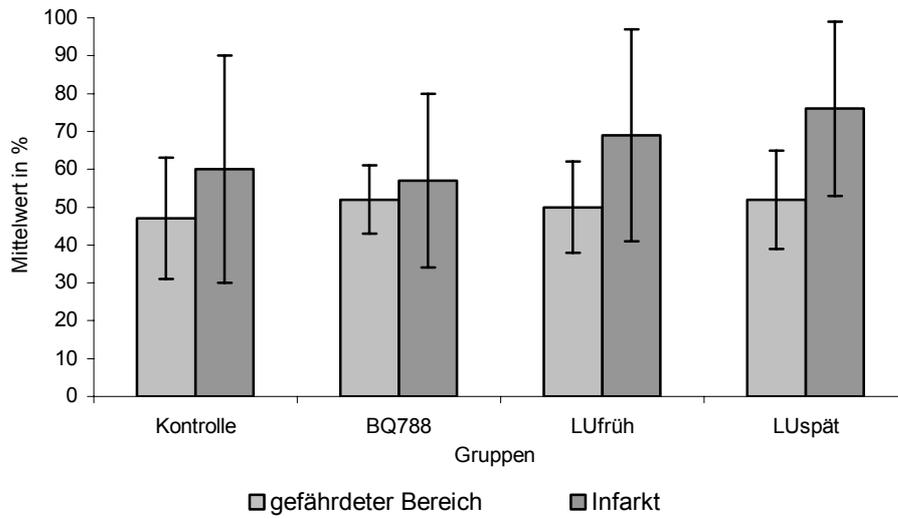


Abb. 4: Größe der gefährdeten Bereiche und der Infarkte in den gefährdeten Bereichen der einzelnen Versuchsgruppen. Mittelwerte \pm Standardabweichung

4. Diskussion

In der 180 min Reperfusion zeigte sich nach ET_A -Blockade ein negativ inotroper und lusitroper Effekt, denn LVP_{max} und dP/dt_{max} waren signifikant und dP/dt_{min} nicht signifikant verschlechtert. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Endothelin am postischämischen Herzen im Gegensatz zum normoxischen und ischämischen Herzen hauptsächlich über ET_A -Rezeptoren dazu beiträgt, die systolische Funktion zu verbessern.

Parallel zur reduzierten ventrikulären Funktion fiel der arterielle Druck (AoP) nach ET_A -Blockade in der späten Reperfusion signifikant ab. Da sich der periphere Widerstand in den einzelnen Versuchsgruppen nicht deutlich unterschied, scheint Endothelin nicht der entscheidende Faktor für die Regulierung des basalen Gefäßtonus zu sein, beeinflusst jedoch möglicherweise insbesondere in der späteren Reperfusion das Gefäßsystem. Durch die spezifische ET_A - oder ET_B -Rezeptorblockade wurde die Infarktgröße in den ersten 3 h der Reperfusion nicht signifikant beeinflusst. Eine mögliche Veränderung der Infarktgröße durch Endothelin ist eher in einem späteren Zeitraum der Reperfusion durch proliferative, profibrotische und inflammatorische Prozesse zu erwarten.

4.1. Methodenkritik

Aus der Literatur ist die Erhöhung der Endothelinwerte bei einer akuten Ischämie bekannt. Daher wurde in unseren Versuchen auf die Messung von Endothelinwerten im Plasma oder Myokard verzichtet. In dem von uns verwendeten Ischämie-Reperfusionsmodell kann nach den Untersuchungen von Kusumoto et al. etwa von einer Verdoppelung des Plasma-Endothelin-1 ausgegangen werden (60).

Für unsere Versuche wurde die regionale Myokarddurchblutung nicht gemessen. Um von ausreichend hohen Dosierungen im späteren Infarktbereich ausgehen zu können, wurde deshalb mit der Perfusion der Endothelinantagonisten BQ788 und LU135252 bereits 10 min

vor Beginn der Ischämie begonnen. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die linksventrikuläre (LV) Funktion trotz eines erheblichen Infarktes (28 % - 40 %) bis zum Protokollende relativ gut erhalten blieb. Es wird allerdings daran erinnert, dass 14 Tieren aufgrund von Arrhythmien oder hohen Blutverlusten ausgeschlossen werden mussten. Desweiteren wurden die Versuchstiere nach unserem Protokoll nicht zusätzlich zur Narkose analgesiert. Um die mögliche Erhöhung der Herzfrequenz durch eine Sympathikusaktivierung aufgrund einer inadäquaten Schmerztherapie näher zu untersuchen, führten wir in späteren Versuchen eine Analgesie mit initial 0,25 mg Fentanyl i.v. und weiteren Bolusgaben bis zu einer Gesamtdosis von 0,1 mg durch. Die Herzfrequenz und der AoP in diesen Versuchen unterschieden sich nicht von den in unseren Gruppen beobachteten Werten. Die Gabe der Rezeptorblocker BQ788 und LU135252 führte vor Beginn der Ischämie zu keinen Veränderungen der erfassten funktionellen Grössen. Diese Beobachtung deckt sich mit einer anderen Studie (68) und ist darauf zurückzuführen, dass es erst durch die Ischämie zu einer relevanten Erhöhung der Endothelinwerte kommt.

4.2. Einflüsse auf die ventrikuläre Funktion

4.2.1. Normoxische Herzen

Am normoxischen Herzen führte die Applikation der verwendeten Endothelinantagonisten zu keinen signifikanten Unterschieden der ventrikulären Funktion in den einzelnen Versuchsgruppen.

Als Folge der Ischämie kam es zu einem Energieverlust in den Myokardzellen, der durch den Abfall von LVP_{max} und SV und dem kontinuierlichen Anstieg von dP/dt_{min} und LVP_{min} gekennzeichnet war: in allen Versuchsgruppen zeigten sich ausgeprägt negativ inotrope und lusitrope Reaktionen. Kompensatorisch erhöhte sich die Herzfrequenz. An der externen Herzarbeit lässt sich die verminderte LV-Funktion weiter veranschaulichen, denn diese Größe fiel

in allen Gruppen bis zum Ischämieende gegenüber Ausgangswerten um bis 51 %. In keiner Gruppe wurde diese Reaktion durch das Ischämie-aktivierte Endothelinsystem verbessert. Im Gegensatz dazu wurde durch alleinige Applikation von Endothelin an isolierten Hühnermyokardzellen eine ausgeprägte, positiv inotrope Reaktion hervorgerufen (69). Ganz ähnlich löste die ET-1 Applikation positiv inotrope Reaktionen an isolierten Schweine-, Ratten- und Kaninchenmyokardzellen aus (70;71). Watanabe et al. wiesen darauf hin, dass diese positiv inotrope Reaktion nicht ausschließlich mit der Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu erklären sei (71). Auch an menschlichen isolierten Myokardzellen wurden ET_A - und ET_B -vermittelte, positiv inotrope Reaktionen beobachtet (72). In weiteren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die ET_A - oder ET_B -Aktivierung zu erhöhtem Ca^{2+} -Einfluss in die Zelle, zu vermehrter Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und zu erhöhter Ca^{2+} -Sensibilität führt. Dieses erklärt die positiv inotrope Wirkung an isolierten Myokardzellen. Beyer et al. konnten diese positiv inotrope Wirkung von Endothelin in vivo allerdings nicht belegen. In ihren Akut-Versuchen an Ratten blieb, wie in den von uns durchgeführten Versuchen, eine positiv inotrope Reaktion nach Endothelininfusion aus. Sie zogen hieraus den Schluss, dass der direkte positive inotrope Effekt von Endothelin in vitro durch einen koronarkonstriktiven Effekt in vivo gegenreguliert wird (52). Auch eine mögliche Verschlechterung der kardialen Perfusion durch die vasokonstriktive Potenz von ET-1 war in unseren Versuchen nicht zu belegen. So wurde unter der effektiven ET_A - oder ET_B -Blockade in den Gruppen BQ788 und LU-früh keine Verbesserung der LV-Funktion beobachtet. Entsprechend diesen Ergebnissen wird die LV-Funktion durch ein aktiviertes Endothelinsystem während einer akuten Myokardischämie in vivo nicht beeinflusst.

4.2.2. Postischämische Herzen

Am postischämischen Herzen scheint Endothelin hingegen von größerer Bedeutung zu sein. Nach Ablauf der 180 min Reperfusion war die LV-Funktion in der Kontrollgruppe gegenüber der deutlichen Verschlechterung bis zum Ende der Ischämie nur noch geringfügig weiter

verringert. Diese Funktionsverschlechterung lässt sich mit dem Untergang von bis zu 40 % der Myokardzellen des linken Ventrikels hinreichend erklären. Signifikante Unterschiede ergaben sich nach ET_A-Blockade der LU-spät-Gruppe bezüglich LVP_{max} und dP/dt_{max}. Hier wurden nach 180 min Reperfusion signifikant niedrigere Werte gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Krause et al., welche nach akuter Koronarokklusion bei Hunden nach Applikation eines nicht selektiven Endothelinantagonisten eine signifikante Reduktion der Nachlast verzeichneten und dieses als Zeichen der Senkung des myokardialen Widerstandes werteten (73). Dieses könnte ein Hinweis dafür sein, dass Endothelin im Gegensatz zum normoxischen oder ischämischen Herzen am postischämischen Herzen dazu beiträgt, die systolische Funktion zu verbessern. Auf die diastolische Funktion scheint Endothelin auch in der frühen Reperfusion (≤ 180 min) keinen Einfluss zu haben, da die diastolischen Größen wie dP/dt_{min} und LVP_{min} keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen aufwiesen.

4.3. Einflüsse auf die Hämodynamik und das koronare und periphere Gefäßsystem

Mehrere Arbeiten legen den Schluss nahe, dass das von Yanagisawa et al. 1988 (1) entdeckte Peptid Endothelin die Größe eines Myokardinfarktes beeinflusst. Einer der Gründe hierfür ist in der ausgeprägten vasokonstriktorischen Potenz des Peptids zu suchen. Diese wurde in mehreren Studien, z.B. an Karotiden (74;75), Pulmonal- (76) und Mesenterialarterien (77) sowie an der Aorta (78) von Kaninchen nachgewiesen. Kusumoto et al. beobachteten unter Infusion von Endothelin an isolierten Kaninchenherzen einen Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes und führten dieses auf eine Konstriktion der Koronararterien zurück (60). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Donkier et al. in Versuchen an Hundeherzen. Sie zeigten, dass der Perfusionsdruck im ischämischen Bereich stärker anstieg als im umliegenden, normal perfundierten Gewebe (79). Dabei war die Wirkung von Endothelin dosisabhängig. In einer Studie von Traverse et al. an Hunden erhöhte die ET-1-Gabe (10 ng min⁻¹) den koronaren Blutfluss, während höhere Dosen für einen deutlichen

Abfall dieser Größe sorgten (80). Andere Autoren beobachteten unabhängig von der Dosis jeweils ein Absinken des koronaren Blutflusses (81-83).

Die Beeinflussung des koronaren Blutflusses, des totalen peripheren Widerstandes (TPR) und des Blutdruckes ist über zwei unterschiedliche Mechanismen möglich. Zum einen über die Aktivierung von ET_A - und ET_B -Rezeptoren, wodurch eine Vasokonstriktion glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt wird. Diese führt zu einer Verminderung des koronaren Blutflusses und einer Erhöhung des TPR und des Blutdruckes (1). Zum anderen kann die Aktivierung von ET_B -Rezeptoren eine vermehrte Freisetzung vasodilatierender Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und nachfolgend eine Senkung von TPR, Blutdruck (9) und koronarem Widerstand zur Folge haben. Endothelin vermittelt demnach sowohl Vasokonstriktion als auch Vasodilatation, wobei der vasokonstriktorische Effekt überwiegt.

In unseren Versuchen wurden spezifische ET_A - und ET_B -Rezeptorblocker eingesetzt, wodurch die ET_A - und ET_B -vermittelten Reaktionen getrennt betrachtet werden konnten. Obwohl eine durch Endothelin bedingte Vasokonstriktion im peripheren Gefäßsystem hauptsächlich durch ET_A -Rezeptoren vermittelt wird (16;17;84;85), beobachteten wir bezüglich des TPR keinen Unterschied zwischen den mit LU135252 behandelten Tieren und den beiden anderen Gruppen.

Endothelin ist aufgrund seiner vasoaktiven Eigenschaften an der Aufrechterhaltung des Grundtonus im Gefäßsystem mitbeteiligt (11). In physiologischen Konzentrationen reicht ET-1 alleine jedoch nicht aus, einen vaskulären Grundtonus aufrechtzuerhalten (86). Auch in unserem Modell ist Endothelin zumindest unter normoxischen Bedingungen nicht hauptsächlich an der Aufrechterhaltung des Grundtonus beteiligt, da es nach Rezeptorblockade zu keinem Abfall des TPR kam. Die Beobachtung, dass der TPR in der LU-spät-Gruppe tendenziell stärker abfiel als in der LU-früh-Gruppe, könnte ein Hinweis dafür sein, dass Endothelin

besonders in der späteren Reperfusion nach Myokardinfarkt Einfluss auf das periphere Gefäßsystem nimmt. Endothelin würde so durch Erhöhung des TPR dem kardial bedingt erniedrigtem Blutdruck entgegenwirken. Masaki et al. beobachteten unter dem Stress einer chirurgischen Operation eine vermehrte Produktion von ET-1 im peripheren Gewebe. Dieses führte zu einem Anstieg des TPR, so dass die Durchblutung vitaler Organe verbessert wurde (87).

In der ersten klinischen Studie an Patienten mit essentieller Hypertonie, reduzierte Bosentan, ein unspezifischer ET_A/ET_B-Rezeptorantagonist, den systolischen und diastolischen Blutdruck (88). In einer späteren Multi-Center-Studie reduzierte der selektive ET_A-Rezeptorantagonist Darusentan dosisabhängig den systolischen und diastolischen Blutdruck (89). Kowala et al. beobachteten nach Gabe eines ET_A/AT₁-Antagonisten ebenfalls eine Verringerung des Blutdruckes (90). Wie in Akut-Versuchen an Ratten von Ihara et al. (85) wurde eine derartige Senkung der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in unseren Versuchen nicht beobachtet. Dieses könnte daran liegen, dass unsere Versuchstiere keine essentielle Hypertonie hatten. Endothelinrezeptor-Antagonisten könnten demnach zwar einen senkenden Einfluss auf den bereits erhöhten Blutdruck haben – wie beim Vorliegen einer essentiellen Hypertonie – den im physiologischen Bereich befindlichen Blutdruck aber nicht entscheidend beeinflussen. Hier gelten nach Masaki et al. erhöhte Endothelinwerte nicht als auslösender, sondern als kompensatorischer Faktor (87).

Der von uns beobachtete signifikante Abfall des AoP in der LU-spät-Gruppe gegen Ende der Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe lässt die Annahme zu, dass durch die ET_A/ET_B-Rezeptorblockade ein gegenregulatorischer Effekt zugunsten eines verbesserten systolischen Perfusionsdruckes gehemmt wurde. Inwieweit diese Mechanismen in der späteren Reperfusion (≥ 3 h) an Bedeutung gewinnen, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4. Einflüsse auf die Infarktgröße

In verschiedenen tierexperimentellen Studien waren die Endothelinwerte kurz nach einem akuten Myokardinfarkt deutlich angestiegen. Watanabe et al. (54) fanden bei Ratten nach 60-minütiger Okklusion einer Koronararterie einen Anstieg auf das Vierfache von ET-1 und Big-Endothelin im Plasma. Im Myokard stieg ET-1 auf das Siebenfache der Ausgangswerte an. Spätere Studien berichteten über eine frühe und anhaltende Erhöhung der ET-1-mRNA-Werte im Infarktbereich gegenüber normalperfundiertem Myokard (66;91-93). Entsprechend wiesen Steward et al. bei Patienten mit frischem Myokardinfarkt eine deutliche ET-1-Erhöhung auch im venösen Blut nach (94). Diese und andere Studien zeigen, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer Hochregulation der ET-Synthese mit erhöhten Endothelinwerten kommt (95). Da nicht nur die ET-Synthese gesteigert, sondern auch die ET-Rezeptordichte erhöht wird (96), kann man von einer Hochregulierung des gesamten kardialen ET-Systems sprechen.

In dem von uns verwendeten Ischämie-Reperusionsmodell wurde die Infarktgröße durch die Gabe der spezifischen ET-Antagonisten BQ788 und LU135252 nicht signifikant vermindert. Unsere Ergebnisse stehen somit im Kontrast zu einer These, nach der es durch Endothelin zu einer Ausdehnung des Infarktgebietes kommt. Zum Einen durch die ET_A-vermittelte Vasokonstriktion im koronaren Gefäßbett (16;97;98) und somit durch die Verringerung des myokardialen Sauerstoffangebotes (60). Zum Anderen durch eine positiv inotrope Wirkung des Endothelins und somit durch eine Erhöhung des myokardialen Sauerstoffbedarfes. Diese Schlussfolgerung basiert im wesentlichen auf den vasokonstriktorisches und positiv inotropen Eigenschaften des Endothelins und scheint dessen Funktion in der akuten Myokardischämie nicht gerecht zu werden. Dieses spiegelt sich in den gegensätzlichen Ergebnissen folgender Arbeiten zu diesem Thema wider.

Krause et al (68) und Mc Murdo et al (62) beobachteten nach ET_A-Rezeptor-Blockade keine Reduktion des Infarktbereiches. Krause et al. verabreichten Hunden den spezifischen ET_A-Antagonisten BQ123 als kontinuierliche systemische Infusion. Die Infusion begann 10 min vor einer 90-min-Ischämie und dauerte bis zum Ende der 4-h-Reperfusion (68). Mc Murdo et al. führten Untersuchungen mit dem spezifischen ET_A-Antagonisten FR139317 in einem Ischämie-Reperfusionsmodell am isolierten Kaninchenherzen durch. Auch hier wurde der ET_A-Antagonist kontinuierlich systemisch verabreicht. Die Applikation von FR139317 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch ET-1 bedingten Vasokonstriktion (62). Demnach wurde ein ausreichend hoher Spiegel des Antagonisten im Zielorgan erreicht. Es ist also davon ausgehen, dass durch die alleinige systemische Applikation eines ET-Antagonisten in der von uns angewendeten Dosierung ohne vorherige Bolus-Aufsättigung bzw. Umgehung des systemischen Kreislaufs ein ausreichend hoher Antagonistenspiegel im Zielorgan erreicht werden kann.

Andere Autoren hingegen beobachteten die erwartete Verringerung des Infarktbereiches bei ähnlichen Versuchsmodellen (61;99-101). Lee et al. infundierten Ratten FR139317 kontinuierlich über einen Zeitraum 30 min vor Ischämie bis zum Ende der 3-h-Reperfusion (61). Bei Burke et al. erfolgte an einem mit unserem vergleichbaren Ischämie-Reperfusionsmodell an Kaninchen die kontinuierliche Infusion eines ET_A-Blockers erst nach Gabe eines initialen Bolus (99). Gonon et al. verzichteten auf die kontinuierliche Infusion und verabreichten anästhesierten Schweinen einen einmaligen Bolus von LU135252 vor Beginn der Ischämie (100). Gourine et al. infundierten anästhesierten Schweinen LU135252 distal der okkludierten Koronararterie gegen Ende der Ischämie und umgingen somit den systemischen Kreislauf (102).

Beim Vergleich der einzelnen Versuchsmodelle fällt auf, dass unter Verwendung gleicher ET-Antagonisten in entsprechender Dosierung und ähnlicher Versuchsprotokolle sehr unter-

schiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Substanzbezogene Einflüsse auf die Ergebnisse sowie eine Über- bzw. Unterdosierung der verabreichten Antagonisten können demnach weitestgehend ausgeschlossen werden.

Aus den Aussagen der aufgeführten Autoren lässt sich ersehen, dass eine zufriedenstellende Erklärung der Versuchsergebnisse noch aussteht. Grover und Lee interpretieren die durch Endothelin ausgelöste Vasokonstriktion der Koronararterien als Ursache für die Ausdehnung des Myokardinfarktes (101). Burke et al. nahmen weiter an, dass diese vasokonstriktorische Wirkung hauptsächlich in der eigentlichen Ischämiezeit von Bedeutung ist (99). Gonon et al. verschoben diesen Zeitraum auf das Ende der Ischämiezeit bis in die frühe Reperfusion hinein und verwiesen zusätzlich auf eine gehemmte Aktivität von neutrophilen Granulozyten (100).

Die Annahme, dass die Vasokonstriktion der Koronararterien während der Ischämie- und der frühen Reperfusion die wichtigste Zielgröße für eine ET_A-Blockade zur Verringerung der Infarktgröße ist, konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden. Unseren Ergebnissen entsprechend scheint Endothelin die Infarktgröße weder in der akuten Ischämie noch in der frühen Reperfusion zu beeinflussen. In der späteren Reperfusion hingegen könnte Endothelin durch proliferative, profibrotische und inflammatorische Prozesse Einfluss auf den Infarktbereich nehmen (29;103;104). So wurden bei erhöhten Endothelinspiegeln ein vermehrtes Zellwachstum und eine verstärkte Neutrophilenanlagerung in Koronararterien beobachtet. Diese Prozesse konnten durch ET_A- nicht aber durch ET_B-Rezeptorblockade signifikant reduziert werden. Folglich wird vermutet, dass sie überwiegend durch ET_A-Rezeptoren vermittelt werden (103;105). Ngyen et al. sahen unter ET_A-Blockade eine verminderte Narbenheilung und eine verstärkte linksventrikuläre Dilatation sowie Dysfunktion nach Ischämie (106). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Arbeit von Fraccarollo et al. Hier wurde unter Applikation von LU135252 ein verminderter Kollagengehalt in der Infarktnarbe und eine

Ausdehnung der Infarktzone 7 Tage nach der Ischämie gefunden (107). Diese Arbeiten geben Hinweise darauf, dass Endothelin unter anderem durch induziertes Zellwachstum und Neutrophilenanlagerung im infarzierten Gewebe in der späteren Reperfusionzeit kardiale Remodeling-Prozesse positiv beeinflussen kann.

5. Zusammenfassung

In einem etablierten Ischämie-Reperusionsmodell wurde an in-vivo Kaninchenherzen die Auswirkung von einer ET_A- oder ET_B-Rezeptorblockade während und direkt nach einer 60 min Myokardischämie untersucht. Hierfür wurden ein spezifischer ET_A- (LU135252) oder ein spezifischer ET_B- (BQ788) Rezeptorantagonist verwendet. Funktionelle Größen wurden aufgezeichnet und die auf den gefährdeten Myokardbereich bezogene Infarktgröße erfasst.

In der akuten Ischämie wurde die ventrikuläre Funktion durch das aktivierte Endothelin-System nicht verbessert. Die Applikation der Endothelinantagonisten BQ788 und LU135252 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die von uns bestimmten hämodynamischen Parameter.

In der 180-min Reperfusion zeigte sich unter ET_A-Blockade ein negativ inotroper und lusitroper Effekt, durch den sich LVP_{max} und dP/dt_{max} signifikant und dP/dt_{min} nicht signifikant verschlechterten. Dieses lässt den Schluss zu, dass Endothelin am postischämischen Herzen im Gegensatz zum normoxischen und ischämischen Herzen, hauptsächlich vermittelt durch ET_A-Rezeptoren, dazu beiträgt die systolische Funktion zu verbessern.

Parallel zur reduzierten ventrikulären Funktion fiel der arterielle Druck unter ET_A-Blockade in der späten Reperfusion signifikant ab. Bezogen auf den TPR zeigte sich in unseren Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Endothelin ist demnach nicht der entscheidende Faktor für die Regulierung des basalen Gefäßtonus, beeinflusst jedoch möglicherweise insbesondere in der späteren Reperfusion das Gefäßsystem.

Durch die spezifische ET_A- oder ET_B-Rezeptorblockade wurde die Infarktgröße in unserem Ischämie-Reperusionsmodell zumindest in den ersten 3 h der Reperfusion nicht signifikant

verändert. Anhand unserer Ergebnisse ist eine Beeinflussung der Infarktgröße durch Endothelin eher in einem späteren Zeitraum der Reperfusion durch proliferative, profibrotische und inflammatorische Prozesse zu erwarten.

Literaturverzeichnis

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl.* 1988;6:188-191.
2. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, . Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6964-6967.
3. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem.* 1989;264:14613-14616.
4. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:16066-16068.
5. Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Santicoli P, Rovero P, Giachetti A, Meli A. The C-terminal hexapeptide, endothelin-(16-21), discriminates between different endothelin receptors. *Eur J Pharmacol.* 1989;166:121-122.
6. Eglezos A, Cucchi P, Patacchini R, Quartara L, Maggi CA, Mizrahi J. Differential effects of BQ-123 against endothelin-1 and endothelin-3 on the rat vas deferens: evidence for an atypical endothelin receptor. *Br J Pharmacol.* 1993;109:736-738.

7. Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology*. 1992;130:1885-1895.
8. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178:248-255.
9. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci*. 1998;62:1485-1489.
10. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*. 1993;268:19126-19133.
11. Haynes WG, Ferro CE, Webb DJ. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 3:S183-S185.
12. Gellai M, Fletcher T, Pullen M, Nambi P. Evidence for the existence of endothelin-B receptor subtypes and their physiological roles in the rat. *Am J Physiol*. 1996;271:R254-R261.
13. Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *FASEB J*. 1991;5:2713-2720.
14. Wang J, Zeballos GA, Kaley G, Hintze TH. Dilation and constriction of large coronary arteries in conscious dogs by endothelin. *Am J Physiol*. 1991;261:H1379-H1386.

15. Schmitz-Spanke S, Schipke J. Role of endothelin-1 receptors in healthy anaesthetized rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:647-650.
16. Pierre LN, Davenport AP. Relative contribution of endothelin A and endothelin B receptors to vasoconstriction in small arteries from human heart and brain. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31 Suppl 1:S74-S76.
17. Pierre LN, Davenport AP. Endothelin receptor subtypes and their functional relevance in human small coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 1998;124:499-506.
18. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3915-3918.
19. Lee TS, Chao T, Hu KQ, King GL. Endothelin stimulates a sustained 1,2-diacylglycerol increase and protein kinase C activation in bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;162:381-386.
20. Muldoon LL, Rodland KD, Forsythe ML, Magun BE. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1989;264:8529-8536.
21. Pang DC, Johns A, Patterson K, Botelho LH, Rubanyi GM. Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S75-S79.

22. Rapoport RM, Stauderman KA, Highsmith RF. Effects of EDCF and endothelin on phosphatidylinositol hydrolysis and contraction in rat aorta. *Am J Physiol.* 1990; 258: C122-C131.
23. Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157: 1360-1368.
24. Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, Kudo M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1990;85:653-658.
25. Kodama M, Kanaide H, Abe S, Hirano K, Kai H, Nakamura M. Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;160:1302-1308.
26. Mitsuhashi T, Morris RC, Jr., Ives HE. Endothelin-induced increases in vascular smooth muscle Ca²⁺ do not depend on dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. *J Clin Invest.* 1989;84:635-639.
27. Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1989;264:8237-8240.

28. Sugiura M, Inagami T, Hare GM, Johns JA. Endothelin action: Inhibition by a protein kinase C inhibitor and involvement of phosphoinositols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;158:170-176.
29. Kusuhara M, Yamaguchi K, Kuranami M, Suzaki A, Ishikawa S, Moon H, Adachi I, Hori S, Handa S. Stimulation of anchorage-independent cell growth by endothelin in NRK 49F cells. *Cancer Res.* 1992;52:3011-3014.
30. Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res.* 2002;62:6381-6384.
31. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol.* 1999;375:133-138.
32. Kurzelewski M, Czarnowska E, Beresewicz A. Endothelin in the mechanism of endothelial injury and neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol.* 2002;434:95-107.
33. Langenfeld MR, Nakhla S, Death AK, Jessup W, Celermajer DS. Endothelin-1 plus oxidized low-density lipoprotein, but neither alone, increase human monocyte adhesion to endothelial cells. *Clin Sci (Lond).* 2001;101:731-738.
34. Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol.* 1999;127:969-979.

35. Lopez FA, Riesco A, Espinosa G, Digiuni E, Cernadas MR, Alvarez V, Monton M, Rivas F, Gallego MJ, Egido J, . Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation*. 1993;88:1166-1171.
36. Filep JG. Endogenous endothelin modulates blood pressure, plasma volume, and albumin escape after systemic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1997;30:22-28.
37. Filep JG, Foldes-Filep E, Rousseau A, Fournier A, Sirois P, Yano M. Endothelin-1 enhances vascular permeability in the rat heart through the ETA receptor. *Eur J Pharmacol*. 1992;219:343-344.
38. Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Tonussi CR, Rae GA. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997;75:596-600.
39. Battistini B, Filep J, Sirois P. Potent thromboxane-mediated in vitro bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig. *Eur J Pharmacol*. 1990;178:141-142.
40. Zhu Y, Yang HT, Endoh M. Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscle. *Am J Physiol*. 1997;273:H119-H127.
41. Concas V, Laurent S, Brisac AM, Perret C, Safar M. Endothelin has potent direct inotropic and chronotropic effects in cultured heart cells. *J Hypertens Suppl*. 1989;7:S96-S97.

42. Picker O, Schindler AW, Scheeren TW. Endogenous endothelin and vasopressin support blood pressure during epidural anesthesia in conscious dogs. *Anesth Analg.* 2001;93:1580-6, table.
43. Nagasaka T, Izumi M, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Positive inotropic effect of endothelin-1 in the neonatal mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol.* 2003;472:197-204.
44. Saetrum OO, Moller S, de Vries R, Edvinsson L, Saxena PR. Positive inotropic responses mediated by endothelin ET(A) and ET(B) receptors in human myocardial trabeculae. *Clin Sci (Lond).* 2000;99:161-168.
45. Poli E, Barbosa G, Casoli C, Starcich R, Bertaccini G. Positive inotropic effect of endothelin-2 on human atrium preparations in vitro. *Cardioscience.* 1991;2:99-104.
46. Endoh M, Takanashi M. Inotropic effects of endothelin on mammalian ventricular contractility. *Basic Res Cardiol.* 1991;86 Suppl 1:173-178.
47. Watanabe T, Kusumoto K, Kitayoshi T, Shimamoto N. Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 13 Suppl 5: S108-S111.
48. Sakurai K, Norota I, Tanaka H, Kubota I, Tomoike H, Endo M. Negative inotropic effects of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. *Life Sci.* 2002;70:1173-1184.

49. Izumi M, Miyamoto S, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol.* 2000;396:109-117.
50. Zhu Y, Yang HT, Endoh M. Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1997;273:H119-H127.
51. MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET(A) receptor antagonist. *Circulation.* 2000;101:142-147.
52. Beyer ME, Nerz S, Kramer BK, Hoffmeister HM. Hemodynamic and inotropic effects of endothelin-1 in vivo. *Basic Res Cardiol.* 1994;89:39-49.
53. Tonnessen T, Giaid A, Saleh D, Naess PA, Yanagisawa M, Christensen G. Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res.* 1995;76:767-772.
54. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circ Res.* 1991;69:370-377.
55. Yasuda M, Kohno M, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, Teragaki M, Oku H, Takeuchi K, Takeda T. Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J.* 1990;119:801-806.
56. Ray SG, McMurray JJ, Morton JJ, Dargie HJ. Circulating endothelin in acute ischaemic syndromes. *Br Heart J.* 1992;67:383-386.

57. Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, Toth M, Juhasz-Nagy A, Orzechowski HD, Bohm M, Paul M. Endothelin converting-enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20:417-437.
58. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1994;89:1573-1579.
59. Tsuji S, Sawamura A, Watanabe H, Takihara K, Park SE, Azuma J. Plasma endothelin levels during myocardial ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 1991;48:1745-1749.
60. Kusumoto K, Awane Y, Fujiwara S, Watanabe T. Role of endogenous endothelin in extension of rabbit myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 8: S339-S342.
61. Lee JY, Warner RB, Adler AL, Opgenorth TJ. Endothelin ETA receptor antagonist reduces myocardial infarction induced by coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Pharmacology*. 1994;49:319-324.
62. McMurdo L, Thiemermann C, Vane JR. The effects of the endothelin ETA receptor antagonist, FR 139317, on infarct size in a rabbit model of acute myocardial ischaemia and reperfusion. *Br J Pharmacol*. 1994;112:75-80.
63. Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:290-298.

64. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest.* 1995;96:1059-1065.
65. Noll G, Luscher TF. The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 1998; 19 Suppl C:C30-C38.
66. Oie E, Vinge LE, Tonnessen T, Groggaard HK, Kjekshus H, Christensen G, Smiseth OA, Attramadal H. Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol.* 1997;273:H1727-H1736.
67. Wang QD, Li XS, Lundberg JM, Pernow J. Protective effects of non-peptide endothelin receptor antagonist bosentan on myocardial ischaemic and reperfusion injury in the pig. *Cardiovasc Res.* 1995;29:805-812.
68. Krause SM, Lynch JJ, Jr., Stabilito II, Woltmann RF. Intravenous administration of the endothelin-1 antagonist BQ-123 does not ameliorate myocardial ischaemic injury following acute coronary artery occlusion in the dog. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1672-1678.
69. Concas V, Laurent S, Brisac AM, Perret C, Safar M. Endothelin has potent direct inotropic and chronotropic effects in cultured heart cells. *J Hypertens Suppl.* 1989;7: S96-S97.
70. Endoh M, Takanashi M. Inotropic effects of endothelin on mammalian ventricular contractility. *Basic Res Cardiol.* 1991;86 Suppl 1:173-178.

71. Watanabe T, Kusumoto K, Kitayoshi T, Shimamoto N. Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 13 Suppl 5:S108-S111.
72. Saetrum OO, Moller S, de Vries R, Edvinsson L, Saxena PR. Positive inotropic responses mediated by endothelin ET(A) and ET(B) receptors in human myocardial trabeculae. *Clin Sci (Lond).* 2000;99:161-168.
73. Krause SM, Clayton FC, Williams DL, Jr. Myocardial protection with the non-selective endothelin receptor antagonist L-753,037 following acute coronary artery occlusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:214-221.
74. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184:100-106.
75. White DG, Cannon TR, Garratt H, Mundin JW, Sumner MJ, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S144-S148.
76. LaDouceur DM, Flynn MA, Keiser JA, Reynolds E, Haleen SJ. ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;196:209-215.
77. Eglen RM, Michel AD, Sharif NA, Swank SR, Whiting RL. The pharmacological properties of the peptide, endothelin. *Br J Pharmacol.* 1989;97:1297-1307.

78. Ohlstein EH, Horohonich S, Hay DW. Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;250:548-555.
79. Donckier J, Hanet C, Stoleru L, Van Mechelen H, Galanti L, Hayashida W, Keyeux A, Ketelslegers JM, Pouleur H. Effects of endothelin-1 at pathophysiologic concentrations on coronary perfusion and mechanical function of normal and postischemic myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23:212-219.
80. Traverse JH, Judd D, Bache RJ. Dose-dependent effect of endothelin-1 on blood flow to normal and collateral-dependent myocardium. *Circulation.* 1996;93:558-566.
81. Domenech R, Macho P, Gonzalez R, Huidobro-Toro JP. Effect of endothelin on total and regional coronary resistance and on myocardial contractility. *Eur J Pharmacol.* 1991;192:409-416.
82. Fukuda K, Hori S, Kusuhara M, Satoh T, Kyotani S, Inoue S, Ohno H, Yamaguchi K, Handa S, Nakamura Y. Intracoronary endothelin-1 increases coronary retrograde pressure by constricting arterioles. *Cardiovasc Res.* 1990;24:987-992.
83. Larkin SW, Clarke JG, Keogh BE, Araujo L, Rhodes C, Davies GJ, Taylor KM, Maseri A. Intracoronary endothelin induces myocardial ischemia by small vessel constriction in the dog. *Am J Cardiol.* 1989;64:956-958.
84. Filep JG. Endogenous endothelin modulates blood pressure, plasma volume, and albumin escape after systemic nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1997;30:22-28.

85. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* 1992;50:247-255.
86. Fukuda Y, Hirata Y, Yoshimi H, Kojima T, Kobayashi Y, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;155:167-172.
87. Masaki T. Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocr Rev.* 1993;14:256-268.
88. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med.* 1998;338:784-790.
89. Nakov R, Pfarr E, Eberle S. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens.* 2002;15:583-589.
90. Kowala M, Murugesan N, Tellew J, Carlson K, Monshizadegan H, Ryan C, Gu Z, Kane B, Fadnis L, Baska RA, Beyer S, Dickinson K, Zang D, Mark P, Ferrer P, Giancarli M, Bauman J, Bird E, Panchal B, Yang Y, Trippodo N, Barrish J, Macor J. Novel Dual Action AT1 And ETA Receptor Antagonists Reduce Blood Pressure In Experimental Hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004.
91. Tonnessen T, Giaid A, Saleh D, Naess PA, Yanagisawa M, Christensen G. Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res.* 1995;76:767-772.

92. Tonnessen T, Christensen G, Oie E, Holt E, Kjekshus H, Smiseth OA, Sejersted OM, Attramadal H. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovasc Res.* 1997;33:601-610.
93. Tonnessen T, Lunde PK, Giaid A, Sejersted OM, Christensen G. Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc Res.* 1998;39:633-643.
94. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:38-43.
95. Cernacek P, Stewart DJ, Monge JC, Rouleau JL. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:598-606.
96. Wackenfors A, Emilson M, Ingemansson R, Hortobagyi T, Szok D, Tajti J, Vecsei L, Edvinsson L, Malmstro M. Ischemic heart disease induce upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries. *Eur J Pharmacol.* 2004;484:103-109.
97. Cannan CR, Burnett JC, Jr., Brandt RR, Lerman A. Endothelin at pathophysiological concentrations mediates coronary vasoconstriction via the endothelin-A receptor. *Circulation.* 1995;92:3312-3317.
98. Lavalley M, Thorin E. Role of ET-1 in the regulation of coronary circulation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:570-577.

99. Burke SE, Nelson RA. Endothelin-receptor antagonist FR 139317 reduces infarct size in a rabbit model when given before, but not after, coronary artery occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;29:87-92.
100. Gonon AT, Gourine AV, Middelveld RJ, Alving K, Pernow J. Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:454-462.
101. Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS. The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1613-1618.
102. Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1105-H1112.
103. Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res.* 2002;62:6381-6384.
104. Kon V, Fogo A. Endothelin: potential role in development and disease. *Pediatr Nephrol.* 1993;7:876-880.
105. Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol.* 1999;127:969-979.

106. Nguyen QT, Cernacek P, Calderoni A, Stewart DJ, Picard P, Sirois P, White M, Rouleau JL. Endothelin A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat. *Circulation*. 1998;98:2323-2330.
107. Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J, Ertl G. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling. *Cardiovasc Res*. 2002;54:559-567.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Schipke und Frau Dr. Simone Schmitz-Spanke für die Anregungen und lehrreiche Anleitungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiter bedanke ich mich bei Frau Renate Rummel für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich stets ermutigt und unterstützt haben.

Auch meiner Ehefrau gilt besonderer Dank für die stetige Rücksicht und Geduld sowie den Rückhalt, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit fertig zu stellen.

Lebenslauf

Name: Stephan Schmidt
Geburtsdatum/-ort: 14. November 1976, Mettmann
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 – 1987 Kath. Grundschule, Mettmann
1987 – 1996 Konrad-Heresbach-Gymnasium, Mettmann

Wehrdienst:

1996 – 1997 Sanitätsdienst Wachbataillon BMVg, Siegburg

Hochschulbildung:

1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1999 Ärztliche Vorprüfung
2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 – 2003 Praktisches Jahr in den Kliniken St. Antonius, Wuppertal
2003 - 2004 Arzt im Praktikum in der Chirurgischen Klinik des Bethesda Krankenhauses, Wuppertal
Seit Oktober 2004 Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik des Bethesda Krankenhauses, Wuppertal
Seit August 2005 Assistenzarzt in der Orthopädie des St. Josef Krankenhauses, Wuppertal
Solingen 2005

**Einfluss der Endothelin-Rezeptorblockade auf kardiale Funktion und Infarktgröße
im akuten Ischämie-Reperusionsmodell am Kaninchenherzen**

Stephan Schmidt

Abstract

In einem etablierten Ischämie-Reperusionsmodell wurde an in-vivo Kaninchenherzen die Auswirkung einer ET_A- oder ET_B-Rezeptorblockade während und direkt nach einer 60-min Myokardischämie untersucht. Hierfür wurden ein spezifischer ET_A- (LU135252) und ein spezifischer ET_B- (BQ788) Rezeptorantagonist verwendet. Funktionelle Größen wurden aufgezeichnet und die auf den gefährdeten Myokardbereich bezogene Infarktgröße erfasst.

In der akuten Ischämie wurde die ventrikuläre Funktion durch das aktivierte Endothelin-System nicht verbessert. Die Applikation der Endothelin-Antagonisten BQ788 und LU135252 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erfassten hämodynamischen Variablen.

In der 180-min Reperfusion zeigte sich unter ET_A-Blockade ein negativ inotroper und lusitroper Effekt, durch den sich LVP_{max} und dP/dt_{max} signifikant und dP/dt_{min} nicht signifikant verschlechterten. Dieses lässt den Schluss zu, dass Endothelin am postischämischen Herzen im Gegensatz zum normoxischen und ischämischen Herzen - hauptsächlich vermittelt durch ET_A-Rezeptoren - dazu beiträgt, die systolische Funktion zu verbessern.

Parallel zur reduzierten ventrikulären Funktion fiel der arterielle Druck unter ET_A-Blockade in der späten Reperfusion signifikant ab. Bezogen auf den peripheren Widerstand zeigte sich in unseren Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Endothelin ist demnach nicht der entscheidende Faktor für die Regulierung des basalen Gefäßtonus, beeinflusst jedoch möglicherweise insbesondere in der späteren Reperfusion das Gefäßsystem.

Durch die spezifische ET_A- oder ET_B-Rezeptorblockade wurde die Infarktgröße in unserem Ischämie-Reperusionsmodell zumindest in den ersten 3 h der Reperfusion nicht signifikant verändert. Anhand unserer Ergebnisse ist eine Beeinflussung der Infarktgröße durch Endothelin eher in einem späteren Zeitraum der Reperfusion durch proliferative, profibrotische und inflammatorische Prozesse zu erwarten.