

Aus der Medizinischen Klinik II
der Medizinischen Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. H. Schunkert

Der Effekt von ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor-Antagonisten auf die kardiale
Noradrenalinfreisetzung:

Ein Vergleich zwischen normoxischen und ischämischen Bedingungen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Catherine Walliser

Hütten 2010

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. G. Richardt

2. Berichtstatter/ Berichtstatterin:

Prof. Dr. med. N. Guldner

Tag der mündlichen Prüfung:

15.04.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Das Renin-Angiotensin-System	7
1.2 AT1- und AT2-Rezeptoren	8
1.3 Das Angiotensin-Converting-Enzym und Bradykinin	8
1.4 Angiotensin-II-Rezeptoren und Bradykinin	9
1.5 Kardiale Noradrenalinfreisetzung	9
1.6 Klinische Bedeutung der RAS-Komponenten	9
1.7 Fragestellung	11
1.8 Methodischer Ansatz	11
2 Material und Methodik	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Experimentelles Vorgehen	13
2.2.1 Präparation und Perfusion der Rattenherzen	13
2.2.2 Stimulation und exozytotische Noradrenalinfreisetzung	14
2.3 Versuchsanordnung	15
2.3.1 Normoxische Experimente	15
2.3.2 Ischämische Experimente	17
2.4 Bestimmung von endogenem Noradrenalin	19
2.5 Substanzen	20
2.5.1 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHL)	20
2.5.2 Medikamente	21
2.6 Statistik	21
2.7 Grafische Darstellung	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Noradrenalinfreisetzung im Experiment	23
3.2 Angiotensin II	23
3.3 Dosiswirkungskurven der ACE-Hemmer	25
3.3.1 Dosiswirkungskurve von Enalapril	25
3.3.2 Dosiswirkungskurve von Quinalaprilat	28
3.3.3 Dosiswirkungskurve von Ramiprilat	30
3.4 Dosiswirkungskurven der AT1-Rezeptor-Antagonisten	32
3.4.1 Dosiswirkungskurve von Candesartan	32
3.4.2 Dosiswirkungskurve von Eprosartan	34
3.4.3 Dosiswirkungskurve von EXP 3174	36

3.5	Kontrollversuche	38
3.5.1	Dosiswirkungskurve von PD 123319	38
3.5.2	Kontrollversuch mit HOE 140	40
3.5.3	Kontrollversuch mit Apstatin	42
3.6	Wirkstoffkombinationen	43
3.6.1	B2-Rezeptor-Blockade durch HOE 140	43
3.6.1.1	Kombination Ramiprilat mit HOE 140:	43
3.6.1.2	Kombination Candesartan mit HOE 140:	45
3.6.2	AT2-Rezeptorblockade durch PD 123319	46
3.6.3	Kombination Candesartan mit Apstatin	48
4	Diskussion	50
4.1	Die Rolle von Aminopeptidase P in der Bradykinin-vermittelten Kardioprotektion	54
4.2	Perspektiven	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	58
7	Danksagung	69
8	Curriculum vitae - Catherine Walliser	70
9	Publikation	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Renin-Angiotensin-System	10
Abbildung 2, Das normoxische Versuchsprotokoll.....	14
Abbildung 3, Das ischämische Versuchsprotokoll	16
Abbildung 4, Noradrenalinausschüttung und Angiotensin-II-Gabe	21
Abbildung 5, Dosiswirkungskurve von Enalapril	23
Abbildung 6, Dosiswirkungskurve von Quinalapril	25
Abbildung 7, Dosiswirkungskurve von Ramiprilat	27
Abbildung 8, Dosiswirkungskurve von Candesartan.....	29
Abbildung 9, Dosiswirkungskurve von Eprosartan.....	31
Abbildung 10, Dosiswirkungskurve von EXP 3174	33
Abbildung 11, Dosiswirkungskurve von PD 123319	35
Abbildung 12, Kontrollversuch mit HOE 140.....	37
Abbildung 13, Kontrollversuch mit Apstatin	39
Abbildung 14, Kombination Ramiprilat mit HOE 140	33
Abbildung 15, Kombination Candesartan mit HOE 140.....	34
Abbildung 16, Kombination Candesartan mit PD 123319.....	35
Abbildung 17, Kombination Candesartan mit Apstatin.....	37

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Aps	Apstatin
ANG II	Angiotensin II
AT1 (-R)	Angiotensin II Subtyp 1 (-Rezeptor)
AT2 (-R)	Angiotensin II Subtyp 2 (-Rezeptor)
B2 (-R)	Bradykinin Typ 2 (-Rezeptor)
Cand	Candesartan
DMI	Desipramin-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
Ena	Enalapril
HOE	HOE 140
HPLC	High-Pressure-liquid-Chromatography, Hochdruckflüssigkeits chromatographie
KHL	Krebs-Henseleit-Lösung
NA	Noradrenalin
Quina	Quinalaprilat
Rami	Ramiprilat
S1	Stimulation 1
S2	Stimulation 2
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte

1 Einleitung

Nachdem Betablocker und Diuretika lange die einzigen Antihypertensiva waren, für die eine Reduktion von Morbidität und Mortalität wissenschaftlich nachgewiesen werden konnte, haben sich seit den neunziger Jahren auch ACE-Hemmer und AT1-Blocker in der Therapie des arteriellen Hypertonus und kardialer Erkrankungen etabliert. Zum Verständnis der Wirkung haben Untersuchungen beigetragen, die ein lokales Renin-Angiotensin-System (RAS) im Herzen aufzeigten (Dzau und Re, 1987; Lindpaintner et al., 1987, Dostal und Baker, 1999) und als Regulationsmechanismus für Blutdruck, Plasmaosmolarität und –volumen identifizierten (Lavoie und Sigmund, 2003).

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

Lange Zeit wurde das Renin-Angiotensin-System (RAS) als rein renales Volumenregulationssystem mit enzymatisch-hormoneller Signalübertragung gesehen. Eine renale Minderdurchblutung, gleich welcher Ursache, führt zu einer gesteigerten Renin-freisetzung aus den granulierten Epitheloidzellen des Vas afferens des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Renin als Proteinase setzt aus dem Plasmaprotein Angiotensinogen Angiotensin I frei, welches durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zu Angiotensin II verkürzt wird. Angiotensin II schließlich ist ein äußerst effektives blutdrucksteigerndes Hormon, das an mehreren Stellen angreift. Auf periphere Arteriolen wirkt es kontrahierend, über Stimulation der Aldosteronbildung in der Nebennierenrinde beeinflusst es den Natrium- und damit den Wasserhaushalt. Durch Freisetzung adrenerger Transmitter aus Nervenendigungen moduliert es außerdem das sympathische System.

Die Hauptkomponenten des RAS werden in unterschiedlichen Organen gebildet. So erfolgt z.B. die Synthese von Renin in der Niere, die von Angiotensinogen in der Leber, das Angiotensin-Converting-Enzym wird in Gefäßendothelzellen der Lunge gebildet, und erst die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II findet im Plasma statt (Montani und van Vliet, 2004).

Untersuchungen von Brasch et al. 1993 zeigten, dass die durch Angiotensin II gesteigerte Noradrenalinausschüttung auf einen lokalen Effekt an sympathischen

Nervenendigungen zurückgeführt werden kann. Vermittelt wird dieser Effekt über präjunktionale AT1-Rezeptoren (Brasch et al., 1993; Rump et al., 1994).

1.2 AT1- und AT2-Rezeptoren

In den 80er Jahren führte die Entwicklung spezifischer Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten zu der Identifikation der Angiotensin-Rezeptor-Subtypen AT1 und AT2 sowie zur Unterscheidung der Subtyp-abhängigen Angiotensinwirkungen (de Gasparo et al., 2000). Über den AT1-Rezeptor vermittelt bewirkt Angiotensin II u.a. eine Förderung der Zellproliferation und –hypertrophie sowie eine Eskalation inflammatorischer Prozesse (de Gasparo et al., 2000). Mit dem AT2-Rezeptor wurden antiinflammatorische und antiproliferative Prozesse oder auch Apoptose in Verbindung gebracht (de Gasparo et al., 2000), womit zumindest in Anteilen eine gegensätzliche Wirkungsweise besteht.

Beim gesunden Menschen findet sich überwiegend der AT1-Rezeptor. Er wird u.a. in Herz, Gefäßen, Lunge, Niere, Leber, im Gehirn, der Plazenta, Blase sowie im Gastrointestinaltrakt exprimiert (de Gasparo et al., 2000). Der AT2-Rezeptor hingegen spielt bei Gesunden nur eine untergeordnete Rolle (de Gasparo et al., 2000), ließ sich aber bei pathologischen Prozessen mit Gewebszerstörung, z.B. Herzinfarkt oder Apoplex, deutlich vermehrt nachweisen (Rosenstiel et al., 2002).

1.3 Das Angiotensin-Converting-Enzym und Bradykinin

Bradykinin ist ein hochwirksames gefäßerweiterndes Nonapeptid, das durch die proteolytische Wirkung von Kallikrein aus Kininogen entsteht. Abgebaut werden Kinine durch Kininasen, wobei die Kininase II gleichzusetzen ist mit dem ACE (Yang et al., 1970). Demzufolge kann die kardiale Bradykininkonzentration durch ACE-Blockade gesteigert werden, während die Angiotensin-II-Bildung reduziert wird. Bradykinin-vermittelte Effekte lassen sich durch den selektiven B2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 aufheben (Linz et al., 1990). An isolierten Rattenherzen konnte eine kontinuierliche Bradykinin-Freisetzung nachgewiesen werden, die unter ischämischen Bedingungen zunahm und nach Zugabe von Ramiprilat in die Perfusionslösung nochmals anstieg (Baumgarten et al., 1993).

1. 4 Angiotensin-II-Rezeptoren und Bradykinin

Der Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT1-Rezeptor) lässt sich ebenso wie der Bradykinin-B2-Rezeptor an sympathischen Nervenendigungen nachweisen (Brasch et al., 1993, Kurz et al., 1997). Eine AT1-Rezeptorblockade reduziert die myokardiale Hypertrophie nach Myokardinfarkt bei Ratten (Taylor et al., 1998). Sie verhindert, ebenfalls im Experiment mit Ratten, die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie durch Druckbelastung (Obayashi et al., 1997) und unterbindet beim Hund das Auftreten kardialer Arrhythmien in der Reperfusion nach Infarkt (Yang et al., 2005). Somit wirken AT1-Antagonisten kardioprotektiv, wobei nicht nur die Wirkung von Angiotensin am AT1-Rezeptor unterbrochen wird, sondern über konsekutiv erhöhte Angiotensinlevel eine Aktivierung des AT2-Rezeptors und damit des Kininsystems erfolgt (Liu et al., 1997). Der so herbeigeführte Anstieg von Bradykinin kann – ebenfalls an Rattenherzen – einen partiellen kardialen Schutz bewirken (Zhang YJ et al., 2005).

1. 5 Kardiale Noradrenalinfreisetzung

Über präjunktionale Rezeptoren (AT1-Rezeptor und B2-Rezeptor) bewirken Angiotensin II und Bradykinin eine Noradrenalinexkretion an sympathischen Nervenendigungen (Brasch et al., 1993, Kurz et al., 1997, s.o.). Da Noradrenalin bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen oder Herzinsuffizienz eine erhebliche Bedeutung hinsichtlich der Pathophysiologie und Prognose zukommt (Schömig und Richardt, 1991, Meredith et al., 1993) ist es wichtig zu eruieren, ob sich ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten in ihrer Wirkung auf die Noradrenalinausschüttung unterscheiden.

1. 6 Klinische Bedeutung der RAS-Komponenten

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Arbeiten begründet den großen Stellenwert der medikamentösen Beeinflussung sämtlicher Komponenten des RAS.

So wurde im Januar 2000 die kanadische HOPE-Studie veröffentlicht, in der untersucht wurde, ob der ACE-Hemmer Ramipril bei Patienten mit einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung bzw. mit Diabetes mellitus das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung reduzieren kann. Hierzu wurde Hochrisikopatienten im Alter über 55 Jahren mit bekannter Gefäßerkrankung oder Diabetes in Kombination mit kardiovaskulären Risikofaktoren aber ohne vorliegende Herzerkrankung über fünf Jahre täglich 10 mg Ramipril verabreicht. Als Endpunkt wurde Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse definiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Ramipril die Herzinfarktrate, die Anzahl von Schlaganfällen sowie das Auftreten von Herzinsuffizienz oder Diabetes-bedingten Komplikationen signifikant reduzieren konnte (Yusuf et al., 2000).

Kurze Zeit später folgte die Veröffentlichung der Ergebnisse der LIFE-Studie, in der bei Hochrisikopatienten mit Myokardhypertrophie zur Therapie der arteriellen Hypertrophie Atenolol (50 bis 100 mg / Tag) oder Losartan (50 bis 100 mg / Tag) eingesetzt wurde. Während die Blutdrucksenkung bei beiden Gruppen vergleichbar erfolgreich war, konnte unter Losartan eine bessere Risikoreduktion (13% vs. 26%) verzeichnet werden. Primäres Zielkriterium für die Effizienz war dabei eine Kombination klinischer Ereignisse wie kardiovaskulärer Tod, Schlaganfall und Myokardinfarkt (Dahlöf et al., 2002).

Aktuellste Studien untersuchten nun die Wirkung einer direkten Hemmung von Renin. In der 2009 veröffentlichten ALLAY-Studie (Solomon et al., 2009) wurde Hochdruckpatienten mit linksventrikulärer Hypertrophie über neun Monate Aliskiren (300mg tgl.) oder Losartan (100 mg tgl.) verabreicht. Der primäre Endpunkt war eine Änderung des linksventrikulären Masseindex. Der direkte Renin-Antagonist Aliskiren reduzierte dabei die linksventrikuläre Hypertrophie bei Hypertonikern im gleichen Maße wie Losartan. Ein additiver Effekt durch Kombination beider Wirkstoffe und damit Hemmung des RAS an zwei verschiedenen Bereichen ließ sich allerdings nicht feststellen, verstärkt auftretende Nebenwirkungen aber auch nicht.

Die gesamte Signalkette von Renin über die Angiotensine und verschiedene Rezeptoren bis zum Effekt am Zielorgan stellt sich also ausgesprochen vielschichtig dar und damit bleibt auch der Wirkmechanismus der Angiotensinblockade und das

Zusammenspiel einzelner Komponenten der neurohumoralen Aktivierung
Gegenstand experimenteller Arbeiten.

1.7 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Unterscheiden sich ACE-Inhibitoren und AT1-Blocker hinsichtlich ihrer Wirkung auf die kardiale Noradrenalinfreisetzung?
2. Über welchen Weg – Angiotensin oder Bradykinin – werden mögliche Effekte vermittelt?

1.8 Methodischer Ansatz

Da zwischen einzelnen ACE-Hemmern Unterschiede in ihrem Wirkungspotential und bei AT1-Blockern verschiedene Affinitäten zu prä- und postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren festgestellt wurden (Ohlstein et al., 1997), die möglicherweise zu den individuellen pharmakologischen Profilen beitragen, wurden jeweils verschiedene ACE-Hemmer bzw. AT1-Antagonisten untersucht. Die Angiotensin- und Bradykininbildung steigt in Ischämie bekannterweise an (Linz et al., 1996), weshalb die Wirkstoffe bei normoxischen und bei ischämischen Bedingungen getestet wurden.

Renin-Angiotensin-System

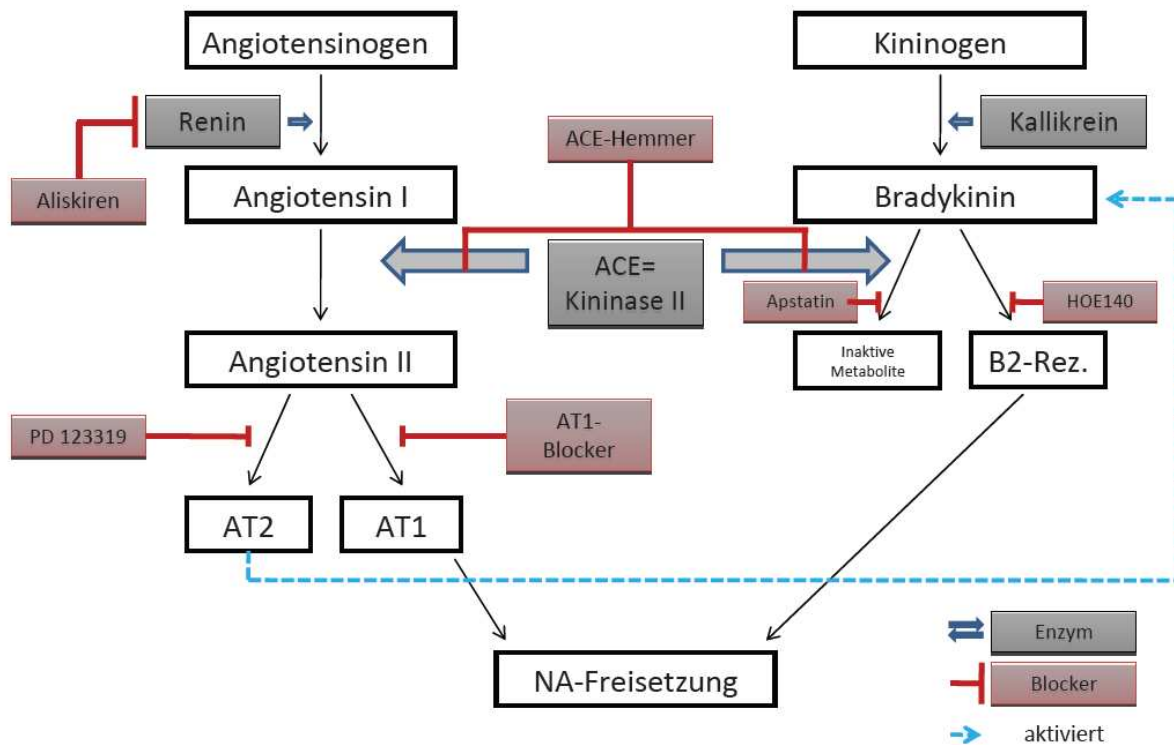


Abb. 1 Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems mit den einwirkenden Antagonisten (in Anlehnung an Maruyama et al., 2000)

2 Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Die für diese Studie verwendeten männlichen Wistar-Ratten (Charles River) wurden gemäß den Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, publiziert vom US National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, in der revidierten Fassung von 1996 veröffentlicht), gehalten. Genehmigungen für die beschriebenen Versuche wurden beim Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein in Kiel eingeholt.

Die Tiere wurden pathogenfrei aufgezogen und erhielten eine Standard-Pellet-Diät mit Wasser ad libitum. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 10h/ 14h sowie eine konstante Raumtemperatur von 20-22°C wurden vorgegeben. Zum Versuchszeitpunkt waren die Ratten 45-60 Tage alt und hatten ein Gewicht von 180-200 g. Sie wurden am Versuchstag aus dem Tierstall der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck geholt und bis zur Organentnahme reizarm aufbewahrt.

2.2 Experimentelles Vorgehen

2.2.1 Präparation und Perfusion der Rattenherzen

Mittels einer intraperitonealen Injektion von 75-100 mg/kg Körpergewicht Natriumthiopental (Trapanal®) wurden die Versuchstiere narkotisiert. Die Peritonealhöhle wurde eröffnet und die Vena cava inferior in Höhe der rechten Niere dargestellt. Intracaval wurden nun 500 I.E./kg Körpergewicht Heparin-Natrium injiziert, um eine Thrombosierung der Koronargefäße zu verhindern. Nach Eröffnen des Thorax wurde das Herz entnommen, gewogen (mittleres Herzgewicht 0,75g) und sofort in eiskalte Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Direkt anschließend wurde die Aorta ascendens retrograd bis kurz vor die Klappenebene kanüliert und an der Perfusionskanüle mit einem Faden befestigt. Über eine Mehrkanal-Rollerpumpe (Watson Marlow 5058, Watson Marlow Limited Falmouth Cornwall, England) konnte die gleichzeitige antegrade Koronarperfusion

(Langendorff, 1895) von bis zu vier Herzen pro Versuch gewährleistet werden. Zwei weitere Kanäle dienten der pH-Messung sowie zusätzlich der Messung des Sauerstoffgehaltes der Krebs-Henseleit-Lösung.

Die modifizierte Lösung nach Krebs-Henseleit (Zusammensetzung s. S. 20) wurde als Perfusat auf einen konstanten Fluß von 8 ml/min pro Gramm Herzgewicht eingestellt. Die Lösung wurde mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast und auf einer Temperatur von 37,0 ± 0,3 °C gehalten, so daß sich ein pH-Wert von 7,4 ± 0,02 ergab. Über die gesamte Versuchsdauer wurde die Umgebungstemperatur der Herzen mit Hilfe einer Wärmekammer auf 37,0° gehalten. Von der Auswertung ausgeschlossen wurden Herzen mit sichtbaren höhergradigen Rhythmusstörungen sowie Herzen, die nach der Präparation nicht wieder spontan schlugen.

2.2.2 Stimulation und exozytotische Noradrenalinfreisetzung

In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit wird die Stimulation elektrisch erzeugt, hierzu umfassen jeweils zwei konkav geformte Stahlkontaktscheiben von ca. 10x7 mm ein Herz so, daß sich das Septum interventrikulare in der Mitte befindet und das Herz nicht komprimiert wird. Eine elektrische Feld-Stimulation mit einem Frequenzgenerator (HSE Stimulator P, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland; 1 min., 5V, 6Hz, 2 msec Impulsdauer) induziert die exozytotische Noradrenalin-Freisetzung in den synaptischen Spalt (Seyfarth et al., 1993). Die Spannung wurde während der Stimulation mit Hilfe eines Oszilloskops (30 MHz-Oszilloscope CO 30, Grundig, Deutschland) überwacht.

2.3 Versuchsanordnung

Zunächst wurden die Herzen für zehn Minuten ohne pharmakologische Intervention perfundiert. Ab der elften Versuchsminute bis zum Versuchsende wurde kontinuierlich 0,1 µmol/L Desipramin (DMI) zur KHL zugegeben, um die nicht-exozytotische Noradrenalinfreisetzung zu hemmen (Schömig et al., 1984). Nach einer weiteren Äquibrierungsphase wurden zwei Stimulationen (S1, S2) in vordefinierten Intervallen induziert. Medikamentöse Interventionen wurden zehn Minuten vor der zweiten Stimulation gestartet und dauerten bis zum Versuchsende an. Durch die Berechnung des jeweiligen S2/S1-Quotienten war es möglich, die Noradrenalinfreisetzung bei Stimulation mit Medikamentengabe (S2) individuell mit der Noradrenalinfreisetzung bei Stimulation ohne Medikamentengabe (S1) zu vergleichen.

2.3.1 Normoxische Experimente

Die erste Stimulation (S1) erfolgte nach einer zwanzigminütigen Äquibrierungsphase in der 20. bis 21. Minute. Es wurden dabei vor, während und für zwei Minuten nach der Stimulation Effluatproben gesammelt. Anschließend wurde mit der Medikamentengabe begonnen, um nach zehn Minuten erneut zu stimulieren (S2) und Proben zu entnehmen (s. Abb.2).

Als Medikamente wurde zunächst Angiotensin II in der Konzentration 100 nmol/L (n=7) getestet. Als ACE-Hemmer wurden Enalapril in den Konzentrationen 1, 10, 100 nmol/L und 1 µmol/L (jeweils Gruppen von n=4 bzw. n=8), Quinalaprilat in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L (jeweils Gruppen von n=4-6) und Ramiprilat in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 nmol/L sowie 1 µmol/L (jeweils Gruppen von n=4-8) untersucht.

Außerdem wurde die Noradrenalinfreisetzung nach Gabe folgender AT1-Rezeptor-Antagonisten bestimmt: Candesartan, Eprosartan und EXP 3174 jeweils in den Konzentrationen 1, 10 und 100 nmol/L (jeweils in Gruppen von n=3-10). Der AT2-

Rezeptor-Antagonist PD 123319 wurde in den Konzentrationen 1, 10 und 100 nmol/L untersucht (jeweils in Gruppen von n=4-7), der B2-Rezeptor-Antagonist HOE 140 in den Dosierungen 10 und 100 nmol/L sowie 1 µmol/L (jeweils in Gruppen von n=8) und der Aminopeptidase-Hemmer Apstatin mit 0,1 µmol/L (n=6). Die Reproduzierbarkeit der stimulationsinduzierten Noradrenalinfreisetzung wurde in Versuchen ohne pharmakologische Intervention unter normoxischen Bedingungen (n=8) untersucht. Es wurden jeweils bis zu vier Herzen gleichzeitig untersucht.

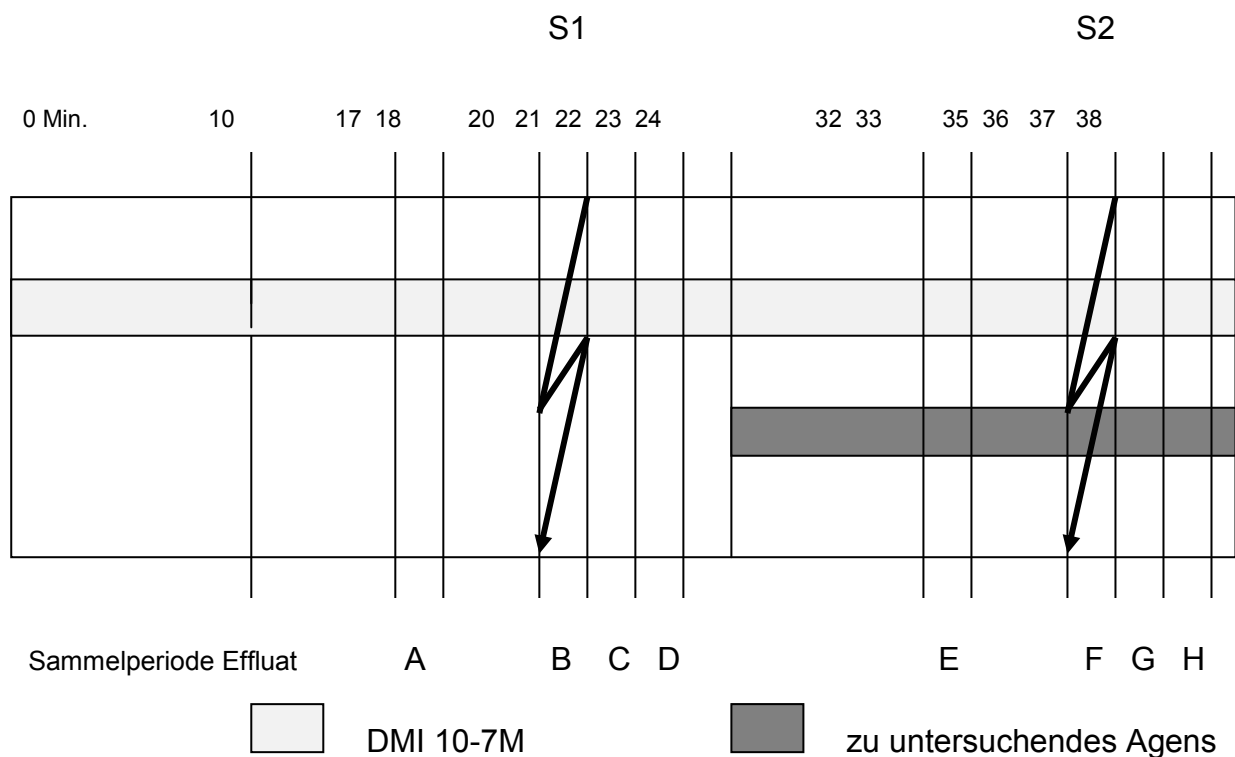


Abb. 2: Das normoxische Versuchsprotokoll: Durch zwei elektrische Feldstimulationen S1 und S2 wurde die Noradrenalinfreisetzung ausgelöst.

2.3.2 Ischämische Experimente

Nach einer 20-minütigen Stabilisierungsphase wird durch eine Perfusionsunterbrechung für insgesamt vier Minuten eine globale *stop-flow* Ischämie erzeugt. In der letzten Minute dieser Ischämiephase erfolgte die erste Stimulation der Herzen (S1). Anschließend wird die Perfusion der Herzen mit normaler Flußrate (8 ml/min) fortgesetzt und mit der Medikamentengabe begonnen. Nach der Äquilibrationsphase wird eine zweite globale Myocardischämie für vier Minuten erzeugt. Analog zur ersten Stimulation erfolgt eine zweite Stimulation (S2) in der letzten Minute der Ischämie. Koronarvenöses Effluat wurde direkt vor und zwei Minuten nach der Ischämiephase gesammelt (s. Abb. 3).

Mit folgenden Medikamenten wurde die Noradrenalinfreisetzung bei Ischämie untersucht: Angiotensin II (100 nmol/L, n=7), Enalapril mit 1, 10, 100 nmol/L und 1 µmol/L (jeweils Gruppen von n=6-8), Quinalaprilat mit 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L (jeweils Gruppen von n=4) und Ramiprilat in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 nmol/L sowie 1 µmol/L (jeweils Gruppen von n=4-8). Außerdem wurden untersucht: Candesartan, Eprosartan und EXP jeweils in den Konzentrationen 1, 10 und 100 nmol/L (jeweils Gruppen von n=3-9) sowie PD 123319 (10, 100 nmol/L und 1 µmol/L; jeweils Gruppen von n=5-8), HOE 140 (100 nmol/L, n=8) und Apstatin (0,1 µmol/L, n=6).

Als Kontrolle dienten ischämische Herzen, die ohne Medikamentengabe parallel perfundiert wurden (n=8).

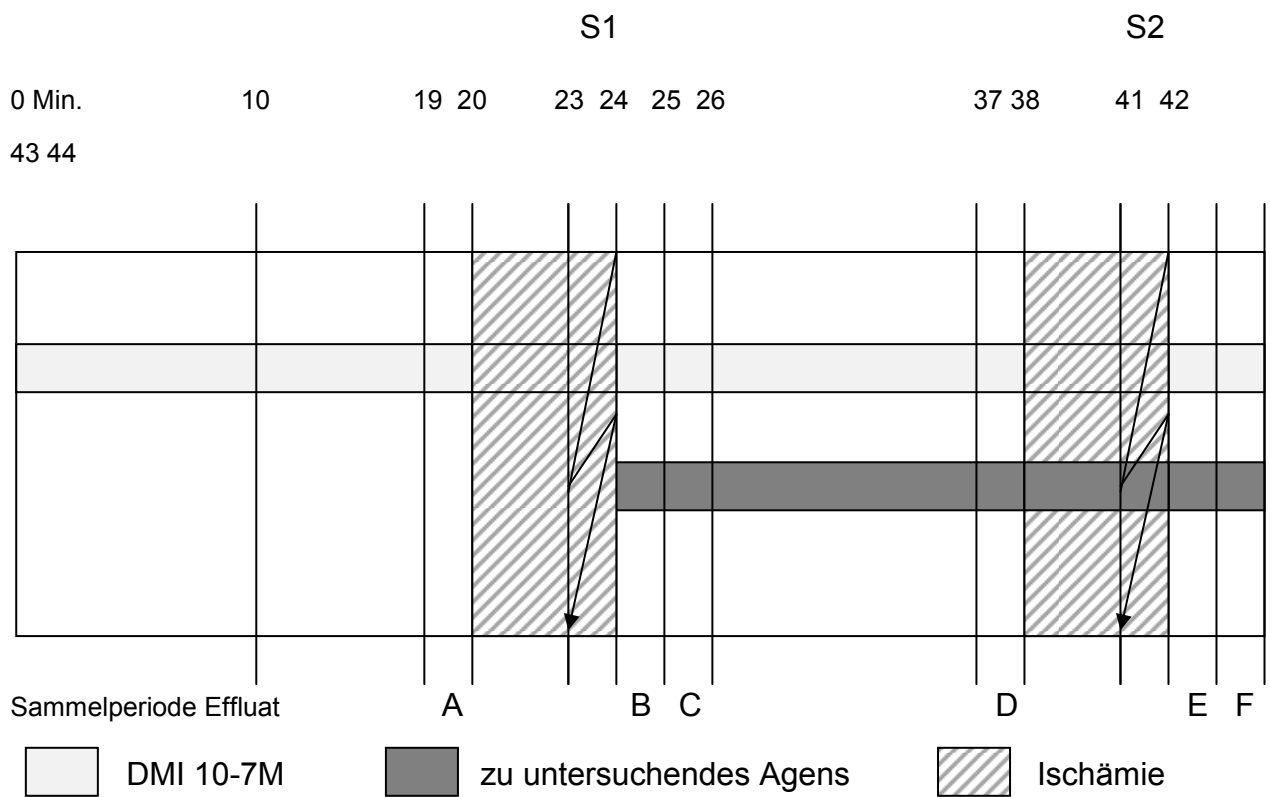


Abb. 3: Das ischämische Versuchsprotokoll: Die Noradrenalinfreisetzung wurde durch zwei elektrische Feldstimulationen S1 und S2 in der letzten Minute einer vierminütigen Ischämie ausgelöst.

2.4 Bestimmung von endogenem Noradrenalin

Dem koronarvenösen Effluat wurden Proben für die Bestimmung von Noradrenalin – je nach Versuchsprotokoll – vor, während und nach den Stimulationen entnommen, wobei zur Stabilisierung 300 µl Ethylendiamintetraacetatlösung (EDTA 0,3 M) in die Abnahmeröhrchen vorgelegt wurden. Die Proben wurden sofort auf einem vorgekühlten Metallblock tiefgefroren und bis zur Katecholaminextraktion bei -60°C aufbewahrt. Die Bestimmung von endogenem Noradrenalin (Smedes et al., 1982; modifiziert nach Schömig et al., 1987) erfolgte mit elektrochemischer Detektion über die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high-pressure liquid chromatography, HPLC; HPLC Autosampler 465 Kontron Instruments, Thermo Separation Products SpectraSeries P 100 Pumpe, Sample Injector Model 231 Gilson Abimed). Ein externes Standardgemisch von Noradrenalin und DOPEG diente als Referenz für die im Herzen endogen freigesetzten Katecholamine.

Jeweils 3 ml des tiefgefrorenen Effluats wurden aufgetaut und mit 1 ml Ammoniumchlorid-Ammoniumhydroxid-Puffer (NH₄Cl-NH₄OH-Puffer, 2 mol/L), der 0,2% Diphenylboratethylamin und 0,6% Natrium-EDTA enthielt, versetzt, um einen pH-Wert von 8,5 zu erreichen. Die Extraktion der Katecholamine aus der wässrigen Phase gelang durch Zugabe von 5 ml 99% n-Hexan, 1% Octanol zusammen mit 0,25% Tetraoctylammoniumbromid und anschließend 8-minütiges Schütteln. Nach Zentrifugieren der Proben bei 2.000 RPM (Rotanta 96 RC, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) wurde die wässrige Phase bei -20°C abgefroren, wodurch die wässrige von der organischen Phase getrennt wurde. Die nichtgefrorene Hexanphase wurde in einem nächsten Schritt mit 150 µl einer 0,2 molaren Phosphorsäure und 1 ml Octanol versetzt und erneut geschüttelt, um die Wiederfindung zu optimieren und auch DOPEG in die wässrige Phase zu überführen. Erneut wurde fünf Minuten bei 4.500 RPM zentrifugiert. Aus der nun entstandenen wässrigen Phase konnte Noradrenalin durch Ansäuern der Probe mit Phosphorsäure gelöst werden. Diese befand sich nach dem Zentrifugieren am

Boden des Röhrchens, so dass etwa 100 µl der Flüssigkeit mit einer Spritze aufgezogen und auf das HPLC-System zur Analyse aufgegeben werden konnte. Die Phosphorsäure verblieb dabei am Boden des Röhrchens.

Über eine C18-reversed-phase-Säule (LiChroCART® 125 mm x 4 mm, Merck, Deutschland) erfolgte die Auftrennung der Katecholamine nach dem Gegenionen-Prinzip mit einem Laufmittelfluß von 0,8 ml/Min. Ein Phosphatpuffer (0,17 mol/L), der mit 50 µmol/L Natrium-EDTA und 10 mmol/L Natriumchlorid versetzt war, diente dabei als mobile Phase. Durch Titration mit Natriumhydroxid wurde ein pH-Wert von 3 eingestellt. Als Gegenionen wurde 0,1 g Octylsulfat auf 100 ml Wasser angesetzt, dabei konnte die Menge der Gegenionen in der mobilen Phase zur Optimierung der Chromatographie variiert werden. Im Schnitt lag diese im Bereich zwischen 0,50 ml/L und 0,67 ml/L. Zur quantitativen Analyse wurde eine elektrochemische Detektionselektrode (Waters 745 Data Module) bei einer Spannung von 0,65 V verwendet. Die Retentionszeit für Noradrenalin lag bei 2,9 Minuten, die für DOPEG bei 3,6 Minuten. Blindwerte und Standardproben mit bekannter NoradrenalinKonzentration wurden wie Versuchsproben analysiert. Die Nachweisgrenze lag für Noradrenalin bei 0,1 mmol/L und für DOPEG bei 0,2 nmol/L. Der Variationskoeffizient betrug 5,9% bzw. 5,8% und die Wiederfindungsrate betrug 98% bzw. 92%. Die bei den Versuchen verwendeten Pharmaka hatten keinen Einfluß auf die Extraktion, Trennung oder Detektion von Noradrenalin oder DOPEG.

2.5 Substanzen

2.5.1 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHL)

Die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung setzt sich folgendermaßen zusammen (mmol/L): NaCl 125; NaHCO₃ 16,9; Na₂HPO₄ 0,2; KCl 4; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1,85; Glucose 11; EDTA 0,027.

2.5.2 Medikamente

Desipramin und Enalapril maleate wurden von Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) , Thiopental-Natrium wurde als Trapanal® 0,5 g von Byk Gulden (Konstanz, Deutschland bezogen. Heparin-Natrium wurde von Novo-Nordisc Pharma (Mainz, Deutschland) bezogen.

Quinalaprilat wurde von der Gödecke AG (Freiburg, Deutschland), Ramiprilat von Hoechst (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Candesartan wurde von Astra Zeneca (Mölnal, Schweden), Eprosartan von Hoechst Marion Roussel (Bad Soden / Taunus, Deutschland) und EXP 3174 (2-Buthyl-4-chlor-1-{4-[2-(1H-tetrazol-5-yl)]phenyl}imidazol-5-carbonsäure) von DuPont Merck Pharmaceuticals (Wilmington, Delaware, U.S.A.) bezogen. PD 123319 wurde von RBI (Natick, MA, U.S.A.) bezogen, Apstatin wurde von Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.) bzw. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen und HOE 140 (D-arginyl-L-arginyl-L-propyl-trans-4-hydroxy-L-prolylglycyl-3-(2-thienyl)-L-alanyl-L-seryl-D-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarbonyl-L-(2 α 3 β ,7 α β)-octahydro-1H-indole-2-carbonyl-L-arginine) über Aventis Pharma (Frankfurt, Deutschland).

2.6 Statistik

Die dargestellten Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Die freigesetzte Noradrenalinmenge wurde in pmol/g Herzgewicht berechnet. Aus der freigesetzten Noradrenalinmenge der ersten Stimulation (S1) und der freigesetzten Noradrenalinmenge der zweiten Stimulation (S2) wurde das Verhältnis S2/S1 errechnet und als geometrischer Mittelwert angegeben. Wurden verschiedene Versuchsgruppen miteinander verglichen, wurde beim Vergleich zweier Gruppen ein zweiseitig ungepaarter Student's t-Test, bei drei oder mehr Versuchsgruppen wurde die Varianzanalyse für unabhängige Daten (*one-way analysis of variance* (ANOVA)) und der Post hoc Test nach Bonferroni angewendet .

Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant definiert und grafisch mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet, als hochsignifikant galt ein p-Wert < 0.01, der mit zwei Sternchen (**) dargestellt wurde.

Die Durchführung der statistischen Bewertung erfolgte mit Graph Pad Prism Software 3.0.

2.7 Grafische Darstellung

In der verwendeten grafischen Darstellung der Noradrenalinausschüttung verdeutlicht die Abszisse den mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, während auf der Ordinate die unterschiedlichen Wirkstoffe bzw. deren unterschiedliche Konzentrationen abgebildet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Noradrenalinfreisetzung im Experiment

Während der Äquilibrationsphase wurde keine Noradrenalinfreisetzung ($< 0,1$ pmol/l) gemessen. Ebenso hatte keines der Medikamente in den verwendeten Konzentrationen einen messbaren Einfluß auf die Noradrenalinfreisetzung vor der Stimulation. Nach der Stimulation kommt es sowohl unter normoxischen als auch unter ischämischen Bedingungen wirkstoff- und dosisabhängig zu einer Noradrenalinakkumulation im koronarvenösen Effluat. In Kontrollexperimenten ohne pharmakologische Intervention konnte unter normoxischen Bedingungen ein mittleres S2/S1-Verhältnis von $1,05 \pm 0,04$, unter ischämischen Bedingungen von $0,99 \pm 0,05$ ermittelt werden. Zur besseren Veranschaulichung wurden diese Kontrollversuche in die Graphiken der folgenden Versuche eingefügt.

3.2 Angiotensin II

Durch exogen zugeführtes Angiotensin II zeigte sich sowohl im normoxischen als auch im ischämischen Experiment ein hochsignifikanter Anstieg der Noradrenalinausschüttung. Angiotensin II wurde dabei jeweils in einer Dosis von 100 nmol/L zugeführt, es ergaben sich folgende Werte: in Normoxie: S1 277 ± 33 pmol/g, S2 483 ± 52 pmol/g, S2/S1: $176 \pm 9\%$, $n=8$, $p=0,0001$. In Ischämie: S1 95 ± 11 pmol/g, S2 168 ± 29 pmol/g, S2/S1: $174 \pm 2\%$, $n=8$, $p=0,012$.

(s. Abb.4)

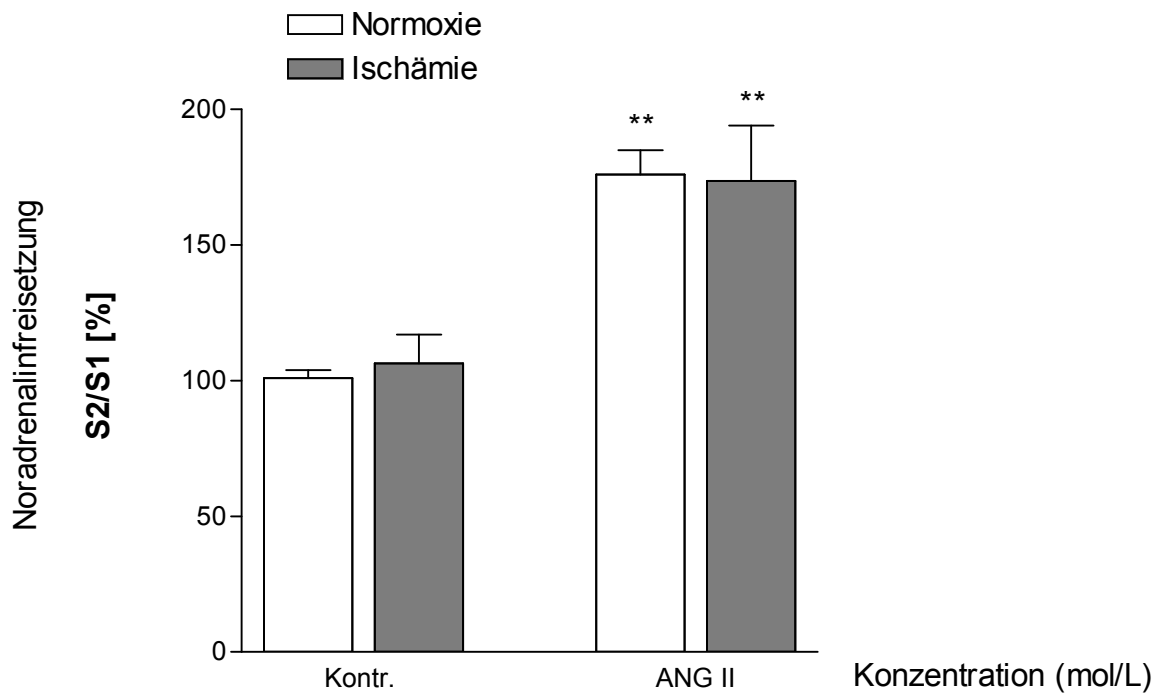


Abb. 4: Noradrenalin ausschüttung unter Angiotensin-II-Gabe

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Angiotensin-II (100 nmol/L). Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=8, **p < 0,01 vs. S1.

3.3 Dosiswirkungskurven der ACE-Hemmer

Für alle in weiteren Untersuchungen eingesetzten Medikamente wurden Dosiswirkungskurven erstellt, um den jeweils optimalen Wirkungsbereich sowohl bei Normoxie als auch bei Ischämie zu ermitteln. Nachfolgend werden die Versuche mit den ACE-Hemmern Enalapril, Quinalaprilat und Ramiprilat aufgeführt.

Unter normoxischen Bedingungen konnte nur bei Enalapril und Ramiprilat jeweils bei einer Dosis eine leichte Suppression der Freisetzung dargestellt werden (s. Abb. 5 und 7).

Für alle drei Wirkstoffe wurde eine geringe aber signifikante Steigerung Noradrenalinfreisetzung bei Ischämie gezeigt; bei Enalapril in einer annähernd glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurve (s. Abb. 5), angedeutet ebenso bei Ramiprilat (s. Abb. 7). Quinalaprilat führte lediglich in einer Konzentration zu einer signifikanten Zunahme der Noradrenalinfreisetzung (s. Abb. 6).

3.3.1 Dosiswirkungskurve von Enalapril

Enalapril wurde in den Konzentrationen 1,10, 100 nmol/L sowie 1 μ mol/L untersucht. Bei Normoxie zeigte sich in der Dosis von 100 nmol/L eine leichte aber signifikante Suppression (S1 259 ± 14 pmol/g, S2 236 ± 15 pmol/g, S2/S1: $91 \pm 4\%$, n=8, p=0,05).

Im ischämischen Experiment zeigte sich eine deutliche aber nicht signifikante Steigerung der Noradrenalinfreisetzung bei einer Konzentration von 10 nmol/L (S1 122 ± 14 pmol/g, S2 142 ± 7 pmol/g, S2/S1: $128 \pm 17\%$, n=8, p=0,216) bei insgesamt angedeutet glockenförmigem Kurvenverlauf. Signifikant erhöht war die Ausschüttung bei 100 nmol/L (S1 104 ± 11 pmol/g, S2 129 ± 17 pmol/g, S2/S1: $124 \pm 7\%$, n=8, p=0,026). (s. Abb.5)

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 1 nmol/L: S1 228 ± 42 pmol/g, S2 251 ± 37 pmol/g, S2/S1: $98 \pm 5\%$, n=8; 10 nmol/L: S1 355 ± 46 pmol/g, S2 363 ± 38 pmol/g, S2/S1: $108 \pm 13\%$, n=8; 1 μ mol/L: S1 196 ± 36 pmol/g, S2 208 ± 25 pmol/g, S2/S1: $109 \pm 7\%$, n=4.

Ischämie 1nmol/L: S1 142 ± 23 pmol/g, S2 135 ± 16 pmol/g, S2/S1: $101 \pm 8\%$, n=8; 1 μ mol/L: S2/S1: $100 \pm 12\%$, n=6.

Kontrollen s. 3.1.

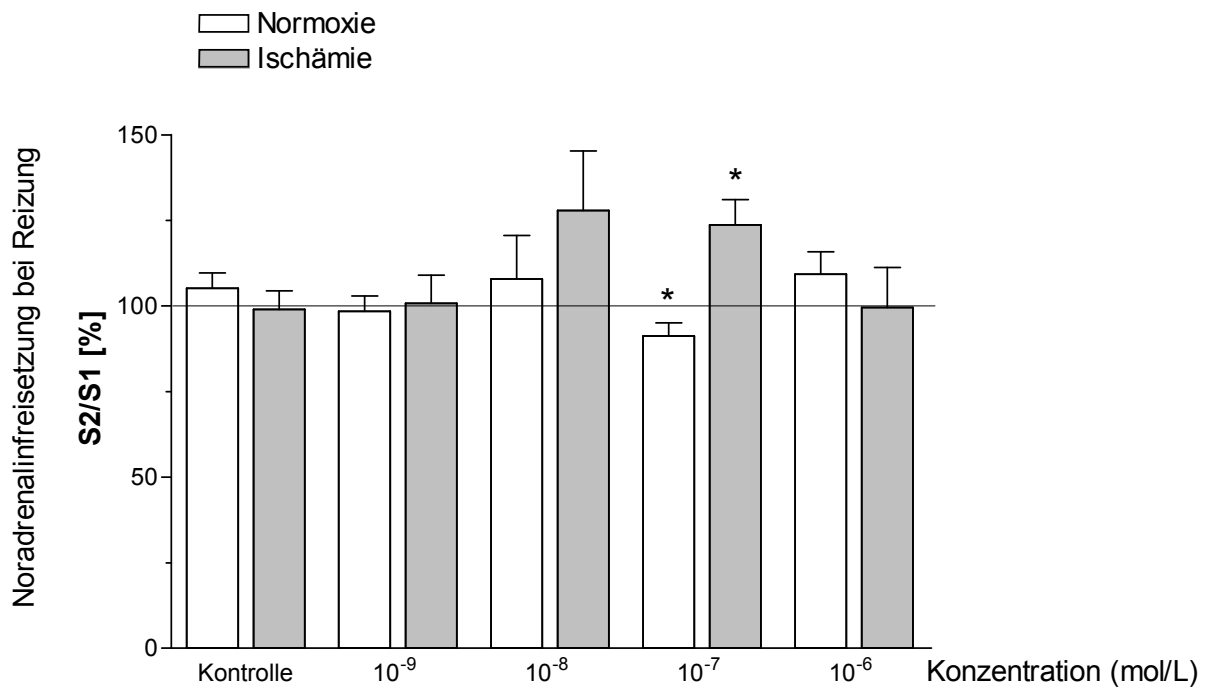


Abb. 5: Dosiswirkungskurve von Enalapril:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Enalapril in den Konzentrationen 1, 10, 100 nmol/L sowie 1 µmol/L. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten ± SEM in %, n=4-8, *p< 0,05 vs. S1.

3.3.2 Dosiswirkungskurve von Quinalaprilat

Quinalaprilat wurde in Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 100 nmol/L untersucht. In Normoxie ließ sich kein signifikanter Einfluß auf die Noradrenalinausschüttung feststellen. In der Ischämie ergab sich eine signifikant erhöhte Katecholaminfreisetzung bei 1 nmol/L (S1 158±12 pmol/g, S2 187±21 pmol/g, S2/S1: 118±4%, n=4, p= 0,049). (s. Abb. 6)

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie: 0,1 nmol/L: S1 302 ±15 pmol/g , S2 316±3 pmol/g, S2/S1: 105±4%, n=4; 1 nmol/L: S1 299±35 pmol/g, S2 300±34 pmol/g , S2/S1: 100±2%, n=5; 10 nmol/L: S1 228±30 pmol/g, S2 219±22 pmol/g, S2/S1: 100±12%, n=4; 100 nmol/L: S1 346±29 pmol/g, S2 377±44 pmol/g, S2/S1: 109±9%, n=4.

Ischämie: 0,1 nmol/L: S1 156±25 pmol/g, S2 168±32 pmol/g , S2/S1: 106±5%, n=4; 10 nmol/L: S1 135±27 pmol/g, S2 125±6 pmol/g, S2/S1: 100±12%, n=4; 100 nmol/L: S1 192±23 pmol/g, S2 196±33 pmol/g , S2/S1: 100±5%, n=4.

Kontrollen s. 3.1.

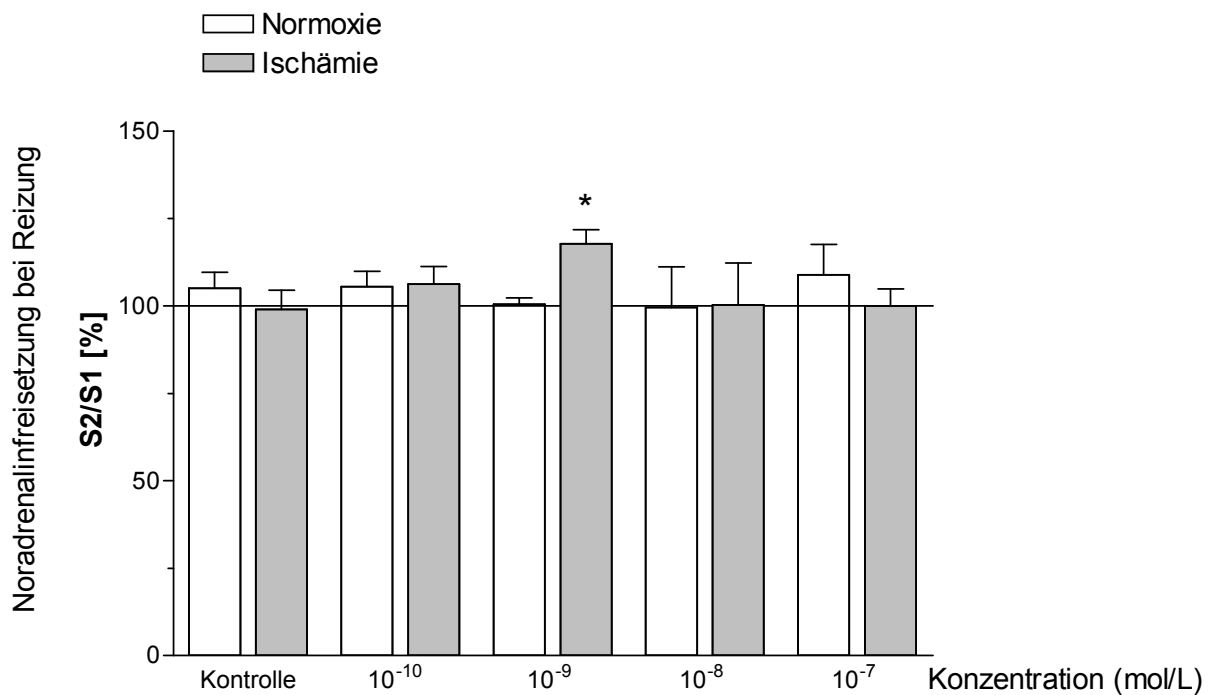


Abb. 6: Dosiswirkungskurve von Quinalapril:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Quinalapril in den Konzentrationen 0,1, 1,10, 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=4-6, *p< 0,05 vs. S1.

3.3.3 Dosiswirkungskurve von Ramiprilat

Ramiprilat wurde sowohl in Normoxie als auch in Ischämie in den Konzentrationen von 0,1 nmol/L bis 1 µmol/L untersucht. Hierbei zeigte sich unter normoxischen Bedingungen bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 nmol/L eine hochsignifikante Reduktion der Noradrenalin ausschüttung (S1 412±47 pmol/g, S2 346±47 pmol/g, S2/S1: 83±3%, n=8, p= 0,0006). In Ischämie zeigte sich in den Konzentrationen von 1 nmol/L eine signifikante und bei 10 nmol/L eine hochsignifikante Steigerung der Noradrenalin exkretion. Es ergaben sich dabei folgende Werte: 1 nmol/L: S1 108±11 pmol/g, S2 128±12 pmol/g, S2/S1: 121±8%, n=8, p= 0,017; 10 nmol/L: S1 146±12 pmol/g, S2 187±14 pmol/g, S2/S1: 130±8%, n=8, p= 0,008. (s. Abb. 7)

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 0,1 nmol/L: S1 375±42 pmol/g, S2 367±45 pmol/g, S2/S1: 98±3%, n=4; 1 nmol/L: S1 299±26 pmol/g, S2 277±21 pmol/g, S2/S1: 94±3%, n=8; 100 nmol/L: S1 219±20 pmol/g, S2 214±19 pmol/g, S2/S1: 99±5%, n=8; 1 µmol/L: S1 217±21 pmol/g, S2 208±18 pmol/g, S2/S1: 97±4%, n=8.

Ischämie 0,1 nmol/L: S1 131±19 pmol/g, S2 147±17 pmol/g, S2/S1: 116±10%, n=4; 100 nmol/L: S1 120±3 pmol/g, S2 146±13 pmol/g, S2/S1: 121±9%, n=5; 1 µmol/L: S1 163±12 pmol/g, S2 204±13 pmol/g, S2/S1: 129±9%, n=7.

Kontrollen s. 3.1.

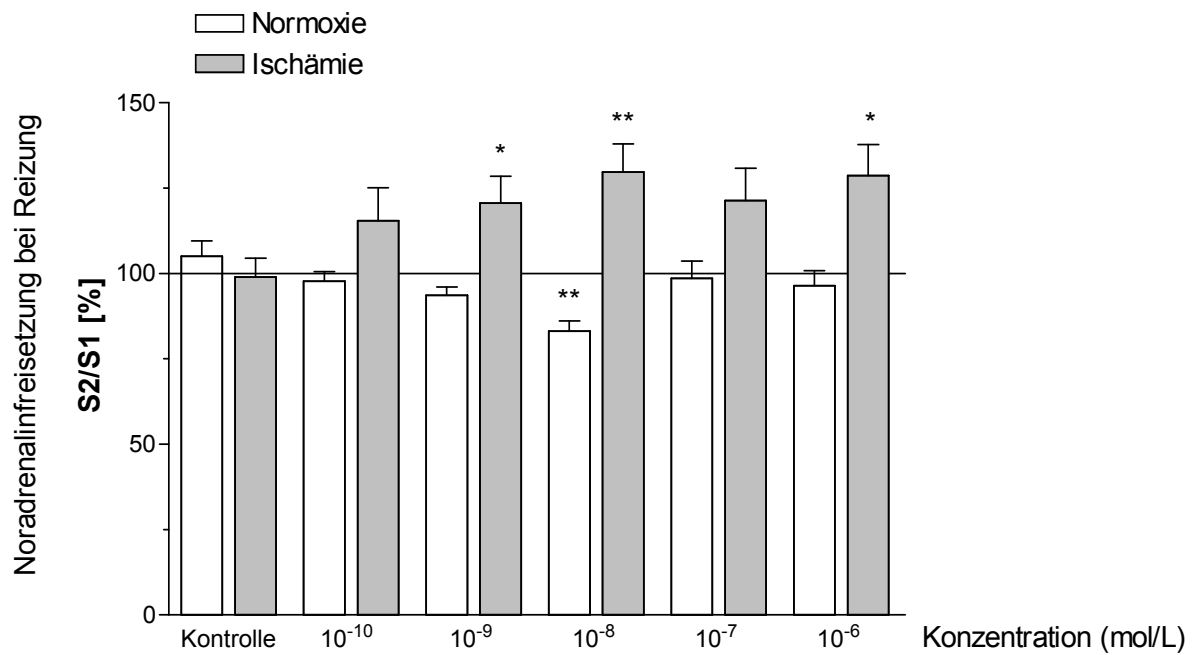


Abb. 7: Dosiswirkungskurve von Ramiprilat:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Ramiprilat in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 nmol/L und 1 µmol/L. Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten ± SEM in %, n=4-8, *p<0,05 vs. S1, **p<0,01 vs. S1.

3.4 Dosiswirkungskurven der AT1-Rezeptor-Antagonisten

Nachfolgend werden von den AT1-Rezeptor-Antagonisten Candesartan, Eprosartan und EXP 3174 Dosiswirkungskurven erstellt, wobei die Wirkstoffe jeweils in den Konzentrationen 1, 10 und 100 nmol/L getestet wurden. In jeweils einer Dosis zeigten sich bei ischämischen Bedingungen signifikante Steigerungen der Noradrenalinausschüttung nach Stimulation. Der Kurvenverlauf unter der ischämischen Versuchsanordnung erscheint dabei in der Untersuchung von Candesartan dosisabhängig ansteigend, bei Eprosartan und EXP 3174 wird eher eine Glockenform beschrieben.

In Normoxie hat lediglich EXP 3174 in einer Dosis einen signifikanten Einfluß auf die Noradrenalinexkretion.

3.4.1 Dosiswirkungskurve von Candesartan

Candesartan hatte in der normoxischen Versuchsanordnung keinen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung, bei Ischämie wurde eine dosisabhängig zunehmende Steigerung der Transmitterausschüttung mit einem signifikanten Wert bei 100 nmol/l (S1 175±16 pmol/g, S2 220±27 pmol/g, S2/S1: 127±11%, n=8, p=0,039) ermittelt (s. Abb. 8).

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 1nmol/L: S1 136±10 pmol/g, S2 139±21 pmol/g, S2/S1: 101±11%, n=8;
10 nmol/L: S1 153±16 pmol/g, S2 170±6 pmol/g, S2/S1: 113±7%, n=8; 100 nmol:
S1 145±16 pmol/g, S2 153±24 pmol/g, S2/S1: 104±6%, n=8.

Ischämie 1 nmol/L: S1 68±7 pmol/g, S2 106±5 pmol/g, S2/S1: 106±14%, n=8; 10
nmol/L: S1 91±13 pmol/g, S2 100±13 pmol/g, S2/S1: 17±11%, n=8.

Kontrollen s. 3.1.

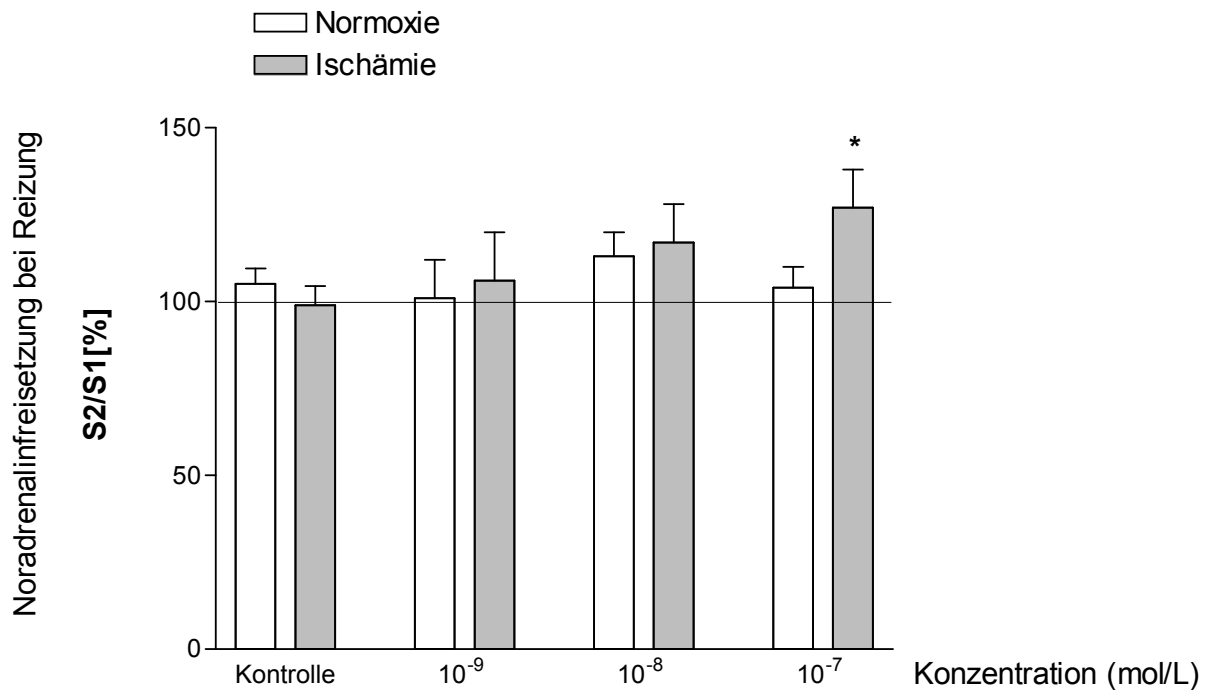


Abb. 8: Dosiswirkungskurve von Candesartan:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Candesartan in den Konzentrationen 1,10, und 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=8, *p < 0,05 vs. S1.

3.4.2 Dosiswirkungskurve von Eprosartan

Eprosartan verhielt sich in Normoxie neutral, d.h. ohne jeglichen Einfluß auf die Noradrenalinausschüttung. Unter ischämischen Bedingungen bewirkte Eprosartan einen angedeutet glockenförmigen Kurvenverlauf mit einer signifikanten Freisetzungssteigerung von Noradrenalin bei einer Konzentration von 10 nmol/L (S1 123±23 pmol/g, S2 154±28 pmol/g, S2/S1: 126±7%, n=8, p=0,008). (s. Abb. 9).

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 1 nmol/L: S1 328±17 pmol/g, S2 319±31 pmol/g, S2/S1: 97±4%, n=4; 10 nmol/L: S1 325±41 pmol/g, S2 327±44 pmol/g, S2/S1: 100±2%, n=3; 100 nmol/L: S1 17±14 pmol/g, S2 193±5 pmol/g, S2/S1: 100±5%, n=8.

Ischämie 1 nmol/L: S1 149±25 pmol/g, S2 155±20 pmol/g, S2/S1: 106±6%, n=3; 100 nmol/L: S1 87±11 pmol/g, S2 80±8 pmol/g, S2/S1: 97±13%, n=6.

Kontrollen s. 3.1.

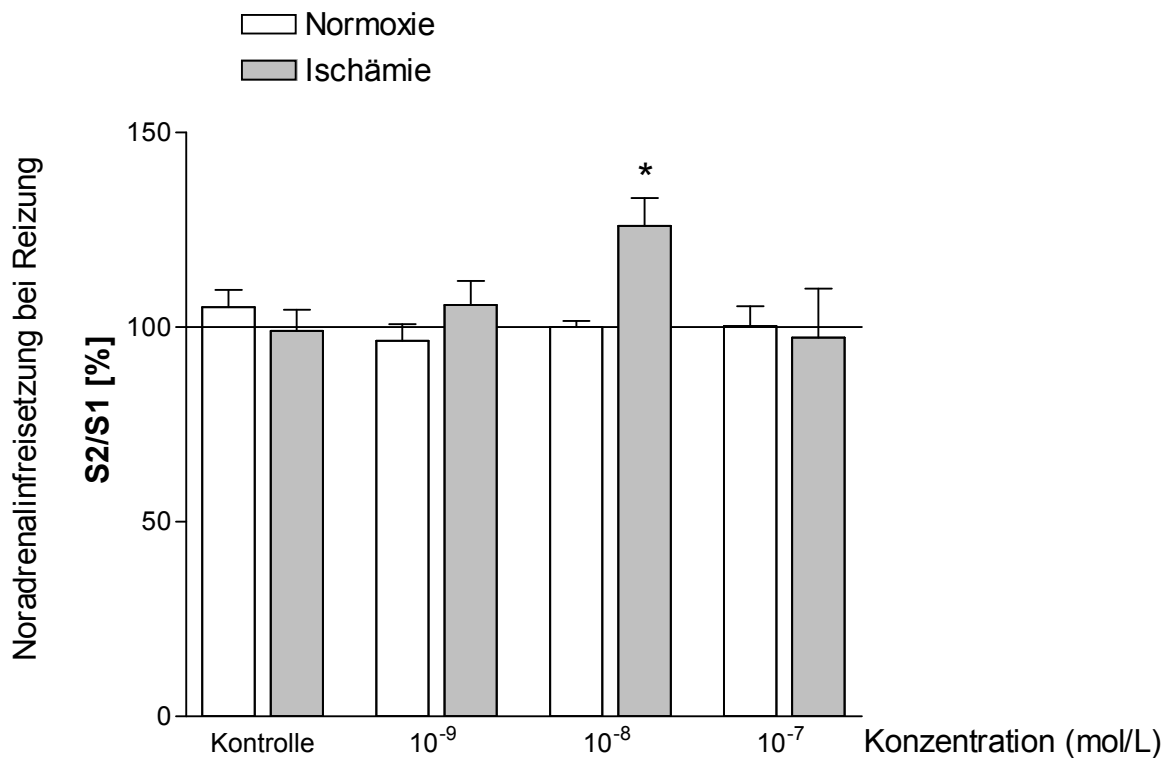


Abb. 9: Dosiswirkungskurve von Eprosartan:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Eprosartan in den Konzentrationen 1,10, und 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=3-8, *p< 0,05 vs. S1.

3.4.3 Dosiswirkungskurve von EXP 3174

Bei der Untersuchung von EXP 3174 zeigte sich eine leichte, aber signifikante Suppression der kardialen Noradrenalinfreisetzung bei einer Konzentration von 10 nmol/L in Normoxie (S1 305±45 pmol/g, S2 257±29 pmol/g, S2/S1: 90±5%, n=10, p= 0,024). Bei Ischämie zeigte sich eine deutlich verstärkte, aber nicht signifikante Transmitterfreisetzung bei einer Konzentration von 10 nmol/L (S1 126±22 pmol/g, S2 152±22 pmol/g, S2/S1: 124±9%, n=9, p= 0,030). Auch hier beschrieben die ischämischen Versuche hinsichtlich der dosisabhängigen Wirkung einen angedeutet glockenförmigen Verlauf. (s. Abb. 10)

Für die übrigen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 1 nmol/L: S1 415±36 pmol/g, S2 385±31 pmol/g, S2/S1: 93±3%, n=6;
100 nmol/L: S1 245±22 pmol/g, S2 240±18 pmol/g, S2/S1: 99±3%, n=4.

Ischämie 1 nmol/L: S1 118±16 pmol/g, S2 135±16 pmol/g , S2/S1: 115±8%, n=10;
100 nmol/L: S1 124±10 pmol/g, S2 143±19 pmol/g, S2/S1: 113±7%, n=8.

Kontrollen s. 3.1.

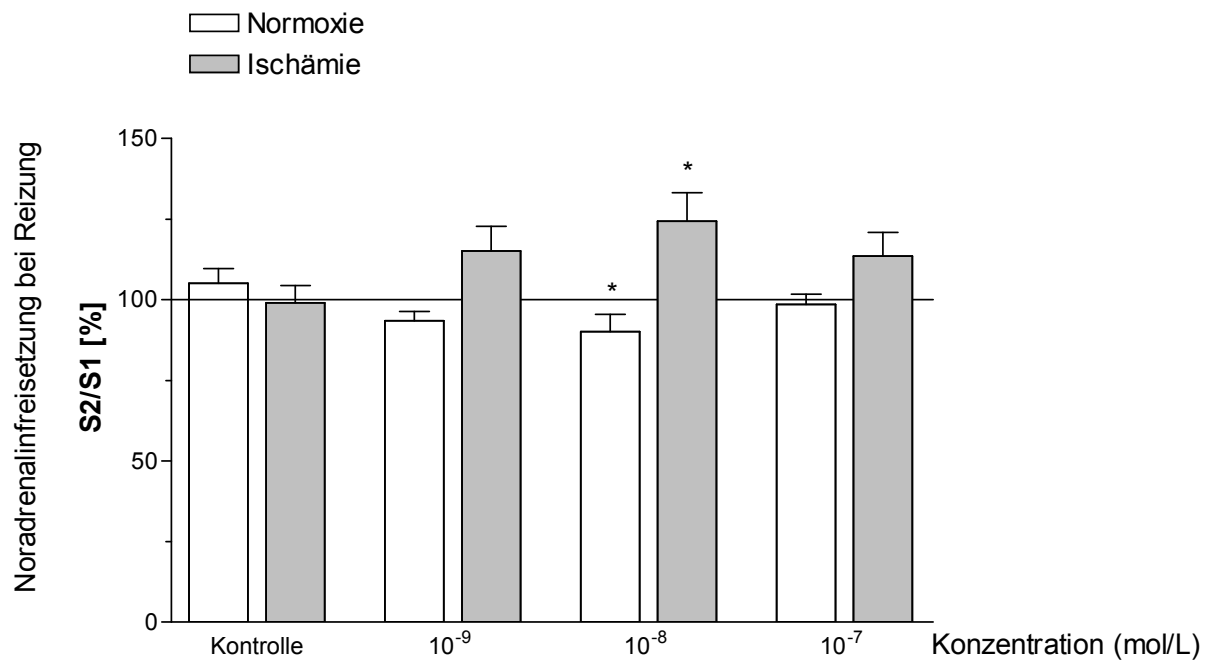


Abb. 10: Dosiswirkungskurve von EXP 3174:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und EXP 3174 in den Konzentrationen 1,10, und 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=4-10, *p < 0,05 vs. S1.

3.5 Kontrollversuche

Der AT2-Rezeptor-Antagonisten PD 123 319, der selektive Bradykinin-Typ2-Rezeptor-Antagonist HOE 140 sowie der spezifischer Aminopeptidase-P-Hemmer Apstatin wurden vor der Kombination mit ACE-Hemmern bzw. AT1-Rezeptor-Antagonisten (s.u.) hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Wirkungen bei Normoxie und Ischämie bzw. im Vergleich zu Kontrollherzen getestet.

3.5.1 Dosiswirkungskurve von PD 123319

Der AT2-Rezeptor-Antagonisten PD 123 319 wurde in den Konzentrationen 10 und 100 nmol/L sowie 1 μ mol/L sowohl unter normoxischen als auch ischämischen Bedingungen untersucht. Eine signifikante Veränderung der Noradrenalinfreisetzung wurde nicht gefunden. (s. Abb. 11)

Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 10 nmol/L: S1 283 ± 23 pmol/g, S2 274 ± 19 pmol/g, S2/S1: $97 \pm 3\%$, n=4;
100 nmol/L: S1 254 ± 32 pmol/g, S2 245 ± 27 pmol/g, S2/S1: $97 \pm 3\%$, n=4; 1 μ mol/L:
S1 289 ± 52 pmol/g, S2 257 ± 42 pmol/g, S2/S1: $94 \pm 6\%$, n=8.

Ischämie 10 nmol/L: S1 174 ± 19 pmol/g, S2 156 ± 24 pmol/g, S2/S1: $89 \pm 8\%$, n=5;
100 nmol/L: S1 145 ± 30 pmol/g, S2 142 ± 26 pmol/g, S2/S1: $103 \pm 6\%$, n=7; 1 μ mol/L:
S1 144 ± 9 pmol/g, S2 174 ± 20 pmol/g, S2/S1: $121 \pm 12\%$, n=8.

Kontrollen s. 3.1.

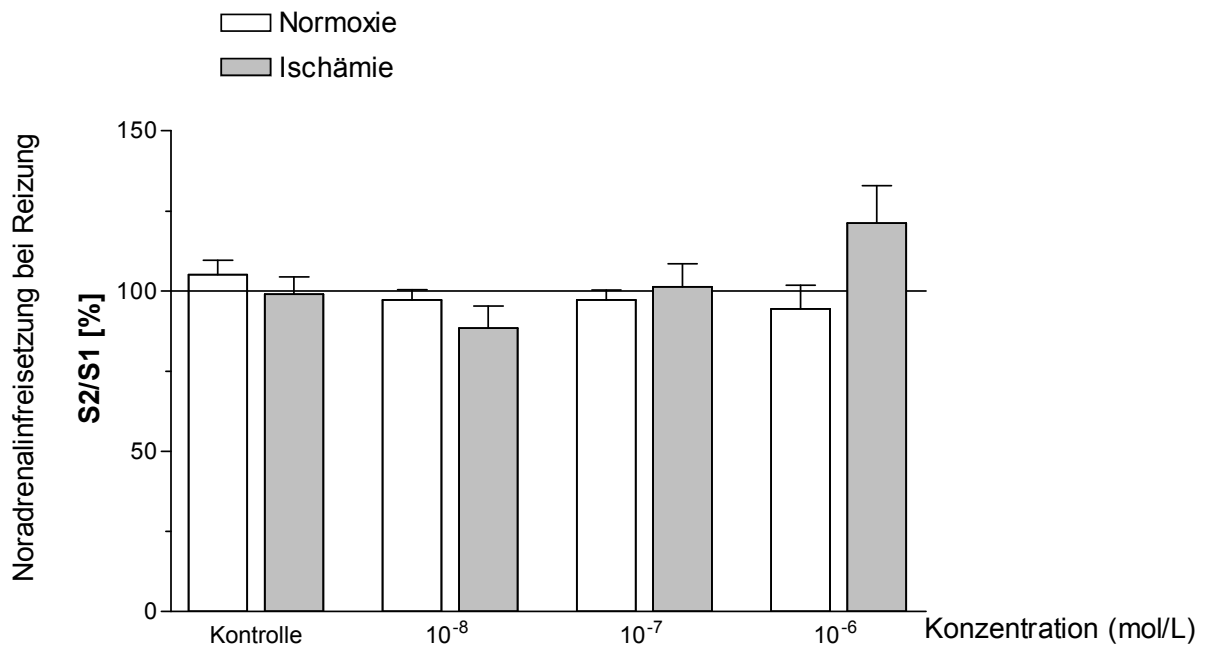


Abb. 11: Dosiswirkungskurve von PD 123319:

Noradrenalinausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und PD 123319 in den Konzentrationen 10 und 100 nmol/L sowie 1 µmol/L. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten ± SEM in %, n=4-8.

3.5.2 Kontrollversuch mit HOE 140

Der B2- Rezeptor-Antagonisten HOE 140 wurde in dem nachfolgend aufgeführten Versuch in der Konzentration 100 nmol/L verwendet. Sowohl unter normoxischen als auch unter ischämischen Bedingungen hatte HOE 140 im Vergleich zu Kontrollversuchen keinen nachweisbaren Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung. (s. Abb.12)

Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Normoxie 100 nmol/L: S1 211±26 pmol/g, S2 179±17 pmol/g, S2/S1: 108±13%, n=8.

Ischämie 100 nmol/L: S1 98±14 pmol/g, S2 114±15 pmol/g, S2/S1: 123±17%, n=8.

Kontrollen s. 3.1.

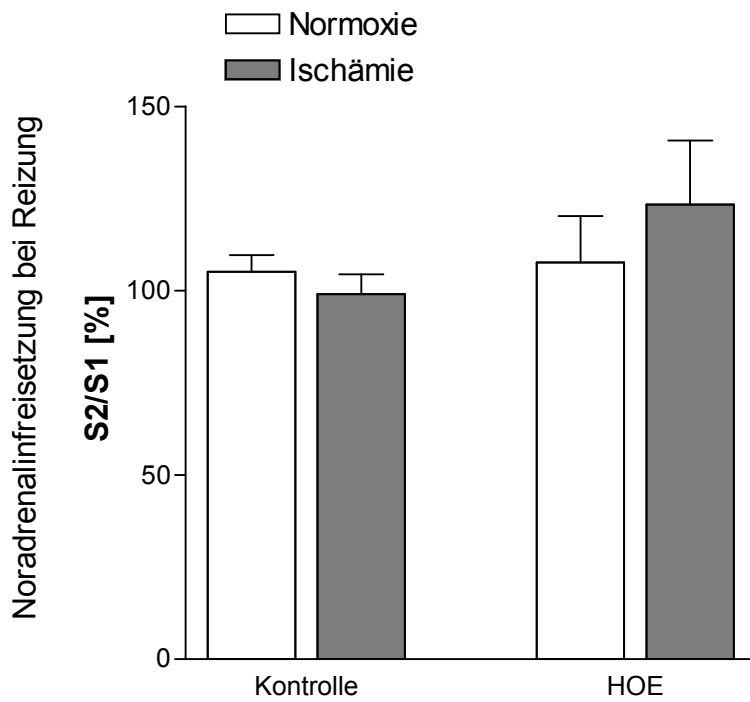


Abb. 12: Kontrollversuch mit HOE 140:

Noradrenalin ausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und HOE 140 in der Konzentration 100 nmol/L. Die exozytische Noradrenalin freisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=8.

3.5.3 Kontrollversuch mit Apstatin

In weiteren Versuchen wurde der selektive Aminopeptidase-P-Hemmer Apstatin in der Konzentration 0,1 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Im zunächst durchgeführten Vergleich zu Kontrollherzen konnte durch Apstatin in Normoxie kein Einfluß auf die Noradrenalinexkretion festgestellt werden (S1 260 \pm 62 pmol/g, S2 231 \pm 68 pmol/g, S2/S1: 101 \pm 6%, n=6). Unter ischämischen Bedingungen zeigte sich hingegen eine signifikante Ausschüttungssteigerung (S1 158 \pm 11 pmol/g, S2 205 \pm 0 pmol/g, S2/S1: 131 \pm 11%, n=6, p= 0,0,37). (s. Abb. 13).

Kontrollen s. 3.1.

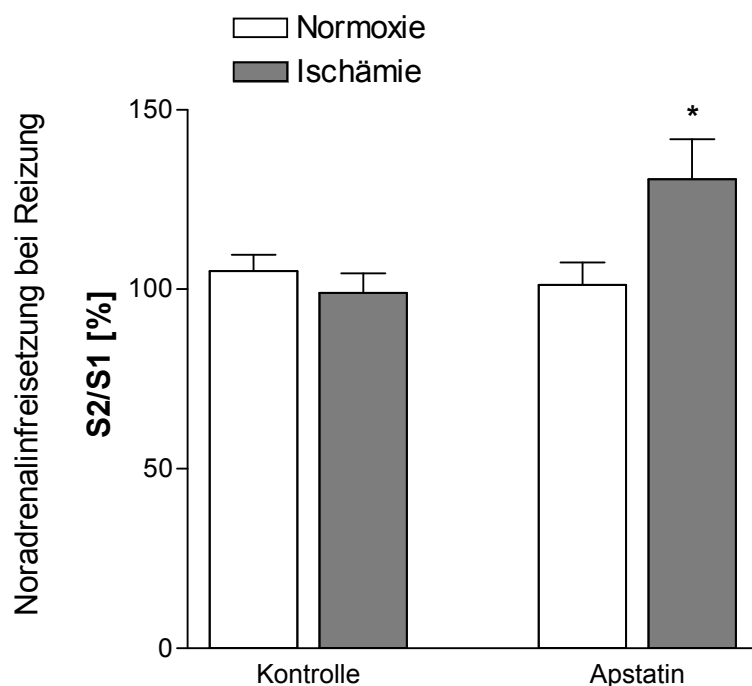


Abb. 13: Kontrollversuch mit Apstatin:

Noradrenalinausschüttung während Normoxie und Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Apstatin in der Konzentration 0,1 $\mu\text{mol/L}$. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=6, *p< 0,05 vs. S1.

3.6 Wirkstoffkombinationen

Um beurteilen zu können, über welchen Weg, Bradykinin- oder Angiotensin-abhängig, (s. auch Abb.1) es unter ischämischen Bedingungen zu der von ACE-Hemmern bzw. AT1-Rezeptor-Antagonisten gesteigerten Transmitterfreisetzung kommt, wurden in mehreren Versuchsreihen verschiedene Wirkstoffe miteinander kombiniert.

3.6.1 B2-Rezeptor-Blockade durch HOE 140

Der Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 (100 nmol/L) wurde unter ischämischen Konditionen sowohl mit dem ACE-Hemmer Ramiprilat (10 nmol/L) als auch vergleichend mit dem AT1-Rezeptor-Antagonist Candesartan (100 nmol/L) getestet. In beiden Fällen wurde die zuvor durch beide Agenzien bewirkte Steigerung der Noradrenalin ausschüttung (s. auch 3.2.1 und 3.3.1) vollständig blockiert.

Im Einzelnen ergaben sich hierbei folgende Werte:

3.6.1.1 Kombination Ramiprilat mit HOE 140:

Ramiprilat 10 nmol/L: S1 146 ± 12 pmol/g, S2 187 ± 14 pmol/g, S2/S1: $130 \pm 8\%$, n=8, $p= 0,008$.

HOE 140 100 nmol/L: S1 98 ± 14 pmol/g, S2 114 ± 15 pmol/g, S2/S1: $123 \pm 17\%$, n=8.

Ramiprilat 10 nmol/L mit HOE 140 100 nmol/L: S1 211 ± 33 pmol/g, S2 210 ± 36 pmol/g, S2/S1: $99 \pm 7\%$, n=9.

Kontrollen s. 3.1.

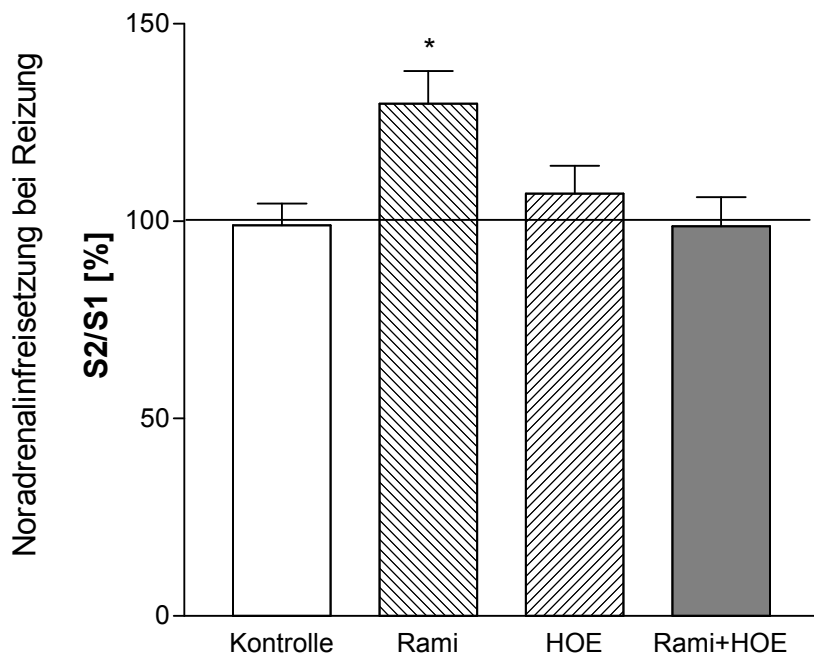


Abb. 14: Kombination Ramiprilat mit Hoe 140:

Noradrenalin ausschüttung während Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Ramiprilat in der Konzentration 10 nmol/L, HOE 140 in der Konzentration 100 nmol/L sowie Ramiprilat 10 nmol/L kombiniert mit HOE 140 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=8-9, *p< 0,05 vs. S1.

3.6.1.2 Kombination Candesartan mit HOE 140:

Candesartan 100 nmol/L: S1 175±16 pmol/g, S2 220±27 pmol/g, S2/S1: 127±11%, n=8, p=0,039.

HOE 140 100 nmol/L: S1 98±14 pmol/g, S2 114±15 pmol/g, S2/S1: 123±17%, n=8.

Candesartan 100 nmol/L mit HOE 140 100 nmol/L: S1 202±25 pmol/g, S2 207±40 pmol/g, S2/S1: 100±12%, n=7.

Kontrollen s. 3.1.

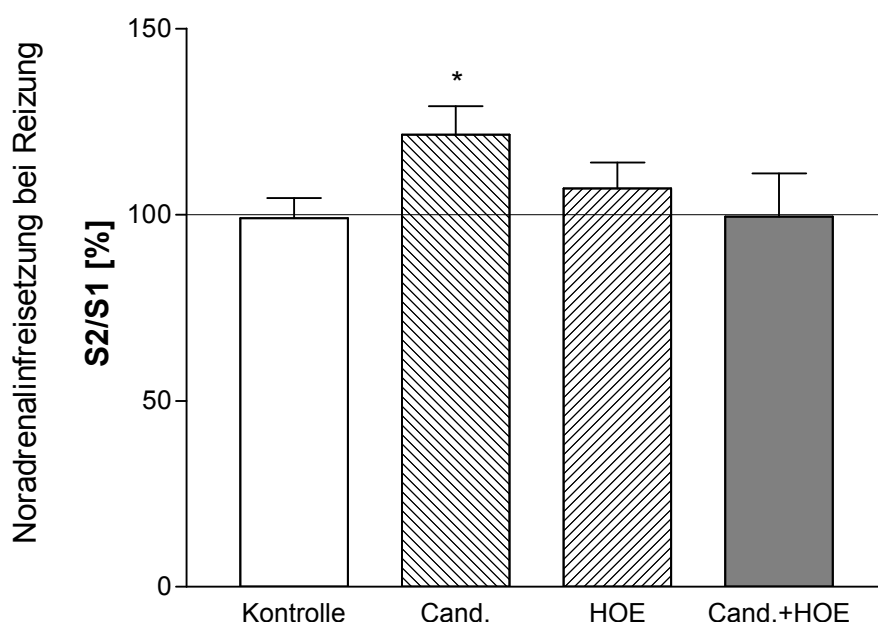


Abb. 15: Kombination Candesartan mit HOE 140:

Noradrenalin ausschüttung während Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Candesartan in der Konzentration 100 nmol/L, HOE 140 in der Konzentration 100 nmol/L sowie Candesartan 100 nmol/L kombiniert mit HOE 140 100 nmol/L. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten ± SEM in %, n=7-8, *p< 0,05 vs. S1.

3.6.2 AT2-Rezeptorblockade durch PD 123319

Candesartan bewirkt in der Konzentration von 100 nmol/L eine signifikante Steigerung der Noradrenalinexkretion (s. hierzu auch Abb.8). Dieser Effekt wird durch Hinzufügen des Bradykinin2-Antagonisten PD 123319 vollständig aufgehoben. PD 123319 selbst hat keinen Einfluß auf die Noradrenalinausschüttung. Die Versuche wurden unter ischämischen Bedingungen durchgeführt.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Candesartan 100 nmol/L: S1 175±16 pmol/g, S2 220±27 pmol/g , S2/S1: 127±11%, n=8, p=0,039.

PD 123319 100 nmol/L: S1 145±30 pmol/g, S2 142±26 pmol/g, S2/S1: 103±6%, n=7.

Candesartan 100 nmol/L mit PD 123319 100 nmol/L: S1 138±11 pmol/g, S2 149±13 pmol/g, S2/S1: 108±2%, n=7, p=0,020.

Kontrollen s. 3.1.

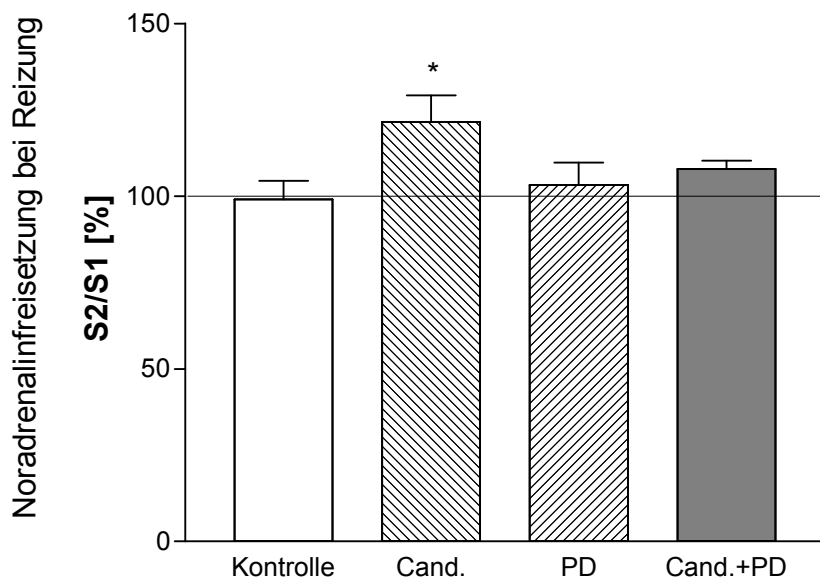


Abb. 16: Kombination Candesartan mit PD 123319:

Noradrenalin ausschüttung während Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Candesartan in der Konzentration 100 nmol/L, PD 123319 in der Konzentration 100 nmol/L sowie Candesartan 100 nmol/L kombiniert mit PD 123319 100 nmol/L.. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten \pm SEM in %, n=7-8, *p< 0,05 vs. S1.

3.6.3 Kombination Candesartan mit Apstatin

Wie zuvor gezeigt, bewirkt Candesartan in einer Konzentration von 100 nmol/L eine signifikante Noradrenalinausschüttung. (s. Abb. 8)

Auch der spezifische Aminopeptidase-P-Hemmer Apstatin führt in der Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ zu einer signifikanten Steigerung der Noradrenalinfreisetzung.

Bei der Kombination von Candesartan (100 nmol/L) mit Apstatin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) konnte allerdings nur eine Steigerung der Noradrenalinausschüttung festgestellt werden, die nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Alle Versuche wurden ebenfalls unter ischämischen Bedingungen durchgeführt.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Candesartan 100 nmol/L: S1 175 ± 16 pmol/g, S2 220 ± 27 pmol/g, S2/S1: $127 \pm 11\%$, n=8, p=0,039.

Apstatin 0,1 $\mu\text{mol/L}$: S1 158 ± 11 pmol/g, S2 205 ± 20 pmol/g, S2/S1 $131 \pm 11\%$, n=6, p=0,037.

Candesartan 100 nmol/L mit Apstatin 0,1 $\mu\text{mol/L}$: S1 62 ± 7 pmol/g, S2 71 ± 7 pmol/g, S2/S1 $117 \pm 7\%$, n=8.

Kontrollen s. 3.1.

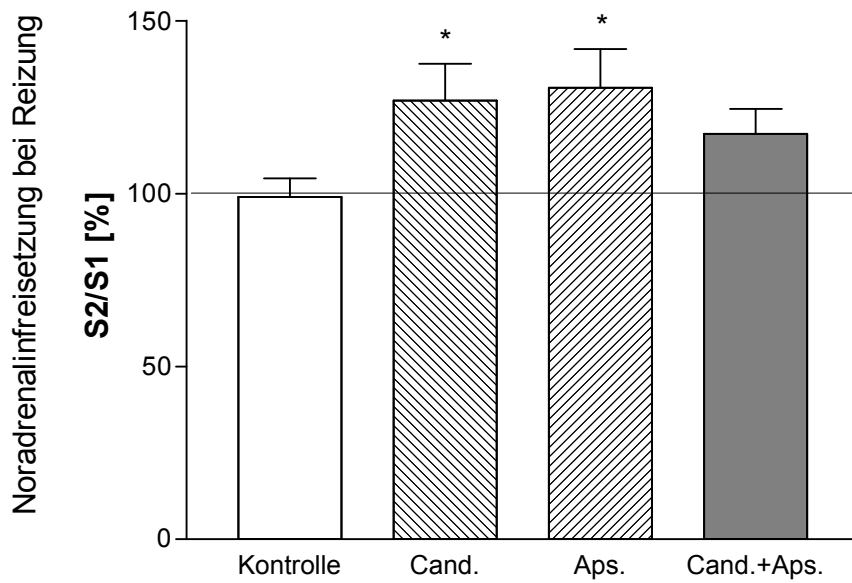


Abb. 17: Kombination Candesartan mit Apstatin:

Noradrenalin ausschüttung während Ischämie unter Kontrollbedingungen (Kontrolle s. 3.1) und Candesartan in der Konzentration 100 nmol/L, Apstatin in der Konzentration 0,1 µmol/L sowie Candesartan 100 nmol/L kombiniert mit Apstatin 0,1 µmol/L.. Die exozytotische Noradrenalinfreisetzung wurde durch elektrische Feldstimulation vor (S1) und nach (S2) Medikamentengabe ausgelöst. Die Werte sind dargestellt in Form der mittleren S2/S1-Quotienten ± SEM in %, n=6-8, *p< 0,05 vs. S1.

4 Diskussion

In dieser experimentellen Studie am isolierten Rattenherzen wurden ausgewählte ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten hinsichtlich ihrer Effekte auf die kardiale Noradrenalinausschüttung bei Normoxie und Ischämie untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich beide Wirkstoffgruppen qualitativ nicht unterscheiden.

Bei kontinuierlichem Perfusionsfluß (Normoxie) und ohne Einwirkung exogener Agonisten hatten sowohl ACE-Inhibitoren als auch AT1-Blocker einen nahezu neutralen Effekt auf die kardiale Noradrenalinfreisetzung.

Unter ischämischen Bedingungen bewirkten beide Substanzklassen, ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten, einen Anstieg der Noradrenalinfreisetzung.

Es gibt eine intensive Debatte über mögliche differentielle kardiovaskuläre und renale Wirkungen der ACE-Inhibitoren und AT1-Antagonisten. Unterschiede zwischen beiden Wirkstoffgruppen finden sich möglicherweise im pharmakologischen Profil: Bei den ACE-Hemmern scheint die Bradykininpotenzierung, bei den AT1-Rezeptor-Antagonisten eine effektivere Angiotensinblockade ursächlich zu sein.

Bereits in vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass unter normoxischen Bedingungen und unbeeinflusster Perfusion ein endogener Einfluß von Bradykinin und Angiotensin auf die Noradrenalinausschüttung besteht (Rump et al., 1997). Das Renin-Angiotensin-System wird bekanntermaßen bei akuter Ischämie stimuliert, woraus eine vermehrte Angiotensinbildung resultiert. Entsprechend müßte durch ACE-Hemmung die Noradrenalinfreisetzung verringert werden, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gefunden wurde. Die tatsächlich gesteigerte Transmitterfreisetzung ließ sich durch eine unter ischämischen Bedingungen vorherrschende und durch ACE-Hemmung potenzierte Bradykininbildung erklären. Ein durch exogenes Bradykinin provozierter, konzentrationsabhängiger

Noradrenalinanstieg konnte bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden (Kurz et al., 1997). Der durch ACE-Inhibition ausgelöste Effekt von endogenem Bradykinin in der Ischämie ließ sich durch den Bradykinin-2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 aufheben. Zuvor war ein Eigeneffekt von HOE 140 ausgeschlossen worden.

Auch die untersuchten AT1-Rezeptor-Blocker Candesartan und Eprosartan bewirkten unter ischämischen Bedingungen einen Anstieg der Noradrenalinfreisetzung. Das Ausmaß der Steigerung war mit dem der ACE-Hemmer vergleichbar, und auch im Fall der AT-1-Blocker ließ sich die Wirkung durch den Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 aufheben und ist damit Bradykinin-abhängig. Dieser Bradykinin-vermittelte Effekt der AT1-Blocker lässt sich am ehesten auf eine Aktivierung der AT2-Rezeptoren zurückführen. Entsprechend konnte der Noradrenalinanstieg auch durch den AT2-Rezeptor-Antagonisten PD 123 319 aufgehoben werden. Übereinstimmend damit wurde 1997 von *Liu et al.* berichtet, dass AT1-Rezeptor-Antagonisten eine Aktivierung des AT2-Rezeptors aufgrund erhöhter Angiotensinlevel bewirken, was schließlich zu einer Bradykininbildung führt.

Auch im experimentellen Myokardinfarkt wurde durch AT1-Rezeptor-Antagonisten eine kardioprotektive Wirkung hervorgerufen. Dieser Effekt wurde auf einen erhöhten Angiotensin Spiegel mit konsekutiver Aktivierung des AT2-Rezeptors zurückgeführt, wodurch letztlich vermehrt Bradykinin entsteht (Jalowy et al., '98).

Theoretisch betrachtet, sind die vorliegenden Ergebnisse nicht notwendigerweise auf einen erhöhten Bradykinin Spiegel unter ACE-Inhibitoren oder AT1-Blockern zurückzuführen. Es ist ebenso denkbar, dass ischämische Bedingungen eine Sensibilisierung der präjunktionalen Rezeptoren für Bradykinin hervorrufen. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte aber durch Verwendung exogen hinzugeführten Bradykinins und Angiotensins dokumentiert werden, dass die präsynaptische Antwort, also die Noradrenalinfreisetzung, durch ischämische Bedingungen nicht beeinflusst wird (Münch et al., 1996; Grimm et al., 2001). Gleiches ließ sich auch für die enzymatische Aktivität von ACE feststellen, die

ebenfalls unter ischämischen Verhältnissen unbeeinträchtigt blieb. Darüber hinaus wurde kürzlich beobachtet, dass die intrakoronare Applikation eines ACE-Hemmers bei Patienten mit mechanischer Rekanalisation im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts eine gesteigerte kardiale Bradykininfreisetzung bewirkt (Kurz et al., 2001).

Der Noradrenalin-freisetzende Effekt der ACE-Hemmer und der AT1-Rezeptor-Antagonisten war bei den meisten untersuchten Substanzen moderat mit ca. 130% gegenüber dem Ausgangswert an. Dabei fanden sich für die meisten Agenzien keine konzentrationsabhängigen Dosis-Wirkungskurven, sondern eher eine glockenförmig konfigurierte Kurve, was ein Hinweis auf überlappende, gegensätzliche Einflüsse auf die Noradrenalinfreisetzung sein kann. Gesteigerte Noradrenalinausschüttungen wurden dabei aber unter Wirkstoffkonzentrationen beobachtet, die sich im Bereich therapeutischer Plasmalevel bei Patienten bewegen. Außerdem könnten auch schon geringe Veränderungen der kardialen Noradrenalinfreisetzung eine erhebliche Auswirkung in der Kaskade der sympathischen Neurotransmission haben.

Obwohl voneinander differierende, präjunktionale Wirkungen von ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten bereits beobachtet wurden (Balt et al., 2001), konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen ACE-Hemmern und AT1-Blockern festgestellt werden. Lediglich unter Quinaprilat, von dem eine besondere Affinität zum lokalen RAS vermutet wird, zeigte sich unter ischämischen Bedingungen nur ein geringer Nordrenalin-freisetzender Effekt.

Unter längeren Ischämieperioden oder in in-vivo-Modellen mit aktiven kardiovaskulären Reaktionen mögen sich allerdings Unterschiede zwischen ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten aufzeigen lassen (Mulligan et al., 1989; Maruyama et al., 2000).

Berücksichtigt man, dass eine kardiale Noradrenalinfreisetzung das Auftreten maligner Arrhythmien begünstigt (Meredith et al., 1991) und dass kurze Ischämieperioden bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung wiederholt beobachtet wurden, erhalten die Ergebnisse dieser Arbeit eine besondere klinische Bedeutung.

Obwohl auf Grundlage der Ergebnisse erster vergleichender, klinischer Studien ein Unterschied zwischen ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten auf voneinander abweichende präjunktionale Wirkungen zurückgeführt wurde, kann diese Theorie anhand der vorliegenden Arbeit nicht gehalten werden. Hinsichtlich der präsynaptischen Modulation der kardialen Noradrenalinexkretion lässt sich zwischen den beiden Wirkstoffgruppen kein Unterschied feststellen.

Insgesamt muß damit von einem gleichartigen Effekt von ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten auf die Noradrenalinausschüttung ausgegangen werden. Dies ist auch im Einklang mit späteren großen klinischen Studien.

Die bereits eingangs erwähnte HOPE-Studie (s.S. 10) deren Ergebnisse im Januar 2000 veröffentlicht wurden, konnte den Stellenwert der ACE-Hemmer in der Behandlung kardiovaskulärer Risikopatienten verdeutlichen. Beinahe zeitgleich wurden die Ergebnisse der ELITE-II-Studie präsentiert, in der der Einfluß von Losartan vs. Captopril (also AT1-Rezeptor-Antagonist vs. ACE-Hemmer) auf die Mortalität bei herzinsuffizienten Patienten verglichen wurde (Yusuf et al., 2000). Hinsichtlich des primären Endpunktes der Gesamtmortalität sowie der sekundären Endpunkte wie z.B. Krankenhauseinweisungen konnte keine Überlegenheit einer der beiden Wirkstoffe gefunden werden.

In 2003 folgte die VALIANT-Studie. Auch hier wurden AT1-Rezeptor-Antagonisten (Valsartan) und ACE-Hemmer (Captopril) direkt miteinander verglichen. Die Präparate wurden nach akutem Herzinfarkt bei Patienten mit Zeichen der Herzinsuffizienz verabreicht; Beobachtungszeitraum waren 24,7 Monate. In der dritten parallel untersuchten Gruppe wurden sowohl Captopril als auch Valsartan eingenommen. Zwischen allen drei Therapiegruppen zeigten sich bzgl. der Gesamtmortalität keine Unterschiede, und auch eine Überlegenheit des ACE-

Hemmers bzw. umgekehrt des AT1-Rezeptor-Antagonisten gegenüber dem jeweils anderen Präparat konnte nicht nachgewiesen werden. Unter der Kombinationsbehandlung mit beiden Wirkstoffen erhöhte sich hingegen die Rate unerwünschter Ereignisse, ohne dass sich die Überlebensrate im Vergleich zu den Parallelgruppen verbesserte (Pfeffer et al., 2003).

Der ausbleibende potenzierende Effekt durch gleichzeitige Gabe eines ACE-Hemmers und eines AT1-Rezeptor-Blockers (Candesartan) wurde auch in einem Untersuchungsarm der CHARM-Studie (Yusuf et al., 2003) gezeigt. In dieser großangelegten Arbeit wurde der Einfluß von Candesartan auf die Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz über einen Gesamtzeitraum von 37,7 Monaten beobachtet. In drei Substudien wurden dabei Patienten untersucht, die a) eine Ejektionsfraktion (EF) $\leq 40\%$ hatten und mit einem ACE-Hemmer anbehandelt waren, b) eine EF $\leq 40\%$ und eine ACE-Hemmer-Unverträglichkeit hatten oder c) Patienten mit einer EF $\geq 40\%$. Insgesamt zeigte Candesartan hinsichtlich des primären Endpunktes der Gesamtmortalität gegenüber alternativen Therapiegruppen keine Überlegenheit. Eine Kombination von ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten blieb auch bei dieser Untersuchung bzgl. der Gesamtmortalität ohne signifikante Auswirkung.

Eine der aktuellsten Arbeiten (ONTARGET, Mann et al., 2008) bestätigte den ausbleibenden potenzierenden Effekt einer gleichzeitigen Gabe von ACE-Hemmer (Ramipril) und AT1-Rezeptor-Antagonisten (Telmisartan), konnte aber bei nahezu gleicher blutdrucksenkender Wirkung eine bessere Verträglichkeit des AT1-Rezeptor-Blockers nachweisen. Angioödeme und Husten traten deutlich seltener auf als unter Ramipril.

4.1 Die Rolle von Aminopeptidase P in der Bradykinin-vermittelten Kardioprotektion

Wie sich anhand der vorliegenden Ergebnisse darstellen ließ, scheint die Potenzierung des endogen gebildeten Bradykinin hinsichtlich der Kardioprotektion

eine zentrale Rolle zu spielen. Neben der Steigerung des Bradykininlevels durch Gabe von ACE-Inhibitoren oder AT1-Rezeptor-Antagonisten bleibt die Möglichkeit der gezielten Hemmung des Bradykininmetabolismus durch den selektiven Aminopeptidase-P-Blocker Apstatin.

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass Apstatin die Bradykininwirkung auf den untersuchten Blutdruck verdoppelte (Kitamura et al., 1995). Auch der Effekt des hierbei verwendeten ACE-Hemmers Lisinopril wurde eindeutig gesteigert.

In nachfolgenden Studien konnte ein antiarrhythmischer und damit kardioprotektiver Effekt von Apstatin eruiert werden, der durch den B2-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben und damit als Bradykinin-vermittelt identifiziert wurde (Ersahin et al., 1999; Wolfrum et al., 2001). Eine Kombination des Aminopeptidase-P-Hemmers mit einem ACE-Hemmer konnte die im In-vivo-Modell untersuchte Größe des experimentellen Myocardinfarkts nochmals verkleinern (Veeravalli et al., 2003), wobei hier nach neuesten Erkenntnissen auch Stickoxid (NO) und Prostaglandine eine entscheidende Rolle spielen können (Veeravalli et al., 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Apstatin in Kombination mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Candesartan untersucht. Während Apstatin allein und auch Candesartan allein die Noradrenalinfreisetzung wie erwartet steigerten, ließ sich durch Hinzufügen von Candesartan zu Apstatin nur eine geringfügige, nicht signifikante Ausschüttungspotenzierung beobachten (s. Abb. 3.5.4). Anhand unserer Untersuchungen können wir keine Erklärungen für dieses unerwartete Ergebnis anbieten.

4.2 Perspektiven

Neben der weiteren Erforschung des Zusammenspiels von Angiotensin, Bradykinin und den jeweiligen Rezeptoren gewinnt seit wenigen Jahren auch der neu entwickelte Renin-Antagonist Aliskiren an Bedeutung.

Mit der Renin-Blockade durch Aliskiren wird bereits an einem sehr frühen Punkt in die RAS-Kaskade eingegriffen. In klinischen Arbeiten zeigte Aliskiren bei Patienten mit moderatem Bluthochdruck eine vergleichbare Wirkung mit Irbesartan (Gradman et al., 2005). Nachfolgende Untersuchungen zeigten auf, dass Aliskiren nicht nur, so wie beispielsweise auch Irbesartan, den systolischen Blutdruck, sondern darüberhinaus auch die Plasma-Renin-Aktivität senkte. Die Plasma-Renin-Konzentration hingegen stieg dosisabhängig an. Unter Irbesartan zeigte sich ebenfalls eine Reduktion des systolischen Blutdrucks, die Plasma-Renin-Aktivität wurde jedoch genauso gesteigert wie die Plasma-Renin-Konzentration (Nussberger et al., 2007). Die Plasma-Renin-Aktivität wird dabei als ein Maß für die Kapazität der Angiotensin-I-Bildung verstanden und kann damit als Effizienzkontrolle der antihypertensiven Wirkstoffe herangezogen werden.

Bei Patienten mit Hypertension und linksventrikulärer Hypertrophie wiesen Aliskiren und Losartan eine vergleichbare Wirkung mit Reduktion der Blutdruckwerte und der linksventrikulären Herzmasse auf. Interessanterweise konnte auch hier kein additiver Effekt durch Kombination der beiden Antihypertensiva erzielt werden (ALLAY-Studie: Solomon et al., 2009).

Die einzelnen Komponenten der RAS-Kaskade bleiben also weiterhin Grundlage intensiver Untersuchungen. Dabei gilt es, nicht nur das Zusammenspiel der jeweiligen Wirkstoffe, sondern auch die Wege der Signalübertragung und möglicherweise auch die Gewebeunterschiede zu berücksichtigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte am isolierten Rattenherzen gezeigt werden, dass sich ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten hinsichtlich ihrer Wirkung auf die kardiale Noradrenalinfreisetzung weder in Normoxie noch in Ischämie qualitativ unterscheiden. In Normoxie bleibt die Wirkung jeweils neutral, in Ischämie hingegen zeigte sich in allen Versuchen eine deutliche Steigerung der Transmitterausschüttung. Dieser Effekt war sowohl bei den ACE-Hemmern als auch bei den AT1-Blockern Bradykinin-vermittelt. Die Bradykinin-Potenzierung durch AT1-Antagonisten ist wahrscheinlich AT2-Rezeptor-vermittelt.

6 Literaturverzeichnis

Balt JC, Mathy MJ, Nap A, Pfaffendorf M, van Zwieten PA (2001): Effect of the AT1-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery.

J Cardiovasc Pharmacol **38**(1): 141-8

Baumgarten CR, Linz WL, Kunkel G, Schölkens BA, Wiemer G (1993): Ramiprilat increases bradykinin overflow from isolated hearts of rat.

Br J Pharmacol **108**: 293-295

Brasch H, Sieroslowski L, Dominiak P (1993): Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors.

Hypertension **22**: 699-704

Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, deFaire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group (2002): Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol.

Lancet **359** (9311): 995-1003

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000): International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.

Pharmacol Rev; **52**:415

Dostal DE, Baker KM (1999): The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function?

Circ Res **85**(7):643-50. Review

Dzau VJ, Re RN (1987): Evidence for the existence of renin in the heart.

Circulation **75**(1 Pt 2):1134-6.

Erşahin C, Euler DE, Simmons WH (1999): Cardioprotective effects of the aminopeptidase P inhibitor apstatin: studies on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart.

J Cardiovasc Pharmacol **34**(4):604-11

Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP (2005): Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients.

Circulation **111**(8):1012-8. Epub 2005 Feb 21

Grimm M, Kurz T, Schwarz M, Richardt D, Schäfer U, Katus HA, Richardt G (2001): Presynaptic regulation of cardiac norepinephrine release in ischemia.

J Cardiovasc Pharmacol **38**: 58-68

Jalowoy A, Schulz R, Dörge H, Behrends M, Heusch G (1998): Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs.

J Am Coll Cardiol **32**: 1787-1796

Kitamura S, Carbini LA, Carretero OA, Simmons WH, Scicli AG (1995): Potentiation by aminopeptidase P of blood pressure response to bradykinin.

Br J Pharmacol **114** (1): 6-7

Kurz T, Schäfer U, Dendorfer A, Hartmann F, Raasch W, Tölg R, Remppis A, Giannitsis E, Dominiak P, Katus HA, Richardt G (2001): Effects of intracoronary low-dose enalaprilat as an adjunct to primary percutaneous transluminal coronary angiography in acute myocardial infarction.

Am J Cardiol **88**(12): 1351-7

Kurz T, Tölg R, Richardt G (1997): Bradykinin-B2-receptor-mediated stimulation of exocytotic norepinephrine release from cardiac sympathetic neurons.

J Mol Cell Cardiol **29**: 2561-2569

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.

Arch. Ges. Physiol. **61**: 291-332

Lavoie JL, Sigmund CD (2003): Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system.

Endocrinology **144**(6):2179-83. Review

Lindpaintner K, Wilhelm MJ, Jin M, Unger T, Lang RE, Schoelkens BA, Ganten D (1987): Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart.

J Hypertens Suppl **5**(2):S33-8.

Linz W, Martorana PA, Schölkens BA (1990): Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts.

J Cardiovasc Pharmacol. **15 Suppl 6**:S99-109

Linz W, Wiemer G, Schölkens BA (1996): Role of kinins in the pathophysiology of myocardial ischemia. In vitro and in vivo studies.

Diabetes **45 Suppl 1**:S51-8. Review

Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HH, Peterson E, Carretero OA (1997): Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rat with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors.

J Clin Invest **99**: 1926-1935

Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaitiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S (2008): Renal outcomes

with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial.

Lancet **372**(9638):547-53

Maruyama R, Hatta E, Yasuda K, Smith NCE, Levi R (2000): Angiotensin-converting enzyme-independent angiotensin formation in a human model of myocardial ischemia: Modulation of norepinephrine release by angiotensin type 1 and angiotensin type 2 receptors.

J Pharmacol Exp Ther **294**: 248-254

Meredith IT, Broughton A, Jennings GL, Esler MD (1991): Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias.

N Engl J Med **325**(9):618-24

Meredith I, Eisenhofer G, Lambert G, Dewar E, Jennings G, Esler M (1993): Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake.

Circulation **88**: 136-145

Montani JP, van Vliet BN (2004): General Physiology and Pathophysiology of the Renin-Angiotensin System.

In: Unger T, Schoelkens BA (eds) Angiotensin Vol. I, 1st edn. Springer, Berlin Heidelberg New York

Handbook of experimental pharmacology, vol **163/I**, pp 4-7

Münch G, Kurz T, Urlbauer T, Seyfarth M, Richardt G (1996): Differential presynaptic modulation of norepinephrine release in human atrial tissue in normoxia and anoxia.

Br J Pharmacol **118**: 1855-1861

Mulligan IP, Fraser AG, Lewis MJ, Henderson AH (1989): Effects of enalapril on myocardial noradrenaline overflow during exercise in patients with chronic heart failure.

Br Heart J **61**: 23-28

Nussberger J, Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Chiang Y, Prescott MF (2007): Plasma renin and the antihypertensive effect of the orally active renin inhibitor aliskiren in clinical hypertension.

Int J Clin Pract **61**(9):1461-8. Epub 2007 Jun 22

Obayashi M, Yano M, Kohno M, Kobayashi S, Tanigawa T, Hironaka K, Ryouke T, Matsuzaki M (1997): Dose-dependent effect of ANG II-receptor antagonist on myocyte remodeling in rat cardiac hypertrophy.

Am J Physiol **273**(4 Pt 2):H1824-31

Ohlstein EH, Brooks DP, Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr. (1997): Inhibition of sympathetic outflow by the angiotensin II receptor antagonist, eprosartan, but not by losartan, valsartan or irbesartan: relationship to differences in prejunctional angiotensin II receptor blockade.

Pharmacology. **55**(5):244-51

Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM; Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators (2003): Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. (VALIANT)

N Engl J Med. **349**(20):1893-906. Epub 2003 Nov 10. Erratum in: *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):203

Richardt G, Mayer E, Schömig A (1991): Role of angiotensin and sodium intake in cardiac noradrenaline release.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **344**: 297-301

Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R (2002): Angiotensin AT(2) Receptor Ligands :Do They Have Potential as Future Treatment for Neurological Disease?

CNS Drugs **16**(3): 145-53.

Rump LC, Berlitz T, Schwertfeger E, Beyersdorf F, Schollmeyer P, Bohmann C. (1997): Angiotensin Converting Enzyme inhibition unmasks the sympathofacilitatory effect of bradykinin in human right atrium.

J Hypertens **15**: 1263-1270

Schömig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kübler W (1984): Release of endogenous

catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release.

Circ Res **55(5):689-701**

Schömig A, Fischer S, Kurz T, Richardt G, Schömig E (1987): Nonexocytotic release of endogenous norepinephrine in the ischemic and anoxic rat heart: mechanism and metabolic requirements.

Circ Res **60: 194-205**

Schömig A, Richardt G (1991): Cardiac sympathetic activity in myocardial ischemia: release and effects of noradrenaline.

Basic Res Cardiol **85 Suppl 1: 9-30**

Seyfarth M, Feng Y, Hagl S, Sebening F, Richardt G, Schömig A (1993): Effect of myocardial ischemia on stimulation-evoked noradrenaline release. Modulated neurotransmission in rat, guinea pig, and human cardiac tissue.

Circ Res **73(3):496-502**

Sivieri DO Jr, Bispo-da-Silva LB, Oliveira EB, Resende AC, Salgado MC (2007): Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries.

Hypertension **50(1):110-5. Epub 2007 Apr 30**

Smedes F, Kraak JC, Poppe H (1982): Simple and fast solvent extraction system for

selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine.

Chromatogr **231**(1):25-39

Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, Verma A, Berglund T, Lukashevich V, Cherif Papst C, Smith BA, Dahlöf B (2009); Aliskiren in Left Ventricular Hypertrophy (ALLAY) Trial Investigators. Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy.

Circulation **119**(4):530-7. Epub 2009 Jan 19

Taylor K, Patten RD, Smith JJ, Aronovitz MJ, Wight J, Salomon RN, Konstam MA (1998): Divergent effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II-receptor antagonism on myocardial cellular proliferation and collagen deposition after myocardial infarction in rats.

J Cardiovasc Pharmacol. **31**(5):654-60

Veeravalli KK, Akula A (2004): Involvement of nitric oxide and prostaglandine pathways in the cardioprotective actions of bradykinin in rats with experimental myocardial infarction.

Pharmacol Res **49** (1): 23-9

Veeravalli KK, Akula A, Routhu KV, Kota MK (2003): Infarct size limiting effect of apstatin alone and in combination with enalapril, lisinopril and ramipril in rats with experimental myocardial infarction.

Pharmacol Res **48** (6): 557-63

Wolfrum S, Richardt G, Dominiak P, Katus HA, Dendorfer A (2001): Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase P, reduces myocardial infarct size by a kinin-dependent pathway.

Br J Pharmacol **134**(2):370-4

Yang HYT, Erdos EG, Levin Y (1970): A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.

Biochimica et Biophysica Acta **214** : 374-376

Yang Y, Huo ZC, Peng J, Jia MY, Huang Z, Wang ZM, Chen YL (2005): Protective effects of losartan against myocardial ischemic reperfusion in intact canine

Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. **25**(5):580-1. Chinese

Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J; CHARM Investigators and Committees (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial.

Lancet **362** (9386): 777-81

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000): Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-

risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.

N Engl J Med. 2000 Jan 20;**342**(3):145-53. Erratum in: 2000 May 4;**342**(18):1376. *N Engl J Med* 2000 Mar 9;**342**(10):748

Zhang YJ, Bai XJ, Qi ZM, Wang HX (2005): Mechanism of cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by valsartan: an experiment with isolated rat hearts.

Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2005 Dec 14; **85**(47):3350-3

7 Danksagung

Für die Überlassung der Arbeit und insbesondere für die intensive Betreuung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gert Richardt bedanken. Bei seiner Frau und meiner Tutorin Dr. med. Doreen Richardt habe ich stets eine freundliche und geduldige Beratung, viel persönliches Verständnis und Motivation erfahren, wofür ich mich ganz besonders bedanken möchte.

Darüberhinaus stand mir v.a. Herr Dr. med. Christof Burgdorf mit beherztem und freundschaftlichem Engagement zur Seite. Bei allen Mitarbeiterinnen des Katecholaminlabors der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, insbesondere bei Frau Ines Stölting, Frau Doris Kemken und Cindy Krause möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung bedanken. Zur Beantwortung einzelner spezieller Fragen stand wiederholt Herr Dr. med. Sebastian Wolfrum bereitwillig zur Verfügung.

Meine Schwester hat mich großartig und jederzeit hilfsbereit bei „Computerfragen“ unterstützt, ohne sie wollte ich mehrfach verzweifeln.

Nicht zuletzt gebührt besonderer Dank natürlich auch meiner übrigen Familie, die mir stets geduldig und mit viel Verständnis beruflich und privat den Rücken freigehalten und damit schließlich doch noch den Abschluss der Arbeit ermöglicht hat.

8 Curriculum vitae - Catherine Walliser

Persönliche Daten:

Name: Catherine Walliser, geb. Buettner
Geburtsdatum: 22. April 1975 in Bad Oldesloe
Mutter: Rita Buettner, geb. Abel; Kaufm. Techn. Assistentin
Vater: Dr. med. Falk Buettner, Facharzt für Allgemeinmedizin
Familienstand: verheiratet mit Hendrik Walliser, Redakteur, eine Tochter
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

01/1981-07/1985 Gorch-Fock-Schule Eckernförde
07/1985-06/1994 Jungmangymnasium Eckernförde, Leistungskurse
Deutsch und Kunst, Abschluß Abitur

10/1995-10/1997 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-
Universität Göttingen
08/1997 Physikum
Ab 10/1997 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Universität zu Lübeck
03/1999 Erstes Staatsexamen
03/2001 Zweites Staatsexamen
04/2001-01/2002 Praktisches Jahr in der Ostholsteinklinik Eutin,
Fachbereiche Anästhesie, Chirurgie, Innere Medizin
04/2002 Drittes Staatsexamen
06/2002-11/2003 ÄiP in der Chirurgie Ostholsteinklinik Eutin

Berufserfahrung:

12/2003-01/2005 Beschäftigung als Assistenzärztin in der Chirurgie
Paracelsusklinik Kaltenkirchen
02/2005-11/2005 Beschäftigung als Assistenzärztin in der Interdisziplinären
Notaufnahme im Albertinenkrankenhaus Hamburg

12/2005-11/2006	Beschäftigung in der Internistisch-rheumatologischen Abteilung der Ostseeklinik Damp
12/2006-08/2008	Weiterbildungsassistentin in der Allgemeinarztpraxis Dr. med. Buettner, Eckernförde

09/2008-06/2009 Angestellte Ärztin in der Allgemeinarztpraxis
Dr. med. Buettner, Eckernförde

01/2009 Fachärztin für Allgemeinmedizin

07/2009-01/2010 Niederlassung als Fachärztin für Allgemeinmedizin in der
Gemeinschaftspraxis mit Dr. med. Buettner, Eckernförde

Ab 01/2010 Niederlassung als Fachärztin für Allgemeinmedizin in der
Praxisgemeinschaft mit Dres. R. Föry und M. Siemsen,
Eckernförde

9 Publikation

Richardt D, Buttner C, Wolfrum S, Schäfer U, Dendorfer A, Kurz T, Richardt G. Effect of ACE-inhibitor ramiprilat and AT1-receptor antagonist candesartan on cardiac norepinephrine release: comparison between ischemic and nonischemic conditions.

J Cardiovasc Pharmacol 2002; **40(4)**: 641-6