

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln
Institut für Vegetative Physiologie
Geschäftsführende Direktorin: Frau Universitätsprofessor Dr. med. G. Pfitzer

Der Einfluß des Atrialen Natriuretischen Peptids
auf die Bewegung der Kationen und
die Katecholamin-Freisetzung
am isolierten ischämischen Rattenherzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Andreas Hilger
aus Düsseldorf

promoviert am 07. August 1997.

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln
Institut für Vegetative Physiologie
Geschäftsführende Direktorin: Frau Universitätsprofessor Dr. med. G. Pfitzer

**Der Einfluß des Atrialen Natriuretischen Peptids
auf die Bewegung der Kationen und
die Katecholamin-Freisetzung
am isolierten ischämischen Rattenherzen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Andreas Hilger
aus Düsseldorf

promoviert am 07. August 1997

Dekanin/Dekan:

Universitätsprofessor Dr. med. C. A. Baldamus

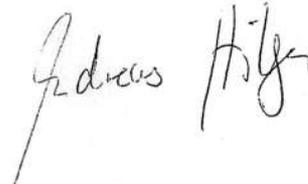
1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. H. Hürche

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. K. Addicks

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Doktorschrift
ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das Schrifttum vollständig
erwähnt habe und daß die Doktorarbeit von keiner anderen Fakultät
abgelehnt worden ist.

Stoke-on-Trent, den 29.4.1996



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

1997

Druck: Copy Team Zülpicher Wall 6 50674 Köln
Tel: (0221) 9440570

1. Die Wirkung von ...
2. Die Wirkung von ...
3. Die Wirkung von ...

Die Wirkung von ...
Die Wirkung von ...
Die Wirkung von ...

Die Wirkung von ...
Die Wirkung von ...

Die Wirkung von ...

Die Wirkung von ...

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden von mir mit Unterstützung durch wissenschaftliche und technische Angestellte des Instituts für Vegetative Physiologie der Universität zu Köln durchgeführt.

Die Wirkung von ...
Die Wirkung von ...
Die Wirkung von ...

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Herrn Prof. Dr. med. H. Hirche danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und seine Unterstützung bei der Interpretation der erhobenen Befunde.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. H. Knopf und Herrn Dr. R. Theising für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente, Frau S. Hilsdorf und Frau Glahé für die labortechnische Unterstützung und für die Bestimmung der Katecholamine, sowie Herrn St. Verborg für seine Hilfe bei der Anfertigung der Grafiken.

Das ist die erste Seite des Buches. Es enthält die Vorrede des Verfassers, in der er die Gründe für die Entstehung dieses Werkes erklärt. Er erwähnt die Unterstützung durch die Familie und die Freunde, die ihm bei der Arbeit an diesem Buch zur Verfügung standen.

Das Buch ist in drei Teile unterteilt. Der erste Teil behandelt die Grundlagen der Physik, der zweite Teil die Anwendungen der Physik in der Technik, und der dritte Teil die neuere Entwicklung der Physik. Die ersten beiden Teile sind für die Schüler der oberen Klassen geeignet, während der dritte Teil für die Studenten der Universitäten bestimmt ist.

Meiner Familie	
1. Vorrede	1
2. Einleitung	2
3. Die Grundlagen der Physik	3
4. Die Anwendungen der Physik in der Technik	4
5. Die neuere Entwicklung der Physik	5
6. Die Grundlagen der Mechanik	6
7. Die Grundlagen der Optik	7
8. Die Grundlagen der Akustik	8
9. Die Grundlagen der Wärmelehre	9
10. Die Grundlagen der Elektrizität	10
11. Die Grundlagen der Magnetismus	11
12. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	12
13. Die Grundlagen der Schwerkraft	13
14. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	14
15. Die Grundlagen der Schwerkraft	15
16. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	16
17. Die Grundlagen der Schwerkraft	17
18. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	18
19. Die Grundlagen der Schwerkraft	19
20. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	20
21. Die Grundlagen der Schwerkraft	21
22. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	22
23. Die Grundlagen der Schwerkraft	23
24. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	24
25. Die Grundlagen der Schwerkraft	25
26. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	26
27. Die Grundlagen der Schwerkraft	27
28. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	28
29. Die Grundlagen der Schwerkraft	29
30. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	30
31. Die Grundlagen der Schwerkraft	31
32. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	32
33. Die Grundlagen der Schwerkraft	33
34. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	34
35. Die Grundlagen der Schwerkraft	35
36. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	36
37. Die Grundlagen der Schwerkraft	37
38. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	38
39. Die Grundlagen der Schwerkraft	39
40. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	40
41. Die Grundlagen der Schwerkraft	41
42. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	42
43. Die Grundlagen der Schwerkraft	43
44. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	44
45. Die Grundlagen der Schwerkraft	45
46. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	46
47. Die Grundlagen der Schwerkraft	47
48. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	48
49. Die Grundlagen der Schwerkraft	49
50. Die Grundlagen der Erdbeschleunigung	50

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. METHODIK	5
2.1. Versuchstiere	5
2.2. Versuchsaufbau	5
2.2.1. Anästhesie und Präparation	5
2.2.2. Perfusion während des Experiments	6
2.2.3. Messung der hämodynamischen Parameter	7
2.2.4. Temperaturkonstanz und Sauerstoffausschluß während der globalen Ischämie	10
2.3. Bestimmung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und der trans- membranalen Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie	10
2.3.1. Ionenselektive Elektroden	10
2.3.1.1. Extrazelluläre Ionenkonzentrationen	10
2.3.1.2. Bestimmung der relativen Veränderung des Extrazellulär-raums	11
2.3.2. Eichung und Messung	12
2.3.2.1. Elektrodeneichung	13
2.3.2.2. Selektivität	13
2.3.2.3. Einsatz der Elektroden während des Experiments	13
2.3.3. Berechnung der Veränderung des Extrazellulär-raums und der Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie	15
2.4. Versuchsablauf	16
2.5. Katecholaminbestimmung	16
2.6. Pharmakologie des atrialen natriuretischen Peptid	17
2.7. Statistik	19
3. ERGEBNISSE	20
3.1. Temperaturkonstanz während der Ischämie	20
3.2. Hämodynamik der Rattenherzen unter dem Einfluß von ANP	21

3.3. Änderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und transmembranale Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von ANP	22
3.3.1. TMA-Ionen und Änderung des Extrazellulärraums	22
3.3.2. Kaliumionen	24
3.3.3. Natriumionen	25
3.3.4. Kalziumionen	26
3.3.5. H ⁺ -Ionen	29
3.3.6. Wirkung von ANP	29
3.4. Auswaschung der akkumulierten Katecholamine nach 60minütiger globaler Ischämie unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von ANP	31
4. DISKUSSION	33
4.1. Versuchsaufbau	33
4.2. Physiologie von ANP	35
4.3. Hämodynamik vor und nach Gaben von ANP	37
4.4. Verschiebungen von Wasser und Kationen während globaler Ischämie	38
4.4.1. Schrumpfung des Extrazellulärraums	38
4.4.2. Kalium	39
4.4.3. Natrium	40
4.4.4. Kalzium	41
4.4.5. Extrazellulärer pH	43
4.5. Einfluß von ANP auf die zelluläre Ionenhomöostase	43
4.5.1. Wassertransport und Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Kotransport	43
4.5.2. Natrium/Kalium- ATPase und Kalium- und Natriumkanäle	44
4.5.3. Der Amilorid-sensitive Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	45
4.5.4. Natrium/Kalzium-Austausch, Kalzium-ATPase und Kalziumkanäle	45
4.6. ANP und Katecholamine	47
5. ZUSAMMENFASSUNG	49
6. LITERATURVERZEICHNIS	51
7. VORABVERÖFFENTLICHUNG	70

1. EINLEITUNG

Bei der akuten myokardialen Ischämie wird eine Minderung der Kontraktionsleistung und häufig das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen und Kammerflimmern beobachtet. Es kommt dabei zu einer Unterbrechung der Versorgung des Herzens mit Sauerstoff und energiereichen Substraten sowie des Abtransportes von Stoffwechselprodukten. Ein total ischämisches Areal kann daher als ein annähernd geschlossenes physiologisches System betrachtet werden.

Unter diesen Bedingungen kommt es darin sehr rasch nach Einsetzen der Ischämie zu Störungen der Ionenhomöostase. Der Anfall von sauren Metaboliten, wie Laktat (TENNANT, 1935, WOLLENBERGER u. SHAHAB, 1965) und Phosphat (KÜBLER u. KATZ, 1977) führt zu einem Abfall des pH sowohl im Intra- wie auch im Extrazellulärraum. (IZR, EZR; MALLOY et al., 1986). Mit Hilfe von ionenselektiven Elektroden fanden HIRCHE et al. (1980) und FLEET et al. (1985) am Schweineherzen, COBBE et al. (1982) am Kaninchenherzen in vivo sowie COBBE u. POOLE-WILSON (1980) am isolierten Kaninchenmyocard, einen raschen Anstieg der extrazellulären Protonenkonzentration ($[H^+]_e$), welchen letztgenannte im Gegensatz zu WEISS et al. (1984) als wichtige Ursache des gleichzeitig beobachteten Kontraktionsversagens ansahen.

Eine Abnahme der energieabhängigen Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase ist zum Teil verantwortlich für einen dreiphasigen Anstieg der extrazellulären K⁺-Ionenkonzentration ($[K^+]_e$) (WIEGAND et al., 1979, HILL u. GETTES, 1980, HIRCHE et al., 1980, WEISS u. SHINE, 1982a, KNOPF et al., 1988). Gleichzeitig kommt es zur lokalen Freisetzung von Noradrenalin (NA; DIETZ et al., 1981, SCHÖMIG et al., 1984, HIRCHE et al., 1985). Beide Phänomene begünstigen ventrikuläre Arrhythmien (HARRIS et al., 1951, BÖS et al., 1978, OPIE et al., 1979, WEISS u. SHINE, 1982b).

Über die Umverteilung von Natrium- und Kalziumionen nach Einsetzen einer myokardialen Ischämie ist weniger bekannt. Während KLÉBER (1983) am isolierten Meerschweinchenherzen in den ersten Minuten keine Änderung der intrazellulären Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) fand, ermittelten BALSCHI et al. (1985) und TANI u. NEELY (1989), einen Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$. Frühe Untersuchungen mit ionenselektiven Elektroden durch FRIEDRICH et al. (1981) am Schwein ergaben in Übereinstimmung mit KNOPF et al. (1988) am isolierten Rattenherzen einen langsamen initialen Anstieg und späteren Abfall der extrazellulären Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_e$). LAZDUNSKI et al. (1985) beschrieben eine vermehrte Aufnahme von Na^+ , bedingt durch die Wirkung einer ansteigenden, intrazellulären H^+ -Konzentration ($[\text{H}^+]_i$) auf den Amilorid-sensitiven Na^+/H^+ -Antiporter. STEENBERGEN et al. (1987) und LEE et al. (1988), konnten eine Akkumulation von intrazellulärem, freiem Kalzium in der ischämischen Herzmuskelzelle beobachten, was zu Schädigung der zellulären Ultrastruktur führt (SHEN u. JENNINGS, 1972, HEARSE et al., 1978). In einer neueren Untersuchung am isolierten Rattenherz fanden KNOPF et al. (1990) mit ionenselektiven Minielektroden zwar einen anfänglichen Anstieg der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$). Durch gleichzeitige, kontinuierliche Bestimmung der Konzentration von Tetramethylammoniumchlorid (TMA^+Cl^-), eines EZR-Markers, konnte jedoch eine Schrumpfung des EZR um 45% während 20minütiger, globaler Ischämie bestimmt werden. Daraus berechnete sich dann ein zweigipfliger Nettoeinstrom von Ca^{2+} . Die Zunahme der Osmolarität im IZR ist sehr wahrscheinlich der Grund für den "Shift" von freiem Wasser aus dem EZR (TRANUP-JENSEN et al., 1981, JENNINGS et al., 1986).

Seit der Entdeckung einer erheblichen diuretischen und natriuretischen Wirkung von Extrakten aus Atrien von Rattenherzen durch DE BOLDT et al. (1981), konnten eine Reihe von strukturell sehr ähnlichen Oligopeptiden aus Kardiozyten isoliert werden (ATLAS et al., 1984, SEIDAH et al., 1984).

Diese sogenannten atrialen natriuretischen Peptide (ANP), mit einer gemeinsamen aktiven Sequenz von mindestens 22 Aminosäuren, zeichnen sich durch qualitativ aber nicht quantitativ ähnliche Wirkung aus (THIBAUT et al., 1984, NEEDLEMAN, 1986).

Als mögliche Releasemechanismen kommen neben Volumenbelastung (LANG et al., 1985), direkter atrialer Dehnung (DIETZ, 1984, LEDSONE et al., 1985), Hypoxie (BAERTSCHI et al., 1986) oder Ischämie (MENDEZ et al., 1987) auch Katecholamineinfluß (KUCHEL et al. 1987b, RUSKOAHO et al., 1987) in Betracht. Neben verschiedenen Rezeptorwirkungen an den Abschnitten des Nephrons (SEYMOUR et al., 1985, SONNENBERG, 1986), steht die relaxierende Wirkung von ANP an der glatten Gefäßmuskulatur (WINQUIST et al., 1984), wobei eine Hemmung der Adenylatcyclase (ANAND-SRIVASTAVA et al., 1984) und ein Abfall von intrazellulärem Kalzium (CORNWELL u. LINCOLN 1989) beobachtet wurde. Periphere Vasodilatation und vermehrte Diurese führen zu Blutdrucksenkung und verminderter Herzleistung (ACKERMANN et al., 1983).

Obwohl BIANCHI et al. (1985) eine hohe endokardiale Rezeptordichte für ANP beschreiben, berichten nur wenige Arbeiten über direkte Wirkungen von ANP auf das Myokard. OTERO et al. (1987) beschrieben einen koronardilatatorischen Effekt von ANP am isolierten Meerschweinchenherzen. Nach Gabe von ANP fanden BÖHM et al. (1988) keine Änderung der myokardialen Kontraktilität am isolierten Papillarmuskel, während MEULEMANS et al. (1988) in einer ähnlichen Präparation eine Relaxation beobachteten. LINZ et al. (1988) berichten über eine ANP-induzierte Abnahme der ventrikulären Arrhythmierate nach Koronarokklusion am isolierten Rattenherzen. Nach Gabe von ANP fanden GISBERT u. FISCHMEISTER (1988) eine Verminderung des durch Isoprenalin ausgelösten Kalziumeinstroms in die isolierte Herzmuskelzelle, was auf einer Hemmung der Betarezeptor-abhängigen Adenylatcyclase am Kardiozyten (ANAND-SRIVASTAVA u. CANTIN, 1986) beruhen könnte.

Der Einfluß von ANP auf den Transport von Natrium-, Kalium- und Wasserstoffionen ist hauptsächlich an den verschiedenen Zellen des Nephrons untersucht worden. Der natriuretische Effekt von ANP beruht dabei unter anderem auf einer Hemmung des Amilorid-sensitiven Na^+/H^+ -Antiporters, welches zu einer verminderten Reabsorption von Na^+ in die proximale Tubuluszelle (HAMMOND et al., 1985) oder Sammelrohrzelle (ZEIDEL et al., 1986, WILSON et al., 1987) führt. Gleichzeitig kommt es zum Anstieg von $[\text{H}^+]_i$; (HAMMOND et al., 1985). Seit klinische Studien (LANG et al., 1986, PORTER et al., 1987, GALIPEAU et al., 1988) auch bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit stark erhöhte Plasmaspiegel von ANP nachweisen konnten, stellt sich die Frage nach einer möglichen kardioprotektiven Wirkung dieses Peptidhormons. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die direkte Wirkung von ANP auf die oben beschriebenen Veränderungen des Ionengleichgewichts und auf die Katecholaminfreisetzung im ischämischen Myokard zu untersuchen. Hierzu wurden isoliert perfundierte Rattenherzen einer 60minütigen globalen Ischämie (gI) ausgesetzt, wobei $[\text{H}^+]_e$, $[\text{K}^+]_e$, $[\text{Na}^+]_e$ und $[\text{Ca}^{2+}]_e$ mit Hilfe von ionenselektiven Minielektroden nach HILL et al. (1978) bestimmt wurden. Die Katecholaminkonzentration im ischämischen Herzgewebe wurde mit Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie ermittelt.

2. METHODIK

2.1. Versuchstiere

Die Präparation wurde an männlichen Ratten (Stamm: Wistar) mit einem Durchschnittsgewicht von $364 \pm 1,4$ g vorgenommen. Die Tiere wurden über den Zeitraum der Versuchsreihe unter ständig gleichen Bedingungen gehalten. Die Ratten wurden randomisiert und in eine Kontrollgruppe und eine ANP-Gruppe eingeteilt.

2.2. Versuchsaufbau

2.2.1. Anästhesie und Präparation

Zur Narkose erhielten die Ratten eine Bolusinjektion von 80 mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital-Natrium (Nembutal[®], Abbot S.A.) intraperitoneal (i.p.) und zur Verhinderung von Thrombenbildung während der Präparation Heparin-Natrium (1000 i.E./kg KG, Thrombophob[®], Nordmark) ebenfalls i.p. Bei genügender Narkosetiefe, welche man durch fehlende Schmerzreaktion auf den Fußsohlenreflex überprüfte, wurden die Tiere auf dem Rücken fixiert. Bei noch erhaltener Spontanatmung wurde jetzt rasch die Trachea zur Beatmung (Raumlufte) kanüliert. Als Respirator diente eine Kolbenpumpe (Rodent Respirator, Harvard Apparatus), die auf ein Atemzugvolumen von 1 ml/kg KG und eine Beatmungsfrequenz von 40/min eingestellt wurde.

Nach kurzer Verweildauer begann man mit der eigentlichen Präparation, indem man zunächst das Fell über Thorax und Oberbauch entfernte und anschließend über eine substernale Querinzision der Bauchdecke und unter Durchtrennung des L. falciforme hepatis das Zwerchfell darstellte. Vorsichtig, unter Vermeidung einer Verletzung der Thoraxorgane, wurde sodann das Zwerchfell horizontal eingeschnitten und die Rippen zuerst rechtsseitig, dann linksseitig von kaudal nach kranial in der vorderen

Axillarlinie durchtrennt und das nun erhaltene Resektat kopfwärts hochgeschlagen. Nachbehaltsamer Luxation des kräftig schlagenden Herzens mit der Hand und Durchtrennung der Gefäßwurzel mit einem Scherenschlag wurde das Herz nach kurzem Auswiegen in eine Glasschale mit ca. 20°C warmer, modifizierter Krebs-Henseleit Perfusionslösung (KHL) getaucht (Zusammensetzung der KHL siehe Tab 2.1). Hierunter kam es zu einer deutlich sichtbaren Abnahme der Herzfrequenz. Rasch wurde nun der Aortenstumpf, zur Verhinderung von Luftembolien im Lösungsbad, auf eine mit niedrigem Fluß vorperfundierte Metallkanüle aufgezogen und mit einem Seidenfaden fixiert. Um die Ischämiezeit möglichst kurz zu halten, betrug das Intervall zwischen Exzision und Kanülierung nicht mehr als 15 Sekunden. Die entnommenen Herzen hatten vor Anschluß an die Perfusion ein Feuchtgewicht von im Mittel $1,15 \pm 0,022$ g.

NaCl	120,00	NaHCO ₃	23,80
KCl	4,02	NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	0,44
CaCl ₂ ×H ₂ O	1,85	Na-Pyruvat	1,82
MgCl ₂ ×6H ₂ O	1,05	Na ₂ EDTA×2H ₂ O	1,82
Glucose	11,10		
pH:	7,40	bei 37°C und Begasung der Lösung mit Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	

Tabelle 2.1:
Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit Lösung [mmol/l].
(Alle Substanzen von E. Merck, Darmstadt)

2.2.2. Perfusion während des Experimentes

Das isolierte Herz wurde volumenkonstant mit einem Flow von 6 ml/min/g Herzgewicht (HG) perfundiert. Dazu wurde ca. 500 ml KHL in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂, Linde AG)

begast, wodurch die Lösung auf den pH-Wert 7,40 bei 37,5°C, einen pCO₂ von 40 mmHg und einen pO₂ von ca. 600 mmHg eingestellt wurde. Von einer Rollerpumpe (Minipuls, Gilson) getrieben, gelangte das Perfusat nach Passage eines Mikrofilters, welches zur Verhinderung von Mikroembolien substantielle Verschmutzungen und aus gefällte Salzaggregate auffangen sollte, zu einem Wärmetauscher, wo es auf 37,5°C temperiert wurde. Ein zentral im Wärmetauscher angebrachtes und nach oben hin zu entlüftendes Steigrohr diente als Windkessel und letzte Blasenfalle vor dem Herzen.

Auf ein geeignetes Zwischenstück am unteren Ausfluß, aus dem zuvor eine Probe der Lösung zur Blutgas- und Elektrolytanalyse gekommen war, wurde nun die vorbeschriebene Kanüle mit dem präparierten Herzen so aufgesteckt, daß das Herz an der Aortenwurzel hängend mit dem linken Ventrikel nach vorne und der Spitze nach unten zeigte. Bei suffizienten Aortenklappen wurden dann die Koronararterien mit isotoner substrat- und sauerstoffangereicherter Lösung perfundiert. Das über den Sinus venosus aus dem rechten Atrium austretende Eluat ermöglichte eine intermittierende Entnahme der erforderlichen Proben. Den schematische Aufbau zeigt Abb. 2.1.

2.2.3. Messung der hämodynamischen Parameter

Zur Messung der linksventrikulären Hämodynamik unter möglichst physiologischen Bedingungen, also unter Berücksichtigung von Druck- und Volumenarbeit, diente das von BARDENHEUER und SCHRADER (1983) am Meerschweinchenherzen beschriebene Modell des "working heart". Hierbei handelte es sich um eine künstliche Zirkulation, welche es ermöglichte, die Druckvolumenarbeit des linken Ventrikels konstant zu halten (Abb.2.1). Kernstück war eine in Kunstharz gegossene Kammer (ca. 0,5 cm³), die über ein Einlaß- (funktionell der Mitralklappe entsprechend) und ein Auslaßventil (funktionelle Aortenklappe) verfügte. Die Ventile bestanden aus einem fixen Gummiring mit einem Öffnungsdurchmesser von 2,1 mm,

an dem tangential und elastisch ein schließender Gummideckel angebracht war. Über ein dünnes Messingrohr (Innendurchmesser (i.d.) ca. 1,5 mm, Außendurchmesser (a.d.) ca. 2,0 mm, Länge ca. 20 mm) stand die Kammer mit einem kleinen Latexballon (Länge 8 mm, Durchmesser 5 mm; Größe 5, Hugo Sachs Elektronik KG), in Verbindung. Die gesamte Apparatur war an einer feintriebigen Schraubenmechanik aufgehängt, mit deren Hilfe der Ballon in kollabiertem Zustand über den vorher eröffneten linken Vorhof unter Sprengung der Mitralklappe in die linke Kammer des bereits perfundierten Herzens plazierte wurde. Erleichtert wurde dieser Vorgang durch einen stumpfen Führungsdraht im Innern des Ballons welcher zugleich die Aufhängung des Herzens stabilisierte. Das System war vorher mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt worden. Für die Füllung des Ballons und somit der diastolischen linksventrikulären Füllung, sorgte ein Nachfüllgefäß, dessen Flüssigkeitsspiegel während sämtlicher Versuche auf 13 cm über Herzniveau gehalten wurde was einer *Vorlast* von 10 mmHg entsprach. Ein zweites Gefäß, mit einem Spiegel in 52 cm Höhe (entsprechend 40 mmHg) über Herzniveau, das über das Auslaßventil mit der Kammer kommunizierte, erzeugte die *Nachlast*. Zwischen Auslaßventil und Nachlastgefäß befand sich ein kleines luftgefülltes Steigrohr als Windkessel. Die im Nachlastgefäß zunehmende Flüssigkeit konnte über einen Überlauf in das Vorlastgefäß abtropfen. Hierdurch schloß sich der künstliche Kreislauf. Über ein Statham-Druckwandlerelement, das mit der Kammer in Verbindung stand, wurde der linksventrikuläre Druck (LVP) gemessen. Der mit einem zweiten Druckwandler unmittelbar vor der Aortenkanüle ermittelte Druck im Perfusionssystem wurde als koronarer Perfusionsdruck (CPP) angenommen. Ein Überwachungsmonitor (Sirecust 838/8368, Siemens AG) zeigte Druckkurven und -werte kontinuierlich an und errechnete simultan die Ableitung des LVP, dP/dt . Diese drei Parameter wurden auf einem 4-Kanal-Direktschreiber (Gould-Brush 2400S) mit konstanter Geschwindigkeit aufgezeichnet. Durch intermittierende Schnellschrift berechnete man die jeweilige Herzfrequenz und erhielt Aufschluß über das Verhalten der linksventrikulären Druckkurve.

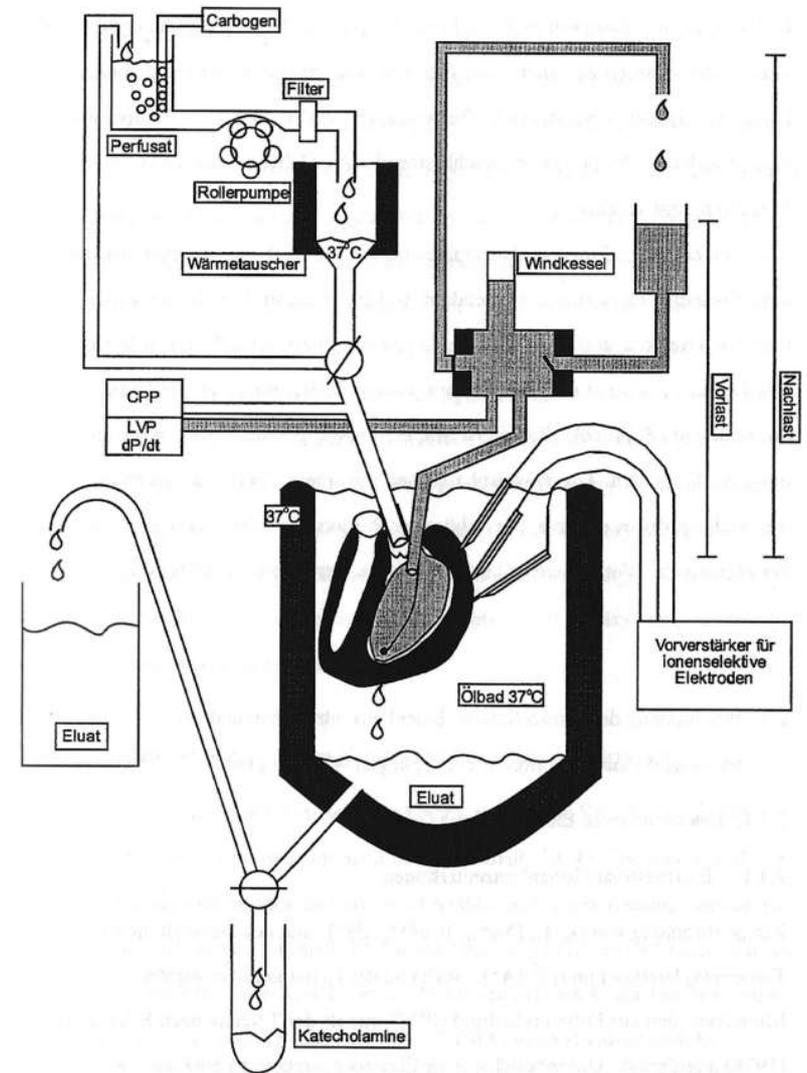


Abbildung 2.1:

Schematischer Versuchsaufbau. Beachte die Aufhängung des Herzens im Ölbad und die Anordnung des "working heart"-Modelles.

2.2.4. Temperaturkonstanz und Sauerstoffausschluß während der globalen Ischämie

In der Perfusionsphase war es durch Erwärmung der KHL möglich, die myokardiale Temperatur konstant zu halten. Um Artefakte während der Phase der globalen Ischämie (gI) und insbesondere zu Beginn zu vermeiden, mußte die Temperatur auch nach Abschalten der Perfusion gleichbleibend sein. Dabei wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt.

Während der Perfusions- und Ischämiephase wurden die Herzen in eine erwärmte, doppelwandige Glaskammer suspendiert, welche im ersten Verfahren ständig mit temperiertem Stickstoff begast wurde. Im zweiten Versuchsaufbau wurde die Glaskammer zuunterst mit einer Phase wässriger KHL und darüber mit einer Phase dünnflüssigen Silikonöls (Baysilone M3, Bayer AG) gefüllt, in welche die Herzen eingetaucht wurden. Die Wasserphase stand mit einem Überlaufschlauch in Verbindung, der es erlaubte, überschüssiges Perfusat ablaufen zu lassen. Während der eigentlichen Versuchsreihe kam das letztere Verfahren zur Anwendung.

2.3. Bestimmung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und der transmembranalen Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie

2.3.1. Ionenselektiven Elektroden

2.3.1.1. Extrazelluläre Ionenkonzentrationen

Zur Bestimmung von $[K^+]_e$, $[Na^+]_e$, $[Ca^{2+}]_e$, $[H^+]_e$ und des extrazellulären Tetramethylammonium ($[TMA^+]_e$) während der Ischämiephase wurden Minielektroden aus Polyvinylchlorid (PVC) mittels der Technik nach HILL et al. (1978) angefertigt. Um möglichst feine Elektrodenspitzen zu erhalten (ca. 0,35 mm a.d., 0,15 mm i.d.), erwärmte man dünne PVC-Schläuche (1,6 mm a.d., 0,6 mm i.d.) und zog sie über einem feinen Seidenfaden (Mersilk 5-0, Ethicon) aus. Jeweils zwei etwa 3 cm lange Spitzen wurden mit Tetrahydrofuran (THF) so verschweißt, daß der Meßkanal den Referenzkanal um ca. 0,5 mm überagte. Flüssige

ionenselektiven Membranen wurde wie von AMMAN et al. (1976) beschrieben durch Einbettung von entsprechenden Ionenaustauschern in PVC angefertigt.

Tabelle 2.2 zeigt deren Zusammensetzung für die jeweiligen Kationen.

Die Meßkanäle für Kalium, Natrium und Kalzium wurden jeweils mit 0.16 molarer Lösung von KCl, NaCl oder respektive $CaCl_2$ gefüllt, der Meßkanal für Protonen mit einer Lösung aus 38 mmol/l Natriumzitat-2-Hydrat, 19 mmol/l Zitronensäure-1-hydrat und 58 mmol/l NaCl und anschließend mehrmals in die jeweilige Membranlösung eingetaucht, bis der Kanal sicher verschlossen war. Die Referenzkanäle wurden mit Agar (SERVA, Heidelberg) in 160 mmol/l NH_4Cl Lösung gefüllt. Die elektrische Kopplung erfolgte über an den Enden chlorierte, dünne, mit Teflon isolierte Silberdrähte (Medwire), die mit Zahnwachs in die Elektroden eingebettet wurden. Die Elektroden wurden über abgeschirmte Kabel an einen Meßverstärker mit hoher Eingangsimpedanz (6×10^8 MOhm) und niedrigem Leerlaufstrom (10^{-14} A) angeschlossen. Die Potentialschwankungen wurden auf einem 6-Kanalschreiber (Watanabe) mit einer Breite von 100 Kästchen (Auflösung ca. 2 mm/Kästchen) aufgezeichnet.

2.3.1.2. Bestimmung der relativen Veränderung des Extrazellulärraums

Während globaler myokardialer Ischämie kommt es zu einer Verschiebung von Gewebswasser von extra- nach intrazellulär (KLÉBER, 1984). Die kontinuierliche Veränderung kann durch Messung von nicht membrangängigen Kationen bestimmt werden. Im vorliegenden Experiment wurden dazu einige Herzen (Kontrollen: n=24; ANP: n=10), nach dem von KNOPF et al. (1990) beschriebenen Verfahren, mit Tetramethylammoniumchlorid (KHL + 0,1 mmol/l TMA) vorperfundiert und die extrazelluläre Zunahme von TMA^+ in der Ischämiephase gemessen. Der Meßkanal der entsprechenden Minielektrode wurde mit 0,16 molarer TMA-Lösung gefüllt und mit der entsprechenden, selektiven Membran verschlossen (Tab. 2.2).

2.2.4. Temperaturkonstanz und Sauerstoffausschluß während der globalen Ischämie

In der Perfusionsphase war es durch Erwärmung der KHL möglich, die myokardiale Temperatur konstant zu halten. Um Artefakte während der Phase der globalen Ischämie (gI) und insbesondere zu Beginn zu vermeiden, mußte die Temperatur auch nach Abschalten der Perfusion gleichbleibend sein. Dabei wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt.

Während der Perfusions- und Ischämiephase wurden die Herzen in eine erwärmte, doppelwandige Glaskammer suspendiert, welche im ersten Verfahren ständig mit temperiertem Stickstoff begast wurde. Im zweiten Versuchsaufbau wurde die Glaskammer zuunterst mit einer Phase wässriger KHL und darüber mit einer Phase dünnflüssigen Silikonöls (Baysilone M3, Bayer AG) gefüllt, in welche die Herzen eingetaucht wurden. Die Wasserphase stand mit einem Überlaufschlauch in Verbindung, der es erlaubte, überschüssiges Perfusat ablaufen zu lassen. Während der eigentlichen Versuchsreihe kam das letztere Verfahren zur Anwendung.

2.3. Bestimmung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und der transmembranalen Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie

2.3.1. Ionenselektiven Elektroden

2.3.1.1. Extrazelluläre Ionenkonzentrationen

Zur Bestimmung von $[K^+]_e$, $[Na^+]_e$, $[Ca^{2+}]_e$, $[H^+]_e$ und des extrazellulären Tetramethylammonium ($[TMA^+]_e$) während der Ischämiephase wurden Minielektroden aus Polyvinylchlorid (PVC) mittels der Technik nach HILL et al. (1978) angefertigt. Um möglichst feine Elektrodenspitzen zu erhalten (ca. 0,35 mm a.d., 0,15 mm i.d.), erwärmte man dünne PVC-Schläuche (1,6 mm a.d., 0,6 mm i.d.) und zog sie über einem feinen Seidenfaden (Mersilk 5-0, Ethicon) aus. Jeweils zwei etwa 3 cm lange Spitzen wurden mit Tetrahydrofuran (THF) so verschweißt, daß der Meßkanal den Referenzkanal um ca. 0,5 mm überagte. Flüssige

ionenselektiven Membranen wurde wie von AMMAN et al. (1976) beschrieben durch Einbettung von entsprechenden Ionenaustauschern in PVC angefertigt.

Tabelle 2.2 zeigt deren Zusammensetzung für die jeweiligen Kationen.

Die Meßkanäle für Kalium, Natrium und Kalzium wurden jeweils mit 0.16 molarer Lösung von KCl, NaCl oder respektive $CaCl_2$ gefüllt, der Meßkanal für Protonen mit einer Lösung aus 38 mmol/l Natriumzitat-2-Hydrat, 19 mmol/l Zitronensäure-1-hydrat und 58 mmol/l NaCl und anschließend mehrmals in die jeweilige Membranlösung eingetaucht, bis der Kanal sicher verschlossen war. Die Referenzkanäle wurden mit Agar (SERVA, Heidelberg) in 160 mmol/l NH_4Cl Lösung gefüllt. Die elektrische Kopplung erfolgte über an den Enden chlorierte, dünne, mit Teflon isolierte Silberdrähte (Medwire), die mit Zahnwachs in die Elektroden eingebettet wurden. Die Elektroden wurden über abgeschirmte Kabel an einen Meßverstärker mit hoher Eingangsimpedanz (6×10^8 MOhm) und niedrigem Leerlaufstrom (10^{-14} A) angeschlossen. Die Potentialschwankungen wurden auf einem 6-Kanalschreiber (Watanabe) mit einer Breite von 100 Kästchen (Auflösung ca. 2 mm/Kästchen) aufgezeichnet.

2.3.1.2. Bestimmung der relativen Veränderung des Extrazellulärtraums

Während globaler myokardialer Ischämie kommt es zu einer Verschiebung von Gewebswasser von extra- nach intrazellulär (KLÉBER, 1984). Die kontinuierliche Veränderung kann durch Messung von nicht membrangängigen Kationen bestimmt werden. Im vorliegenden Experiment wurden dazu einige Herzen (Kontrollen: n=24; ANP: n=10), nach dem von KNOFF et al. (1990) beschriebenen Verfahren, mit Tetramethyl-ammoniumchlorid (KHL + 0,1 mmol/l TMA) vorperfundiert und die extrazelluläre Zunahme von TMA^+ in der Ischämiephase gemessen. Der Meßkanal der entsprechenden Minielektrode wurde mit 0,16molarer TMA-Lösung gefüllt und mit der entsprechenden, selektiven Membran verschlossen (Tab. 2.2).

K ⁺ :	VAL	4,0	Ca ²⁺ :	ETH 1001	3,4
	TET	1,0		TET	2,1
	DOS	70,0		BBPA	63,5
	PVC	25,0		PVC	31,0
Na ⁺ :	ETH 2120	4,0	H ⁺ :	TRI	4,0
	TET	1,0		TET	1,0
	DOS	70,0		BBPA	70,0
	PVC	25,0		PVC	25,0
TMA ⁺ :	Corning 477317			70,0	
	PVC			30,0	

Alle Substanzen in [Gew.-%] und gelöst in 5 ml Tetra-Hydrofuran

Corning K⁺ Exchanger 477317
 BBPA: Bis (1-Butyl-Pentyl) Adipat (FLUKA GmbH)
 DOS: Di-(Ethyl-Hexyl)-Sebacat (FLUKA GmbH)
 TRI: Tridodecylamin (FLUKA GmbH)
 VAL: Valinomycin (Sigma AG)
 TMA: Tetramethylammoniumchlorid (FLUKA GmbH)
 ETH 2120, 1001 Carrier nach Amman et al. (1976)
 PVC: Polyvinylchlorid, SDP hoch molekular (LONZA AG)
 TET: Tetrakis (p-Chloro-Phenyl) Borat (FLUKA GmbH)

Tabelle 2.2:

Zusammensetzung der flüssigen Membranen für die PVC-Minielektroden

2.3.2. Eichung und Messung

Um Störungen durch elektromagnetische Felder zu vermeiden wurden Messungen und Kalibrierungen in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt.

2.3.2.1. Elektrodeneichung

Die Elektrodenkalibrierung wurde in jeweils zwei Referenzlösungen vorgenommen, die ungefähr den zu erwartenden Meßbereich umfaßten und annähernd isoton waren.

Für Kalium-, Natrium- und Kalziumelektronen bestand Eichlösung I aus

7 mmol/l K⁺, 150 mmol/l Na⁺, 1 mmol/l Ca²⁺ und Eichlösung II aus 70 mmol K⁺, 80 mmol/l Na⁺, 5 mmol/l Ca²⁺. Die beiden Eichlösungen für TMA⁺ enthielten 4 mmol/l K⁺, 140 mmol/l Na⁺, 1,8 mmol/l Ca²⁺ und entweder 0,5 mmol/l oder 0,05 mmol/l TMA⁺. Wasserstoffelektroden wurden in gepufferten Lösungen von pH6 (66,7 mmol/l KH₂PO₄ und 83,8 mmol/l Na₂PO₄ im Verhältnis 88:12) bzw. pH7 (gleiche Lösungen im Verhältnis 39:61) geeicht. Da die Elektroden während des Versuches völlig in das Ölbad eintauchten, wurden auch die Eichlösungen auf 37°C erwärmt. Nur Elektroden, deren Steilheit dem Nernst'schen Potential der Konzentrationsdifferenz des jeweiligen Ions zwischen den beiden Eichlösungen entsprach (±5%), wurden im Versuch verwendet. Mehrpunkteichung zeigte gutes Linearverhalten. Nachdem sich die Kalibrierung stabilisiert hatte, wurden die Eckwerte der individuellen Elektrode auf die maximale Schreiberbreite eingestellt, welche nun der jeweiligen Konzentrationsdifferenz der Eichlösungen entsprach.

2.3.2.2. Selektivität

Der Selektivitätskoeffizient für eine bestimmte Elektrode gibt deren Präferenz für ein mögliches, störendes Kation an. Er wurde für sämtliche Membranen nach NIKOLSKY et al. (1967) ermittelt und lag deutlich unter 0,1 (Tab.2.3).

2.3.2.3. Einsatz der Elektroden während des Experiments

Nachdem sich die mechanische Aktion des isolierten Herzens stabilisiert hatte, wurden in der Mitte des linksventrikulären Myocards mit einer Injektionsnadel (Microlance, Nr. 2) ca. 3 mm lange, subepikardiale Inzisionen zur Aufnahme der Minielektroden geschaffen. Diese, durch minimales Gewebstrauma hervorgerufenen, Räume wurden als extrazellulär angenommen.

Bis zu drei Minielektroden wurden so im Myokard verankert und mittels eines verschieblichen Halters an ihren Drähten dynamisch aufgehängt. Auf dies Art und Weise konnten fortgesetzte, traumatische Arrhythmien verhindert werden. Für die Berechnung der Konzentrationsänderung eines Ions wurde die Position des Schreibers in der Perfusionsphase mit der Konzentration des entsprechenden Ions in der begasten KHL gleichgesetzt. Dazu wurden die Na⁺- und K⁺-Konzentrationen mit einem Analysator (Orion Research 1020) bestimmt. Die H⁺-Konzentration wurde aus dem pH-Wert der Lösung vor dem Herzen (Blutgas Analysator MT 33/2, Eschweiler) errechnet. Für Ca²⁺ und TMA⁺ wurden die eingewogene Konzentration angenommen. Mit in die Berechnung ging die mögliche lineare Drift der Elektrode, welche sich in einer Abweichung der Position des Schreibers von der Ausgangsposition bei Rückeichung am Ende der Reperfusionphase ausdrückte, sowie das logarithmische Verhältnis zwischen aufgezeichnetem, elektrochemischen Potential und Ionenkonzentration (Nernst'sche Gleichung), ein. Das Ergebnis wurde mit dem jeweiligen Selektivitätskoeffizienten (Tab. 2.3) korrigiert.

Elektrode	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	TMA ⁺
K ⁺	1	0,074	1,3×10 ⁻³	-	4,7×10 ⁻⁴
Stör-Ion Na ⁺	<10 ⁻⁵	1	2,5×10 ⁻³	<10 ⁻¹³	5,7×10 ⁻⁵
Ca ²⁺	<10 ⁻⁴	<10 ⁻³	1	-	0,011
H ⁺	-	-	-	1	-

Tabelle 2.3: Selektivitätskoeffizienten der ionenselektiven Elektroden gegenüber dem jeweiligen, potentiellen Stör-Ion. Dieser Koeffizient gibt die Präferenz einer ionenselektiven Membran für das Stör-Ion im Verhältnis zum zu messenden Ion an.

2.3.3. Berechnung der Veränderung des Extrazellulärtraums und der Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie

Isoliertes Myokard stellt unter gI ein geschlossenes physiologisches System dar, bestehend aus zwei durch das Sarkolemm getrennten Kompartimenten, nämlich dem EZR und IZR. Da weder Ionen noch freies Wasser hinzu- oder abgeführt werden, repräsentierte eine Änderung der Ionenkonzentration im EZR entweder eine transmembranale Bewegung des Ions oder eine entgegengesetzte Bewegung von freiem Wasser. Somit wäre eine ansteigende Konzentration des streng extrazellulären Kations TMA⁺ Ausdruck einer proportionalen Abnahme extrazellulären Wassers (*water shift*), woraus sich eine relative Schrumpfung des EZR berechnen lässt. Für das relative Volumen des EZR (relVe) zum Zeitpunkt (t_n) nach Einsetzen der gI, gilt daher die simple Beziehung:

$$\text{relVe}_{t_n}[\%] = 100 \times [\text{TMA}^+]_{t_n} / [\text{TMA}^+]_{t_0}$$

wobei [TMA⁺]_{t_n} die Konzentration zum Zeitpunkt (t_n) nach und [TMA⁺]_{t₀} die Konzentration von TMA⁺ vor Einsatz der gI ist.

Die Nettobewegung der Kationen zwischen den beiden genannten Kompartimenten konnte nun über die Konzentrationsdifferenz des entsprechenden Kations und TMA⁺-Ions unter Berücksichtigung der relativen EZR-Schrumpfung im Vergleich zur Vorminute berechnet werden. Dazu wurde die folgende Gleichung benutzt:

$$\text{Nettokationenbewegung}_{t_n} [\text{mmol/l}] = (\text{rel}[\text{Kat}]_{t_n} - \text{rel}[\text{TMA}]_{t_n}) \times [\text{Kat}]_{t_{n-1}}$$

wobei: $\text{rel}[\text{Kat}]_{t_n} = ([\text{Kat}]_{t_n} - [\text{Kat}]_{t_{n-1}}) / [\text{Kat}]_{t_{n-1}}$
 Relative Konzentrationsänderung des Kations während einer Minute zwischen t_{n-1} und t_n
 $\text{rel}[\text{TMA}]_{t_n} = ([\text{TMA}]_{t_n} - [\text{TMA}]_{t_{n-1}}) / [\text{TMA}]_{t_{n-1}}$
 Relative Konzentrationsänderung von TMA⁺ während einer Minute zwischen t_{n-1} und t_n

2.4. Versuchsablauf

Nachdem die Herzen montiert und die Elektroden eingesetzt waren, wurden sie zunächst mit KHL oder KHL + 0.1 mmol/l TMA (n=34) vorperfundiert. In der Kontrollgruppe wurde nach 30 Minuten die gI durch Umschaltung der Perfusion unmittelbar oberhalb der Aortenkanüle eingeleitet. In der ANP-Gruppe stellte man die anfängliche Kontrollperfusion nach 15 Minuten auf KHL + ANP bzw. KHL + TMA + ANP, was den intraindividuellen Vergleich der hämodynamischen Parameter zwischen den beiden Gruppen ermöglichte. Gleichzeitig wurden in beiden Gruppen Auswaschproben zur Katecholamin- und Elektrolytbestimmung gewonnen. Nach weiteren 15 Minuten wurde auf gI umgeschaltet. Sämtliche Herzen wurden einer 60minütigen gI ausgesetzt und anschließend reperfundiert. Das anfallende Eluat wurde über 10 Minuten in 1minütigen Intervallen zur Katecholaminbestimmung gesammelt. Um möglichst unverfälschte Werte zu erhalten, wurde hierzu das Wärmegefäß 2-3 min vor Ende der gI vom Herzen entfernt und das Eluat direkt hinter an der Herzspitze aufgefangen. Diese Manipulation störte in mehreren Experimenten die Elektrodenaufzeichnung so sehr, daß zu Gunsten der Zuverlässigkeit der Analyse auf die Wiedergabe der Ionenaktivität in den letzten 5 min der gI verzichtet wurde.

2.5. Katecholaminbestimmung mittels HPLC

Das Eluat wurde in fraktionierten Proben während jeweils einer Minute aufgefangen, sein Volumen bestimmt, jeweils 1 ml in Eppendorf-Cups abpipettiert und mit 20 µl Antioxidanz (65 mg EDTA und 60 mg reduziertes Glutathion in 1 ml H₂O) versetzt. Die Proben wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Zur Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin wurden die Proben zunächst im Eisbad aufgetaut und über 20 mg Al₂O₃ zur Adsorption gegossen und darauf mit 20 µl 3,4-Dihydroxy-benzylamin (DBHA, 1 mg/l) und 400 µl TRIS-Puffer (2 mmol/l, 2% EDTA, pH 8,7) versetzt.

Der Ansatz wurde nun für 15 Minuten (min) geschüttelt, 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Al₂O₃ wurde 3 mal mit 1 ml 0,2% TRIS-Puffer (pH 8,1) gewaschen, in dem man die Cups jeweils für 1 min schüttelte, dann zentrifugierte und den Überstand absaugte. Anschließend wurden die Katecholamine mit einer Gebrauchslösung von 200 µl HClO₄ (50 mmol/l sowie jeweils 5 ml/l 10% Natriumbisulfit und 5% EDTA) vom Al₂O₃ desorbiert. Nachdem der Überstand kurz anzentrifugiert worden war, injizierte man 25 µl in die HPLC-Säule. Zur HPLC war das *Catecholamine Analyser System* der Firma Waters GmbH mit folgenden technischen Daten installiert: Durchflußgeschwindigkeit, 0,8 ml/min; Druck, 138 kPa; Säule, Resolve 5 µm spherical C18; Kolbenpumpe, Mod. 590; Injektionsvolumen 25 µl; Elektrochemischer Detektor, Mod M 460; Schreibersystem, Waters Automatic Data Module. Als Eluent zur Trennung der Katecholamine diente eine Methanol/Wasserlösung (9,5:0,5) von 50 mmol/l Natriumazetat, 20 mmol/l Zitronensäure, 0,5 mmol/l Natriumoktansulphonat, 1 mmol/l Di-n-Butylamin, 0,1 mmol/l Na₂-EDTA (Sämtliche verwendeten Chemikalien von E. Merck, Darmstadt). Die Konzentrationen der Katecholamine wurden zunächst in pg/ml angeben und dann unter Berücksichtigung des Herzgewichtes und des ursprünglichen Probenvolumens auf ng/gHG/min umgerechnet.

2.6. Pharmakologie des atrial natriuretischen Peptids

Erste Hinweise auf die Bioaktivität von ANP stammen von Versuchen mit systemischen Gaben von Rohextrakten aus atrialem Gewebe (DE BOLDT et al., 1981). Als Ursprung wurden die von JAMIESON u. PALLADE (1964) beschriebenen spezifischen Granula in atrialen Kardiozyten angesehen. Seitdem ist es gelungen verschiedene aktive Polypeptide und das zugehörige Prä-Propeptid mit 153 Aminosäuren nebst DNA zu isolieren. Die aktiven Formen bestehen aus bis zu 35 Aminosäuren und entstehen proteolytisch am C-terminalen Ende zwischen Position Leu94 und Arg128.

Sie zeichnen sich durch sehr ähnliche Sequenz mit einer charakteristischen Disulfidbrücke zwischen Cys105 und Cys121 aus, was eine omegaförmige Sekundärkonfiguration ergibt, wobei sich Human- und Ratten-ANP lediglich durch die Aminosäure Met110 im Gegensatz zu Ile110 unterscheiden. Anhand von natriuretischem und gefäßrelaxierendem Effekt fassen CANTIN u. GENEST (1985) die relative Potenz der verschiedene Strukturen im Vergleich zum synthetischen ANP (Arg101-Tyr126) zusammen. Verkürzung am N-terminalen Ende ließ die Wirkung unverändert, N-terminale Verlängerung - wie bei der natürlichen, zirkulierenden Form (Gly96-Tyr126) - leicht vermindert, während es bei C-terminaler Verkürzung zum drastischen Wirkungsabfall kam. Die gleiche Arbeit gibt eine Wirkungsdauer für ANP (Arg101-Tyr126) von einer Stunde an, was WINQUIST (1986) für niedrig-nanomolare Konzentrationen von ANP anhand von Vasodilatation bestätigt. In der vorliegenden Arbeit wurde ANP (Arg101-Tyr126, alte Nomenklatur 8-33, Peninsula Laboratories, Belmont, California, Best.-Nr.9111, Molekulargewicht 2862.65 g/mol) verwendet. Abbildung 2.2 zeigt die Aminosäuresequenz. 500 mg Trockensubstanz wurden auf 10 ml 0,9% NaCl gelöst, 25 Proben a 0,4 ml (20 mg) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -24°C aufbewahrt. Kurz vor Beginn eines Experimentes wurden die Proben aufgetaut und 0,2 ml der Stammlösung auf 500 ml KHL gegeben, was einer ANP-Konzentration von 20 mg/l (6,99 µmol/l) im Perfusat entsprach. Ausgehend von einer durchschnittlich 15minütigen präischämischen Perfusion mit ANP, waren die Herzen einer kumulativen Menge von 222.33 µg/g HG (77.67 nmol/g HG) ausgesetzt. ANP wird in-vitro langsamer abgebaut, als in vivo; MURTHY et al. (1986) maßen nach Bolusinjektion von ANP in die isoliert perfundierte Mesenterialarterie einen Abfall auf 50% nach 15 min und 13% nach 25 min. Bezieht man diese Abbaurate auf die hier verwendete Dosis, so lagen die Gewebekonzentrationen von ANP auch nach 25 min noch weit über den von MICHEL et al. (1988) angegebenen Plasmawerten in der Ratte (Kontrollen: 76 ng/l; nach Koronarokklusion: 185 ng/l).

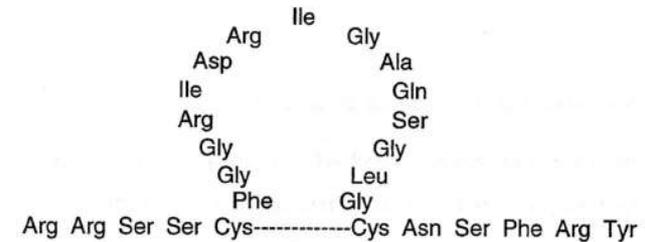


Abbildung 2.2:

Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur von ANP (Arg101-Tyr126) wie im Versuch verwendet.

2.7. Statistik

Die Daten sind in dieser Arbeit als Mittelwerte und deren Streuung als Standardfehler (\pm SEM) angegeben. Die Unterschiede der Mittelwertskurven zwischen den jeweils spezifizierten Untergruppen wurden unter Anwendung des zweiseitigen t-Tests für unabhängige Variablen nach STUDENT auf Signifikanz geprüft. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% akzeptiert, welche mit $P < 0,05$ oder einem Stern (*) gekennzeichnet ist (nicht signifikant: ns). Das entsprechende Signifikanzniveau der erhobenen Daten wurde bei der Interpretation der berechneten Daten zugrundegelegt. Die Berechnungen wurden entweder auf einem Taschenrechner (Casio) oder einem Personal Computer mit Tabellenkalkulation (Excel, Microsoft) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Temperaturkonstanz während der Ischämie

Jeweils zwei Herzen von etwa gleich schweren Ratten ($445\text{g} \pm 7.45$) wurden gewogen, vorperfundiert, während 60minütiger Ischämie in erwärmtem, befeuchtetem Stickstoff (N_2) bzw. in erwärmtem Silikonöl gehalten und darauf ohne Reperfusion erneut gewogen. Das Ischämiegewicht zwischen den beiden Verfahren unterschied sich dabei signifikant um 85 mg (ca. 7% des Ausgangsgewichts; $P < 0,05$), wobei die mit Stickstoff begasten Herzen im Mittel um $60\text{ mg} \pm 10$ abnahmen, während die in Öl temperierten Herzen um $25\text{ mg} \pm 5$ zunahmen.

Abb. 3.1 zeigt den Verlauf von $[\text{K}^+]_e$ und $[\text{H}^+]_e$ während 60minütiger gI in N_2 ($n=9$) und in Öl (K^+ : $n=8$, H^+ : $n=10$). Obwohl $[\text{K}^+]_e$ unter beiden Bedingungen einen typischen, biphasischen Anstieg zeigte, so lag der erste Gipfel nach 10 min in der N_2 -Gruppe deutlich höher (7.82 ± 0.46 vs 6.39 ± 0.14 ; $P < 0,05$). Auf dieses kurze Plateau folgte dann in der Ölgruppe ein rascher, steiler Anstieg, der ab der 21. min ($14,15 \pm 0.54$) abflachte, um sich dann linear dem Maximalwert von $32,00 \pm 2.95\text{ mmol/l}$ zu nähern. In der N_2 -Gruppe war der zweite Anstieg signifikant verzögert, um dann ab der 21. min ($10,3 \pm 0,7$; $P < 0,001$) stetig zu beschleunigen ($34,51 \pm 3,25\text{ mmol/l}$ nach 55 min; $P > 0,05$). $[\text{H}^+]_e$ stieg im N_2 - bzw. Ölmilieu (O) von durchschnittlich $41,0$ ($43,7$) über $490,5$ ($513,7$) in der 15. min und $800,7$ ($701,9$) in der 25. min auf maximal $1237,2\text{ nmol/l}$ ($822,8$) an ($P > 0,05$). Beachte hierbei vor allem die größere Streuung in der N_2 - im Gegensatz zur Meßstabilität in der Öl-Gruppe bei etwa gleicher Anzahl von Messungen. Sowohl Gewichtsabnahme als auch höhere Azidose könnten durch Verdampfung und damit Schrumpfung des EZR erklärt werden. Dieses böte ebenfalls eine Erklärung für den rascheren, nonlinearen Kaliumanstieg ab der 21. Minute und das höhere Maximum in der N_2 -Atmosphäre gegenüber dem mäßigen, linearen Anstieg in der Öl-Gruppe.

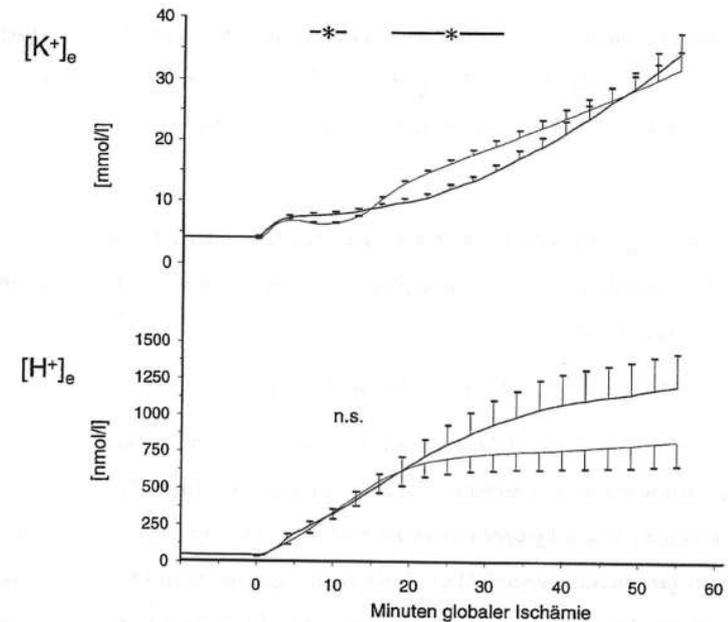


Abbildung 3.1:

Verschiedene Verläufe von $[\text{K}^+]_e$ und $[\text{H}^+]_e$ im global ischämischen Herzen: Temperierung durch Stickstoff (—) bzw. Öl (---), *: $P < 0,05$.

3.2. Häodynamik der Rattenherzen unter dem Einfluß von ANP

Nach anfänglicher Unruhe während der Montage, war die Herzaktion in der Vorperfusionsphase, von vereinzelten Extrasystolen abgesehen, im Allgemeinen sehr regelmäßig. Nur wenige Herzen ($n=4$) wiesen, wahrscheinlich ischämiebedingt, zu diesem Zeitpunkt eine hohe Arrhythmierate auf und wurden daher vom Experiment ausgeschlossen. Die im weiteren aufgeführten, häodynamischen Ergebnisse gelten für die Gruppe der Herzen, welche später mit KHL+ANP perfundiert wurden ($n=21$). Hierbei lag der LVP während der Kontrollperfusion bei 46 mmHg ($\pm 0,50$), um unter dem Einfluß von ANP auf 50 mmHg ($\pm 0,57$) anzusteigen ($P < 0,05$). Gleichzeitig nahmen dp/dt_{max} signifikant von 1629 ($\pm 45,7$) auf 1815 ($\pm 56,2$) mmHg/s und dp/dt_{min} von 1154 ($31,8$) auf 1350 ($36,0$) mmHg/s .

CPP stieg nur unwesentlich von 46 auf 47 mmHg. Die Herzfrequenz blieb praktisch unverändert (Kont.: 258/min; ANP: 253/min; ns). In beiden Gruppen sistierte die Herzaktion etwa 4 Minuten nach Beginn der globalen Ischämie.

3.3. Änderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und transmembranale Nettoionenbewegungen während globaler Ischämie unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von ANP

3.3.1. TMA-Ionen und Änderung des Extrazellulärraums

Die Kurven in Abbildung 3.2 beschreiben die anfänglich rasche und immer langsamer werdende Konzentrationszunahme des TMA-Ions [mmol/l]. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe kam es unter ANP zu einem wesentlich geringeren und verspäteten Anstieg von TMA⁺. In der Kontrollgruppe nahm TMA⁺ schon nach 10minütiger Ischämie um über 50% (155,24±7,71 vs ANP 124,34±2,87; P<0,05) zu, während Gabe von ANP einen solchen Anstieg auf 25 Minuten verzögerte (152,96±6,86). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich TMA⁺ in der Kontrollgruppe mehr als verdoppelt (211,89±14,27; P<0,05). Der maximale Anstieg von [TMA⁺]_e betrug 291,4±25,99 nach 55 Minuten und war nach Gabe von ANP um nahezu 100 mmol/l niedriger (196,7±11,6; P<0,05). ANP verminderte somit die Schrumpfung des EZR während gI (Abb.3.2). Während der EZR unter Kontrollbedingungen nach 5 min um 25,1%, nach 10 min um 35,58% und nach 20 min um fast 50% abnahm, beschränkte sich seine Schrumpfung unter Einfluß von ANP auf 12,75% nach 5 min, 19,58% nach 10 min und nur ca. 30% nach 20 min respektive. Über die folgenden 35 min globaler Ischämie schrumpfte der EZR nur noch um weitere 26% (Kont) bzw. 20% (ANP). Diese signifikant unterschiedliche, ischämiebedingte Abnahme des EZR wird im weiteren bei der Interpretation der gemessenen, extrazellulären Kationenänderung berücksichtigt.

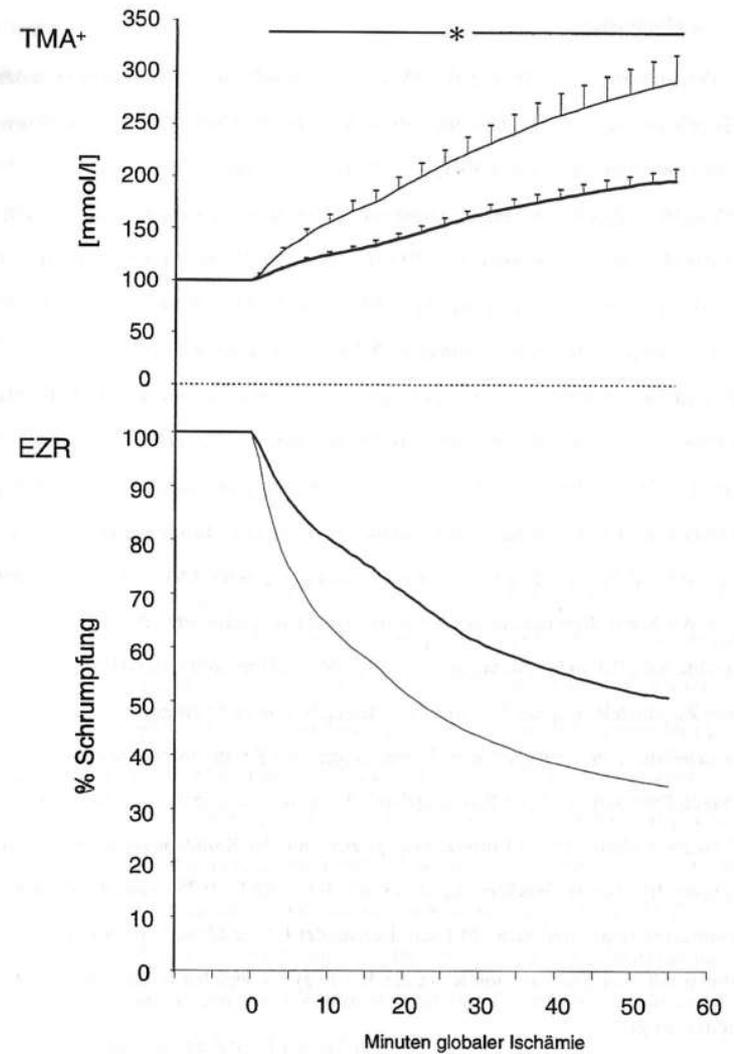


Abbildung 3.2:

Verlauf von [TMA⁺]_e im global ischämischen Myokard: Kontrollen (—) und unter Einfluß von ANP (---), *: P<0,05. Darunter die daraus resultierende, relative Schrumpfung des Extrazellulärraums.

3.3.2. Kaliumionen

Der Verlauf von $[K^+]_e$ während gI, welcher in 8 kontroll- und 11 ANP-perfundierten () Herzen gemessen wurde, beschrieb einen dreiphasigen Verlauf (Abb. 3.3). Einem raschen, initialen Anstieg von $3,84 \pm 0,12$ ($3,86 \pm 0,05$; ns) auf $6,77 \pm 0,38$ mmol/l ($6,57 \pm 0,16$; ns) folgte eine Plateauphase, welche im Kontrollmyokard 8 min anhielt ($7,46 \pm 0,18$ mmol/l; ANP: $6,811 \pm 0,2$; $P < 0,05$). Bis zur 20. min kam es dann zu einem beschleunigten Anstieg auf $13,54 \pm 0,51$ mmol/l (ANP: $9,38 \pm 0,4$; $P < 0,001$), welcher sich dann linear auf maximal $32,0 \pm 2,95$ mmol/l in der 55. min fortsetzte. Während die initiale Phase in beiden Gruppen sehr ähnlich verlief ($P > 0,05$), dauerte die Plateauphase unter Wirkung von ANP 4 min länger an ($8,02 \pm 0,38$; 17. min; Kont.: $11,18 \pm 0,57$; $P < 0,001$). Die Phase des beschleunigten Anstiegs war ebenfalls, bis etwa zur 30. min verlängert und bedeutend flacher ($12,71 \pm 0,48$ mmol/l; Kont.: $18,68 \pm 0,93$; $P < 0,001$). Der weitere Anstieg von $[K^+]_e$ unter ANP war ähnlich linear wie in der Kontrollgruppe, jedoch hoch signifikant abgeschwächt ($P < 0,001$) und erreichte lediglich einen Maximalwert von $18,96 \pm 1,07$ mmol/l ($P < 0,001$). Unter Zugrundelegung der Schrumpfung des EZR kam es zu einem charakteristischen zweigipfeligen Nettoausstrom von K^+ , der insbesondere in den späteren Phasen unter ANP-Wirkung deutlich weniger ausgeprägt ist (Abb. 3.4). Schon zwei Minuten nach Einsetzen der gI erreichte der Kaliumausstrom in beiden Gruppen die höchste Geschwindigkeit (Kont.: 0,94; ANP.: 0,75 mmol/l/min), um daraufhin stark abzunehmen. Mit dem Beginn der Plateauphase kam es zu einem siebenminütigen Einstrom von K^+ in den Kardiozyten, welcher in der 7. min nach Beginn der gI mit $-0,5$ mmol/l/min gipfelte, jedoch in der ANP-Gruppe weniger als halb so groß war ($-0,19$ mmol/l/min) und zwei Minuten später eintrat.

Die zweite Phase des Kaliumausstroms der Kontrollgruppe begann in der 12. min und erreichte mit $0,91$ mmol/l/min in der 15. min die gleiche Höhe wie in der ersten Phase. Dieser Gipfel war unter ANP deutlich weniger prominent und verspätet ($0,36$ mmol/l/min; 19. min). Ab der 25. min verlief die Nettozunahme von K^+ in beiden Gruppe in ähnlichem, beinahe konstantem Tempo. Dies ist Ausdruck einer engen Korrelation zwischen EZR-Schrumpfung und der Zunahme von $[K^+]_e$ in dieser Phase. Auch wenn sowohl $[K^+]_e$ als auch $[TMA^+]_e$ in der ANP-Gruppe während der Spätphase der gI im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedriger gemessen wurde, so war das Verhältnis der beiden Ionenkonzentrationen zueinander innerhalb der betrachteten Versuchsgruppen angenähert (Abb. 3.2 und 3.3).

3.3.3. Natriumionen

Der Verlauf von $[Na^+]_e$ im ischämischen Myokard von 16 Kontroll- und 11 ANP-behandelten Herzen ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Ausgangskonzentrationen betragen $138,93 \pm 0,59$ (Kont.) und $140,07 \pm 0,63$ (ANP). In beiden Gruppen kam es zum gleichen, stetigen, fast linearen Anstieg bis zur 12. min nach Beginn der gI (Kont.: $156,19 \pm 1,78$, ANP: $156,15 \pm 1,40$; $P > 0,05$), welcher dann immer langsamer wurde und in der 20. min gipfelte (Kont.: $159,55 \pm 2,31$, ANP: $160,97 \pm 1,89$). Über die folgenden 35 min kam es zu einer linearen Abnahme von $[Na^+]_e$, welche im mit ANP behandelten Myokard nur unsignifikant langsamer verlief ($153,30 \pm 1,80$; 55 min) als in den Herzen der Kontrollgruppe ($148,1 \pm 2,05$, $P > 0,05$). Der Zeitpunkt der maximalen extrazellulären Natriumkonzentration nach 20 min koinzidierte mit dem Eintritt von $[K^+]_e$ in die letzte Linearphase. Angesichts der Tatsache, daß Na^+ auf Grund seiner Konzentrationsdifferenz zwischen EZR und IZR normalerweise einen nach intrazellulär gerichteten Gradienten hat, kommt der obenbeschriebene, extrazellulär gemessene Anstieg eher unerwartet.

Betrachtet man jedoch die Schrumpfung des EZR während 60minütiger gI, so berechnet sich ein ständiger Einstrom von Na^+ [mmol/l/min] in die Zelle (Abb. 3.4). Dem Kaliumausstrom genau entgegengerichtet, kam es zu einem maximalen, wenn auch nicht äquimolaren Natriumeinstrom in der 2. min (-10,84). Dieser war unter Wirkung von ANP stark abgeschwächt und leicht verzögert (-3,78; 3. min). Ab der 5. min nach Beginn der gI (Kont.: -4,20; ANP: -2,09) nahm die Geschwindigkeit des Einstroms in beiden Gruppen langsam ab (Kont.: -1,21; ANP: -0,13; 10. min). Hierauf kam es noch einmal zu einem erhöhten Natriumeinstrom, welcher für die Kontrollen in der 19. min (-4,13) und in der ANP-Gruppe erst in der 28. min (3,12) einen Höhepunkt erreichte. Auffallend ist, daß die beiden Maxima 4 bzw. 9 min nach dem entsprechenden 2. Gipfel des Kaliumausstroms eintreten. Ab der 30. min kommt es zu einem annähernd deckungsgleichen, abnehmenden Verlauf des Natriumeinstroms in beiden Gruppen.

3.3.4. Kalziumionen

Zu Beginn der 60minütiger Ischämie kam es sowohl in der Kontrollgruppe (n=24) als auch in der ANP-Gruppe (n=10) zu ähnlich wie bei $[\text{Na}^+]_e$ zu einem initial linearen Anstieg des extrazellulären Kalziums [mmol/l]. Die Ausgangskonzentration von 1,85 mmol/l stieg dabei bis zur 10. Minute auf $2,48 \pm 0,044$ an, um danach abzufachen und in der 19. min $2,67 \pm 0,059$ den Höchststand zu erreichen (ANP nach 19 min: $2,38 \pm 0,094$; $P < 0,05$). Wie schon zuvor bei $[\text{K}^+]_e$ und $[\text{Na}^+]_e$ war der Kalziumanstieg in der ANP-Gruppe signifikant schwächer und deutlich verlangsamt. Hierbei lag $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in der 10. min erst bei $2,16 \pm 0,049$ ($P < 0,001$) und gipfelte erst in der 21. min mit $2,38 \pm 0,089$ (Kont.: $2,66 \pm 0,059$; $P < 0,05$). Im weiteren nahm $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in der ANP-Gruppe langsam ab um sich ab der 35. min auf durchschnittlich 2,30 mmol/l einzustellen.

Hingegen war in der Kontrollgruppe ein stetiger, langsamer Abfall bis auf $2,44 \pm 0,076$ in der 55. min zu beobachten (ANP: $2,30 \pm 0,16$; ns). Abbildung 3.3 zeigt den erkennbar unterschiedlichen Verlauf von $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in beiden Gruppen, der jedoch nur bis zur 30. min signifikant war.

Die transmembranalen Flußgeschwindigkeiten von Kalzium verliefen in beiden Gruppen annähernd synchron zu denen des Natriums (Abb. 3.4). Der insgesamt zweiphasige Nettoeinstrom [mmol/l/min] war jedoch deutlich ausgeprägter. Die erste Phase gipfelte in der Kontrollgruppe mit einem Einstrom von -0,11 mmol/l/min in der 2. min, bremste im folgenden stark ab und endete in der 6. min mit einem geringgradigen Ausstrom von Ca^{2+} (+0,010). Dieser war fast zeitgleich mit dem Höhepunkt des Kaliumeinstroms (7. min). Zur Zeit des maximalen Kaliumausstroms folgte der Beginn der zweiten Phase des Kalziumeinstroms (-0,024; 15. min) und erreichte in der 20. min ähnlich wie bei Natrium ein Maximum (-0,068). Im Vergleich zwischen den untersuchten Gruppen war der Nettoeinstrom von Ca^{2+} in der ANP-Gruppe wie schon zuvor bei K^+ und Na^+ stark verlangsamt und zeitlich verzögert. Der Gipfel der ersten Einstromphase lag in der 3. min mit -0,041 deutlich niedriger. Mit ähnlicher Verzögerung wie zuvor schon bei K^+ und Na^+ kam es hierauf zu einem kurzfristigen Ausstrom zwischen der 8. und 12. min (max. +0,01; 10. min). Die zweite Einstromphase spielte sich zwischen der 13. und 35. min ab und war erst nach 28 min mit -0,051 maximal. Dieser Wert lag noch deutlich über dem Betrag des ersten maximalen Einstroms (-0,041). Wie im Falle des Natriums verlangsamte sich die Einstromgeschwindigkeit von Ca^{2+} ab der 20. min (Kont.) bzw. 35. min (ANP) stetig, lag jedoch in der Kontroll- höher als in der ANP-Gruppe.

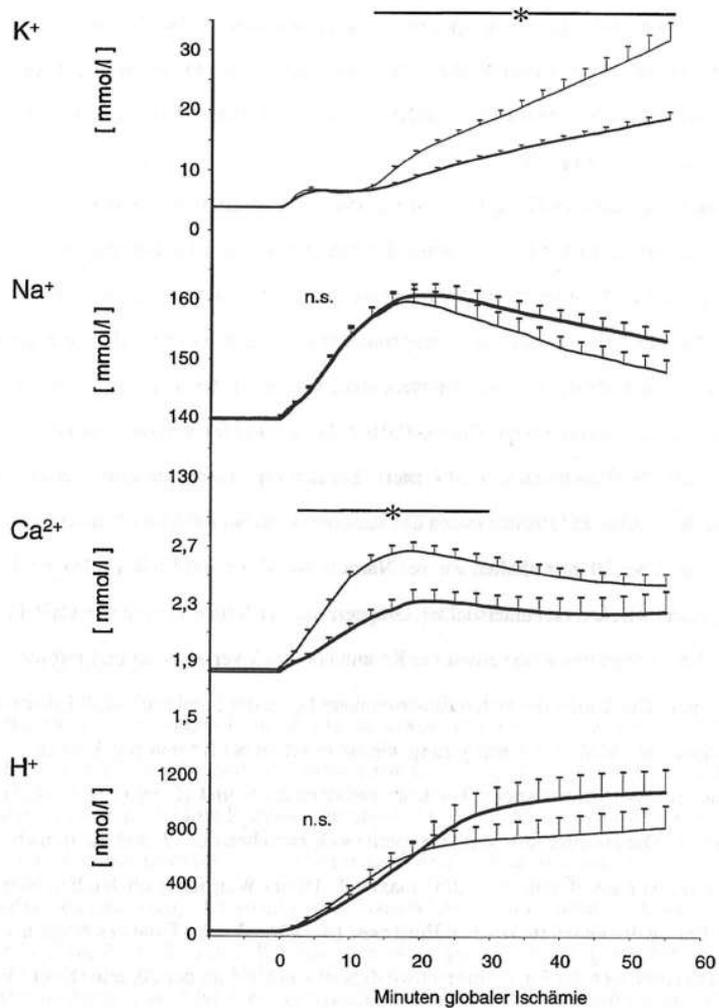


Abbildung 3.3:
Verlauf der extrazellulären Konzentrationen von K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} - und H^+ -Ionen im global ischämischen Myokard: Kontrollen (—) und nach ANP (---), *: $P < 0,05$.

3.3.5 H^+ -Ionen

Die extrazelluläre Konzentrationsänderung der Protonen ($[H^+]_e$) zeigt Abbildung 3.3 wiedergegeben. Nach einem initial raschen Anstieg in beiden Gruppen, flachte die Zunahme in der ANP-Gruppe ($n=9$) nach etwa 30 min ab ($947,35 \pm 163,64$; Kont.: $731,85 \pm 110,1$; ns) und war nach 55 min mit $1087,37 \pm 163,64$ maximal. In der Kontrollgruppe ($n=10$) kam es zur Abflachung schon in der 20. min ($642,73 \pm 88,26$; ANP: $646,39 \pm 120,04$; ns), gefolgt von einem allmählichen Anstieg auf $822,80 \pm 162,7$; ns). Auch wenn sich der nach intrazellulär gerichtete "water shift" sicherlich auf die extrazelluläre Azidose während gI auswirkt, so bleibt sein Ausmaß wegen der ebenfalls stattfindenden, fortwährenden, intrazellulären Produktion von H^+ im Rahmen der anaeroben Glykolyse ungewiß. Auf eine entsprechende Berechnung wurde daher verzichtet. In Abbildung 3.4 ist jedoch der Verlauf des pH_e synchron zu den transmembranalen Bewegungen der übrigen Kationen dargestellt. Den Verläufen von $[H^+]_e$ entsprechend fällt der pH in der Kontrollgruppe von 7,38 (ANP: 7,40) über 20 min auf 6,19 (ANP: 6,19) ab, nach 55 min auf 6,08; die maximale Azidose wird unter ANP in der 30. min erreicht ($pH_{5,95}$) und sinkt über die weitere Ischämiezeit nicht mehr ab. Die erkennbaren Unterschiede im Verlauf von pH_e waren im statistischen Vergleich zwischen den beiden Meßgruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant.

3.3.6. Wirkung von ANP

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die transmembranalen Ionenflüsse unter ANP für alle gemessenen Kationen zwar ähnlich verliefen wie die der Kontrollgruppen. Die Änderungen hingegen, waren z.T. signifikant geringer und zeitlich verzögert.

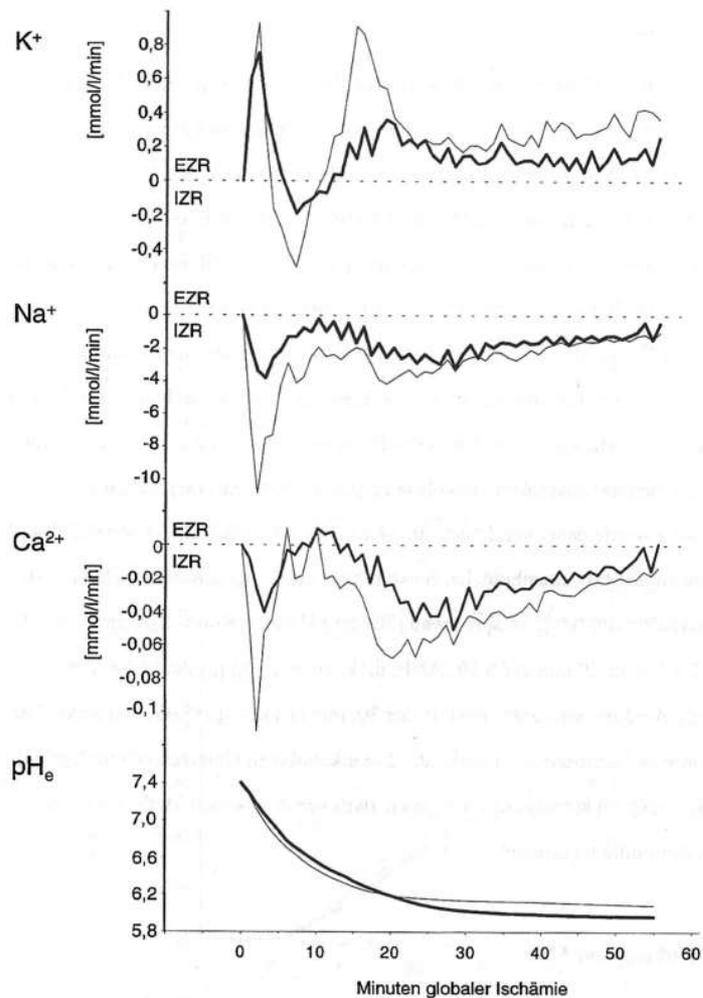


Abbildung 3.4:

Vergleich der transmembranalen Nettoflüsse von K^+ , Na^+ und Ca^{2+} sowie der extrazellulären Azidose im global ischämischen Myokard: Kontrollgruppe (—) und nach ANP (---).

3.4. Auswaschung der akkumulierten Katecholamine nach 60minütiger globaler

Ischämie unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von ANP

Im Eluat der Vorperfusion waren weder während der Kontrollphase, noch nach Gabe von ANP, Katecholamine meßbar (Abb. 3.5). Dagegen fanden sich im Eluat während der Reperfusion hohe Konzentrationen von Noradrenalin. Dopamin konnte nur sporadisch in drei Kontrollproben über die ersten 1-3 min nachgewiesen werden. Adrenalin war nicht nachweisbar. Vorherige Gabe von ANP (n=11) verminderte das Gesamtnoradrenalin auf fast die Hälfte (127,31 ng/gHG) der Werte bei Kontrolle (n=16; 251.00 ng/gHG). Die NA-Konzentrationen, welche insgesamt in der ersten (Kont: $104,4 \pm 8,06$; ANP: $60,89 \pm 6,33$; $P < 0,001$), zweiten (Kont.: $60,34 \pm 7,05$; ANP: $20,71 \pm 3,80$; $P < 0,001$) und dritten Minute (Kont.: $33,83 \pm 3,34$; $P < 0,001$) nach Beginn der Reperfusion innerhalb beider Gruppen am höchsten waren, lagen in der ANP-Gruppe hoch signifikant niedriger. Dieser starke Konzentrationsunterschied setzte sich, wenn auch insgesamt weniger ausgeprägt, bis zur 10. Minute (Kont.: $2,98 \pm 0,085$; ANP.: $1,53 \pm 0,46$; $P < 0,001$) der frühen Reperusionsphase fort.

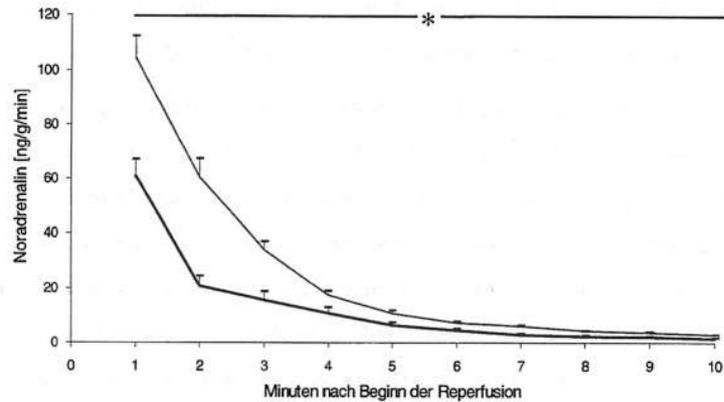


Abbildung: 3.5:

Vergleich der NoradrenalinKonzentrationen im fraktionierten Eluat während 10minütiger Reperfusion nach 60minütiger globaler Ischämie [ng/g_{HG}/min]: Kontrollgruppe (—) und ANP-Gruppe (---), *: P<0,05.

4. DISKUSSION

4.1. Versuchsaufbau

Die in-vitro-Perfusion isolierter Säugetierherzen ist seit LANGENDORFF (1895) in zahlreichen Experimenten eingesetzt worden. Im vorliegenden Experiment reduzierte die Ventilation des Versuchstieres während der Präparation, sowie die rasche Herzentnahme die mögliche ischämische Myokardschädigung auf ein Minimum. Die Kanülierung des Herzens unter gleichzeitiger geringer Perfusion im kühlen Lösungsbad verhinderte Luftembolien. Nur wenige Herzen, welche kurze Zeit nach Vollperfusion keinen Sinusrhythmus hatten, mußten vom weiteren Experiment ausgeschlossen werden. Die Hämodynamik der "working heart"-Präparation nach BARDENHEUER u. SCHRADER (1983) ähnelt weitgehend den entsprechenden Verhältnissen in vivo. Der Vorteil dieses in-vitro-Modells liegt jedoch u.a. in der Erfassung von, auf das Herz beschränkten Aspekten der sonst den Organismus betreffenden Phänomene, wie die komplexen, hormonalen Wirkungen des ANP auf Diurese (DE BOLD et al., 1981), Blutkreislauf (PEGRAM et al., 1986) und Ionenverschiebungen (CANTIN u. GENEST, 1985). Der Zustand der globalen Ischämie erlaubt die Messung von Ionenverschiebung am Herzen, wobei der anaerobe Stoffwechsel zu einer Veränderung des Ionengleichgewichts im Vergleich zur Kontrollperfusion, in einem geschlossenen System (COBBE u. POOLE-WILSON, 1980, KNOPF et al., 1990), führt. Die Unterbrechung der Perfusion führt jedoch zu zwei Problemen, nämlich zum Ausbleiben eines analysierbaren Eluats, und zweitens zum Absinken der Gewebetemperatur.

Erst die Implantation von ionenselektiven Elektroden ermöglichte daher eine kontinuierliche Beobachtung des Verhaltens der Elektrolyte (HILL et al., 1978, WEISS u. SHINE, 1982a), zumal das geschlossene Milieu um die eingepflanzten Minielektroden im vorliegenden Versuchsaufbau die tatsächlichen Gewebekonzentrationen genauer reflektiert als fraktionierte Entnahmen von Eluat (HIRCHE et al., 1980, KNOPF et al., 1988). Da die Aktivität metabolischer Prozesse stark von der Gewebetemperatur abhängt, ist Temperaturkonstanz insbesondere zum Zeitpunkt der Umschaltung von Perfusion auf Ischämie von Wichtigkeit. COBBE u. POOLE-WILSON (1980) vermuteten, daß schon minimale Abkühlung zu Beginn der Ischämie fälschlich zu Alkalose statt Azidose führen kann, welches entweder durch eine temperierte Stickstoffatmosphäre (N_2) oder aber ein inertes Ölbad verhindert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Suspension der Herzen im erwärmten Ölbad zu deutlich akurateren Resultaten, besonders in der Spätphase der globalen Ischämie, führt (Abb. 3.1). Die externe Stickstoffbegasung führt möglicherweise zu Unterkühlung der tieferen Gewebsschichten und zu Austrocknung im peripheren Gewebe, was den Gewichtsverlust der so behandelten Herzen während gI im Gegensatz zur Gewichtszunahme im Ölbad, welcher durch ischämischen Zellhydrops zu erwarten wäre, erklären würde. Konstante Gewebetemperatur und zuverlässiger Sauerstoffausschluß durch Suspension des Herzen im Ölbad könnte ebenfalls der Grund für die raschen initialen Anstiege der Ionenkonzentrationen im vorliegenden Experiment (Abb. 3.2) sein, verglichen mit beispielsweise der N_2 -umfluteten isolierten Kaninchenpräparation von WEISS u. SHINE (1982b), der für $[K^+]_e$ erst nach 15 min die Plateauphase erreichte. Betrachtet man die Verlaufskurven von $[K^+]_e$ in dieser Arbeit (Abb. 3.3), so kam es während der ersten 20 min gI zu einem zweiphasigen Anstieg, der mit einem zweigipfligen Ausstrom von K^+ verbunden war (Abb. 3.4).

Ein ähnlicher Verlauf in die entgegengesetzte Richtung wurde für die Natrium- und Kalziumflüsse beobachtet. Diese ischämieinduzierten ionalen Veränderungen sind während dieser ersten Periode reversibel (HILL u. GETTES, 1980, WEISS u. SHINE, 1982b). Während der verbleibenden Ischämie nach etwa 20 min verhielten sich die Kationenveränderungen gleichförmig und stetig. Während dieser zweiten Periode kommt es außerdem, möglicherweise durch einen umgekehrten Carriermechanismus (SCHÖMIG et al., 1984) oder aber durch zunehmende Membrandurchlässigkeit im Rahmen von irreversibler Zellschädigung (KNOPF et al., 1988), zu einer deutlichen, ischämiebedingte Akkumulation von Noradrenalin aus den Varikositäten der sympathischen Nervenfasern im EZR, obwohl Noradrenalin auch schon in der frühen ischämischen Phase freigesetzt wird (HIRCHE et al., 1985). Das, in diesem Experiment gewählte, Ischämieintervall ermöglichte daher die Beobachtung der zeitlich versetzten elektrophysiologischen und neuronalen Phänomene.

4.2. Physiologie von ANP

Bei den atrialen natriuretischen Peptiden handelt es sich um eine Reihe strukturell verwandter Oligopeptide (Abb. 2.2), die in speziellen Vesikeln von Kardiomyozyten hauptsächlich des rechten Vorhofs synthetisiert werden. Als Stimuli für die Freisetzung von ANP sind neben Volumenbelastung (LANG et al., 1985) und direkter atrialer Dehnung (DIETZ, 1984, LEDSONE et al., 1985), auch Hypoxie (BAERTSCHI et al., 1986) und Ischämie (MENDEZ et al., 1987), sowie Katecholamineinfluß (CURRIE u. NEWMAN, 1986, KUCHEL et al. 1987b, RUSKOAHO et al., 1987) beschrieben worden. Ihre diuretische und natriuretische Wirkung wurde erstmals von DE BOLDT et al. (1981) beschrieben und ist seitdem in zahlreichen Arbeiten bestätigt worden (SEYMOUR et al., 1985, SONNENBERG, 1986, WILSON et al., 1987). An der Rattenniere beobachteten KEELER u. AZZAROLO (1983) ebenfalls eine erhöhte Kalium- und Kalziumausscheidung.

Darüber hinaus ist ANP ein potenter Vasodilatator (WINQUIST et al., 1984), was bei systemischer Gabe zu Blutdrucksenkung und vermindertem peripheren Widerstand führt (ACKERMANN et al., 1983). Zahlreiche Experimente an isolierten Gefäßmuskeln (CHIU et al., 1986, MAACK u. KLEINERT, 1986) oder an Einzelzellen (HASSID, 1986, CORNWELL u. LINCOLN, 1989) belegen diesen Effekt. Arbeiten über den Herzmuskel als Erfolgsorgan für ANP liegen nur vereinzelt vor. SWEET et al. (1985) fanden am ischämischen Hundeherzen nach Infusion von ANP einen erniedrigten koronaren Widerstand. BIANCHI et al. 1985 fanden jedoch, neben Niere, Nebenniere, Lebergefäßen und glattem Bronchialmuskel, auch am Endokard, nicht aber am Kardiomyozyten, eine hohe ANP-Rezeptordichte. Der zelluläre Effekt von ANP wird überwiegend durch Aktivierung der Guanylatcyclase mit cyclischem GMP als *second messenger* (MURAD et al., 1987, RUGG et al., 1989), aber auch durch Hemmung der Adenylatcyclase und damit verbundener Verminderung des cAMP (ANAND-SRIVASTAVA et al., 1984), vermittelt. Am Rattenherzen konnten ANAND-SRIVASTAVA u. CANTIN (1986), nach Inkubation isolierter Kardiocyten mit 10 nmol/l ANP (Arg101-Tyr126), eine Aktivitätsminderung der Adenylatcyclase um 35% nachweisen, während RUGG et al. (1989) eine zweifache Aktivitätssteigerung der Guanylatcyclase nach Gabe von 10 µmol/l ANP (Leu94-Cys121) ermittelten. Der erheblich höhere Bedarf an ANP im letztgenannten Experiment erklärt sich möglicherweise aus der sehr viel niedrigeren pharmakologischen Potenz der C-terminal verkürzten Peptide (z.B. Leu94-Cys121) im Gegensatz zum ANP (Arg101-Tyr126) (CANTIN u. GENEST, 1985). Die im vorliegenden Experiment verwendete ANP-Dosierung (Arg101-Tyr126, 6,99 µmol/l) war folglich im pharmakologisch wirksamen Bereich. (s.a. 2.6. Pharmakologie)

4.3. Hämodynamik vor und nach Gabe von ANP

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für LVP, dp/dtmax, dp/dtmin, CPP und Herzfrequenz lagen etwa im Bereich dessen, was BARDENHEUER u. SCHRADER (1983) unter ähnlichen Bedingungen am isolierten Meerschweinchenherzen beobachteten. Die Gabe von ANP führt charakteristischerweise zu Blutdrucksenkung (DE BOLDT et al., 1981, ACKERMANN et al., 1983), vermutlich durch Vasodilatation (PEGRAM et al., 1986), was jedoch umstritten bleibt. Während nämlich ACKERMANN et al. (1983) am intakten Rattenmodell eine deutliche Senkung des totalen peripheren Widerstandes (TPW), mit reflektorischem Anstieg von Schlagvolumen (SV) und Herzzeitvolumen (HZV) sahen, blieb der TPW sowohl bei LAPPE et al. (1985) als auch bei SEYMOUR et al. (1987), bei gleichzeitig signifikant niedrigerem HZV, unverändert. Dagegen beobachteten SWEET et al. (1985) bei Hunden mit Myokardinfarkt einen Anstieg des HZV ohne Kontraktilitätssteigerung bei unverändertem TPW; ANP hatte jedoch eine deutlich koronardilatierende Wirkung. Die vorliegende Arbeit fand am isolierten Herzen, bei konstanter Vor- und Nachlast, eine positiv inotrope Wirkung und in Übereinstimmung mit CHOWDREY et al. (1989) einen unveränderten koronaren Druck. OTERO et al. (1988) ermittelten dagegen am isolierten Meerschweinchenherzen nach Bolusgabe von 64 nmol/g ANP (Leu94-Cys121) eine 30prozentige Zunahme der Koronardurchblutung. Im Gegensatz zum vorliegenden Versuch fand keiner dieser beiden Autoren eine ANP-Wirkung auf die linksventrikuläre Hämodynamik, was bei CHOWDREY et al. (1989) an der niedrigen Dosierung (2 nmol/l) und bei OTERO et al. (1988) an der niedrigen Potenz des verwandten Peptids liegen könnte.

4.4. Verschiebungen von Wasser und Kationen

während globaler Ischämie

4.4.1. Schrumpfung des Extrazellulärums (EZR)

Die Methodik der kontinuierlichen Bestimmung des extrazellulären Volumens im global ischämischen Myokard mit Hilfe des quarternären TMA⁺-Ions ist von KNOPF et al. (1990) ausführlich beschrieben worden. Hierbei wurde eine myokardiale Membranpermeabilität für TMA⁺ von weniger als 1 % gefunden; die Außerachtlassung eines möglichen Einstroms von TMA⁺ durch das ischämische Sarkolemm könnte dabei allenfalls zu einer Unterschätzung der Schrumpfung des EZR führen. Obwohl ein möglicher kardialer Effekt von quarternären Ammoniumionen beschrieben ist (STANFIELD, 1983) blieb der Verlauf von [K⁺]_e während 60 min gI von der Vorperfusion mit 100 µmol/l TMA⁺ unbeeinflusst. Darüberhinaus sorgte die hohe Selektivität der TMA⁺-Minielektrode (99%) im vorliegenden Versuch für eine möglichst realistische Ermittlung des tatsächlichen Volumens des EZR, welches schon in den ersten 20 min gI um fast 50 %, nach 55 min um 65 % abnahm (Abb. 3.2). Da das global ischämische Myokard ein geschlossenes System bildet, muß es sich dabei um einen "water shift" nach intrazellulär handeln. Ursache dieser Wasserverschiebung könnte die ischämiebedingte intrazelluläre Akkumulation von Laktat und nicht diffundiblen Produkten der anaeroben Hydrolyse von energiereichen Phosphaten sein (FLEAR et al., 1976), welche einen Anstieg der Gewebeosmolalität zur Folge hat (TRANUM-JENSEN et al., 1981), den JENNINGS et al. (1986) auf 69 mOsm nach 15 min und 130 mOsm nach 60 min myokardialer Ischämie berechneten. Da schon alleine diese deutliche Abnahme des extrazellulären Wassers eine Konzentrationszunahme aller Elektrolyte im EZR zur Folge hat,

war es erforderlich, die entsprechende EZR-Schrumpfung bei der Ermittlung der tatsächlichen, transmembranalen Kationenverschiebungen zu berücksichtigen (Abb. 3.4).

4.4.2. Kalium

Ischämie führt im Myokard zu einem raschen Anstieg von [K⁺]_e, der im vorliegenden Versuch in der 2. min maximal war (Abb. 3.4). Es folgt eine "Plateauphase" nach 2-5 min (HILL u. GETTES, 1980, HIRCHE et al., 1980, WEISS u. SHINE, 1982a, KNOPF et al., 1988), die bis zur 8. min anhielt (Abb. 3.3). Eine Verminderung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität könnte die Ursache dieses Nettoausstroms von K⁺ sein (BERSOHN et al., 1982). Dieses ist jedoch wahrscheinlich nicht der wichtigste Mechanismus, da die ATPase in den ersten Minuten nur zum Teil inhibiert ist (WEISS u. SHINE, 1982b, KLÉBER, 1984) und sich die ATP-Abnahme im ischämischen Kardiozyten nur langsam vollzieht (WEISS et al., 1992). Ähnliches gilt für die Möglichkeit eines passiven Kaliumausstroms durch eine Verletzung der Zellmembran, da die beobachteten Veränderungen von [K⁺]_e während der ersten 15-20 min reversibel sind (HILL u. GETTES, 1980). Studien von NOMA (1983) deuten auf eine erhöhte ischämiebedingte Durchlässigkeit der ATP-abhängigen K⁺-Kanäle als Ursache für den frühen K⁺-Ausstrom. Die für die halbmaximale Aktivierung dieser Kanäle notwendige ATP-Verminderung (NOMA, 1983) tritt jedoch erst in den späteren Stadien der Ischämie auf (FIOLET et al., 1984). In einer neueren Studie am Kaninchenherzen berechneten WEISS et al. (1992) unter Berücksichtigung der hohen K⁺-Kanaldichte und dem raschen Anstieg intrazellulären ADPs, welches die Empfindlichkeit dieses Kanals für ATP herabsetzt, daß eine Aktivierung von nur 0,5% der Kanäle ausreicht, um den gemessenen K⁺-Ausstrom zu erklären. Ursache für das Plateau von [K⁺]_e zwischen der 2. und 15. min, und den in dieser Arbeit beobachteten, damit verbundenen K⁺-Einstrom zwischen der 3. und 10. min, könnte eine erhöhte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase sein, da ihre Hemmung durch

Acetylstrophantidin die Plateauphase aufhob (WEISS u. SHINE, 1982b). Als Stimuli kommen sowohl durch Ischämie freigesetztes Noradrenalin (HIRCHE et al., 1980, HIRCHE et al., 1985, KNOPF et al., 1988, HIRCHE et al., 1990), als auch ein starker Anstieg von $[Na^+]_i$ (GLITSCH et al., 1981), wie in diesen Versuchen in den ersten 4 Minuten der Ischämie beobachtet, in Frage. Im Anschluß an die Plateauphase kam es zu einem zweiten Anstieg von $[K^+]_e$, der auf einem erhöhten K^+ -Nettoausstrom beruht (Abb. 3.3, 3.4). Der Beginn dieser Phase könnte auf einer zunehmenden Inhibition der Na^+/K^+ -Pumpe auf Grund von ATP-Mangel beruhen (FIOLET et al., 1984). Der weitere stetige Anstieg von $[K^+]_e$ dürfte auf irreversibler Zellschädigung (WEISS u. SHINE, 1982b, KLÉBER, 1984) und Membranzerstörung ab der 30. min (JENNINGS et al., 1986) beruhen. Im vorliegenden Experiment kann der rasche $[K^+]_e$ -Anstieg auf 6.77 mmol/l in der Initialphase als ursächlich für das gleichzeitige Versagen der Herzaktion 4 min nach Beginn der Ischämie angesehen werden (WEISS u. SHINE, 1982a, KNOPF et al., 1988).

4.4.3. Natrium

Der Einfluß der Ischämie auf die myokardiale Natriumverteilung ist z.T. unklar. In dieser Arbeit kam es während der ersten 20 min der gI zu einem $[Na^+]_e$ -Anstieg von 140 auf 160 mmol/l. Berücksichtigt man jedoch die Schrumpfung des EZR im gleichen Zeitraum, so ergab sich ein ständiger Nettoeinstrom von Na^+ , der in zwei maximalen Phasen verlief. Der berechnete schnelle Einstrom von bis zu 10 mmol/l/min Na^+ während der ersten 2-3 min ist bisher nicht beschrieben worden, könnte aber mit der ischämiebedingten, initialen Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase (WEISS u. SHINE, 1982b) zusammenhängen.

Mit Hilfe von Kernspinresonanz fanden BALSCHI et al. (1986) einen frühen Na^+ -Einstrom in den ischämischen Kardiozyten und PIKE et al. (1990) einen $[Na^+]_i$ -Anstieg auf das 5fache während 20 min am isolierten ischämischen Frettchenherzen, während KLÉBER (1983) am isolierten, Meerschweinchenherzen keine Änderung von $[Na^+]_i$ feststellte. Da ein erhöhtes $[Na^+]_i$ die Na^+/K^+ -ATPase stimuliert, könnte dieser erste große Natriumeinstrom die K^+ -Plateauphase einleiten (Abb. 3.4) (KNOPF et al., 1990). Das zweite Maximum des Natriumeinstroms ab etwa der 19. min könnte durch die nachlassenden Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase auf Grund von ATP-Mangel (KNOPF et al., 1990) entstehen. Die zu diesem Zeitpunkt entstandene Azidose (pH_e 6,3) könnte dabei laut LAZDUNSKI et al. (1985) durch Stimulation des Na^+/H^+ -Antiporters einen Anstieg von $[Na^+]_i$ begünstigen. Dieser Befund wird auch durch den Versuch von TANY et al. (1989) unterstützt, die im global ischämischen Rattenherzen einen Anstieg von $[Na^+]_i$ um 50% nach 15 min und 400% nach 30 min fanden und eine Beteiligung des Na^+/H^+ -Antiporters an diesem Na^+ -Zuwachs annahmen, da dieser nach Gabe des Inhibitors Amilorid um 17% niedriger war. Der stetig abnehmende Na^+ -Einstrom ab etwa der 30. min muß wohl wie schon beim Kalium und auch Kalzium als Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten in Folge eines Versagens der energieabhängigen Membransysteme und einer Azidose (pH_e 6,0), bei der der Na^+/H^+ -Antiporter inaktiv ist, angesehen werden.

4.4.4. Kalzium

Der während der ersten 20 min der gI gemessene Anstieg und danach folgende leichte Abfall der Kalziumkonzentration im EZR (Abb. 3.3), könnte durch die Verlagerung von freiem Wasser in den IZR bedingt sein. Berücksichtigt man diesen "water shift", so berechnete sich für Ca^{2+} ein Nettoeinstrom, dessen zwei Phasen mit denen für $[Na^+]_i$ zeitlich übereinstimmten, wobei jedoch der spätere (max. 0,067 mmol/l/min, 20. min; kumulativ: 1,68 mmol während 45 min) den früheren

mengenmäßig übertraf (max. 0,111 mmol/l/min, 2. min: kumulativ: 0,296 mmol/l während 10 min, Abb. 3.4).

Diese Befunde stehen im Einklang mit Befunden von LEE et al. (1988), die am ischämischen Kaninchenherzen einen Anstieg des freien, zytosolischen Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) während der ersten 3 min beobachteten, und STEENBERGEN et al. (1987), die mit Kernspinresonanz am ischämischen Rattenherzen einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ von 0,12 auf 0,65 mmol/l über 15 min feststellten. Dieser Anstieg kommt dem in dieser Arbeit berechneten Ca^{2+} -Einstrom von 0,41 mmol/l über die gleiche Periode sehr nahe. Das erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ könnte durch Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung die ischämische Zellnekrose verursachen (LEHNINGER, 1970). HAIGNEY et al. (1992) konnten den hypoxiebedingten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im Kardiozyten dadurch verhindern, daß sie den Na^+ -Einstrom blockierten. Sie folgerten daraus, daß das erhöhte $[Na^+]_i$, durch den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher im Rückwärtsmodus, für einen Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol aus dem EZR verantwortlich ist. Dieser Mechanismus könnte den zum Na^+ parallelen Verlauf des Ca^{2+} im vorliegenden Experiment erklären. Ein erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ stimuliert darüber hinaus die Ca^{2+} -ATPase (LEHNINGER, 1970), was über einen gesteigerten ATP-Verbrauch zu einem Nachlassen der maximalen Na^+/K^+ -ATPaseaktivität führen könnte. Der dadurch hervorgerufene Na^+ -Einstrom könnte die zweite Phase des KalziumEinstroms einleiten. Weiterhin kann ein erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ die Membranpermeabilität für Kalium erhöhen (ISENBERG, 1977). Kalziumkanäle scheinen nur eine untergeordnete Rolle in diesem Zusammenhang zu spielen. Beispielsweise konnte die Gabe von L-Type-Blockern am anoxischen, isolierten Kardiozyten einen Ca^{2+} -Einstrom nicht verhindern (HAIGNEY et al., 1992) und hatte keinen Effekt auf die Änderung von "whole cell currents" (FRIEDRICH et al., 1990).

Diese Autoren vermuteten, daß eine anoxische Stimulierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle den beobachteten Anstieg der "outward currents" verursachte.

4.4.5. Extrazellulärer pH [pH_e]

In Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Arbeiten (HIRCHE et al., 1980, COBBE u. POOLE-WILSON, 1980, FLEET et al., 1985, KNOPF et al., 1988) wurde während der gI zunächst ein steiler Abfall des pH_e beobachtet, der nach 20 min gI einen Wert von 6,1 erreichte. Dieser reflektiert die zunehmende intrazelluläre Azidose (MALLOY et al., 1986, LAVANCHY et al., 1986) durch die Zunahme der sauren Metaboliten des anaeroben Stoffwechsels, wie Laktat und Phosphat (WOLLENBERGER u. SHAHAB, 1965, KÜBLER u. KATZ, 1977), die schließlich auch im EZR akkumulieren. Gleichzeitig kommt es zu einem Auswärtstransport von Protonen aus dem IZR durch den Na^+/H^+ -Antiporter, der im Gegenzug den Anstieg von $[Na^+]_i$ verursachen könnte (LAZDUNSKI et al., 1985). Außerdem könnte die Azidose durch Lösung von Eiweißbindungen zum Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ beitragen (KNOPF et al., 1990).

4.5. Der Einfluß von ANP auf die zelluläre Ionenhomöostase

4.5.1. Wassertransport und $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransport

Es gilt als sicher, daß ANP die renale Wasserausscheidung (SEYMOUR et al., 1985) erhöht. Daneben vermehrt ANP den transendothelialen Ausstrom von Wasser aus dem Gefäßbett in den EZR (BATTLE et al., 1992). Als Ursache vermuteten diese Autoren eine erhöhte parazelluläre Permeabilität des Endothels, da sie trotz gesicherter ANP-Wirkung an isolierten Endothelzellen keine erhöhte Membrangängigkeit für Wasser messen konnten.

Über ein erhöhtes cGMP moduliert ANP den durch Schleifendiuretika spezifisch gehemmten, ATP-abhängigen $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransport (OWEN et al., 1987).

Während O'DONNELL et al. (1987) in Gefäßmuskelzellen eine Aktivierung des Transporters mit Anstieg von $[Na^+]_i$ fanden, beobachteten KORT u. KOCH (1990) an HeLa-Zellen und CLEMO et al. (1992) am Kaninchenkardiomyozyten eine cGMP vermittelte Hemmung, wobei letztere eine 10%igen Abnahme des IZR beschrieben. Im vorliegenden Versuch könnte es daher zu einer Zellschrumpfung während der Vorperfusion mit ANP gekommen sein, die durch Persistenz des ANP-Effekts durch die gI zu dem beobachteten, verminderten "water shift" führen würde. Gleichzeitig käme es zu einer Verminderung von $[Na^+]_i$ (CLEMO et al., 1992).

4.5.2. Natrium/Kalium-ATPase und Kalium- und Natriumkanäle

Die Vorperfusion mit ANP führte zu einer Verminderung des ischämieinduzierten $[K^+]_e$ -Anstiegs in der zweiten Phase, sowie zu einer starken Abschwächung des Natriumeinstroms und des späten Kaliumausstroms (Abb. 3.3, 3.4). SATO et al. (1988) beschrieben an der Rattenaorta eine durch ANP induzierte Stimulation der durch ein niedriges $[K^+]_e$ inhibierten Na^+/K^+ -ATPase. Dagegen konnten OWEN et al. (1987) und HEDGE et al. (1989) an Gefäßpräparationen, DAVIS et al. (1988) an Erythrozyten und KORT u. KOCH (1990) an HeLa-Zellen keine Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase durch ANP feststellen. Es ist denkbar, daß die beobachtete Verminderung des K^+ -Ausstroms auf einer ANP-Modulation von Kaliumkanälen beruhen könnte. ANP hat in isolierten Gefäßmuskelzellen einen öffnenden Effekt sowohl auf den ATP-sensitiven als auch auf den Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanal (KUBO et al., 1993). An menschlichen Vorhofzellen stimulierte ANP den $[Ca^{2+}]_i$ -unabhängigen transienten K^+ Auswärtsstrom (LE GRAND et al., 1992). SORBERA u. MORAD (1990) beobachteten an ventrikulären Rattenkardiozyten eine 60%ige Suppression des schnellen Na^+ -Kanals nach hohen Dosen von ANP (100 nmol, Arg101-Tyr126), bei gleichzeitig erhöhter Durchlässigkeit für Kalzium, was den verminderten Na^+ -Einstrom in den ersten Minuten erklären könnte.

4.5.3. Der Amilorid-sensitive Na^+/H^+ -Antiporter

Die Wirkungen von Amilorid und ANP sind ähnlich. Frühe Untersuchungen zur natriuretischen Aktivität von ANP durch HAMMOND et al. (1985) zeigten eine erhebliche Hemmung des Na^+/H^+ -Antiporter an der proximalen Tubuluszelle, mit einer 40%igen Verminderung der Na^+ -Aufnahme und einer Zunahme von $[H^+]_i$. Später fanden LIGHT et al. (1989) an der Sammelrohrzelle eine Blockierung eines Amilorid-sensitiven Natriumkanal durch ANP und cGMP. An der Nebennierenrinde erhöht Amilorid die Sensitivität der Guanylatcyclase für ANP (HEIM et al., 1988). In einer neueren Arbeit fanden CAMELLO et al. (1994) an der Gefäßmuskelzelle nach Gabe von ANP, einem cGMP-Analogen oder Hexamethylen-Amilorid, einem spezifischen Inhibitor des Na^+/H^+ -Antiporter, keinen Unterschied im Verlaufsmuster des Na^+ -Einstroms. Da gleichzeitig $[H^+]_i$ zunahm, liegt es nahe einen inhibitorischen Effekt von ANP auf dieses Transportsystem anzunehmen. Ein ähnliches Experiment für das Herz liegt nicht vor, jedoch könnte eine vergleichbare inhibitorische Wirkung von ANP auf das, von LAZDUNSKI et al. (1985) und TANI u. NEELY (1989) beschriebene, Na^+/H^+ -Austauschsystem am Herzen dazu beitragen, den geringeren durch ANP bedingten Na^+ -Einstrom im vorliegenden Versuch zu erklären. Eine Hemmung des Antiporters könnte ebenfalls den beobachteten verzögerten Verlauf der Azidose im EZR in der ANP-Gruppe bewirken (Abb. 3.4).

4.5.4. Natrium/Kalzium-Austausch, Kalzium-ATPase und Kalziumkanäle

ANP setzte den Anstieg von $[Ca^{2+}]_e$ während gI signifikant herab, was zum Teil durch den verminderten "water shift" bedingt war. Der resultierende, zweigipfelige Einstrom von Ca^{2+} in den IZR war deutlich abgeschwächt und leicht verspätet (Abb. 3.3, 3.4).

ANP reduziert $[Ca^{2+}]_i$ im Gefäßmuskel im Rahmen der vasodilatierenden Wirkung (MURAD et al., 1987, CHIU et al., 1985), wobei basales $[Ca^{2+}]_i$ um 50% (HASSID, 1986) und durch Angiotensin bzw. Vasopressin erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ um 20-40% abnahm (HASSID, 1986, CORNWELL u. LINCOLN, 1989). TEI et al., (1990) beobachteten in ventrikulären Kardiocyten eine Reduzierung des $[Ca^{2+}]_i$ um 25 %. Ein erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ in Vorhof- und Ventrikelzellen scheint wiederum die Freisetzung von ANP zu begünstigen (MATSUBARA et al., 1988), was von VAN DER BENT et al. (1994) als "feed back loop" betrachtet wird. Der verminderte Na^+ -Einstrom nach Gabe von ANP könnte eine Verlangsamung des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers mit einer Senkung des Ca^{2+} -Einstrom bewirken (HAIGNEY et al., 1992). Dagegen stellten TEI et al. (1990) jedoch fest, daß ANP selbst in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ basales $[Ca^{2+}]_i$ verminderte, was sie vermuten ließ, daß es über eine cGMP-vermittelte Aktivierung der membranständigen Ca^{2+} -ATPase zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom kommt. Die ATP-Abnahme nach 30 min gI könnte erklären, warum die Wirkung von ANP auf den Ca^{2+} -Ausstrom zu diesem Zeitpunkt nachließ. Einen vergleichbaren Mechanismus forderten auch MURAD et al. (1987) und CORNWELL u. LINCOLN (1989) für die Abläufe am Gefäßmuskel. Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß ANP die Membranpermeabilität für Ca^{2+} verringert. So fanden GISBERT u. FISCHMEISTER (1988) an isolierten Froschkardiocyten, daß ANP die durch den β -Agonisten Isoprenalin ausgelöste Verstärkung des L-Type Ca^{2+} -Kanal um 35% reduzierte. Eine ähnliche ANP-Wirkung auf den Ca^{2+} -Kanal fanden SORBERA u. MORAD (1990) und LE GRAND et al. (1992) an Rattenkardiocyten, letztere über eine cGMP-abhängige Inhibition.

4.6 ANP und Katecholamine

Myokardiale Ischämie führt zu einer erhöhten Freisetzung von Katecholaminen, hauptsächlich Noradrenalin aus sympathischen kardialen Nervenfasern (WOLLENBERGER u. SHAHAB, 1965, SCHÖMIG et al., 1984), was an der Auslösung von ventrikulären Rhythmusstörungen beim Myokardinfarkt beteiligt ist (HIRCHE et al., 1980, HOLMGREN et al., 1981, HIRCHE et al., 1985). Über α - und β -Rezeptoren stimuliert NA die intrazelluläre Adenylatcyclase mit einem consequenten Anstieg von cAMP (SHAHAB et al., 1985, PECKER et al., 1986). Der vorliegenden Versuch konnte zeigen, daß die Gabe von ANP die Freisetzung von NA während 60 min gI gegenüber den Kontrollen um 50 % verminderte. Da ANP zu keiner vermehrten NA-Auswaschung während der Vorperfusion führte, muß es sich hierbei um direkte oder indirekte Wirkungen während gI handeln. Am glatten Aortenmuskel antagonisierte ANP sowohl NA, Adrenalin und Dopamin, als auch Vasokonstriktoren wie Forskolin und Angiotensin II, was entweder über eine Hemmung der Adenylatcyclase (ANAND-SRIVASTAVA et al., 1984) oder eine Stimulation der Guanylatcyclase zu einer Relaxation führte (WINQUIST et al., 1984, CANTIN u. GENEST, 1985, MAACK u. KLEINERT, 1986). Eine Wechselwirkung zwischen ANP und Katecholaminen am Herzen könnte, im Einklang mit den genannten hämodynamischen Befunden, jener Beobachtung zu Grunde liegen, daß ANP in vorher sympathektomierten Ratten das HZV nicht wie erwartet senkte (SASAKI et al., 1986). Ein entsprechender Antagonismus am kardialen L-Type-Kalziumkanal (GISBERT u. FISCHMEISTER, 1988) könnte den durch ANP verminderten Nettoeinstrom von Ca^{2+} während der gI mitbewirken. Denkbar wäre dabei auch eine Hemmung der durch freigesetztes NA aktivierten Adenylatcyclase (PECKER et al., 1986), was wiederum die durch NA erhöhte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität verminderte (HIRCHE et al., 1990) und daher, wie beobachtet, zu dem geringeren K^+ -Ausstrom (WIEGAND et al., 1979) und Na^+ -Einstrom (PECKER et al., 1986) beitrüge.

Am isolierten Rattenherzen stimuliert NA über α -Rezeptoren die Ausschüttung geringer Mengen von ANP, worin CURRIE u. NEWMAN (1986) den Teil eines kardiovaskulären Regelkreises zwischen Katecholaminen und ANP sahen. Auch wenn RACZ et al. (1986) an Phäochromozytomzellen und KUCHEL et al. (1987a) an Herzen von kardiomyopathischen Hamstern eine Hemmung der Dopamin- β -Hydroxylase durch ANP bei gleichzeitig geringeren NA-Mengen vermuteten, ist es unwahrscheinlich, daß dieser Mechanismus die deutlich geringere, ischämiebedingte NA-Freisetzung in der ANP-Gruppe erklärt, da eine zu erwartende erhöhte Dopaminausscheidung, dem natürlichen Substrat dieses neuronalen Enzyms, nicht gemessen wurde. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß die geringeren Veränderungen der Ionenhomöostase nach ANP, insbesondere des Kaliumausstroms (WEISS u. SHINE, 1982b, HIRCHE et al, 1985, KNOPF et al., 1988) die geringere NA-Ausschüttung zur Folge hatten. Dieser Mechanismus könnte die Befunde von LINZ et al. (1988), die bei Gabe von ANP (100 nmol/l) am isolierten, partiell ischämischen Rattenherzen eine 70%ige Abnahme von Reperfusionsarrhythmien fanden, erklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Herzen männlicher Ratten wurden isoliert 15 - 30 Minuten vorperfundiert und dann einer 60minütigen globalen Ischämie ausgesetzt. Eine zweite Gruppe von Herzen erhielt zusätzlich während der Vorperfusion atriales natriuretisches Peptid in einer kumulativen Dosis von 75 nmol/g. Während der Ischämiephase wurde das unterschiedliche Verhalten von $[K^+]_e$, $[Na^+]_e$, $[Ca^{2+}]_e$ und pH_e im Myokard beider Gruppen mit ionenselektiven Elektroden gemessen. Die Schrumpfung des Extrazellulärraums (EZR) wurde mit Hilfe von für Tetramethylammonium-Ionen selektiven Elektroden bestimmt. Sämtliche Herzen wurden anschließend reperfundiert und die während der Ischämie freigesetzten Katecholaminmengen im Eluat bestimmt. Für $[K^+]_e$ kam es während der Ischämie zu einem dreiphasigen Anstieg, der in der ANP-Gruppe stark abgeschwächt war. Der EZR schrumpfte gleichzeitig um etwa 50% in der Kontroll- und 34% in der ANP-Gruppe, wahrscheinlich durch eine Diffusion von freiem Wasser in den Intrazellulärraum (IZR). Daraus berechnete sich für K^+ ein Ausstrom aus der Zelle in zwei Phasen, die von einem kurzzeitigen Einstrom zwischen der 5. und 10. Minute unterbrochen wurden. Unter Berücksichtigung der Wasserverschiebung ergab sich für Na^+ und Ca^{2+} , trotz eines leichten, bis zur 20. bzw. 25. Minute dauernden, extrazellulären Anstieg und anschließendem Abfall, ein zweiphasiger dem Kalium entgegengerichteter Nettoeinstrom, der in der ANP-Gruppe deutlich niedriger ausfiel. Der pH_e sank in beiden Gruppen auf einen Wert von etwa 6,0 ab. Die mit ANP vorbehandelten Herzen zeigten eine um 50% niedrigere Ansammlung von freigesetztem Noradrenalin gegenüber den Kontrollen. Dopamin konnte nur sporadisch und Adrenalin überhaupt nicht nachgewiesen werden. Ursache des unter ANP deutlich reduzierten, ischämiebedingten Hydrops der Kardiozyten könnte eine Hemmung des $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransport sein.

Die wahrscheinliche Hemmung des Amilorid-sensitiven Na^+/H^+ -Antiporters durch ANP könnte über eine Verminderung des Natriumeinstroms den Antrieb des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im Rückwärtsmodus vermindern. Über einen verringerten Einstrom von Ca^{2+} verlangsamt dieser Mechanismus die ischämieinduzierte Akkumulation von freiem, zytosolischem Kalzium in der Herzmuskelzelle und den damit verbundene möglichen Zelltod. Sowohl das durch Ischämie erhöhte $[\text{K}^+]_e$ als auch das freigesetzte Noradrenalin tragen erheblich zu den beim Myokardinfarkt auftretenden, gefürchteten ventrikulären Arrhythmien bei. Beide Phänomene könnten durch die Wirkung von ANP deutlich unterdrückt werden. ANP, das aus Herzvorhofzellen stammt, könnte einen kardioprotektiven Effekt haben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackermann, U., Irizawa, T.G., Milojevic, S., Sonnenberg, H.: Cardiovascular effects of atrial extracts in anaesthetized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62**, 819, 1983
2. Amman, D., Bissig, R., Cimermann, Z., Fiedler, U., Güggi, M., Morf, W.E., Oehme, M., Osswald, H., Pretsch, E., Simon, W.: Synthetic neutral carriers for cations. In: Kessler M., Clark jr. L.C., Lübbers D.W., Silver I.A., Simon W. (Hrsg.): *Ion and enzyme electrodes in biology and medicine*. Urban und Schwarzenberg, München/Berlin/Wien, 1976
3. Anand-Srivastava, M.B., Franks, D.J., Cantin, M., Genest, J.: Atrial natriuretic factor inhibits adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **121**, 855, 1984
4. Anand-Srivastava, M.B., Cantin, M.: Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **138**, 427, 1986
5. Atlas, S.A., Kleinert, H.D., Camargo, M.J., Januszewicz, A., Sealey, J.E., Schilling, J.W., Lewicki, J.A., Johnson, L.K., Maack, T.: Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature* **309**, 717, 1984
6. Baertschi, A.J., Hausmaninger, C., Walsh, R.S., Mentzer, R.M., Wyatt, D.A., Pence, R.A.: Hypoxia-induced release of atrial natriuretic factor (ANF) from the isolated rat and rabbit heart. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**, 427, 1986

7. Balschi, J.A., Frazier, J.C., Fetters, J.K., Clarke, K., Springer, C.S. Smith, T.W., Ingwall, J.S.:
Shift reagent and Na²³ NMR discriminates between extra and intra cellular sodium pools in ischemic heart.
Circulation **72**, 355, 1985
8. Bardenheuer, H., Schrader, J.:
Relationship between myocardial oxygen consumption, coronary flow, and adenosine release in an improved isolated working heart preparation of guinea pigs.
Circ. Res. **51**, 263, 1983
9. Battle, Th., Michel, J.B., Corman, B.:
Effect of atrial natriuretic factor on the water permeability of endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **185**, 386, 1992
10. Bersohn, M.M., Philipson, K.D., Fukushima, J.Y.:
Sodium-calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischemic rabbit hearts.
Am. J. Physiol. **242**, C288, 1982
11. Bianchi, C., Gutkowska, J., Thibault, G., Garcia, J., Genest, J., Cantin, M.:
Radioautographic localization of ¹²⁵I-atrial natriuretic factor (ANF) in rat tissues.
Histochemistry **82**, 441, 1985
12. Böhm, M., Diet, F., Pieske, B., Erdmann, E.:
H-ANF does not play a role in the regulation of myocardial force of contraction.
Life Sci. **43**, 1261, 1988
13. Bös, L., Franz, Chr., Hirche Hj.:
Cardiac arrhythmia and increase of local myocardial extracellular K⁺ activity in pigs.
J. Physiol., **284**, 88, 1978
14. de Boldt, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., Sonnenberg, H.:
A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats.
Life Sci. **28**, 89, 1981
15. Cantin, M., Genest, J.:
The heart and the atrial natriuretic factor.
Endocr. Rev. **6**, 107, 1985
16. Caramelo, C., Lopez-Farre, A., Riesco, A., Olivera, A., Okada, K., Cragoe jr., E.J., Tsai, P., Briner, V.A., Schrier, R.W.:
Atrial natriuretic peptide and cGMP inhibit Na⁺/H⁺-antiporter in vascular smooth muscle cells in culture.
Kidney Int. **45**, 66, 1994
17. Chowdrey, H.S., Curtis, M.J., Hearse, D.J.:
Effects of atrial natriuretic peptide on ischaemia-induced arrhythmias in the rat heart: arrhythmogen or endogenous antiarrhythmic agent?
J. Cardiovasc. Pharmacol. **13**, 451, 1989
18. Chiu, P.J., Tetzloff, G., Sybertz, E.J.:
The effects of atriopeptin II on calcium fluxes in rabbit aorta.
Eur. J. Pharmacol. **124**, 277, 1986
19. Clemo, H.F., Feher, J.J., Baumgarten, C.M.:
Modulation of rabbit ventricular cell volume and Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Cotransport by cGMP and atral natriuretic factor.
J. Gen. Physiol. **100**, 89, 1992
20. Cobbe, S.M., Poole-Wilson, P.A.:
The Time of Onset and Severity of Acidosis in Myocardial Ischaemia.
J. Mol. Cell. Cardiol., **12**, 745, 1980

21. Cobbe, S.M., Parker, D.J., Poole-Wilson, P.A.:
Tissue and coronary venous pH in ischaemic canine myocardium.
Clin. Cardiol., 5, 153, 1982
22. Cornwell, T.L., Lincoln, T.M.:
Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells.
J. Biol. Chem., 264, 1146, 1989
23. Currie M.G., Newman, W.H.:
Evidence for alpha 1 adrenergic receptor regulation of atriopeptin release from the isolated rat heart. Biochem. Biophys. Res. Comm. 137, 94, 1986
24. Davis, F.B., Blas, S.D., Davis, M.M., Davis, P.J.:
Analogue-specific action in vitro of atrial natriuretic factor on human red blood cell Ca²⁺-ATPase activity.
Hypertension, 12, 428, 1988
25. Dietz, J.R.:
Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension.
Am. J. Physiol. 246, R1093, 1984
26. Dietz, R., Schömig, A., Strasser, R., Kübler, W.:
Catecholamines in myocardial hypoxia and ischaemia. In: Delius, W., Gerlach, E., Grobecker, H., Kübler, W. (Hrsg.): Catecholamines and the heart. Recent advances in experimental and clinical research.
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1981
27. Fiolet, J.W.T., Baartscheer, A., Schumacher C.A., Coronel, R., Ter Welle, H.F.:
The change of the free energy of ATP hydrolysis during global ischemia and anoxia in the rat heart. Its possible role in the regulation of the transsarcolemmal sodium and potassium gradients.
J. Mol. Cell. Cardiol., 16, 1023, 1984
28. Fleet, W.F., Johnson T.A., Graebner, C.A., Gettes L.S.:
Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K⁺, pH and activation in the pig.
Circulation 72, 922, 1985
29. Flear, C.T.G., Riemersma, R.A., Nandra, A., Nandra, G., Talbot, R.:
Changes in myocardial water and solutes after ischemia. In: Harris, P., Bing, R.J., Fleckenstein, A. (Hrsg): Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. Vol. 7. Biochemistry and pharmacology of myocardial hypertrophy, hypoxia, and infarction.
University Park Press, Baltimore, 1976
30. Friedrich, M., Benndorf, K., Schwalb, M., Hirche, H.:
Effects of anoxia on K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated guinea pig cardiocytes.
Pflügers Arch. 416, 207, 1990
31. Friedrich, R., Hirche, H.J., Kebbel, U., Zylka, V., Bissig, R.:
Changes of extra cellular Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and H⁺ in the ischemic myocardium of pigs.
Basic Res. Cardiol. 76, 453, 1981
32. Galipeau, J., Nemer, M., Drouin, J.:
Ventricular activation of the atrial natriuretic factor gene in acute myocardial infarction.
N. Engl. J. Med. 319, 654, 1988
33. Gisbert, M., Fischmeister, R.:
Atrial natriuretic factor regulates the calcium current in frog isolated cardiac cells.
Circ. Res., 62, 660, 1988
34. Glitsch, H.G., Kampmann, W., Pusch, H.:
Activation of active Na⁺ transport in sheep Purkinje fibers by external K or Rb ions.
Pflügers Arch. 391, 23, 1981

35. le Grand, B., Deroubaix, E., Couetil, J.P., Coraboeuf, E.:
Effects of atrionatriuretic factor on Ca^{2+} current and Ca_i -independent transient outward K^+ current in human atrial cells.
Pflügers Arch. 421, 486, 1992
36. Haigney, M.C., Miyata, H., Lakatta, E.G., Stern, M.D., Silverman, H.S.:
Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na^+ - Ca^{2+} exchange.
Circ. Res. 71, 547, 1992
37. Hammond, G.T., Yusufi, A.N.K., Knox, F.G., Dousa, T.P.:
Administration of atrial natriuretic factor inhibits sodium-coupled transport in proximal tubules.
J. Clin. Invest., 75, 1983, 1985
38. Harris, A.S., Estandia, A., Tillotson, R.F.:
Ventricular ectopic rhythms and ventricular fibrillation following cardiac sympathectomy and coronary occlusion.
Am. J. Physiol. 165, 505, 1951
39. Hassid, A.:
Atriopeptin II decreases cytosolic free Ca^{2+} in cultured vascular smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. 251, C681, 1986
40. Hearse, D.J., Humphrey, S.M., Bullock, G.R.:
The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem?
J. Mol. Cell. Cardiol., 10, 641, 1978
41. Heim, J.M., Ivanova, K., Gerzer, R.:
Amiloride increases the sensitivity of particulate guanylate cyclase to atrial natriuretic factor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 152, 1263, 1988
42. Hedge, S.S., de Feo, M.L., Jandhyala, B.S.:
Effects of atrial natriuretic factor on cyclic GMP content in the rat aortic smooth muscle: studies on the role of membrane Na^+ - K^+ -ATPase.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 16, 623, 1989
43. Hill, J.L., Gettes, L.S.:
Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine.
Circulation, 61, 768, 1980
44. Hill, J.L., Gettes, L.S., Lynch, M.R., Hebert, N.C.:
Flexible valinomycin electrodes for on-line determination of intravascular and myocardial K^+ .
Am. J. Physiol. 235, H455, 1978
45. Hirche, H.J., McDonald, F.M., Polwin, W., Addicks, K.:
Vicious cycle of catecholamines and K^+ in cardiac ischemia.
J. Cardiovasc. Pharmacol., 7, Suppl. 5, S71, 1985
46. Hirche, H., Knopf, H., Homburg, H., Walser, R.:
Does noradrenaline influence the extracellular accumulation of potassium, sodium, calcium, and hydrogen ions ($[K^+]_e$, $[Na^+]_e$, $[Ca^{2+}]_e$, $[H^+]_e$) during global ischemia in isolated rat hearts?
Basic Res. Cardiol. 85, Suppl. 1, 283, 1990
47. Hirche, H.J., Franz, Chr., Börs, L., Bissig R., Lang R., Schramm M.:
Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 579, 1980

48. Holmgren, S., Abrahamson, T., Almgren, O., Eriksson, B.M.:
Effect of ischaemia on the adrenergic neurons of the heart: a fluorescence histochemical and biochemical study.
Cardiovasc. Res. 15, 680, 1981
49. Isenberg, G.:
Cardiac Purkinje fibers $[Ca^{2+}]_i$ controls the potassium permeability via the conductance components g_{k1} and g_{k2} .
Pflügers Arch. 371, 77, 1977
50. Jamieson, J.D., Palade, G.E.:
Specific granules in atrial muscle cell.
J. Cell. Biol. 23, 151, 1964
51. Jennings R.B., Reimer, K.A., Steenbergen, C.:
Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion.
J. Mol. Cell. Cardiol. 18, 769, 1986
52. Keeler, R., Azzarolo, A.M.:
Effects of atrial natriuretic factor on renal excretion of water and electrolytes in rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 61, 996, 1983
53. Kléber, A.G.:
Resting membrane potential, extracellular potassium activity and intracellular sodium activity during acute global ischemia in the isolated guinea pig heart.
Circ. Res. 52, 442, 1983
54. Kléber, A.G.:
Extracellular potassium accumulation in acute myocardial ischemia.
J. Mol. Cell. Cardiol., 16, 389, 1984
55. Knopf, H., Theising, R., Hirche, H.:
The effect of desipramine on ischaemia induced changes in extracellular K^+ , Na^+ and H^+ -concentrations and noradrenaline release in the isolated rat heart during global ischaemia.
J. Cardiovasc. Pharmacol., 12, 8, 1988
56. Knopf, H., Theising, R., Moon, C.H., Hirche H.:
Continuous determination of extracellular space and changes of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , and H^+ during global ischaemia isolated rat hearts.
J. Mol. Cell. Cardiol., 22, 1259, 1990
57. Kort, J.J., Koch, G.:
The $Na^+/K^+/2Cl^-$ -cotransport system in HeLa cells: aspects of its physiological regulation.
J. Cell. Physiol. 145, 253, 1990
58. Kubo, M., Nakaya, Y., Matsuoka, S., Saito, K., Kuroda, Y.:
Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K^+ channels in cultured vascular smooth muscle cells.
Circ. Res. 74, 471, 1994
59. Kuchel, O., Cantin, M., Buu, N.T., Debinski, W., Jasmin, G., Genest, J.:
Catecholamine, dopamine- β -hydroxylase and atrial natriuretic factor in separate heart chambers of cardiomyopathic hamsters.
Life Sci. 41, 2333, 1987a
60. Kuchel, O., Debinski, W., Racz, K., Buu, N.T., Garcia, R., Cusson, J.R., Larochelle, P., Cantin, M., Genest, J.:
An emerging relationship between peripheral sympathetic nervous activity and atrial natriuretic factor.
Life Sci. 40, 1545, 1987b

61. Kübler, W., Katz, A.M.:
Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart. Possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation.
Am. J. Cardiol. 40, 467, 1977
62. Lang, R.E., Thölken, H., Ganten, D., Luft, F.C., Ruskoaho, H., Unger, Th.:
Atrial natriuretic factor - a circulating hormone stimulated by volume loading.
Nature 314, 264, 1985
63. Lang, R.E., Dietz, R., Merkel, A., Unger, Th., Ruskoaho, H., Ganten, D.:
Plasma atrial natriuretic peptide values in cardiac disease.
J. Hypertension 4, Suppl. 2, S119, 1986
64. Langendorff, O.:
Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen.
Pflügers Arch., 61, 291, 1895
65. Lappe, R.W., Smits, J.F.M., Todt, J.A., Debets, J.J.M., Wendt, R.L.:
Failure of Atriopeptin II to cause arterial vasodilation in the conscious rat.
Circ. Res. 56, 606, 1985
66. Lavanchy, N., Martin, J., Rossi, A.:
Effects of diltiazem on the energy metabolism of the isolated rat heart submitted to ischaemia: a ³¹P NMR study.
J. Mol. Cell. Cardiol. 18, 931, 1986
67. Lazdunski, M., Frelin, C., Vigne, P.:
The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH.
J. Mol. Cell. Cardiol., 17, 1029, 1985
68. Ledson, J.R., Wilson, N., Courneya, C.A., Rankin, A.J.:
Release of atrial natriuretic peptide by atrial distension.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 63, 739, 1985
69. Lee, H.C., Mohabir, R., Smith, N., Franz, M.R., Clusin W.T.:
Effect of ischemia on Ca-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing Indo 1.
Circulation 78, 1047, 1988
70. Lehninger A.L.:
Mitochondria and calcium ion transport.
Biochem. J. 119, 129, 1970
71. Light, D.B., Schwiebert, E.M., Karlson, K.H., Stanton, B.A.:
Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells.
Science 243, 383, 1989
72. Linz, W., Schölkens, B.A., Albus, U., Petry, P., Breipohl, G., Knolle, J.:
Atrial natriuretic factor protects the isolated working ischaemic rat heart against the action of angiotensin II.
J. Hypertension 6, (Suppl.), 339, 1988
73. Maack, T., Kleinert, H.:
Renal and cardiovascular effects of atrial natriuretic factor.
Biochem. Pharmacol. 35, 2057, 1986
74. Malloy, C.R., Matthews, P.M., Smith, M.B., Radda, G.K.:
Influence of propranolol on acidosis and high energy phosphates in ischaemic myocardium of the rabbit.
Cardiovasc. Res. 20, 710, 1986

75. Matsubara, H., Hirata, Y., Yoshimi, H., Takata, S., Takagi, Y., Umeda, Y., Yamane, Y., Inada, M.:
Role of calcium and protein kinase C in ANP secretion by cultured rat cardiocytes.
Am. J. Physiol. 255, H405, 1988
76. Mendez, R.E., Pfeffer, J.M., Ortola, F.V., Bloch, K.D., Anderson, S., Seidman, J.G., Brenner, B.M.:
Atrial natriuretic peptide transcription, storage and release in rats with myocardial infarction.
Am. J. Physiol. 253, H1449, 1987
77. Meulemans, A.L., Sipido, K.R., Sys, S.U., Brutsaert, D.L.:
Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle.
Circ. Res. 62, 1171, 1988
78. Michel, J., Lattion, A., Salzmann, J., de Lourdes Cerol, M., Philippe, M., Camilleri, J., Corvol, P.:
Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction.
Circ. Res. 62, 641, 1988
79. Mulad, F., Leitman, D.C., Bennett, B.M., Molina, C., Waldman, S.A.:
Regulation of guanylate cyclase by atrial natriuretic factor and the role of cyclic GMP in vasodilatation.
Am. J. Med. Sci. 294, 139, 1987
80. Murthy, K.K., Thibault, G., Garcia, R., Gutkowska, J., Genest, J., Cantin, M.:
Degradation of atrial natriuretic factor in the rat.
Biochem. J. 240, 461, 1986
81. Needleman, P.:
Atriopeptin biochemical pharmacology.
Fed. Proc. 45, 2096, 1986
82. Nikolsky, B.P., Shultz, M.M., Belijustin, A.A.:
Recent developments in the ion-exchange theory of the glass electrode and its application in the chemistry of glass. In: Eisenman G. (Hrsg.): *Glass electrodes for hydrogen and other cations, principles and practise.*
Dekker, New York, 1967
83. Noma, A.:
ATP regulated K⁺ channels in cardiac muscle.
Nature 305, 147, 1983
84. O'Donnell, M.E., Bush, E.N., Holleman, W., Owen, N.E.:
Biologically active atrial natriuretic peptides selectively activate Na⁺/K⁺/Cl⁻-cotransport in vascular smooth muscle cells.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 243, 822, 1987
85. Opie, L.H., Nathan, D., Lubbe, W.F.:
Reviews. Biochemical aspects of arrhythmogenesis and ventricular fibrillation.
Am. J. Cardiol. 43, 131, 1979
86. Otero, H.O., Wangler, R.D., Sparks, H.V., Chimoskev, J.E.:
Alpha-human atrial natriuretic peptide is a coronary vasodilator in the Langendorff-perfused guinea pig heart.
Life Sci. 42, 695, 1987
87. Owen, N.E., Bush, E.N., Holleman, W., O'Donnell, M.E.:
Effect of atrial natriuretic factor on Na⁺/K⁺/Cl⁻-cotransport of vascular smooth muscle cells.
Hypertension, 10, I-128, 1987
88. Pecker, M.S., Im, W.B., Sonn, J.K., Lee, C.O.:
Effect of norepinephrine and cyclic AMP on intracellular sodium ion activity and contractile force in canine cardiac Purkinje fibres.
Circ. Res. 59, 390, 1986

89. Pegram, B.L., Trippodo, N.C., Natsume, T., Kardon, M.B., Frohlich, E.D., Cole, F.E., MacPhee, A.A.:
Hemodynamic effects of atrial natriuretic hormone.
Fed. Proc. 45, 2382, 1986
90. Pike, M.M., Kitakaze, M., Marban, E.:
²³Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion.
Am. J. Physiol. 259, H1761, 1990
91. Porter, B., Gumprecht, E., Geer, P.G., Goetz, K.L.:
Plasma atrial peptide concentration during acute changes in cardiac filling pressure induced by a contrast agent.
Clin. Cardiol. 10, 289, 1987
92. Racz, K., Kuchel, O., Buu, N.T., Debinski, W., Cantin, M., Genest, J.:
Atrial natriuretic factor, catecholamines and natriuresis.
New Engl. J. Med. 314, 321, 1986
93. Rugg, E.L., Aitom, J.F., Cramb, G.:
Atrial natriuretic peptide receptors and activation of guanylate cyclase in rat cardiac sarcolemma.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 162, 1339, 1989
94. Ruskoaho, H., Lang, R.E., Toth, M., Ganten, D., Unger, T.:
Release of atrial natriuretic peptide (ANP).
Eur. Heart J. 8, (Suppl. B), 99, 1987
95. Sasaki, A., Kida, O., Kangawa, K., Matsuo, H., Tanaka, K.:
Involvement of sympathetic nerves in cardiosuppressive effects of α -human atrial natriuretic polypeptide.
Eur. J. Pharmacol. 120, 345, 1986
96. Sato, K., Kazuyasu, M., Nishimura, K., Ito, K., Kangawa, K., Matsuo, H.:
Possible involvement of sodium pump in the relaxation of rat aorta induced by human atrial natriuretic polypeptide.
Japan. J. Physiol., 38, 187, 1988
97. Schömig, A., Dart, A.M., Dietz, R., Mayer, E., Kübler W.:
Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release.
Circ. Res., 55, 689, 1984
98. Seidah, N.G., Lazure, C., Chretien, M., Thibault, G. Garcia. R., Cantin, M., Genest, J., Nutt, R.F., Brady, S.F., Lyle, T.A., Paleveda, W.J., Colton, C.D., Ciccarone, T.M., Veber, D.F.:
Amino acid sequence of homologous rat atrial peptides: Natriuretic activity of native and synthetic forms.
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 2640, 1984
99. Seymour, A.A., Sweet, C.S., Stabilito, I.I., Emmert, S.E.:
Cardiac and haemodynamic responses to synthetic atrial natriuretic factor in rats.
Life Sci. 40, 511, 1987
100. Seymour, A.A., Blaine, E.H., Mazak, E.K., Smith, S.G. Stabilito, I.I., Haley, A.B., Napier, M.A., Whinnery, M.A., Nutt, R.F.:
Renal and systemic effects of synthetic atrial natriuretic factor. Cardiac and haemodynamic responses to synthetic atrial natriuretic factor in rats.
Life Sci. 36, 33, 1985
101. Shen, A.C., Jennings, R.B.:
Myocardial calcium and magnesium in acute ischaemic injury.
Am. J. Pathol. 67, 416, 1972

102. Sonnenberg, H.:
Mechanisms of release and renal tubular action of atrial natriuretic factor.
Fed. Proc. 45, 2106, 1986
103. Sorbera, L.A., Morad, M.:
Atrionatriuretic peptide transforms cardiac sodium channels into calcium-conducting channels.
Science 247, 969, 1990
104. Stanfield, P.R.:
Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells.
In: Adrian, R.H., zur Hausen, H., Helmreich, E., Holzer, H., Jung, R., Linden, R.J., Miescher, P.A., Piiper, J., Rasmussen, H., Trendelenburg, U., Ullrich, K., Vogt, W., Weber, A. (Hrsg.): Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology.
Springer, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, 1983
105. Steenbergen, C., Murphy, E., Levy, L., London, R.E.:
Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat hearts.
Circ. Res. 60, 700, 1987
106. Sweet, C.S., Ludden, C.T., Frederick, C.M., Ribeiro, L.G., Nussberger, J., Slater, E.E., Blaine, E.H.:
Hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic factor (ANF) in dogs with acute left ventricular failure.
Eur. J. Pharmacol. 115, 267, 1985.
107. Tani, M., Neely, J.R.:
Role of intracellular Na⁺ and Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange.
Circ. Res. 65, 1045, 1989
108. Tei, M., Horie, M., Makita, T., Suzuki, H., Hazama, A., Okada, Y., Kawai, C.:
Atrial natriuretic peptide reduces the basal level of cytosolic free Ca²⁺ in guinea pig cardiac myocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 167, 413, 1990
109. Tennant, R.:
Factors concerned in the arrest of contraction in an ischemic myocardial area.
Am. J. Physiol. 113, 677, 1935
110. Thibault, G., Garcia, R., Carrier, F., Seidah, N.G., Lazure, C., Chretien, M., Cantin, M., Genest, J.:
Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). I. Natriuretic activity and relaxation of intestinal smooth muscle.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 125, 938, 1984
111. Tranum-Jensen, J., Janse, M.J., Fiolet, J.W.T., Krieger, W.J.G.:
Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart.
Circ. Res. 49, 364, 1981
112. Van der Bent, V., Church, D.J., Vallotton, M.B., Meda, P., Kem, D.C., Capponi, A.M., Lang, U.:
[Ca²⁺]_i and protein kinase C in vasopressin-induced prostacyclin and ANP release in rat cardiomyocytes.
Am. J. Physiol., 266, H597, 1994
113. Weiss, J., Shine, K.I.:
Extracellular K⁺ accumulation during myocardial ischemia in isolated rabbit heart.
Am. J. Physiol., 242, H619, 1982a

114. Weiss, J., Shine, K.I.:
[K⁺]_o accumulation and electrophysiological alterations during early myocardial ischemia.
Am. J. Physiol., 243, H318, 1982b
115. Weiss, J., Couper G.S., Hiltbrand, B., Shine K.I.:
Role of acidosis in early contractile dysfunction during ischemia: evidence from pH measurement.
Am. J. Physiol., 247, H760, 1984
116. Weiss, J.N., Venkatesh, N., Lamp, S.T.:
ATP-sensitive K⁺ channels and cellular K⁺ loss in hypoxic and ischaemic mammalian ventricle.
J. Physiol. 447, 649, 1992
117. Wiegand, V., Guggi, M., Meesmann, W., Kessler, M., Greitschus, F.:
Extracellular potassium activity changes in the canine myocardium after acute coronary occlusion and the influence of beta-blockade.
Cardiovasc. Res., 13, 297, 1979
118. Will-Shahab, L., Krause, E.G., Bartel, S., Schulze, W., Küttner, I.:
Reversible inhibition of adenylate cyclase activity in the ischemic myocardium.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 7, Suppl. 5, S23, 1985
119. Wilson, D.R., Honrath, U., Sonnenberg, H.:
Interaction of amiloride and hydrochlorothiazide with natriuretic factor in the medullary collecting duct.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 66, 648, 1987
120. Winqvist, R.J., Faison, E.P., Nutt, R.F.:
Vasodilator profile of synthetic atrial natriuretic factor.
Eur. J. Pharmacol. 102, 169, 1984

121. Wollenberger, A., Shahab, L.:
Anoxia-induced release of noradrenaline from the isolated perfused heart.
Nature, 207, 1965, 88
122. Zeidel, M.L., Seifter, J.L., Lear, S., Brenner, B.M., Silva, P.:
Atrial peptides inhibit oxygen consumption in kidney medullary collecting duct cells.
Am. J. Physiol. 251, F379, 1986

7. VORABVERÖFFENTLICHUNG

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in der folgenden Schrift veröffentlicht:

Hilger, A.W., Hirche, Hj., Knopf, H., Theising, R., Moon, Ch.:

Effects of Atrial-Natriuretic-Peptide on ion fluxes in the isolated ischaemic rat myocardium.

In: Kaufmann, W., Wambach, G., (Hrsg.): Endocrinology of the Heart.

Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 1989

LEBENS LAUF

Am 15.12.1960 wurde ich als erstes Kind des Kaufmannes Alois Hilger und seiner Ehefrau Maria-Louise, geb. Kühl, in Düsseldorf geboren. Von 1966 bis 1970 besuchte ich die katholische Grundschule in Wittlaer und ab 1970 das staatliche Max-Planck-Gymnasium, Düsseldorf-Stockum, wo ich im Juni 1979 die allgemeine Hochschulreife erwarb. Zwischen September 1979 und Oktober 1980 leistete ich zivilen Ersatzdienst als Krankenpfleger in der Klinik Golzheim, Düsseldorf. Nach einem längeren Studienaufhalt in Besançon, Frankreich, begann ich zum Sommersemester 1981 das Studium der Humanmedizin an der Universität Heidelberg. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im Jahre 1983, wechselte ich an die Universität zu Köln, wo ich, nach Absolvierung des praktischen Jahres am Städtischen Krankenhaus Solingen, im April 1988 die ärztlichen Prüfung ablegte. Im Mai 1988 wurde mir die Approbation als Arzt zuerkannt. In den Jahren 1985 bis 1988 war ich als Doktorand am Institut für Vegetative Physiologie der Universität zu Köln (Direktor: Prof. Dr. med. H. Hirche) mit der Untersuchung von Ionenveränderungen am isolierten, ischämischen Rattenherzen befaßt. Nach einer intensivmedizinischen Tätigkeit als Assistenzarzt an der Klinik für Thorax- und Kardiovaskulärmedizin am Herzzentrum NRW, Bad Oeynhausen, (Direktor: Prof. Dr. med. R. Körfer) von September 1988 bis August 1989, ging ich nach Großbritannien um mich in der Chirurgie des Hals-Nasen-Ohrengbietes weiterzubilden. Von 1989 bis 1991 war ich als Assistenzarzt im Singleton Hospital, Swansea, und dem University Hospital of Wales, Cardiff, angestellt. Ab 1992 setzte ich meine Weiterbildung als 'Higher Surgical Trainee in Otolaryngology' in der West Midlands Region fort, was mich an die North Staffordshire Royal Infirmary, Stoke-on-Trent, das Queen Elizabeth Hospital, University of Birmingham, und das Eye, Ear and Throat Hospital, Shrewsbury, führte. Im März 1995 wurde ich zum 'Senior Registrar' (Oberarzt) ernannt und arbeite derzeit am University Hospital of Birmingham und am Birmingham Children's Hospital.

Schwerpunkt meiner Weiterbildung ist die Otologie und die Tumorchirurgie des Kopf/Hals-Bereiches. Seit 1992 bin ich Fellow of the Royal College of Surgeons, Edinburgh. Neben klinischer Forschung auf verschiedenen Gebieten des Faches, beschäftige ich mich seit Juli 1992 als Research Fellow am Institute of Communication and Neuroscience, Keele University, Staffordshire, (Direktor: Carole M. Hackney) hauptsächlich mit der Erforschung des anatomischen Korrelates der Otoakustischen Emissionen.

Stoke-on-Trent, den 29.4.1996