

Aus der Klinik für Anaesthesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. J. Tarnow

**Untersuchungen zur Interaktion von endogenem
Stickstoffmonoxid und den vasokonstringierenden Systemen
Endothelin, Angiotensin
Vasopressin sowie dem autonomen Nervensystem
- Eine Studie am wachen Hund -**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Carsten Swak
2006

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Bernd Nürnberg

Referent: Priv.-Doz. Dr. Olaf Picker

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Ulrich Meyer

Einleitung	4
Material und Methoden	7
- Versuchsprotokoll	10
- Statistik.....	14
Ergebnisse	16
- Hemmung der NO-Synthase gegenüber der Kontrollgruppe mit NaCl 0,9%	16
- Endothelinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung	18
- Vasopressinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung	20
- Kombinationsblockade von EB und VB und NO-Synthasehemmung	22
- Angiotensinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung	24
- Hexamethoniumgabe und NO-Synthasehemmung.....	26
- Kontrollversuche zur Stereospezifität des NO-Synthasehemmers	28
Diskussion	29
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	40

Einleitung

An Hand von Experimenten an wachen Hunden sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit das endogene Stickstoffmonoxid (NO) mit den Hormonsystemen Endothelin, Angiotensin und Vasopressin sowie dem autonomen Nervensystem in Bezug auf die hämodynamischen und kardiovaskulären Effekte interagiert.

Endogenes Stickstoffmonoxid (NO) wird durch spezifische Synthasen gebildet, welche in drei verschiedenen Isoformen an den verschiedensten Stellen im menschlichen und tierischen Organismus vorkommen.

Zum einen die endotheliale NO-Synthase (e-NOS) [1, 2], welche durch lokale Bildung von NO relaxierend auf den Tonus der Gefäße wirkt und somit direkt den systemischen Gefäßwiderstand beeinflusst [3]. Des weiteren die neuronale NO-Synthase (n-NOS), welche in Hirngebieten mit Beziehung zur Kreislaufsteuerung, wie beispielsweise in den verschiedenen Kernen der Medulla oblongata und des Hypothalamus [4], sowie im sympathischen und parasymphatischen Nervensystem [5-7] und auch in Schrittmacherzellen des Herzens [6] vorkommt und somit möglicherweise zentral vermittelte Effekte auf die Hämodynamik und insbesondere auf das vegetative Nervensystem hat [8, 9]. Die dritte Isoform, die induzierbare NO-Synthase (i-NOS), setzt erst nach Induktion durch z.B. Zytokine, Tumornekrosefaktor und Endotoxine NO frei [3]. Auch hier liegt anscheinend die Hauptfunktion in der peripheren Vasodilatation, weswegen sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks spielt.

Da die Hauptfunktion des endogenen Stickstoffmonoxids die Vasodilatation darstellt, kommt es unter einer Hemmung dieser Isoformen durch einen nicht-selektiven NO-Synthasehemmer wie z.B. L-NAME (N^o-nitro-L-arginin-methyl-ester) und den damit verbundenem Abfall des Stickstoffmonoxidspiegels, zu einem Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes und einer damit verbunden Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Des weiteren kommt es zu einem

Abfall der Herzfrequenz mit Reduktion des Herzzeitvolumens. Diese Effekte von L-NAME sind bekannt und in mehreren Publikationen schon beschrieben worden [10-12]. Unklar ist allerdings ob die im Rahmen der NO-Synthasehemmung beobachtete Bradykardie rein reflektorischer Natur ist, d.h. bedingt durch den Blutdruckanstieg, oder aber direkt vermittelt wird durch Wirkungen der NO-Synthasehemmung auf Kreislaufzentren.

Darüber hinaus kann man das NO-System bezüglich seiner kardiovaskulären Effekte nicht isoliert betrachten, da man annehmen muss, dass Interaktionen des NO-Systems mit einer Vielzahl von vasokonstriktorischen Hormonsystemen bestehen.

Zum einen wird die Freisetzung von Endothelin unter physiologischen Bedingungen möglicherweise durch NO gehemmt[13, 14], zum anderen ist die Wirksamkeit von Angiotensin gesteigert nach Blockade der NO-Synthase[15] sowie nach Entfernung des Endothels als Syntheseort des NO[16]. Die genauen Wechselwirkungen zwischen NO und Vasopressin sind jedoch bisher noch unklar, da es sowohl über V₁-Rezeptoren[17, 18] als auch über V₂-Rezeptoren[19-21] zu einer Freisetzung von NO zu kommen scheint.

Da NO-Synthasen, wie schon eingangs erwähnt, auch in Hirnnervenkernen mit Bezug zum autonomen Nervensystem gefunden wurden, ist besonders die Herzfrequenzregulation als möglicher zentraler Effekt durch die Hemmung der n-NOS zu beachten. Allerdings führte eine Allgemeinanästhesie, wie in den meisten Studien durchgeführt, nachweislich zu einer Suppression der Aktivität des Nervus vagus[22, 23], und macht dadurch eine Beurteilung unmöglich.

Daher führten wir die eigenen Studien an wachen Tieren durch, um ein funktionstüchtiges autonomes Nervensystem zur Verfügung zu haben und somit auch mögliche zentrale Effekte der NO-Synthasehemmung beurteilen zu können.

Zur Beantwortung der oben gestellten Fragen untersuchten wir an wachen chronisch instrumentierten Hunden, die dosisabhängigen Effekte des nicht-selektiven NO-Synthasehemmers L-NAME auf den Kreislauf, speziell auf den Blutdruck (MAD) und den

systemischen Gefäßwiderstand (SVR), jeweils unter Kontrollbedingungen nach vorhergehender Blockade des Endothelin-, Vasopressin-, Renin-Angiotensin-Systems sowie nach Blockade der autonomen Ganglien.

Material und Methoden

Die Versuche (n=51) wurden nach Genehmigung durch die Bezirksregierung in Düsseldorf an insgesamt 8 wachen, chronisch instrumentierten Hunden (Foxhounds beiderlei Geschlechts, 24-34 kg) in zufälliger Reihenfolge durchgeführt, wobei jeder Hund als seine eigene Kontrolle diente.

Zwischen aufeinanderfolgenden Versuchen an ein und demselben Tier wurde ein Zeitabstand von mindestens zwei Wochen eingehalten, um Interaktionen der verschiedenen Pharmaka zu verhindern und eine vollständige Elimination des NO-Synthaseinhibitors zu ermöglichen [24].

Die Tiere lebten in der universitätseigenen Tierversuchsanlage und wurden mit Standardnahrung (Medium adult 1[®], Royal Canin, Aimargues, France) gefüttert. Die Versuche begannen regelmäßig um 8 Uhr morgens, nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz und bei freiem Zugang zu Wasser. Während der Versuchsreihen waren die Hunde körperlich gesund und verhaltensmäßig unauffällig, wobei Hündinnen die sich im Oestrus befanden von den Versuchen ausgeschlossen wurden

Operationen:

Einige Wochen vor Beginn der eigentlichen Experimente wurden die Hunde unter Allgemeinanästhesie (Enflurane/Stickstoffmonoxid, Fentanyl) und aseptischen Bedingungen operiert.

In einer ersten Operation wurden beide Carotisarterien aus ihrer Umgebung isoliert und in Hautschlingen vorverlagert um während der eigentlichen Experimente kontinuierlich den Blutdruck zu messen und Blutproben abnehmen zu können [25]. In einer zweiten Operation wurde über eine linksseitige Thorakotomie ein Ultraschall-Transitzeit-Flußaufnehmer (T101, Transonic Systems, Ithaca, NY) um die Pulmonalarterie

implantiert zur kontinuierlichen Messung des Herzzeitvolumens sowie zur Berechnung des Gefäßwiderstandes als Maß des Gefäßmuskeltonus [26].

Das zur Übertragung des Flußaufnehmersignals notwendige Kabel wurde zwischen beiden Schulterblättern nach außen geleitet und im weiteren Verlauf durch eine Thoraxweste geschützt.

In der Genesungsphase wurden die Hunde täglich trainiert um wach und ruhig, in rechter Seitenlage, entspannt auf einem gepolsterten Tisch zu liegen. Weiterhin wurden die Hunde durch das Training mit den Räumlichkeiten und den Experimentatoren vertraut gemacht.

Messverfahren:

Herzfrequenz (HF) und RR-Intervalle (RR)

HF und RR wurden von einem Standard-EKG, welches über Oberflächenklebeelektroden abgeleitet wurde, über ein R-Zacken-getriggertes Cardiotachometer, aufgenommen.

Mittlerer arterieller Druck (MAD) und zentralvenöser Druck (ZVD)

Der arterielle Blutdruck und der ZVD wurden kontinuierlich elektromanometrisch über flüssigkeitsgefüllte Katheter in den Carotisarterien und der unteren Hohlvene gemessen. (Statham Manometer P23 ID, USA) Die Elektromanometer wurden auf den Dornfortsatz des 7. Halswirbels adjustiert und vor jedem Versuch mit einer Quecksilbersäule bzw. Wassersäule (Eichwaage nach Gauer) geeicht.

Der mittlere arterielle Druck (MAD) wurde durch Bildung der Integrale aus den Originalsignalen berechnet.

Herzzeitvolumen (HZV)

Der Blutfluß durch die Pulmonalarterie wurde kontinuierlich mit einem Ultraschall-Transitzeit-System gemessen. (T101, Transonic Systems, Ithaca, NY)

Diese Flußwandler wurden geeicht, sowohl vor der Implantation (in vitro durch das Durchströmen mit definierten Flüssen einer Kochsalzlösung über eine Rollerpumpe), als auch wiederholt während der Experimente (in vivo) nach dem Fick'schen Prinzip als Quotient aus :

$$\text{HZV} = \frac{\dot{V}O_2}{A\text{VDO}_2}$$

(Sauerstoffverbrauch ($\dot{V}O_2$); arterio-gemischtenvenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz ($A\text{vDO}_2$); Herzzeitvolumen (HZV))

Systemischer Gefäßwiderstand (SVR)

Der systemische Gefäßwiderstand, als Maß des gefäßmuskulären Tonus, wurde berechnet mit der Formel :

$$\text{SVR} = \frac{(\text{MAD} - \text{ZVD})}{\text{HZV}}$$

(mittlerer arterieller Druck (MAD); zentralvenöser Druck (ZVD), Herzzeitvolumen (HZV))

Alle Variablen wurden kontinuierlich auf einen Acht-Kanal-Polygraphen aufgenommen (Model RS 3800, Gould Inc., Cleveland, OH), sowie auf der Festplatte eines konventionellen Computers nach AD-Wandlung der Signale mit einer Frequenz von 400 Hz-Kanal gespeichert (Powerlab®, ADInstruments, Castle Hill, Australia). Die weitere Auswertung der Variablen EKG, MAD, ZVD, und SV, erfolgte über das Programm Chart 4.0, Powerlab®, ADInstruments, Castle Hill, Australia.

Herzfrequenzvariabilität (HRV)

Als Maß für die Aktivität des autonomen Nervensystems wurde die HRV bestimmt. Dazu wurde, am Ende jeder Intervention, das Original-EKG-Signal für die Dauer von genau 5 Minuten ausgewertet [Programm Chart 4.0, Powerlab®, ADInstruments, Castle Hill, Australia.], und die Standardabweichung der RR-Intervalle über den Analysezeitraum bestimmt.

Ausgewertet wurden am Ende der Kontrollphase sowie am Ende jeder der darauf folgenden Interventionen ausschließlich Ergebnisse bei denen sich sämtliche Kreislaufvariablen im Gleichgewicht befanden. Dabei wurde besonders beachtet, dass ausschließlich EKG-Registrierungen, welche frei von Artefakten und irregulären EKG-Komplexen waren, analysiert wurden. Die so bestimmte Aktivität des autonomen Nervensystems ist insbesondere ein Maß für die Vagusaktivität [27].

Versuchsprotokoll

Die Versuche begannen jeweils um 8:00 Uhr morgens und wurden unter Grundumsatzbedingungen durchgeführt (Nahrungskarenz von mindestens 12 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser, thermoneutraler Raumtemperatur von 24°C [28]). Die Hunde befanden sich in rechts Seitenlage auf einem gepolsterten Untersuchungstisch in einem Schall gedämpften und leicht abgedunkeltem Raum.

Vor jedem Versuch wurde eine Carotisarterie kanüliert, über die ein Katheter in den Aortenbogen vorgeschoben wurde, zur kontinuierlich Messung des Aortendrucks sowie

zur Entnahme von Blutproben. (Vygon Leader Cath. REF 115.11, Durchmesser 1,2mm, 18G, Länge 100mm).

Darüber hinaus wurde über eine Hinterlaufvene ein Katheter bis zur Vena cava inf. vorgeschoben zur Messung des zentralen Venendrucks und zur Infusion der verschiedenen Testsubstanzen (Cavafix, Braun Melsungen, 0,5x0,9mm, Länge 32cm, 20G). Über eine Vorderlaufvene wurde ein weiterer periphervenöser Zugang zur Injektion von Pharmaka vorgeschoben (Venenkatheter Vasofix®, Braun Melsungen, Durchmesser 1,4 mm, Länge 45 mm).

Drei Klebeelektroden wurden zur unipolaren Standard- EKG- Ableitung, links oberhalb des Ellenbogens, auf der linken seitlichen Brustwand in Höhe der Herzbasis und oberhalb des Kniegelenkes, auf der zuvor rasierten Haut, befestigt.

Nachdem die Hunde an die Aufzeichnungssysteme angeschlossen waren, wurde 30 Minuten abgewartet bis sich die verschiedenen Kreislaufvariablen im steady state befanden. Die eigentlichen Experimente begannen mit einer 30-minütigen Kontrollphase, gefolgt von den verschiedenen Interventionen je nach Versuchsprogramm. Am Ende der Kontrollphase sowie jeder Intervention wurden Blutproben zur Bestimmung der arteriellen Blutgase und des pH-Wertes entnommen.

Kontrollversuche (NaCl 0,9%) (n=5)

Um den Zeitgang während der Versuche und seine Auswirkung auf die untersuchten Kreislaufvariablen beurteilen zu können wurde alle 30 Minuten 10 ml NaCl 0,9% Lösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun; B.Braun Meisungen AG) injiziert. Somit hatten die Kontrollversuche die gleiche Dauer wie die eigentlichen Versuchsreihen.

NO-Synthasehemmung durch L-NAME (n=6)

Im Anschluss an die Kontrollphase wurde L-NAME (N^ω-nitro-L-arginin Methyl Ester, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) in aufsteigenden Dosierungen (0,3; 1,0; 3,0; 10,0 und 50,0 mg·kg⁻¹) intravenös injiziert. Zwischen aufeinanderfolgenden L-NAME Injektionen wurde ein Zeitabstand von 30 Minuten abgewartet.

Endothelinrezeptorblockade (EB) mit NO-Synthasehemmung (n=6)

Im Anschluss an die Kontrollphase, wurde eine Endothelin-Rezeptorenblockade mit Tezosentan® (RO 61-0612; 5-isopropyl-pyridine-2-sulfonic acid 6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2-(2-1*H*-tetrazol-5yl-pyridin-4-yl)-pyrimidin-4-ylamid, Actelion LTD) in einer Dosierung von 3 mg·kg⁻¹ durchgeführt. Anschließend folgte eine kontinuierliche Infusion von Tezosentan® in einer Dosierung von 3 mg·kg⁻¹·h⁻¹. Darauf folgten L-NAME-Injektionen wie in dem Versuchsprogramm L-NAME beschrieben. Am Ende des Versuches wurden 7,5 µg Endothelin injiziert (E-7764, Sigma Chemicals), zur Überprüfung der Effektivität der Endothelin-Rezeptorblockad. In Kontrollexperimenten steigerte diese Dosierung den Blutdruck um 25 mmHg und senkte die Herzfrequenz um ca. 15 min⁻¹, wohingegen beide Variablen nach vorheriger Blockade der Endothelinrezeptoren unverändert blieben.

Vasopressinrezeptorblockade (VB) mit NO-Synthasehemmung (n=6)

Nach der Kontrollphase wurde der kompetitive und selektive V₁-Rezeptor-Antagonist (V1B) β-mercapto-β-β-cyclo-penta-methylene-propionyl-O-Me-Tyr-Arg-Vasopressin (V 2255, Sigma Chemicals), in einer Dosierung von 40 µg·kg⁻¹ Körpergewicht injiziert. Die darauf folgenden L-NAME-Injektionen und Blutentnahmen erfolgten, wie im Versuchsprogramm L-NAME beschrieben. Am Ende des Versuches wurde

Vasopressin (V 0377, Sigma Chemicals), zur Überprüfung der Effektivität der vorhergehenden Vasopressinrezeptorblockade, in einer Dosierung von 400 mU injiziert. Diese Dosis Vasopressin steigerte in Kontrollexperimenten den Blutdruck um 20 mmHg und senkte die Herzfrequenz um ca. 10 min^{-1} , blieb aber nach vorhergehender Blockade der Vasopressinrezeptoren wirkungslos.

Kombinationsblockade von EB und VB mit NO-Synthasehemmung (n=6)

Um möglichen additive Effekte des Endothelin- und Vasopressinsystems beurteilen zu können führten wir nach der Kontrollphase eine Endothelin- sowie anschließend eine Vasopressinrezeptorblockade, wie oben geschildert, durch. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Interventionen betrug 30 Minuten. Die darauf folgenden L-NAME-Injektionen wurden, wie in dem Versuchsprogramm L-NAME beschrieben, durchgeführt.

Am Ende des Versuchs wurde Endothelin in der Dosis 7,5 μg , und nach einem Zeitabstand von 5 Minuten Vasopressin in einer Dosierung von 400 mU injiziert, um die Effektivität der Blockade der Endothelin- und Vasopressinrezeptoren überprüfen zu können. Die in den Kontrollversuchen beschriebenen Effekte auf Blutdruck und Herzfrequenz durch Vasopressin und Endothelingabe, blieben auch hier nach vorhergehender Blockade aus.

Angiotensinrezeptorenblockade (AB) mit NO-Synthasehemmung (n=6)

Nach der Kontrollphase wurde eine Angiotensinrezeptorenblockade mit dem Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten Losartan® (2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]-imidazole, (Merck Sharp&Dohme, GB)) durchgeführt, durch Infusion einer kontinuierlichen Menge Losartan® in einer Dosierung von $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ um die Rezeptorblockade während des Experimentes aufrecht zu erhalten. Die nun folgenden L-NAME-Injektionen wurden, wie in dem Versuchsprogramm L-NAME beschrieben, durchgeführt. Am Ende des Versuches wurden $20 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ Angiotensin II (Sigma Chemicals,

St.Louis, USA; A9525) injiziert, welche in Kontrollexperimenten den mittleren arteriellen Blutdruck um 20 mmHg steigerte, jedoch nach vorhergehender Blockade der Angiotensinrezeptoren wirkungslos blieb.

Hexamethoniumgabe mit NO-Synthasehemmung (n=6)

Nach der Kontrollphase wurde, zur Hemmung der efferenten autonomen Aktivität und um möglicherweise zentrale von peripheren Effekten unterscheiden zu können, eine Blockade der vegetativen Ganglien durch Injektion von Hexamethonium (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) in einer Dosierung von $7,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ durchgeführt. Darauf folgte eine kontinuierliche Infusion von $7,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ um die Ganglienblockade aufrecht zu erhalten. Die darauf folgenden L-NAME-Injektionen wurden, wie in dem Versuchsprogramm L-NAME beschrieben, durchgeführt.

D-NAME (n=6)

Um die Isomerspezifität der Effekte von L-NAME zu beurteilen, wurde nach der Kontrollphase D-NAME in einer Dosierung von $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ injiziert.

Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Hierbei wurden folgende Nullhypothesen getestet:

1. L-NAME hat keinen Effekt auf die untersuchten Kreislaufvariablen, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollbedingungen. Diese Hypothese wurde durch eine

Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) überprüft, gefolgt von einem Fisher's Protected Least Square Difference (PLSD) post-hoc Test.

2. Die Maximaleffekte von L-NAME auf die Kreislaufvariablen unterscheiden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. Diese Hypothese wurde durch einen gepaarten t-Test überprüft.

Die Nullhypothese wurde verworfen und eine statistische Signifikanz angenommen, wenn $p < 0,05$ war.

Da sich während der Versuche zeigte, dass die Gabe der höchsten Dosierung von L-NAME ($50,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), zu teilweise starker Unruhe der Tiere führte, wurden in allen Gruppen die Effekte von L-NAME nur bis zu einer maximalen Dosierung von $10,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ analysiert.

Ergebnisse

Hemmung der NO-Synthase gegenüber der Kontrollgruppe mit NaCl 0,9%

Die Hemmung der NO-Synthase mit L-NAME steigerte dosisabhängig den Blutdruck von 96 ± 4 mmHg auf maximal 115 ± 3 mmHg (siehe Abbildung 1). Dieses war bedingt durch einen gleichartigen Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes von 33 ± 4 mmHg·min·l⁻¹ auf 78 ± 10 mmHg·min·l⁻¹.

Gegenläufig hierzu fielen sowohl die Herzfrequenz als auch das Herzzeitvolumen bis auf die Hälfte ihrer Ausgangswerte ab, und zwar von 78 ± 5 min⁻¹ auf 37 ± 2 min⁻¹, bzw. von 95 ± 6 ml·kg⁻¹·min⁻¹ auf 49 ± 10 ml·kg⁻¹·min⁻¹.

Verursacht wurde dieser HF-Abfall durch eine erhöhte Vagusaktivität erkennbar an einer Verdreifachung der SDNN von 186 ± 55 auf 570 ± 42 ms. (vgl. hierzu Hexamethonium S. 25)

Hervorzuheben ist hierbei, das bereits bei einer Dosierung von $0,3$ mg·kg⁻¹ L-NAME die Herzfrequenz mit -24 ± 4 min⁻¹ beträchtlich abfiel, eine Dosierung, die keinen Effekt auf den Blutdruck aufwies.

In der Kontrollgruppe zeigten sich lediglich geringgradige Veränderungen der Kreislaufvariablen im Sinne einer weitgehenden Beruhigung der Tiere.

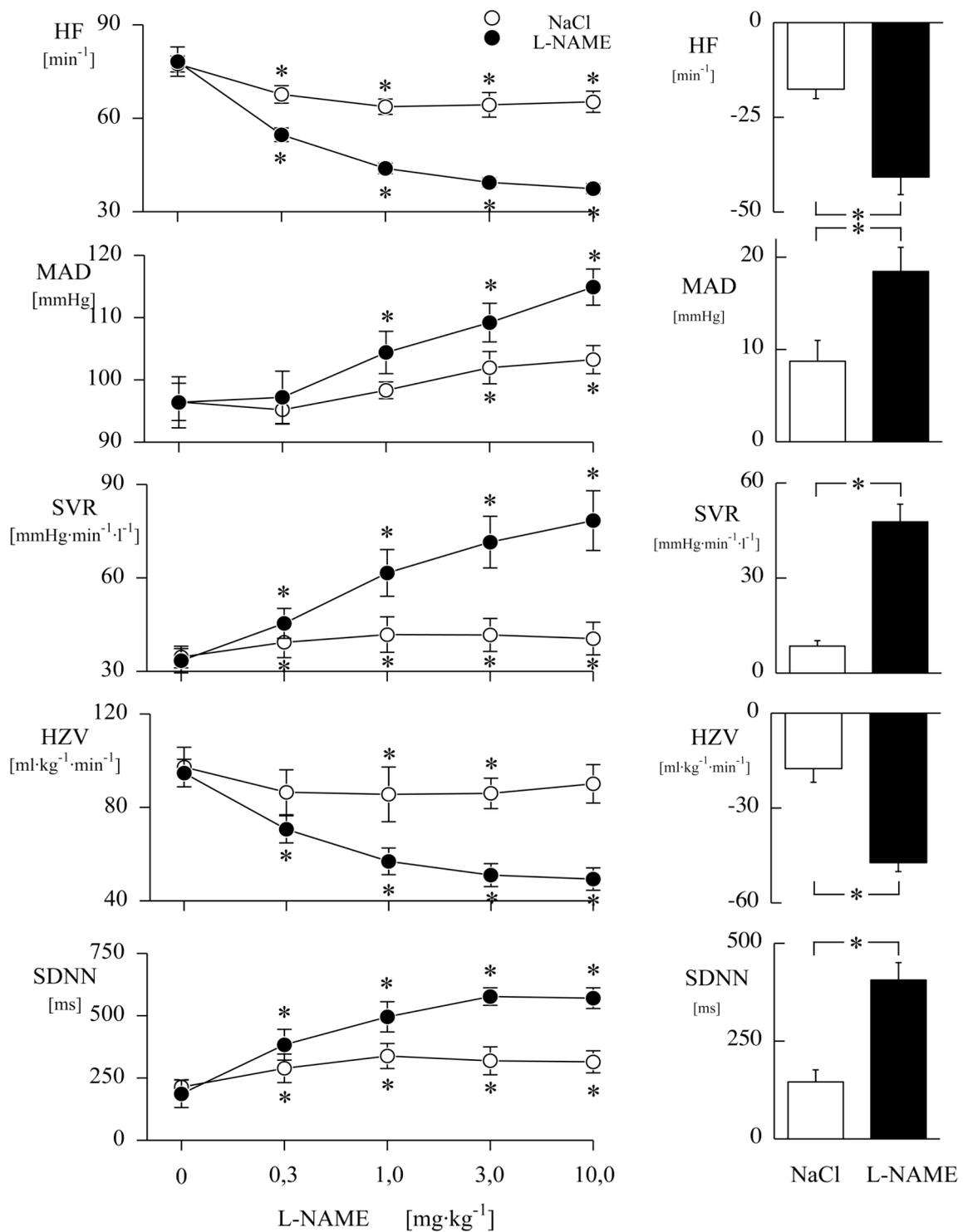


Abbildung 1: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) im Vergleich zur Placebogruppe (NaCl) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD);den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); das Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN-Wert), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (ΔHF;ΔMAD;ΔSVR;ΔHZV;ΔSDNN).Mittelwerte ± SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Endothelinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung

Auch nach Blockade der Endothelinrezeptoren waren die Effekte von L-NAME prinzipiell gleichartig (siehe Abbildung 2). So steigerte L-NAME zwar dosisabhängig den mittleren arteriellen Blutdruck (MAD), jedoch nur um maximal 9 ± 4 mmHg. Das Ausmaß des Blutdruckanstieg war somit deutlich abgeschwächt gegenüber dem maximalen Blutdruckanstieg unter alleiniger L-NAME Gabe von 21 ± 3 mmHg. Verursacht wurde dieser Blutdruckerhöhung durch einen Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes (SVR) in beiden Gruppen, wobei allerdings nach Endothelinrezeptorblockade der Widerstand deutlich geringer anstieg (76 ± 9 mmHg \cdot min \cdot l $^{-1}$ bzw. $61,8\pm 6$ mmHg \cdot min \cdot l $^{-1}$).

Die Endothelinrezeptorblockade per se senkte den Blutdruck von 100 ± 2 mmHg auf 91 ± 3 mmHg.

Unbeeinflusst von der Endothelinrezeptorenblockade waren allerdings die Effekte von L-NAME auf die Herzfrequenz und das Herzzeitvolumen. So fiel die Herzfrequenz in beiden Gruppen um etwa 40 min $^{-1}$ ab einhergehend mit einem gleichartigen Anstieg der SDNN-Werte von 322 ± 35 ms mit und 414 ± 46 ms ohne Endothelinrezeptorblockade. Auch das HZV reduzierte sich von 97 ± 6 ml \cdot kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ auf 50 ± 4 ml \cdot kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ ohne, gegenüber 95 ± 6 ml \cdot kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ auf 52 ± 6 ml \cdot kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ nach vorhergehender Endothelinrezeptorblockade.

Demnach sind die blutdrucksteigernden Effekte von L-NAME abgeschwächt nach vorhergehender Endothelinrezeptorblockade, wohingegen die Effekte auf die Herzfrequenz und die Vagusaktivität nicht beeinflusst werden.

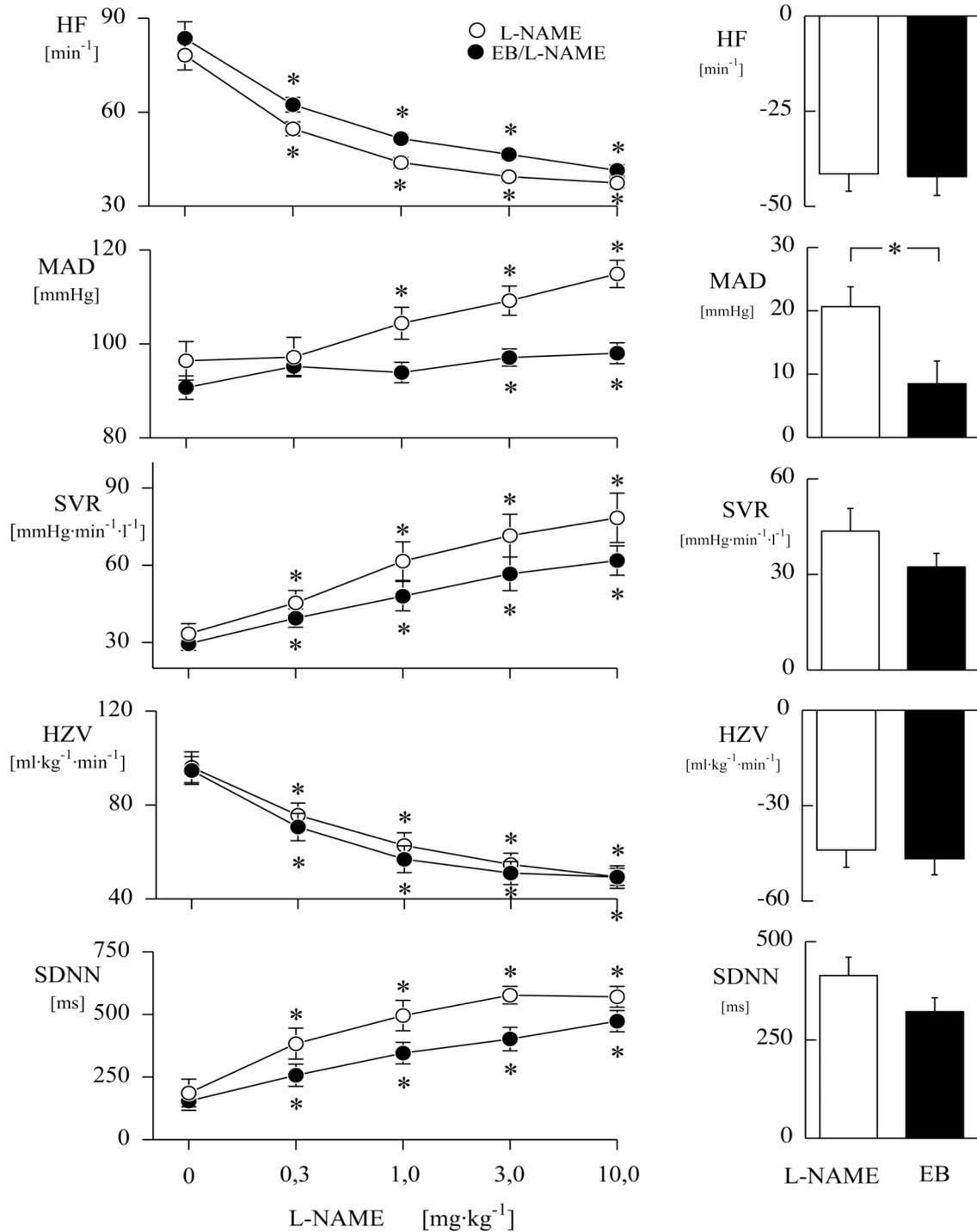


Abbildung 2: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) mit und ohne vorhergehender Endothelinrezeptorblockade (EB/L-NAME) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD); den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); das Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (Δ HF; Δ MAD; Δ SVR; Δ HZV; Δ SDNN). Mittelwerte \pm SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Vasopressinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung

L-NAME steigerte den arteriellen Mitteldruck sowohl mit als auch ohne vorhergehender Vasopressinrezeptorblockade (siehe Abbildung 3). Die vasokonstriktorische Wirkung von L-NAME war nach Vasopressinrezeptorblockade nahezu unverändert, erkennbar an dem identischen Blutdruckanstieg (21 ± 3 mmHg) mit und ohne zusätzlicher Vasopressinrezeptorblockade.

L-NAME senkte ebenfalls die Herzfrequenz gleichartig in beiden Gruppen. So fiel die Herzfrequenz auf Werte von $+41 \pm 5$ min^{-1} bzw. $+33 \pm 2$ min^{-1} ab, begleitet von einem Anstieg der Herzfrequenzvariabilität, als Zeichen der Vagusaktivierung, von $+414 \pm 47$ ms bzw. $+356 \pm 28$ ms. Auch das HZV fiel in beiden Gruppen nahezu identisch ab.

Durch die Vasopressinrezeptorblockade kam es lediglich zu sehr geringem Abfall der Herzfrequenz um im Mittel 10 min^{-1} und einem damit verbundenem Anstieg des SDNN-Wertes von $+131 \pm 2$ ms auf $+189 \pm 4$ ms. Diese Effekte erscheinen allerdings bedeutungslos vor dem Hintergrund das auch unter Placebo-bedingungen gleichartigen Veränderungen, im Sinne einer weiteren Beruhigung der Tiere, auftraten.

Demnach scheint die vasokonstriktorische sowie auch die frequenzreduzierende Wirkung von L-NAME unabhängig von der Wirkung des Vasopressin-Systems zu sein.

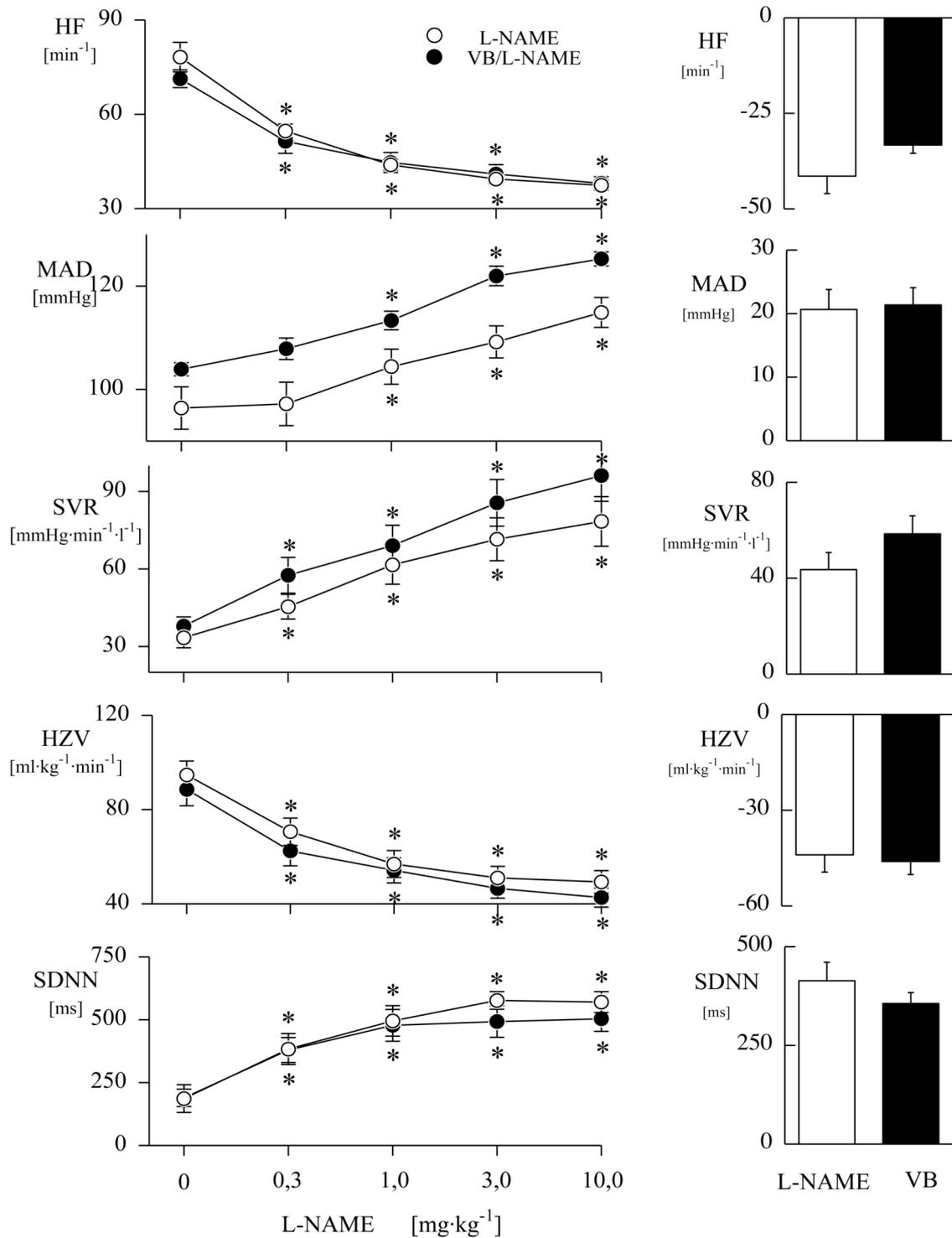


Abbildung 3: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) mit und ohne vorhergehender Vasopressinrezeptorblockade (VB/L-NAME) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD); den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); das Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (Δ HF; Δ MAD; Δ SVR; Δ HZV; Δ SDNN). Mittelwerte \pm SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Kombinationsblockade von EB und VB und NO-Synthasehemmung

L-NAME steigerte in beiden Versuchsgruppen dosisabhängig den mittleren arteriellen Blutdruck (siehe Abbildung 4), allerdings deutlich geringer nach Blockade der Endothelin- und Vasopressinrezeptoren ($+10\pm 5$ mmHg vs. $+19\pm 3$ mmHg). Gleichsinnig kam es auch zu einem verminderten Anstieg des SVR im Maximum um $+34\pm 4$ mmHg·min·l⁻¹ mit, gegenüber $+48\pm 3$ mmHg·min·l⁻¹ ohne Kombinationsblockade.

Die Effekte nach Endothelin-bzw. Vasopressinrezeptorblockade war annähernd gleich der Effekte der Einzelblockade. So führte die Endothelinrezeptorblockade zu einem Abfall des MAD von 99 ± 3 mmHg auf 90 ± 3 mmHg. Die dann folgende Vasopressinrezeptorenblockade zeigte keinerlei Änderungen der beobachteten Kreislaufvariablen.

Demnach sind in Analogie zur alleinigen Endothelinrezeptorblockade die blutdrucksteigernden Effekte von L-NAME abgeschwächt ohne wesentlichen Einfluß auf die Herzfrequenzeffekte. Beide Wirkungen werden nicht beeinflusst von einer zusätzlichen Vasopressinrezeptorblockade (siehe Ergebnisse S.18).

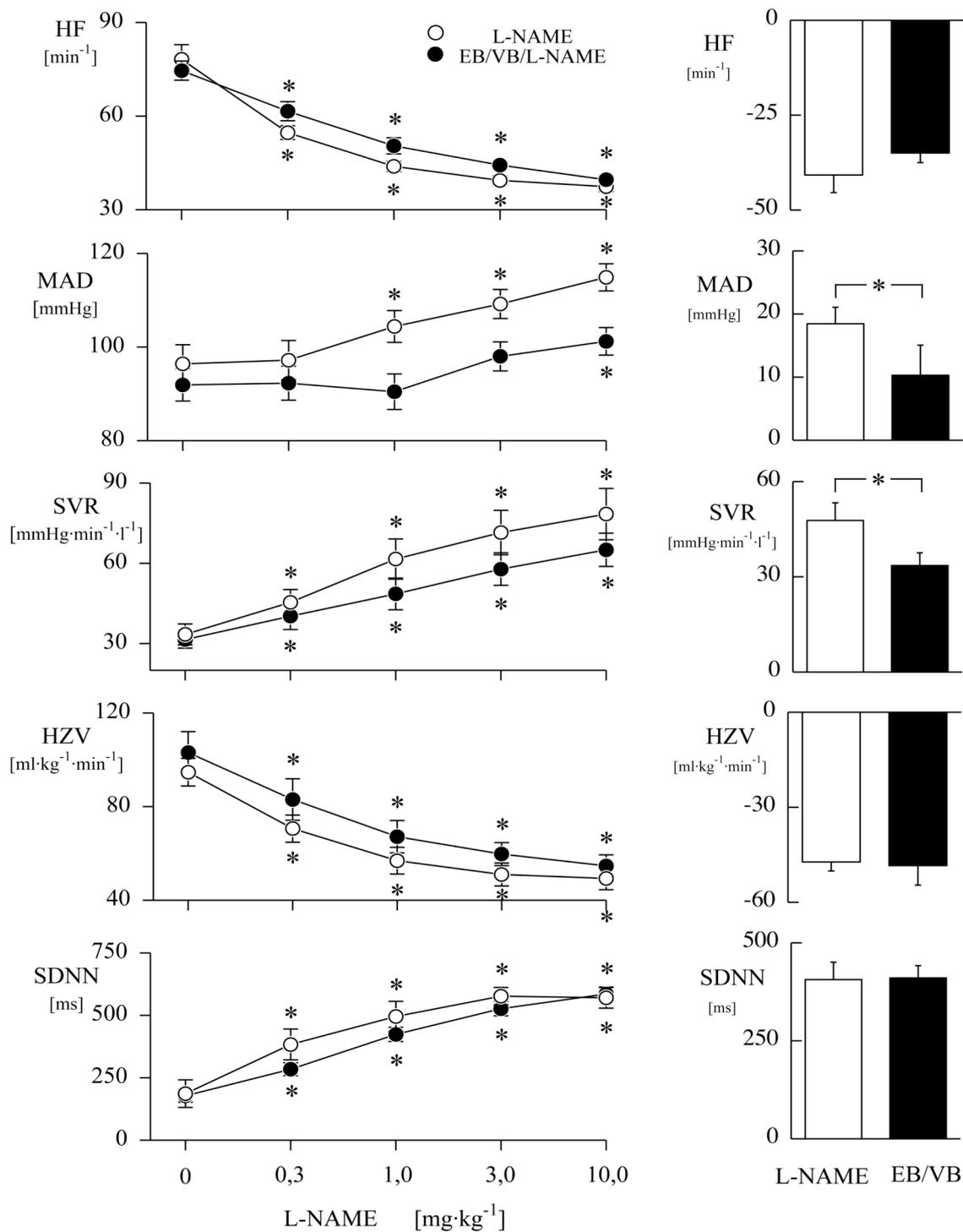


Abbildung 4: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) mit und ohne vorhergehender Kombinationsblockade von Endothelin und Vasopressin (EB/VB/L-NAME) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD); den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); das Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (ΔHF; ΔMAD; ΔSVR; ΔHZV; ΔSDNN). Mittelwerte ± SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Angiotensinrezeptorblockade und NO-Synthasehemmung

Die Angiotensinrezeptorblockade am wachen Hund führte zu keiner signifikanten Änderung gegenüber den Ausgangswerten in den von uns beobachteten Kreislaufvariablen (siehe Abbildung 5). Die Wirkung von L-NAME zeigte keine Abhängigkeit von einer vorhergehenden Angiotensinrezeptor-Blockade sowohl beim arteriellen Mitteldruck, dem systemischen Gefäßwiderstand, der Herzfrequenz, dem Herzzeitvolumen als auch bei der Herzfrequenzvariabilität, was sich im Zeitgang durch den parallelen Verlauf der beiden Versuchsgruppen widerspiegelt. Demnach werden die Effekte von L-NAME sowohl auf den systemischen Gefäßwiderstand und damit den arteriellen Mitteldruck als auch auf die Herzfrequenz und die Herzfrequenzvariabilität nicht durch endogenes Angiotensin modifiziert.

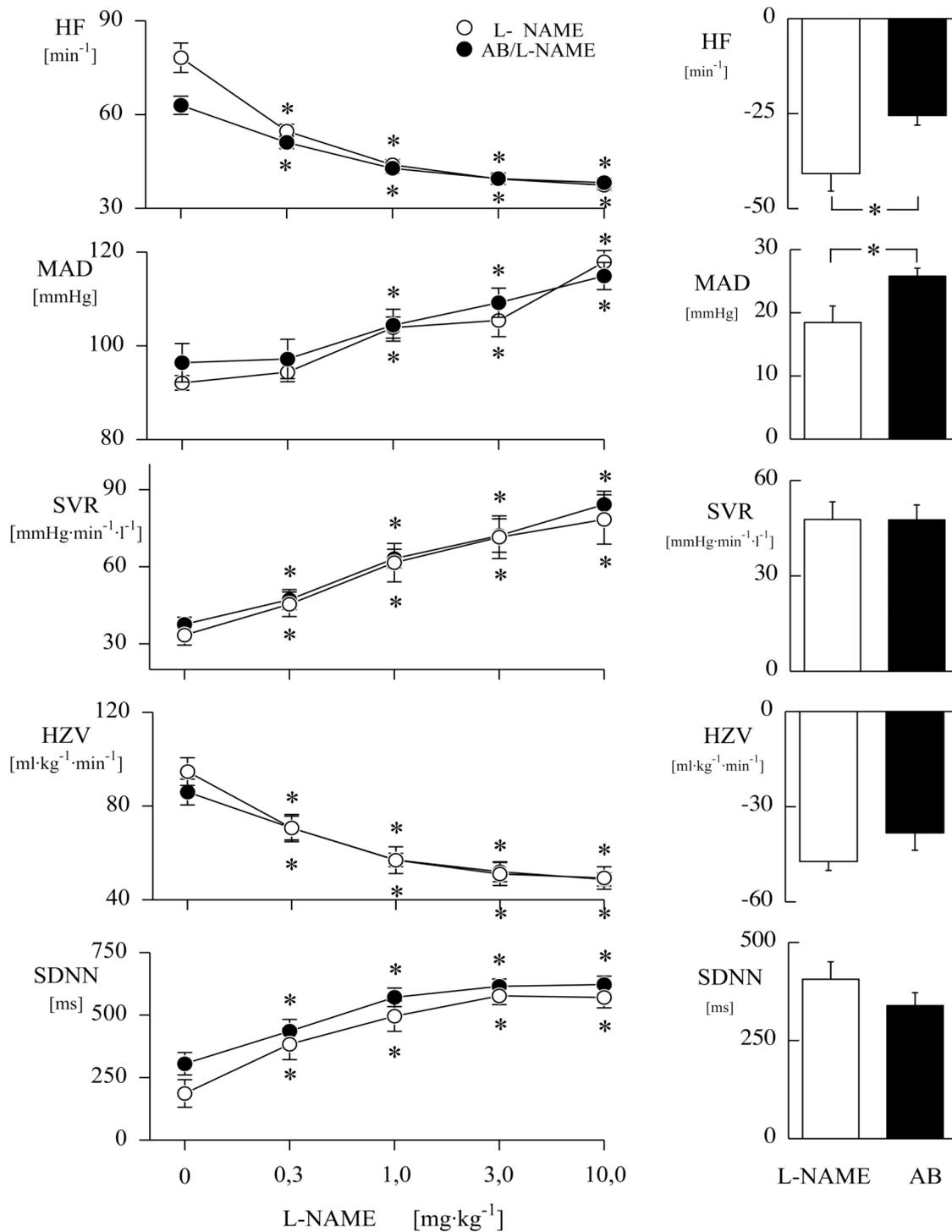


Abbildung 5: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) mit und ohne vorhergehender Angiotensinrezeptorblockade (AB/L-NAME) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD); den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); das Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (ΔHF; ΔMAD; ΔSVR; ΔHZV; ΔSDNN). Mittelwerte ± SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Hexamethoniumgabe und NO-Synthasehemmung

Die Blockade der vegetativen Ganglien durch Hexamethonium steigerte die Herzfrequenz von $81 \pm 5 \text{ min}^{-1}$ auf $129 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ verbunden mit einem starken Abfall des SDNN-Wertes von $181 \pm 37 \text{ ms}$ auf $4 \pm 1 \text{ ms}$ als Zeichen einer vollständigen Blockade des autonomen Nervensystems. Dagegen blieben die Variablen Herzzeitvolumen (HZV) und systemischer Gefäßwiderstand (SVR) nahezu unverändert.

Auch nach autonomer Blockade steigerte L-NAME den mittleren arteriellen Druck, allerdings überproportional um $+86 \pm 9 \text{ mmHg}$ verglichen mit der Kontrollgruppe ($+21 \pm 3 \text{ mmHg}$) (siehe Abbildung 6). Demgegenüber unterschied sich der Verlauf des systemischen Gefäßwiderstandes nicht zwischen den Versuchsgruppen ($+44 \pm 7 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}$ bzw. $+44 \pm 10 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}$). Der dosisabhängige Abfall der Herzfrequenz auf $41 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ unter alleiniger NO-Synthasehemmung war nicht mehr vorhanden nach Ganglienblockade.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach ganglionärer Blockade die lokale Vasokonstriktion uneingeschränkt vorhanden ist (siehe Anstieg des SVR), wohingegen eine vagusbedingte Bradykardie nicht mehr auftrat. Die massive Zunahme des mittleren arteriellen Drucks (MAD) scheint sowohl durch lokale Vasokonstriktoren als auch den Verlust von zentraler Gegenregulation bestimmt zu werden.

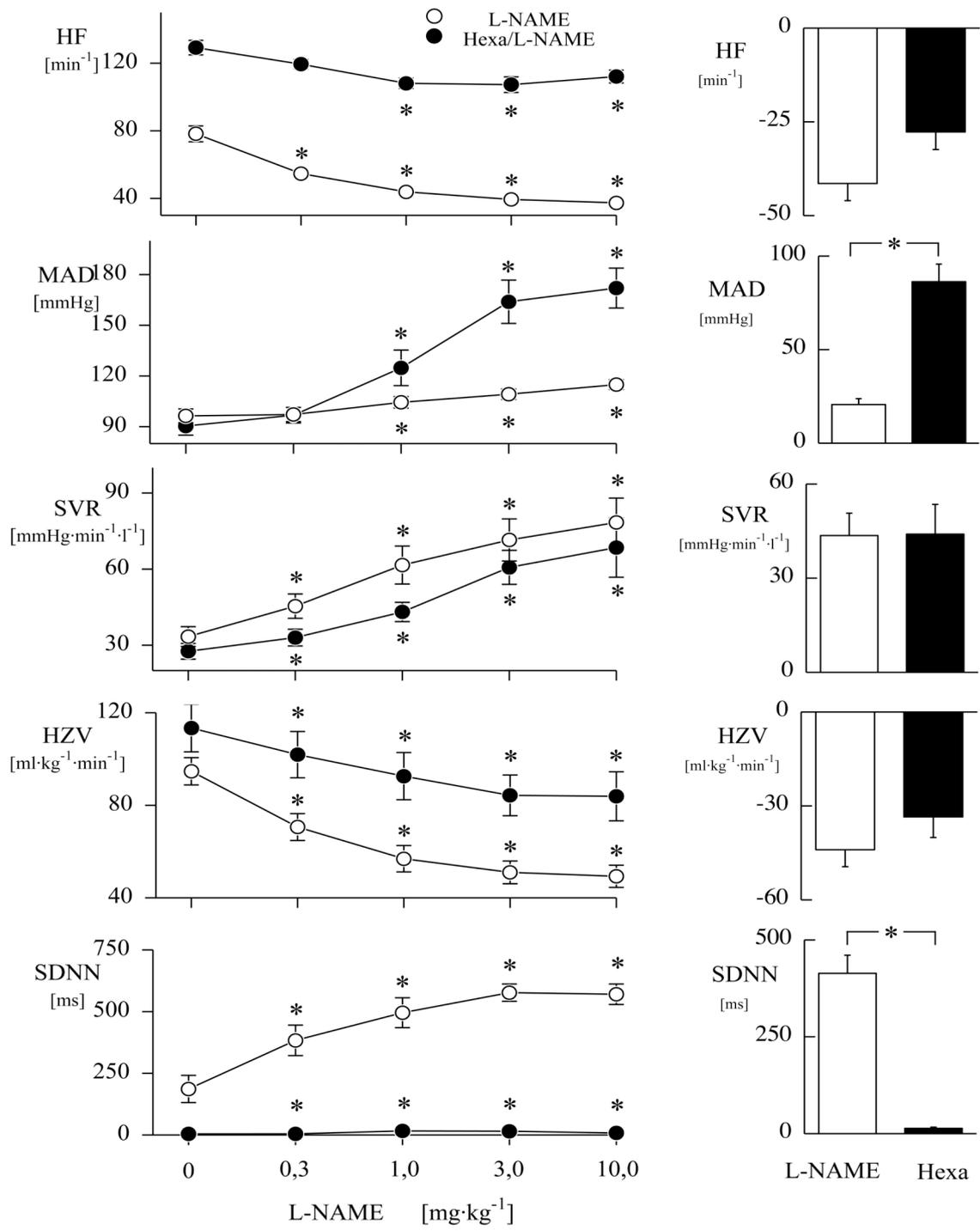


Abbildung 6: Effekte von L-NAME (0,3-10 mg·kg⁻¹) mit und ohne vorhergehender Ganglienblockade mit Hexamethonium (Hexa/L-NAME) auf die Herzfrequenz (HF); den mittleren arteriellen Druck (MAD); den systemischen Gefäßwiderstand (SVR); dem Herzzeitvolumen (HZV) und die Herzfrequenzvariabilität (SDNN), sowie die jeweiligen Maximaleffekte (ΔHF;ΔMAD;ΔSVR;ΔHZV;ΔSDNN). Mittelwerte ± SEM von 6 Hunden (* = p < 0,05 im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. zwischen den Maximaleffekten).

Kontrollversuche zur Stereospezifität des NO-Synthasehemmers

Intervention	Zeit [min]	MAD [mmHg]	SVR [mmHg·min ⁻¹ ·l ⁻¹]	HF [min ⁻¹]
Kontrollbedingungen	0	103±4	35±2	69±10
D-NAME 50,0 mg·kg ⁻¹	30	109±3	35±1	62±7

Tabelle 1: Versuche unter Kontrollbedingungen sowie zusätzlicher Wirkung von 50,0 mg·kg⁻¹ intravenös appliziertem D-NAME (n=5); Mittelwerte ± SEM.

Die intravenöse Gabe von 50,0 mg·kg⁻¹ D-NAME führte zu keiner Veränderung der beobachteten Kreislaufvariablen gegenüber den Kontrollbedingungen.

Diskussion

Mit Blick auf die eingangs gestellten Fragen liefern die eigenen Versuche drei wesentliche Ergebnisse:

1. Das vasodilatierende Stickstoffmonoxid (NO) interagiert bezüglich des systemischen Gefäßwiderstandes und des Blutdruckverhaltens in der Hauptsache mit dem vasokonstriktorisches Endothelin, in der Art, dass das endogene Stickstoffmonoxid die Endothelinwirkung hemmt.
2. Der Abfall der Herzfrequenz unter NO-Synthasehemmung ist nicht reflektorisch, sondern vermittelt durch eine starke Vagusaktivierung die bereits bei niedriger Dosis des NO-Synthasehemmers auftritt, bei denen der Blutdruck unverändert ist.
3. Die Hormonsysteme Vasopressin und Angiotensin interagieren weder bezüglich der Herzfrequenzregulation noch der Blutdruckregulation mit dem NO-System.

Unter methodenkritischen Gesichtspunkten sind bei der Deutung der eigenen Versuchsergebnisse besonders die experimentellen Rahmenbedingungen zu beachten. Hierbei basiert die Interpretation auf folgenden Prämissen:

1. Die intravenös applizierten Blockersubstanzen der Endothelin-, Vasopressin- und Angiotensinrezeptoren hemmen suffizient die Wirkung der endogenen Hormonsysteme.
2. Der intravenös applizierte Ganglienblocker Hexamethonium hemmt suffizient das sowohl sympathische als auch parasympathische Nervensystem.

3. Die Wahl der experimentellen Rahmenbedingungen ist geeignet, sekundäre Einflüsse auf die Kreislaufvariablen zu minimieren und weitgehend identische Kontrollbedingungen in aufeinander folgenden Versuchen zu gewährleisten.
4. Vom Zeitgang abhängige Einflüsse auf die Versuchsergebnisse wurden durch Randomisierung der Interventionen und der Versuchstiere gleichmäßig auf alle Studiengruppen verteilt.

1. Vollständigkeit der Endothelin-, Vasopressin- und Angiotensin-Rezeptorblockade:

Es besteht in der Literatur weiterhin Unklarheit, welche Dosis Tezosentan beim Hund benötigt wird, um eine komplette Hemmung der Endothelinrezeptoren zu erzielen. Allerdings führte in Kontrollexperimenten die intravenöse Applikation von 2,5 µg und 5 µg Endothelin zu einem Anstieg des arteriellen Mitteldrucks um ca. 25 mmHg und einem Abfall der Herzfrequenz um ca. 15 min⁻¹. Diese Veränderungen unterblieben nach vorhergehender Blockade der Endothelinrezeptoren durch Infusion von 3 mg·kg⁻¹ initial gefolgt von 3 mg·kg⁻¹·h⁻¹ Tezosentan. Da auch andere Experimentatoren eine ähnliche Dosis zur Blockierung der Endothelinrezeptoren bei Hunden benutzen [29] und keine zusätzliche hämodynamische Wirkung durch exogen zugeführtes Endothelin mehr zu beobachten war, ist unsere Blockade als vollständig anzusehen.

Die in allen Versuchen von uns verwendete Einzeldosis (40 µg·kg⁻¹ i.v.) des Vasopressin-(V₁)-Rezeptorantagonisten blockierte die über V_{1A}-Rezeptoren vermittelte Wirkung von Arginin-Vasopressin (200-400 mU i.v.) [30]. Dies wurde im Anschluss an jeden Versuch verifiziert, jeweils durch Injektion von 200-400 mU Arginin-Vasopressin. Diese Dosis Vasopressin steigerte in Kontrollexperimenten den Blutdruck um 20 mmHg und senkte die

Herzfrequenz um ca. 10 min^{-1} , blieb jedoch wirkungslos nach vorhergehender Vasopressinrezeptor-Blockade [31].

Auch die Hemmung der Angiotensin-Rezeptoren war nach einer kontinuierlichen Infusion von $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ des Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten Losartan nahezu komplett ausgeprägt. Dies zeigte sich wiederum in der ausbleibenden hämodynamischen Reaktion nach einer Testdosis von $10 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ bzw. $20 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ Angiotensins, welche in Kontrollexperimenten ohne vorhergehende AT-II Rezeptorblockade den arteriellen Mitteldruck um ca. 20 mmHg steigerte.

2. Suffiziente Blockade der vegetativen Ganglien durch Hexamethonium

Die Effektivität der autonomen Blockade ($7,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Hexamethonium + $7,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) zeigte sich an einem Anstieg der Herzfrequenz von $81,4\pm 5 \text{ min}^{-1}$ auf $129,2\pm 4,3 \text{ min}^{-1}$, sowie durch eine annähernd vollständigen Elimination des SDNN-Wertes, als messbares Zeichen einer vollständigen Vagolyse [27]. Die Zuverlässigkeit der verwendeten Dosierungen zur vollständigen Vagolyse war auch in verschiedenen Arbeiten anderer Experimentatoren nachzuweisen [32, 33]. In den anderen Arbeiten äußerte sich ebenfalls eine vollständige Denervierung des N. vagus, ob nun pharmakologisch [34, 35] oder durch Kühlung des Nerven [36], in einem Anstieg der Herzfrequenz auf 130 min^{-1} .

3. Experimentelle Rahmenbedingungen:

Alle Experimente wurden ausnahmslos in einem schallgedämpften, abgedunkelten Raum, unter Grundumsatzbedingungen [37] durchgeführt. Für die Versuche wurden nur Tiere

herangezogen, die wach, abgerichtet und mit dem Labor, dem Versuchsablauf sowie den Experimentatoren vertraut waren. Somit wurden störende Einflüsse wie beispielsweise Kältezittern, Schmerzen oder Angst minimiert. Diese Voraussetzungen manifestierten sich in weitgehend identischen und relativ niedrigen Herzfrequenzen und Blutdrücken in den jeweiligen Kontrollphasen. Daher sind Veränderungen in den beobachteten Variablen den Versuchsinterventionen zuzuordnen.

4. Zeitabhängige Zufallseffekte:

Trotz strikter Einhaltung der experimentellen Rahmenbedingungen lassen sich gerade bei Versuchen an wachen Tieren unspezifische Effekte wie Veränderungen in der Aufmerksamkeit der Tiere sowie Gewöhnungseffekte der Tiere an den Versuchsablauf bei wiederholten Versuchen kaum vermeiden. Um diesen Einfluss dennoch zu minimieren, wurden die jeweiligen Versuche an ein und demselben Tier in randomisierter Reihenfolge durchgeführt, wobei mindestens zwei Wochen zwischen aufeinander folgenden Versuchen lagen. Da dieses Phänomen jedoch bei allen Tieren in ähnlicher Ausprägung zu erwarten ist und die jeweiligen Ergebnisse sich auf Gruppenvergleiche stützen, ist unser Versuchskonzept als geeignet anzusehen, Veränderungen der Variablen auf die Versuchsinterventionen zurückzuführen.

Demnach waren die von uns gewählten Dosierungen und Rahmendbedingungen ausreichend für eine suffiziente Blockade der jeweiligen Rezeptoren und zur Quantifizierung der Interaktionen zwischen endogenem Stickstoffmonoxid und den vasokonstriktorischen Systemen Endothelin, Vasopressin und Angiotensin sowie dem autonomen Nervensystem.

Stickstoffmonoxid (NO) ist als ein bedeutender Faktor an der Steuerung der Hämodynamik und des Gefäßtonus, sowohl am Tier als auch beim Menschen, beteiligt [2]. Gebildet wird Stickstoffmonoxid (NO) von endogenen Synthesen, welche sowohl peripher, z.B. im Endothel der Gefäße als endotheliale NO-Synthase (e-NOS), als auch neuronal, z.B. in den vegetativen Ganglien oder den Hirngebieten mit enger Beziehung zur Kreislaufregulation als neuronale NO-Synthase (n-NOS), vorkommen [3]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine neuronal modulierende Wirkung des NO's, besonders auf das vegetative Nervensystem [34].

In der lokalen Zirkulation kommt NO ein entscheidender Anteil bei der Regulation des Blutflusses zu. Da die endotheliale NO Produktion von der Scherrate und der Flussgeschwindigkeit abhängig ist, werden hierdurch vasokonstriktorische Effekte abgeschwächt [1].

Diesem vasodilatierendem System, stehen verschiedene vasokonstriktorisches Hormonsysteme wie z.B. Renin-Angiotensin, Endothelin und Vasopressin, als Gegenspieler gegenüber. Endothelin ist das potenteste vasokonstringierende Peptidhormon, welches an der lokalen Regulierung des Gefäßtonus und des Blutdrucks beteiligt ist [38]. Gebildet wird dieses Hormon im Endothel der Gefäße und ist entscheidend zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks in kreislaufbelastenden Situationen wie Hypovolämie [39], mesenterialer Ischämie [39] oder pharmakologisch induzierter Hypotension [40]. Als weiteres vasokonstringierendes Hormon wird Angiotensin II u.a. im Endothel über das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) aus Angiotensin I gebildet. Es ist Teil des komplexen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches u.a. Einfluß auf die Hämodynamik über Effekte an den Gefäßen, den Nieren und über die NO-Freisetzung nimmt. Die vasokonstringierende Wirkung wird über den AT-1-Rezeptor vermittelt und zeigt gegenüber dem Endothelin eine agonistische Funktion [41]. Auch Vasopressin ist als endogener Vasokonstriktor an der Blutdruckregulation beteiligt, wobei dessen Bedeutung unter physiologischen Bedingungen

allerdings nicht deutlich wird, sondern erst, wenn das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-System bereits nicht mehr funktionstüchtig sind [31]. Vermittelt wird die blutdruckunterstützende Wirkung des Vasopressins über spezifische Bindungsstellen an der glatten Gefäßmuskulatur, den V_1 -Rezeptoren [42], wohingegen die antidiuretische Wirkung über V_2 -Rezeptoren an der Niere reguliert wird [43].

Das lokal vasodilatatorisch wirksame NO und die oben erwähnten vasokonstriktorischen Hormone interagieren miteinander zur Aufrechterhaltung des optimalen Blutflusses und zur optimalen Anpassung an verschiedenste hämodynamische Situationen [34]. So zeigte sich in anderen Arbeiten, dass zum Beispiel die Freisetzung des im Endothel der Blutgefäße gebildeten Peptidhormons Endothelin unter physiologischen Bedingungen durch NO gehemmt wird [13, 14]. Ebenso scheint auch eine Interaktion zwischen NO und Vasopressin sowohl über V_1 -Rezeptoren [17, 18], als auch über V_2 -Rezeptoren [19, 21] zu bestehen, die zu einer Freisetzung von NO führt.

Um nun die kardiovaskulären Effekte, welche durch NO hervorgerufen werden, zu demaskieren, hemmten wir sowohl die e-NOS als auch die n-NOS über den nicht-selektiven NO-Synthasehemmer L-NAME. Hierbei kam es, wie auch von Anderen vorbeschrieben [10, 44], zu einem dosisabhängigen Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes verbunden mit einem parallelen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, verursacht durch das Überwiegen der vasokonstringierenden Systeme bei reduzierter NO-Freisetzung. Die Herzfrequenz dagegen fiel in den eigenen Versuchen dosisabhängig ab, verbunden mit einem Abfall des Herzzeitvolumens. Dieser Effekt wurde in einigen Artikeln dem Baroreflex zugeschrieben [45]. Dagegen zeigten aber Versuche an Mäusen, welche kein e-NOS-Gen besaßen, und damit keinen Blutdruckanstieg unter L-NAME-Gabe aufwiesen, eine ähnliche Reduktion der Herzfrequenz wie bei Mäusen mit intakter e-NOS [46]. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen in den eigenen Versuchen. Hierbei zeigt sich ein starker Abfall der

Herzfrequenz bereits unter der niedrigsten L-NAME Dosis von $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, bei fehlendem Blutdruckanstieg, was die Theorie der reflektorisch vermittelten Bradykardie unwahrscheinlich macht. An den parallel dazu steigenden SDNN-Werten, als Maß des Vagotonus, sieht man, dass anscheinend eine niedrigere NO-Freisetzung eine Aktivierung des N. Vagus bewirkt. Umgekehrt formuliert bedeutet dies, NO reduziert, am ehesten über die n-NOS, den Vagotonus. Ebenso deuten die Versuche mit dem Ganglienblocker Hexamethonium in die gleiche Richtung. Unter ganglionärer Blockade und damit auch medikamentöser Ausschaltung des N. vagus kam es unter keiner L-NAME Dosierungen zu einem Abfall der Herzfrequenz oder zu einem Anstieg des SDNN-Wertes.

Demnach ist die Bradykardie während NO-Synthasehemmung verursacht durch eine starke Vagusaktivierung vermutlich durch fehlendes NO, welches sonst über die neuronalen NO-Synthasen gebildet würde.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die vasokonstringierenden Hormonsysteme am Anstieg des SVR und damit verbundenen MAD während NO-Synthasehemmung beteiligt sind. Ebenso sollte durch Kombinationsblockade von Endothelin und Vasopressin hier mögliche Interaktionen zwischen den Vasokonstriktoren untersucht werden. Daher wurden, zusätzlich zur NO-Synthasehemmung, die einzelnen Hormonsysteme oder ihre Rezeptoren blockiert und überprüft, ob die bekannten Effekte von L-NAME auf den Blutdruck, den SVR, und die Herzfrequenz moduliert wurde.

Die Wirkung von L-NAME auf den Blutdruck und dem SVR war, unter vorbestehender Endothelinrezeptor-Blockade, deutlich reduziert. Dies verdeutlicht, dass die Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes und damit auch des arteriellen Mitteldrucks nicht ausschließlich auf dem Wegfall der vasodilatierenden Wirkung des Stickstoffmonoxids beruht, sondern dass eine gesteigerte Wirksamkeit des endogenen Endothelinsystems maßgeblich zu den Blutdruck- und Widerstandseffekten der NO-Synthasehemmung beiträgt.

L-NAME wirkt also blutdrucksteigernd sowohl über eine Inhibition des direkt vasodilatierenden Stickstoffmonoxids als auch über eine vermehrte Wirksamkeit des vasokonstriktorisches endogenen Endothelinsystems. Einen Einfluss auf die bradykardisierende Wirkung von L-NAME hatte eine vorhergehende Endothelinrezeptorblockade jedoch nicht.

So folgt im Umkehrschluss, dass endogenes NO wahrscheinlich zum einen die Vasokonstriktion durch endogenes Endothelin abschwächt, wahrscheinlich vermittelt durch eine inhibitorische Wirkung auf die Endothelinfreisetzung [13].

Konform mit dem oben Erwähnten, dass die vasoaktiven Wirkung von Vasopressin unter physiologischen Bedingungen relativ gering sind, zeigte sich auch in unseren Versuchen keinerlei Interaktion zwischen Vasopressin und dem NO-System erkennbar an dem annähernd gleichen Verlauf der Kreislaufvariablen während Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME. Auch die Blockade mit Endothelin- und Vasopressinrezeptorblockern zeigt keine über die Einzeleffekte hinausgehenden Summations- oder Subtraktionseffekt, da auch in Kombination, unter den normalen physiologischen Bedingungen, der Vasopressineffekt, wie oben beschrieben, zu gering ist. So kristallisierte sich nur der Endothelineffekt heraus.

Überraschend wies auch das Renin-Angiotenin-Aldosteron-System keine Interaktion mit dem NO-System auf. Der Verlauf der hämodynamischen Variablen war mit oder ohne Angiotensinblockade bei NO-Synthasehemmung annähernd gleich. Dieses deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, die keine Interaktionen zwischen den beiden Systemen in der kurzzeitigen Anwendung von L-NAME zeigten [47]. Jedoch wies in verschiedenen Arbeiten eine durch chronische Gabe von L-NAME hervorgerufene Hypertonie eindeutig eine Relaxation der arteriellen Gefäße und somit eine Abnahme des SVR unter Angiotensinblockade auf [48, 49]. Somit ist die in unseren Experimenten nicht nachweisbare Interaktion möglicherweise durch die relativ kurze Anwendungszeit von L-NAME bedingt.

Zusammenfassend kann man als Ergebnis der Untersuchungen festhalten, dass das vasodilatierende Stickstoffmonoxid (NO) bezüglich des systemischen Gefäßwiderstandes und des Blutdruckverhaltens in der Hauptsache mit dem vasokonstriktorischem Endothelin interagiert. Darüber hinaus ist der in vielen Publikationen beschriebene Abfall der Herzfrequenz unter NO-Synthasehemmung nicht, wie häufig angenommen, reflektorisch bedingt, sondern wird vermittelt durch eine starke direkte Vagusaktivierung des NO-Synthasehemmers.

Zusammenfassung

An Hand von Experimenten an wachen Hunden sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit das endogene Stickstoffmonoxid (NO) mit den Hormonsystemen Endothelin, Angiotensin und Vasopressin sowie dem autonomen Nervensystem in Bezug auf die hämodynamischen und kardiovaskulären Effekte interagiert.

Dazu wurden insgesamt 51 Versuche an chronisch instrumentierten wachen Hunden durchgeführt, welche unter physiologischen Bedingungen wiederholt untersucht wurden. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde den Tieren zur Messung des Herzzeitvolumens ein Ultraschall-Transitzeit-Flussaufnehmer um die Pulmonalarterie implantiert sowie beide Carotisarterien in Hautschlingen vorverlagert, zur kontinuierlichen Blutdruckmessung und für intermittierende Blutabnahmen.

Die Aussagen stützen sich auf die Analyse der hämodynamischen Variablen: Herzfrequenz, Herzfrequenzvariabilität, arterieller Mitteldruck, systemischer Gefäßwiderstand und des Herzzeitvolumens, während dosisabhängiger Inhibition der NO-Synthase (L-NAME 0,3 – 50 mg·kg⁻¹). Dies geschah jeweils mit und ohne vorhergehender Blockade des Endothelin-(Tezosentan), Vasopressin-([d(CH₂)₅Tyr(Me²)]AVP), oder Angiotensin-Systems (Losartan), sowie Ganglienblockade des vegetativen Nervensystems durch Hexamethonium. Als Maß für die autonome Aktivität, insbesondere die Vagusaktivität, wurde die Herzfrequenzvariabilität in der Zeitdomäne, als Standardabweichung der RR-Abstände, bestimmt.

Die Untersuchungen lieferten folgende Ergebnisse und beantworteten die eingangs gestellten Fragen:

1. Das vasodilatierende Stickstoffmonoxid (NO) interagiert bezüglich des systemischen Gefäßwiderstandes und des Blutdruckverhaltens in der Hauptsache mit dem vasokonstriktorischen Endothelin, in der Art, dass das endogene Stickstoffmonoxid die Endothelinwirkung hemmt.

2. Der Abfall der Herzfrequenz unter NO-Synthasehemmung ist nicht reflektorisch, sondern wird vermittelt durch eine starke Vagusaktivierung die bereits bei niedriger Dosis des NO-Synthasehemmers auftritt, wobei der Blutdruck unverändert ist.
3. Die Hormonsysteme Vasopressin und Angiotensin interagieren weder bezüglich der Herzfrequenzregulation noch der Blutdruckregulation mit dem NO-System.

Demnach wird durch Hemmung der NO-Synthase der arterielle Mitteldruck dosisabhängig erhöht. Dieser Blutdruckanstieg beruht dabei zum einen auf dem Wegfall des vasodilatierenden NO selbst sowie zum anderen auf einer gesteigerten Wirksamkeit des vasokonstriktorischen Endothelins. Der Abfall der Herzfrequenz ist jedoch keine Folge des Blutdruckanstieges (vermittelt über den arteriellen Baroreflex) sondern Folge einer Reduktion der NO-Freisetzung durch die neuronale NO-Synthase und dadurch bedingten Erhöhung des Vagotonus. Dieser Nachweis war möglich, da ausschließlich Tiere im Wachzustand, d.h. mit einem funktionstüchtigen vegetativen Nervensystem untersucht wurden.

Somit interagiert bezüglich der vasokonstriktorischen Effekte das endogene NO-System vorwiegend mit dem Endothelin-System wohingegen keine Interaktion mit dem Vasopressin und dem Angiotensinsystem auftritt. Im Gegensatz dazu werden die Herzfrequenz-Effekte des NO-Systems hingegen nicht moduliert durch das Endothelin, Vasopressin oder Angiotensinsystem.

Literaturverzeichnis

1. Fleming, I. and R. Busse, *NO: the primary EDRF*. Journal-Of-Molecular-and-Cellular-Cardiology, 1999. **31**(1): p. 5-14.
2. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proceedings of the Natural Academy of the Sciences of the United States of America, 1987. **84**(24): p. 9265-9269.
3. Huber, T. and T.F. Lüscher, *Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Stickstoffmonoxid im Kreislauf*. Medizinische Klinik, 1994. **89**(2): p. 2-5.
4. Vincent, S.R. and H. Kimura, *Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain*. Neuroscience, 1992. **46**(4): p. 755-784.
5. Klimaschewski, L., et al., *Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart*. Circulation Research, 1992. **71**(6): p. 1533-1537.
6. Tanaka, K. and T. Chiba, *Nitric oxide synthase containing nerves in the atrioventricular node of the guinea pig heart*. Journal of the autonomic nervous system, 1995. **51**(3): p. 245-253.
7. Tanaka, K., et al., *Direct synaptic contacts of nitric oxide synthase-immunoreactive nerve terminals on the neurons of the intracardiac ganglia of the guinea pig*. Neuroscience Letters, 1993. **158**(1): p. 67-70.
8. Togashi, H., et al., *A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **262**: p. 343-347.
9. Owlya, R., et al., *Cardiovascular and sympathetic effects of nitric oxide inhibition at rest and during static exercise in humans*. Circulation, 1997. **96**: p. 3897-3903.

10. Zappellini, A., et al., *Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs*. J-Cardiovasc-Pharmacol, 1997. **29**(1): p. 45-48.
11. Sener, A. and F.G. Smith, *Dose-dependent effects of nitric oxide synthase inhibition on systemic and renal hemodynamics in conscious lambs*. Canadian-Journal-of-Physiology-and-Pharmacology, 1999. **77**(1): p. 1-7.
12. Pagliaro, P., et al., *Heart rate after inhibition of nitric oxide release in the anaesthetized dog*. J. Biol. Res.-Boll. Soc. It. Biol. Sper, 1995. **71**: p. 75 - 81.
13. Boulanger, C. and T. Luscher, *Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 587-590.
14. Qiu, C., K. Engels, and C. Baylis, *Endothelin modulates the pressor actions of acute systemic nitric oxide blockade*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**(5): p. 1476-1481.
15. Ito, S., C. Johnson, and O. Carretero, *Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole*. J Clin Invest, 1991. **87**(5): p. 1656-1663.
16. Gruetter, C., et al., *Endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in blood vessels*. Eur J Pharmacol, 1988. **146**(1): p. 85-95.
17. Schini, V., Z. Katusic, and P. Vanhoutte, *Neurohypophyseal peptides and tachykinins stimulate the production of cyclic GMP in cultured porcine aortic endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. **255**(3): p. 994-1000.
18. Walker, B., et al., *Vasopressin-induced pulmonary vasodilation in rats*. Am J Physiol, 1989. **257**: p. 415-422.
19. Tagawa, T., et al., *Vasodilatory effect of arginine vasopressin is mediated by nitric oxide in human forearm vessels*. Journal of Clinical Investigation, 1993. **92**(3): p. 1483-1490.

20. Hirsch, J.A. and B. Bishop, *Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate*. American Journal of Physiology, 1981. **241**: p. 620-629.
21. Yamada, K., et al., *Endothelium-dependent vasorelaxation evoked by desmopressin and involvement of nitric oxide in rat aorta*. Am J Physiol, 1993. **264**: p. 203-207.
22. Picker, O., T.W.L. Scheeren, and J.O. Arndt, *Inhalation anaesthetics increase heart rate by decreasing cardiac vagal activity*. British Journal of Anaesthesia, 2001. **87**: p. 748 - 754.
23. Halliwill, J. and G. Billman, *Effect of general anesthesia on cardiac vagal tone*. American Journal of Physiology, 1992. **262**(31): p. 1719-1724.
24. Tabrizi-Fard, M. and H. Fung, *Pharmacokinetics, plasma protein binding and urinary excretion of N omega-nitro-L-arginine in rats*. British Journal of Pharmacology, 1994. **111**(2): p. 394-396.
25. van Leersum, E., *Eine Methode zur Erleichterung der Blutdruckmessung bei Tieren*. Pflügers Archives, 1911. **142**: p. 377-395.
26. Picker, O., A. Schindler, and T.W.L. Scheeren, *Accuracy and reproducibility of long-term implanted transit-time ultrasound flow probes in dogs*. Intensive Care Medicine, 2000. **26**: p. 601-607.
27. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, *Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use*. Circulation, 1996. **93**: p. 1043-1065.
28. Hammel, H.T., C.A. Wyndham, and J.D. Hardy, *Heat production and heat loss in the dog at 8 - 36° C environmental temperature*. American Journal of Physiology, 1958. **194**: p. 99-108.
29. Takamura, M., et al., *Influence of dual ET(A)/ET(B)-receptor blockade on coronary responses to treadmill exercise in dogs*. Journal of Applied Physiology, 2000. **89**(5): p. 2041-2048.

30. Howl, J. and M. Wheatley, *Molecular pharmacology of V1a vasopressin receptors*. Gen Pharmacol, 1995. **26**(6): p. 1143-1152.
31. Peters, J., et al., *Endogenous vasopressin supports blood pressure and prevents severe hypotension during epidural anesthesia in conscious dogs*. Anesthesiology, 1990. **73**(4): p. 694-702.
32. Just, A., et al., *Large vasodilatations in skeletal muscle of resting conscious dogs and their contribution to blood pressure variability*. Journal of Physiology (Lond.), 2000. **527**(3): p. 611-622.
33. Brand, P.H., P.J. Metting, and S.L. Britton, *Support of arterial blood pressure by major pressor systems in conscious dogs*. American Journal of Physiology, 1988. **255**(3): p. 483-491.
34. Picker, O., T.W.L. Scheeren, and J.O. Arndt, *Nitric oxide synthases in vagal neurons are crucial for the regulation of heart rate in awake dogs*. Basic Research in Cardiology, 2001. **96**: p. 395-404.
35. Brunsting, J.R., H.A. Schuil, and W.G. Zijlstra, *Intrinsic heart rate in the dog determined by pharmacologic denervation*. American Journal of Physiology, 1983. **245**(4): p. 592-597.
36. Katona, P.G. and F. Jih, *Respiratory sinus arrhythmia: noninvasive measure of parasympathetic cardiac control*. Journal of Applied Physiology, 1975. **39**: p. 801-805.
37. Mikat, M., et al., *Whole body oxygen consumption in awake, sleeping, and anesthetized dogs*. Anesthesiology, 1984. **60**(3): p. 220-227.
38. Munter, K., H. Ehmke, and H. Kirchengast, *Maintenance of blood pressure in normotensive dogs by endothelin*. American Journal of Physiology, 1999. **45**(3): p. 1022-1027.

39. Schlichting E., A.T., Grotmol T., Lyberg T., *Endothelin and hemodynamic responses to superior mesenteric artery occlusion shock and hemorrhagic shock in pigs*. Shock, 1995. **3**: p. 109-115.
40. Cernacek P., S.D., Levy M., *Plasma endothelin-1 response to acute hypotension induced by vasodilating agents*. Can J Physiol Pharmacol, 1994. **72**: p. 985-991.
41. Burnier, *Angiotensin II Type I Receptor Blockers*. Circulation, 2001. **103**: p. 904-912.
42. Altura, B., Altura BT, *Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic analogs on vascular smooth muscle*. Fed Proc, 1984. **43**: p. 80-86.
43. Kinter LB., H.W., Stassen FL., *Antagonists of the antidiuretic activity of vasopressin*. Am J Physiol, 1988. **254**: p. 165-177.
44. Sander, M., B. Chavoshan, and R.G. Victor, *A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans*. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 937-942.
45. Widdop, R.E., et al., *The influence of atropine and atenolol on the cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats*. British Journal of Pharmacology, 1992. **105**(3): p. 653-656.
46. Kojda, G., et al., *Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control*. Cardiovascular Research, 1999. **42**(1): p. 206-213.
47. Gardiner, S.M., et al., *Cardiovascular responses to angiotensins I and II in normotensive and hypertensive rats; effects of NO synthase inhibition or ET receptor antagonism*. British Journal of Pharmacology, 1999. **128**(8): p. 1795-1803.
48. Kalliovalkama, J., et al., *Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension: influence of long-term angiotensin II receptor antagonism*. Cardiovascular-Research, 1999. **42**(3): p. 773-782.

49. D-Amours, M., et al., *Renal and vascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition: involvement of endothelin 1 and angiotensin II*. *Canadian-Journal-of-Physiology-and-Pharmacology*, 1999. 77(1): p. 8-16.

**Untersuchungen zur Interaktion von endogenem Stickstoffmonoxid und den
vasokonstringierenden Systemen Endothelin, Angiotensin
Vasopressin sowie dem autonomen Nervensystem**

An Hand von Experimenten am wachen Hund sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit das endogene Stickstoffmonoxid (NO) mit den Hormonsystemen Endothelin, Angiotensin und Vasopressin sowie dem autonomen Nervensystem in Bezug auf ihre hämodynamischen und kardiovaskulären Effekte interagiert.

Die Ergebnisse stammen von insgesamt 51 Versuchen, durchgeführt an chronisch instrumentierten wachen Hunden, welche unter physiologischen Bedingungen wiederholt untersucht wurden.

Die Aussagen stützen sich auf die Analyse der hämodynamischen Variablen: Herzfrequenz, Herzfrequenzvariabilität, arterieller Mitteldruck, systemischer Gefäßwiderstand und des Herzzeitvolumens, während dosisabhängiger Inhibition der NO-Synthese. Dies geschah jeweils mit und ohne vorhergehender Blockade des Endothelin-, Vasopressin- oder Angiotensin-Systems, sowie Ganglienblockade des vegetativen Nervensystems durch Hexamethonium.

Die wesentlichen Ergebnisse sind folgende:

1. Das vasodilatierende Stickstoffmonoxid (NO) interagiert bezüglich des systemischen Gefäßwiderstandes und des Blutdruckverhaltens in der Hauptsache mit dem vasokonstriktorisches Endothelin, in der Art, dass das endogene Stickstoffmonoxid die Endothelinwirkung hemmt.
2. Der Abfall der Herzfrequenz unter NO-Synthesehemmung ist nicht reflektorisch, sondern vermittelt durch eine starke Vagusaktivierung die bereits bei niedriger Dosis des NO-Synthesehemmers auftritt, bei denen der Blutdruck unverändert ist.
3. Die Hormonsysteme Vasopressin und Angiotensin interagieren weder bezüglich der Herzfrequenzregulation noch der Blutdruckregulation mit dem NO-System.

Demnach wird durch Hemmung der NO-Synthese der arterielle Mitteldruck dosisabhängig durch enge Wechselwirkungen des NO-Systems mit dem endogenen Endothelinsystem erhöht. Dieser Blutdruckanstieg beruht dabei zum einen auf dem Wegfall des vasodilatierenden NO selbst sowie zum anderen auf einer gesteigerten Wirksamkeit des vasokonstriktorisches Endothelins. Der Abfall der Herzfrequenz ist jedoch keine Folge des Baroreflexes sondern Folge einer Reduktion der NO-Freisetzung durch die neuronale NO-Synthese und dadurch bedingten Erhöhung des Vagotonus.

Danksagungen

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Olaf Picker, Klinik für Anästhesiologie, dass er mein Interesse für dieses Forschungsgebiet geweckt und meine Arbeit durch Anregung und Kritik geprägt hat. Ebenso danke ich für die unermüdliche Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Dissertation und nicht zuletzt für die vielen freundschaftlichen und auch kritischen Dispute.

Besonderer Dank gilt Frau Birgitt Berke für die Anleitung in Registrier- und Auswerttechniken, für die tatkräftige Hilfe und Unterstützung beim Experimentieren, der Auswertung der Daten und der Anfertigung der Abbildungen.

Lebenslauf

30.12.1972	Geboren in Essen
1979-1983	Grundschule Eichendorfschule, Essen
1983-1992	Don-Bosco-Gymnasium, Essen
Juni 1992	Abitur
1992-1995	Krankenpflegeausbildung Krankenpflegeschule an der Ruhr
September 1995	Krankenpflegeexamen
1995-1997	Tätigkeit als Krankenpfleger
April 1997	Studium der Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
April 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dezember 2003	Approbation als Arzt
Januar 2004	Arzt im Praktikum
Seit Oktober 2004	Tätigkeit als Assistenzarzt Innere Medizin

Carsten Swak