

Quantitative immunhistochemische Untersuchung der Innervation der
Koronararterien der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Indira Maria Sequeira
aus Lennestadt

Gießen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: PD Dr. K. Kuchelmeister

Tag der Disputation: 27.07.2005

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis |

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Gefäße des Herzens	1
1.1.1	Koronararterienverlauf bei der Ratte	1
1.1.2	Wandaufbau der Koronararterien bei der Ratte	4
1.2	Allgemeine Mechanismen der koronaren Durchblutung	5
1.3	Gefäßinnervation durch autonome und sensible Nervenfasern	6
1.3.1	Parasympathische perivaskuläre Nervenfasern	6
1.3.1.1	VAcHT-enthaltende perivaskuläre Nervenfasern	6
1.3.1.2	NO-Synthase enthaltende perivaskuläre Nervenfasern	8
1.3.2	Sympathische perivaskuläre Nervenfasern	9
1.3.3	Viscerosensible perivaskuläre Nervenfasern	11
1.4	Intrakardiale Ganglien der Ratte	13
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2.	<u>Material und Methoden</u>	16
2.1	Immunhistochemische Untersuchungen	16
2.1.1	Versuchstiere und Gewebeaufbereitung	16
2.1.2	Immunhistochemische Inkubation	17
2.2	Auswertung	19
2.2.1	Fluoreszenzmikroskopie	19
2.2.2	Digitale Auswertung der Gewebeschnitte	19
2.2.3	Statistische Methodik	20
3.	<u>Ergebnisse</u>	21
3.1	Perivaskuläre Nervenfasern in den verschiedenen Herzabschnitten	21
3.1.1	VAcHT-immunreaktive Axone	21
3.1.2	NOS-immunreaktive Axone	25

3.1.3	TH-immunreaktive Axone	27
3.1.4	CGRP-immunreaktive Axone	31
3.2	Vergleich der perivaskulären Innervation durch unterschiedliche Nervenfasertypen	35
4.	<u>Diskussion</u>	42
4.1	Perivaskuläre Innervation der koronaren Strombahn	42
4.1.1	VACHT-immunreaktive Axone	42
4.1.2	NOS-immunreaktive Axone	44
4.1.3	TH-immunreaktive Axone	45
4.1.4	CGRP-immunreaktive Axone	47
4.2	Vergleich der perivaskulären Innervation der koronaren Strombahn mit dem Innervationsmuster in anderen arteriellen Gefäßregionen	49
5.	<u>Zusammenfassung</u>	52
6.	<u>Summary</u>	54
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	56
8.	<u>Veröffentlichungen</u>	66
9.	<u>Erklärung</u>	66
10.	<u>Danksagung</u>	67
11.	<u>Lebenslauf</u>	68

~~Anlage~~ ~~Manuskript:~~

~~„Atrial and ventricular rat coronary arteries are differently supplied by noradrenergic, cholinergic and nitrenergic, but not sensory nerve fibres.“~~

~~Indira M. Sequeira, Rainer V. Haberberger, Wolfgang Kummer
submitted (Annals of Anatomy, march 2005)~~

ACh	Azetylcholin
BSA	Bovine Serum Albumin
ChAT	Cholinazetyltransferase
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
NA	Noradrenalin
NKA	Neurokinin A
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NSS	Normales Schweineserum
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PBS	Phosphate buffered saline
PP	Phosphatpuffer
SP	Substanz P
TH	Tyrosinhydroxylase
VACht	Vesikulärer Azetylcholintransporter
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VR1	Vanilloid Rezeptor-1

1. Einleitung

1.1 Gefäße des Herzens

1.1.1 Koronararterienverlauf bei der Ratte

Myron H. Halpern beschrieb 1957 den Verlauf der Koronararterien bei der Ratte (Halpern 1957). Diese Arbeit ist die Quelle der Informationen des nun folgenden Abschnittes. Im Gegensatz zur Blutversorgung des menschlichen Herzens erhält das Myokard der Ratte sein Blut nicht nur aus einer rechten und linken Koronararterie, sondern hier existiert eine zusätzliche Versorgung über Äste aus verschiedenen thorakalen Arterien.

Die rechte Koronararterie (siehe Abbildung 1) hat ihren Ursprung aus der Aorta. Ihr proximaler Anteil wird verdeckt durch das rechte Herzohr. Bereits hier gibt sie mehrere Äste ab. Der erste geht direkt in die Tiefe des Myokards und versorgt das interatriale Septum. Aus diesem Grund bezeichnet man sie auch als die interne rechte atriale Koronararterie.

Der zweite Ast des rechten Herzkranzgefäßes wird benannt als externe rechte atriale Koronararterie. Sie versorgt den ventralen und lateralen Teil des rechten Vorhofs sowie das rechte Herzohr. Nach Abgabe dieser Äste zieht die rechte Koronararterie zur Spitze des Herzens. Sie gibt zur Versorgung der rechten ventralen Ventrikelwand zunächst mehrere Äste ab und verläuft anschließend im vorderen longitudinalen Sulcus, um den oberen Rand des interventrikulären Septums mit Blut zu versorgen. Während dieses Verlaufs gibt sie zwei weitere große Äste ab. Der obere zieht unterhalb der Vorhof–Ventrikel Grenze parallel zu dieser zur posterioren Seite des rechten Ventrikels. Der untere zieht ebenfalls zur Hinterwand des rechten Ventrikels und hat seine Endstrecke im hinteren longitudinalen Sulcus. Diese beiden großen Abgänge aus der rechten Koronararterie versorgen die posteriore Seite des rechten Ventrikels und den unteren Rand des interventrikulären Septums.

Die linke Koronararterie (siehe Abbildung 2) verläuft nach ihrem Abgang aus der Aorta um die linke Seite der Pulmonalarterie, um dann in Richtung Herzspitze zu ziehen. Sie verläuft parallel zum vorderen longitudinalen Sulcus. Als ersten Ast gibt sie entweder eine Arterie zum interventrikulären Septum ab (nach Halpern in 50% der Fälle), oder bei Abwesenheit dieses Astes als erstes die Arteria circumflexa. Die

Arteria circumflexa verläuft parallel zum Sulcus coronarius, um dann auf der posterioren Seite des Herzens zu enden. Sie gibt einen Ast ab, welcher zur Vorderwand des linken Vorhofs aufsteigt, um diesen mit Blut zu versorgen. Bei der Versorgung des interventrikulären Septums existieren mehrere Varianten.

Die septale Arterie kann aus der rechten Koronararterie entspringen oder aus der linken. In beiden Fällen ziehen ihre terminalen Äste am kaudalen Ende des Septums sowohl in die rechte als auch die linke vordere und hintere Ventrikelwand. Hier gibt es Anastomosen mit terminalen Ästen der Herzkranzgefäße.

Die **extrakoronaren Arterien** der Ratte können verschiedenen Ursprungs sein. Alle zweigen sich direkt von der kardialen mediastinalen Arterie der Ratte ab. Diese kann auf der rechten Seite aus der rechten Arteria mammaria interna, aus der rechten Arteria subclavia, aus der rechten Arteria carotis communis oder aus einem Zusammenschluss von Ästen aus der rechten Arteria mammaria interna mit Ästen aus der rechten Arteria subclavia entspringen. Auf der linken Seite entspringt die kardiale mediastinale Arterie in den meisten Fällen aus der linken Arteria mammaria interna, aber in einigen Fällen auch aus der linken Arteria subclavia oder der linken ersten Interkostalarterie. Die rechte mediastinale Arterie teilt sich in Höhe des unteren Drittels der Vena cava superior dextra in einen tiefen und einen oberflächlichen Ast. Der oberflächliche läuft entlang der medialen Seite der rechten Vena cava superior und erreicht mit ihr das Vorhofmyokard. Hier teilt sich der Ast in drei kardiale Äste: einen lateralen, einen mittleren und einen medialen. Der laterale versorgt die Region um den Sinusknoten und mit seinen Zweigen die laterale und dorsale Wand des rechten Vorhofs. Der mittlere zieht in den dorsalen Vorhofbereich, welcher zwischen der rechten Vena cava superior und inferior liegt. Der mediale versorgt den oberen Teil des interatrialen Septums, den linken Vorhof und schließlich den Einmündungsbereich der Pulmonalvenen in das Herz. Die linke mediastinale Arterie läuft mit der linken Vena cava superior und teilt sich hier auch in zwei Äste, einen oberflächlichen und einen tiefen. Der oberflächliche erreicht das Herz. Er zieht zum linken Herzohr und versorgt ebenfalls den oberen Bereich des interatrialen Septums, die Einmündungsbereiche der Venae pulmonales, der Vena cava superior und den Ursprungsbereich der Koronararterien. Abschließend ist festzuhalten, dass hier Überlappungen der Blutversorgung durch die Äste der linken und rechten mediastinalen Arterie vorliegen.

Eine weitere Besonderheit der Blutversorgung der Ratte ist uns während der Präparation der in dieser Arbeit untersuchten Rattenherzen aufgefallen. Die Koronararterien ziehen sehr bald nach ihrem Ursprung aus der Aorta in die Tiefe des Myokards, so dass sich auf den Ventrikeln keine epikardialen Gefäße mehr zeigen.

Abb.1

Abb. 2.

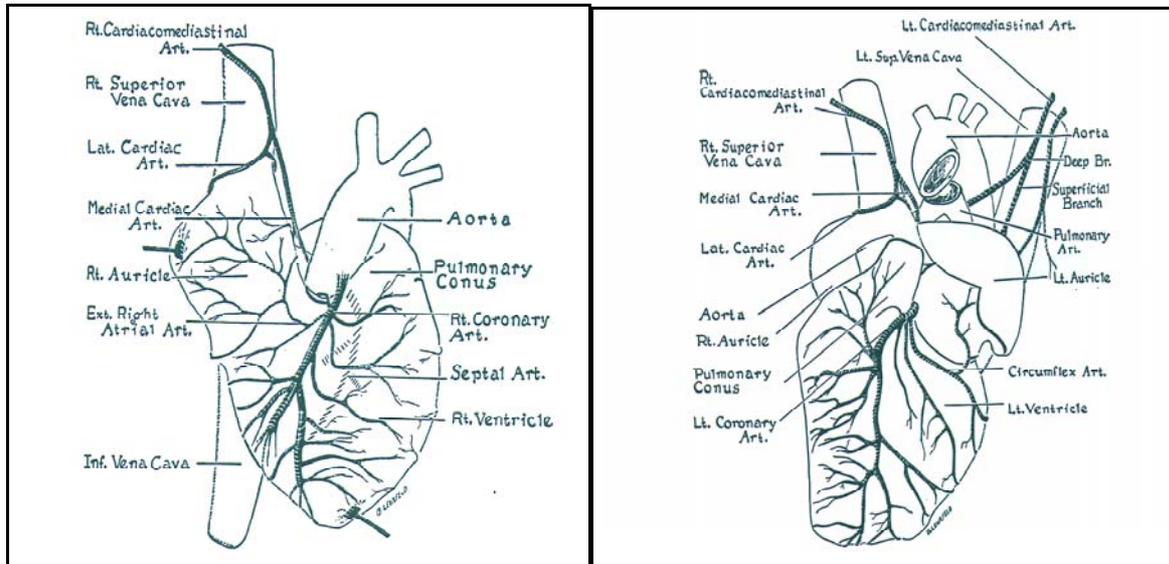


Abbildung 1. Koronararterienverlauf bei der Ratte (aus Halpern 1957)
(Ansicht auf das Herz von medial)

Abbildung 2. Koronararterienverlauf bei der Ratte (aus Halpern 1957)
(Ansicht von lateral)

1.1.2 Wandaufbau der Koronararterien bei der Ratte

Grundlage des folgenden Abschnitts über den Wandaufbau der Koronararterien ist das Kapitel VI aus „Funktionelle Histologie der Haussäugetiere“ (H.-G. Liebich, Schattauer, 2. Auflage, Kap. VI)

Die innere Wandauskleidung der Gefäße wird gebildet von der **Tunica interna**. Sie lässt sich unterteilen in eine einschichtige Lamina endothelialis, ein bindegewebiges Stratum subendotheliale und eine Membrana elastica interna. Die **Tunica media (Media)** schließt sich an. Sie besteht aus mehreren Schichten glatter Muskulatur, in die elastische und kollagene Fasern eingelagert sind. Bei größeren Gefäßen wird die Tunica media abgegrenzt zur **Tunica externa (Adventitia)** durch eine Membrana elastica externa. Die Adventitia bildet einen fibroelastischen Netzverband aus Kollagen Typ I. Sie stellt die Verbindung des Gefäßes mit dem umliegenden Gewebe dar. Abbildung 3 zeigt die einzelnen Wandschichten einer Arterie. Perivaskuläre Nervenfasern lagern sich um die Adventitia an und gelangen über sie bis in die äußeren Abschnitte der Media, wo sie aus ihren terminalen Synapsen Transmitterstoffe freisetzen. Abhängig von der Aufgabe und Größe eines Gefäßes variiert der Grundbauplan. Die Aorta ist eine Arterie vom elastischen Typ. Ihre Tunica media ist vorwiegend aus elastischen Membranen aufgebaut, welche mit einzelnen glatten Muskelzellen Verbindung aufnehmen und so ein elastisch-muskuläres System entstehen lassen. Zudem ist das Stratum subendotheliale verbreitert. Die aus der Aorta entspringenden Koronararterien zeigen den klassischen Wandaufbau, während bei den sich anschließenden Arteriolen (< 100 µm) die Media nur noch aus ein bis drei Muskelschichten besteht und auch das Stratum subendotheliale sehr dünn ist. Die Arteriolen steuern entscheidend den peripheren arteriellen Blutdruck. Die Blutkapillaren (mittlerer Durchmesser 7-9 µm) stellen die Verbindung zwischen den kleinsten Arteriolen und den postkapillären Venolen dar. Über sie findet der Stoffaustausch mit dem anliegenden Gewebe statt. Dementsprechend ist ihre Wand sehr dünn. Sie besteht nur aus einem einschichtigen Endothel, einer außen anliegenden Basalmembran und daran angrenzenden Perizyten. Abhängig von der funktionellen Stoffwechselleistung des umgebenden Gewebes variiert die Struktur der Kapillarwand.

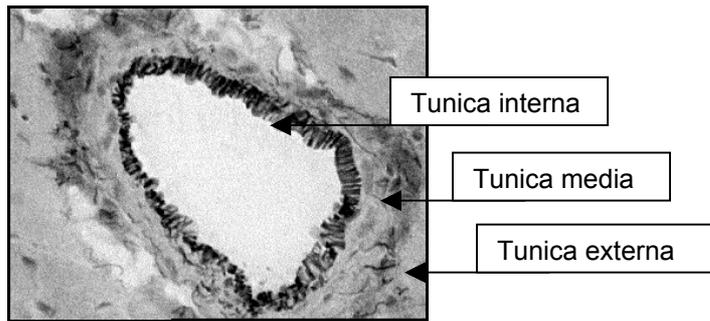


Abbildung 3. Koronararterie Ratte

(Zur Verfügung gestellt von Dr. Th. Stadelbauer/S. Fiedel, Medizinische Klinik I, Klinikum der Justus Liebig Universität Giessen)

1.2 Allgemeine Mechanismen der koronaren Durchblutung

Die Regulation der koronaren Durchblutung und damit die Anpassung an die jeweils vorliegende Stoffwechselsituation wird übernommen von verschiedenen Mechanismen. Einfluss auf die Regulation der Durchblutung der Koronarien haben metabolische und myogene Faktoren, endotheliale Mechanismen, sowie nervale und humorale Steuerungen (Jones et al. 1995). Berne zeigte anhand von Untersuchungen, dass bei Zunahme des Energieumsatzes im Myokard vermehrt Adenosin anfällt (Berne 1963), welches durch Diffusion an koronaren Gefäßen über P2Y Rezeptoren zu einer Vasodilatation führt (Malmsjo et al. 1999). Vorwiegend beteiligt sind hier Gefäße mit einem Durchmesser unter 50 μm . So wird unter einer koronaren Ischämie eine Dilatation der Gefäße beobachtet, welche verzögert wird bei Gabe eines Adenosin Antagonisten (Kanatsuka et al. 1992). Anhand isoliert perfundierter Koronararterien des Schweines wurde gezeigt, dass es bei einer Zunahme des Perfusionsdruckes zu einer vermehrten Konstriktion von Arteriolen mit einem Durchmesser zwischen 50 – 80 μm kommt (Kuo et al. 1988). Diese myogene Reaktion ist unabhängig von einem intakten Endothel. Es wird vermutet, dass es in Folge einer Dehnung des Gefäßes zu einer Öffnung von Natrium-, Kalium- und Kalzium-Kanälen kommt und in dessen Folge zu einer Konstriktion der Gefäße (Davis et al. 1992, Falcone et al. 1991, Kuo et al. 1990). Bei einer Zunahme des Blutflusses kommt es in Folge der am Gefäß wirkenden Scherkräfte zu einer vermehrten Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) im Endothel, welches zu einer Dilatation von Koronararterien, vorwiegend mit Durchmessern zwischen 80 und 150 μm führt (Dinerman et al. 1993). Ein intaktes Endothel scheint eine erhebliche Bedeutung bei der Steuerung der koronaren Durchblutung und der Prävention vor

bestimmten pathophysiologischen Mechanismen zu haben. So kommt es bei einer Verletzung des Endothels zur Umkehrung einer durch Azetylcholin (ACh), Serotonin und Histamin an gesunden Koronargefäßen hervorgerufenen Vasodilatation hin zu einer Vasokonstriktion (Chierchia 1983, Hillis et al. 1978, Rasmussen et al. 1984). Es werden drei im Endothel der Gefäße vorkommende Substanzen beschrieben, welche eine direkte Vasodilatation hervorrufen können: NO (Ferrer et al. 1999, Wellman et al. 1996) Prostazyklin und der Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Vanhoutte et al. 1996). Es wird vermutet, dass die Entstehung von koronaren Vasospasmen zu einem erheblichen Anteil auf dem Boden eines vorgeschädigten Endothels geschieht (Ito et al. 2002). Zu diesen oben genannten Mechanismen, welche gemeinsam die koronare Durchblutung regeln, kommt der Einfluss der perivaskulären Nervenfasern. Um das Ausmaß ihres Einflusses auf die koronare Durchblutung abschätzen zu können, ist es vonnöten, ihr Vorkommen im koronaren Gefäßbaum zu analysieren.

1.3 Gefäßinnervation durch autonome und sensible Nervenfasern

1.3.1 Parasympathische perivaskuläre Nervenfasern

1.3.1.1 VACHT-enhaltende perivaskuläre Nervenfasern

Die kardialen Neurone, welche das Herz cholinerg innervieren, werden über präganglionäre Zellkörper im Nucleus dorsalis nervi vagi, im Nucleus ambiguus und in der Intermediärzone gesteuert (Takanaga et al. 2003). Von diesen Hirnstammkernen aus ziehen die Axone im N. vagus zu Ganglien, welche an verschiedenen Orten im Epi- und Myokard der Herzvorhöfe liegen (erläutert in nachfolgendem Kapitel 1.4). Hier treten die präganglionären Neurone in synaptischen Kontakt mit postganglionären Neuronen. Deren Axone geben Äste ab zur Muskulatur der Vorhöfe und der Ventrikel, zum Sinusknoten und AV-Knoten, sowie den Gefäßen des Herzens (King et al. 1958). Azetylcholin (ACh) ist der klassische Transmitter der postganglionären parasympathischen Neurone. Er wird synthetisiert in den Varikositäten der cholinergen Axone aus Cholin und Azetyl-CoA mit Hilfe des zytoplasmatischen Enzyms Cholinazetyltransferase (ChAT). ACh wird anschließend durch den vesikulären Azetylcholintransporter (VACHT) vom Zytoplasma in Vesikel transportiert. In diesen Vesikeln wird ACh bis zu seiner

Freisetzung gespeichert (Arvidsson et al. 1997). Bei Depolarisation der axonalen Membran verschmelzen die Vesikel mit der Zellmembran und entleeren ihren Inhalt in den Extrazellulärraum (siehe Abbildung 4). ACh reagiert anschließend entweder mit cholinergen Rezeptoren oder wird durch die Azetylcholinesterase in Cholin und Azetat gespalten (Jänig et al. 1996).

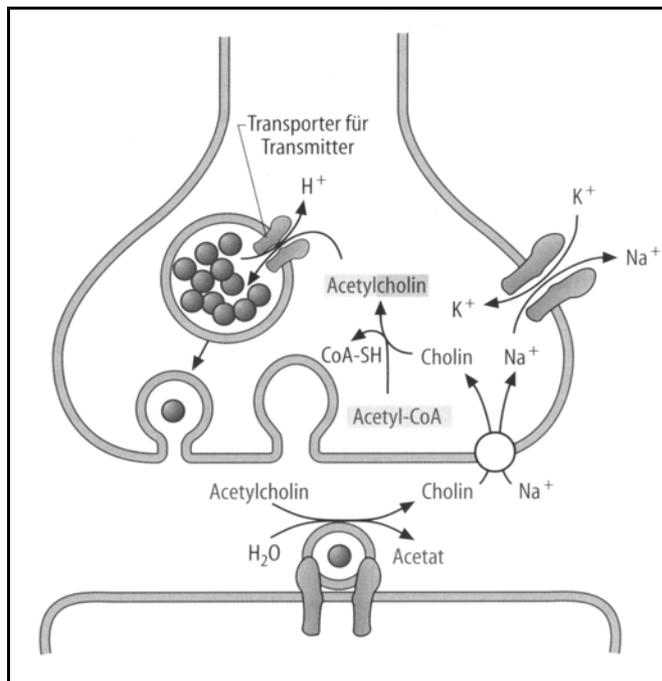


Abbildung 4. Abbau und Wiederaufnahme von Azetylcholin (Petrides et al. 2003)

Die Wirkung von perivaskulär freigesetztem ACh auf Gefäße des Herzens ist speziesabhängig. Wird bei Kaninchen und Meerschweinchen ACh aus parasympathischen perivaskulären Axonen freigesetzt, kann es über zwei unterschiedliche Signalwege entweder zu einer Vasokonstriktion oder aber zu einer Vasodilatation kommen. Bei intaktem Endothel setzt ACh aus den Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) frei und bewirkt über diesen Weg eine Dilatation des Gefäßes. Auf der anderen Seite bewirkt freigesetztes ACh über die Stimulation muskarinischer Rezeptoren der glatten Muskelzellen eine direkte Vasokonstriktion (Amezcuca et al. 1988, Ellwood et al. 1996). Bei Ratten kommt es auch bei intaktem Endothel unter der Gabe von ACh zu einer Vasokonstriktion, wahrscheinlich sowohl vermittelt über muskarinische Rezeptoren der glatten Muskelzellen als auch über die Freisetzung vasokonstriktorischer Prostaglandine der Endothelzellen. Es wird

angenommen, dass hier der Subtyp M2 der muskarinischen Rezeptoren für die konstriktorische Antwort der Koronargefäße zuständig ist (Nasa et al. 1997).

1.3.1.2 NO-Synthase enthaltende perivaskuläre Nervenfasern

Die NO-Synthase (NOS) ist ein Enzym, welches die Aminosäure L-Arginin in das Gasmolekül NO und Zitrullin spaltet (Palmer et al. 1988). Die Synthese und Freisetzung von NO wird in Abbildung 5 gezeigt. Es existieren drei Isoformen der NOS, wobei jede Form durch ein eigenes Gen kodiert wird. Im Herzen enthalten Muskelzellen und Endothelzellen eNOS (NOS 3) und iNOS (NOS 2), ein Teil der perivaskulären kardialen Neuronen enthält die dritte Isoform nNOS (NOS 1) (Smith et al. 1996). Die Bereitstellung von iNOS wird bei entsprechender Stoffwechselsituation durch inflammatorische Zytokine induziert (Smith et al. 1996). Das im Endothel vorkommende eNOS wird aktiviert durch einen Kalziumeinstrom in die Endothelzelle. Dieser Kalziumeinstrom kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Ein Beispiel ist die Wirkung von Scherkräften am Endothel. Kalzium bindet an Kalmodulin. Im Zusammenspiel mit verschiedenen Kofaktoren katalysiert eNOS dann die Bildung von NO. Das gemeinsame Produkt der drei Enzyme NO aktiviert die Guanylatzyklase in glatten Muskelzellen, was zur Folge hat, dass die cGMP-Konzentration im Zytoplasma steigt und die glatten Muskelzellen relaxieren (Arnold et al. 1977, Rapoport et al. 1983). An den Koronargefäßen sind NOS-enthaltende perivaskuläre Nervenfasern an Gefäßen, unabhängig von deren Größe zu finden. Bei der Ratte sind NOS-enthaltende perivaskuläre kardiale Nervenfasern parasymphatisch und cholinerg (Richardson et al. 2003). Die NOS-Immunreaktivität ist nicht nur in den Nervenendigungen, sondern im gesamten Neuron nachweisbar (Klimaschewski et al. 1992). NO kann direkt am Produktionsort freigesetzt werden und wirkt dann dilatativ auf benachbarte Effektorzellen (Knowles et al. 1992, Schmidt et al. 1993, Vincent 1994). Epikardiale Gefäße weisen eine höhere Dichte an perivaskulären NO-enthaltenden Nervenfasern auf als intramyokardiale Gefäße (Klimaschewski et al. 1992). Es wird angenommen, dass das im Endothel gebildete NO eine erhebliche Rolle bei der Regulierung des koronaren Blutflusses spielt und neural freigesetztes NO einen weiteren modulierenden Einfluss besitzt (Sosunov et al. 1995).

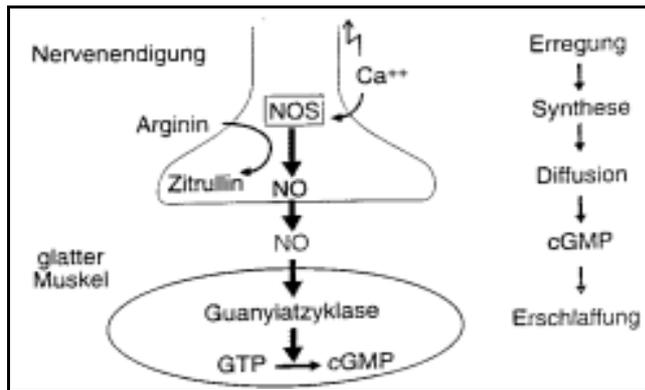


Abbildung 5. Synthese und Freisetzung von Stickoxid (NO) im peripheren Nervensystem bei Erregung der Neurone (Jänig et al. 1996)

1.3.2 Sympathische perivaskuläre Nervenfasern

Die Neurone, welche das Herz sympathisch innervieren, werden über präganglionäre Zellkörper in den Seitenhörnern des Rückenmarks der thorakalen Segmente 1-5 gesteuert. Diese präganglionären Axone verlassen das Rückenmark über die Vorderwurzeln, bilden die Rami communicantes, welche in den sympathischen Grenzstrang ziehen. Sie treten in der paravertebralen Ganglienkette mit den postganglionären Neuronen in Kontakt, welche mit ihren Axonen dann zum Herzen ziehen (Armour et al. 1981). Noradrenalin (NA) ist der Transmitter zwischen postganglionärem Axon und der Effektorzelle. Es wird über die Zwischenstufe Dopamin in den Varikositäten aus Tyrosin gebildet. Die Enzyme, welche diese Umwandlungen katalysieren, sind die Tyrosinhydroxylase (TH), die DOPA-Decarboxylase und die Dopamin-beta-Hydroxylase (siehe Abbildung 6). Die Umwandlung von NA in Adrenalin findet im Nebennierenmark durch Methylierung am Stickstoffatom statt (Jänig et al. 1996). Das adrenerge System übt auf den koronaren Gefäßtonus über verschiedene Rezeptortypen unterschiedliche Wirkungen aus. Durch die Stimulation kardialer β -Rezeptoren kommt es zunächst zu einer Herzfrequenzsteigerung und einer positiv inotropen Wirkung am Herzen. Der dadurch erhöhte Sauerstoffbedarf des Myokards wird unter physiologischen Bedingungen gedeckt durch eine metabolisch induzierte Dilatation (Berne et al. 1965, Miller et al. 1979). Eine Feinregulierung der metabolischen Dilatation wird durch eine α 1- und α 2-Adrenorezeptor vermittelte Konstriktion hervorgerufen (Gerova et al. 1979, Mohrman et al. 1978, Murray et al. 1979). Diese

Adrenorezeptoren sind lokalisiert in der Media der Gefäße. Aktiviert werden diese Rezeptoren, bei intaktem Endothel, über die Ausschüttung von NA aus sympathischen perivaskulären Nervenfasern. An gesunden Koronararterien des Hundes konnte gezeigt werden, dass hier eine α -adrenerge Konstriktion erheblich kleiner ausfällt als an den Gefäßen der Skelettmuskulatur und der Haut (Mark et al. 1972). Über α_2 -Adrenorezeptoren des Endothels kann es aber zusätzlich zu einer Katecholamin-induzierten Dilatation kommen. Außerdem kann es über die Aktivierung von präsynaptischen α_2 -Adrenorezeptoren zu einer verminderten nervalen Ausschüttung von Noradrenalin kommen und somit zu einer Abschwächung der nerval induzierten Konstriktion (Gerova et al. 1979, Heusch et al. 1984). NA kann zudem an den Koronargefäßen eine β -Rezeptor vermittelte Vasodilatation hervorrufen (Rudehill et al. 1986). Eine unabhängige β -adrenerge koronare Dilatation ist beschrieben worden für die großen epikardialen Gefäße und die Widerstandsgefäße (Hamilton et al. 1976, Klocke et al. 1965, McRaven et al. 1971, Vatner et al. 1986, Vatner et al. 1982, von Restorff et al. 1977). Bei Hunden und Kälbern wird die direkte Dilatation der epikardialen Koronararterien über β_1 - und β_2 -Rezeptoren vermittelt (Nakane et al. 1988, Vatner et al. 1986/1982).

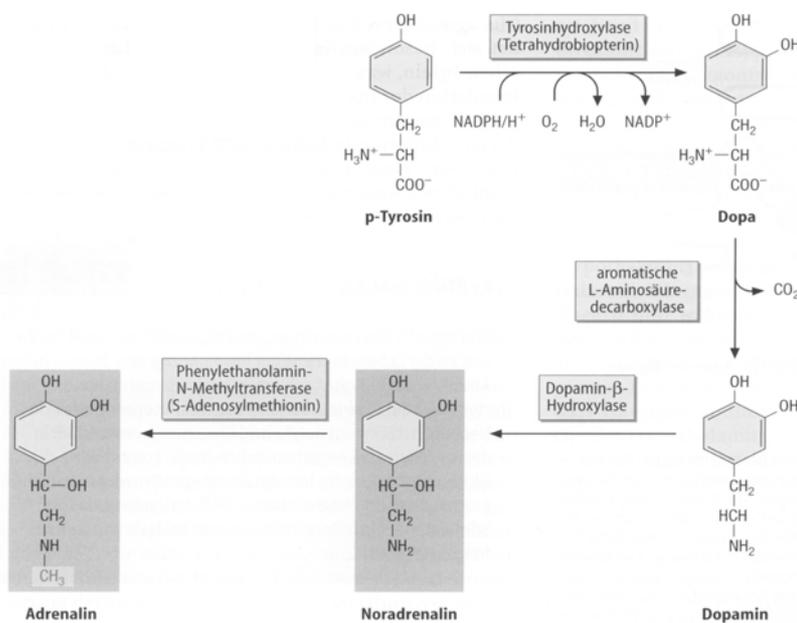


Abbildung 6. Biosynthese der Katecholamine (Löffler et al. 2003)

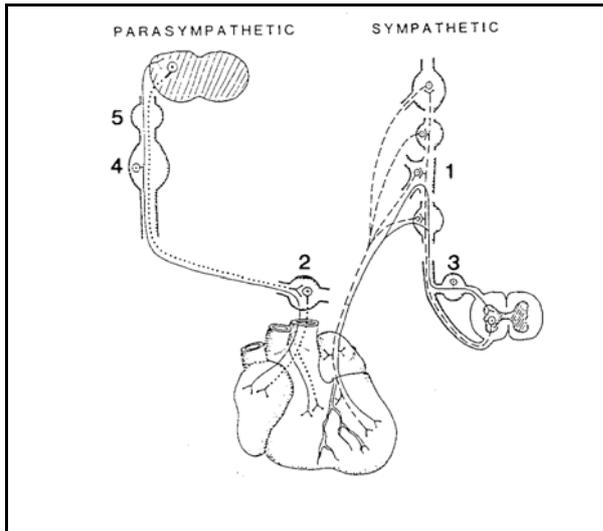


Abbildung 7. Ursprung der parasympathischen und sympathischen Nervenfasern, welche das Herz autonom innervieren, sowie Verlauf der afferenten Fasern des Herzens (Franco-Cereceda ;1988)

- | | | |
|----|--|--|
| 1. | Ganglion stellatum/cervicale Ganglien | |
| 2. | Intrinsisches kardiales Ganglion (parasympathisch) | |
| 3. | Spinalganglion | |
| 4. | Ganglion nodosum | ⇒ Verschmelzen bei der Ratte zu einem Ganglion |
| 5. | Ganglion jugulare | |

1.3.3 Viszerosensible perivaskuläre Nervenfasern

Die Axone der viszerosensiblen perivaskulären Neurone können sowohl zusammen mit parasympathischen Nervenfasern verlaufen und ihre Zellkörper im Ganglion nodosum und Ganglion jugulare haben (vagale Afferenzen), als auch zusammen mit sympathischen Axonen verlaufen mit Zellkörpern in den Spinalganglien (spinale Afferenzen) (Franco-Cereceda 1988). Abbildung 7 zeigt den Ursprung und den Verlauf der parasympathischen, sympathischen und afferenten Nervenfasern des Herzens. Bei der Ratte verschmelzen das Ganglion jugulare und das Ganglion nodosum zu einem Ganglion. Capsaicin-sensitive afferente C-Fasern des Herzens enthalten die Neuropeptide Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) (Franco-Cereceda 1988). Capsaicin (8-methyl-N-vannillyl-6-nonenamide) ist eine Substanz (Extrakt des roten Chili), welche über die Bindung an den Subtyp 1 des Vanilloid Rezeptors (VR1) afferente C-Fasern inaktiviert durch einen kalziumabhängigen Mechanismus, welcher die Freisetzung der gespeicherten Neuropeptide hervorruft. Es kommt in der Folge zu einer lokalen

Vasodilatation (Evans et al. 2003). Eine elektrische Reizung afferenter A δ - und C-Fasern im Bereich der Hinterwurzel des Rückenmarks führt ebenfalls im innervierten Organ zu einer Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität. Diese Effekte werden vermittelt über antidrome Aktionspotenziale und eine folgende Freisetzung der Tachykinine und des CGRP aus peripheren Nervenendigungen (Schaible et al. 1996). Die Fähigkeit, nicht nur Impulse weiterzuleiten, sondern auch lokale Veränderungen am Organ hervorzurufen, wird auch als „lokale Effektorfunktion sensibler Neurone“ bezeichnet. NKA und SP gehören in die Gruppe der Tachykinine. Das gemeinsame Merkmal dieser Peptide ist die Aminosäuresequenz am Carboxy-terminalen Ende (Kotani et al. 1986, Nawa et al. 1983/1984).

Das Transkript des Gens für Kalzitonin produziert durch alternatives Splicing zwei unterschiedliche mRNA Typen, welche entweder Kalzitonin oder das aus 37 Aminosäuren bestehende CGRP kodieren (Amara et al. 1982, Lundberg et al. 1985). CGRP-enthaltende Nervenfasern kommen in allen Bereichen des Herzens vor, allerdings ist die Dichte hier gering. An den Koronargefäßen sind sie assoziiert mit der Adventitia (Lundberg et al. 1985, Mulderry et al. 1985, Saito et al. 1986, Wharton et al. 1986). Der Rezeptor für CGRP und das ebenfalls vasodilatatorisch wirksame Adrenomedullin ist CGRP-1. Er befindet sich am Herzen an den Endothelzellen der Gefäße (Hagner et al. 2001). Die höchste Konzentration an spezifischen Bindungsstellen findet sich an den Hauptstämmen der Koronararterien (Coupe et al. 1990). CGRP ist als ein potenter dosisabhängiger Vasodilatator beschrieben worden (Franco-Cereceda et al. 1987). In der Innervation kardialer Gefäße der Ratte ist CGRP auf viszerosensible Nervenendigungen beschränkt (Wharton et al. 1986). Die immunhistochemische Darstellung von CGRP-enthaltenden Nervenfasern kann daher im Rattenherzen zur Erfassung der Verläufe von nozizeptiven afferenten Nervenfasern mit lokaler Effektorfunktion genutzt werden.

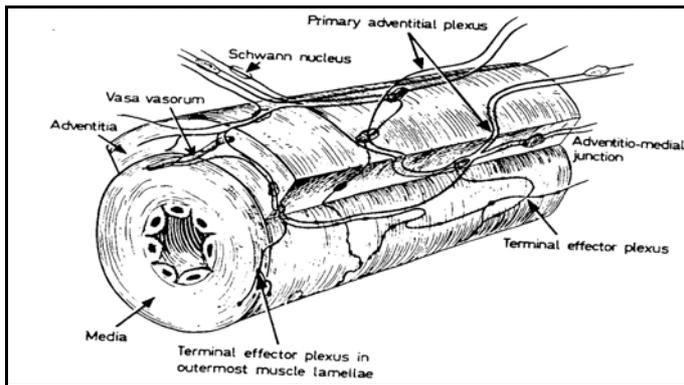


Abbildung 8. Die neurovaskuläre Übertragung an Arterien (Verity 1971)

Postganglionäre autonome Nervenäste bilden einen primären Plexus, welcher in der Adventitia liegt. Von dort ziehen Nervenäste zur äußeren Schicht der Media und bilden einen terminalen Effektorplexus. Nur Zellen an der Grenze zwischen Media und Adventitia erhalten eine direkte autonome Innervation.

1.4 Intrakardiale Ganglien

Es wird vermutet, dass intrakardiale Ganglien und ihre Neurone eine autonome Funktion besitzen, also verschiedene neuronale Aktivitäten integrieren und modifizieren (Randall et al. 1995). Es ist zudem bekannt, dass intrakardiale Ganglien eine Reihe an verschiedenen Typen von Neuronen und Interneuronen enthalten (Smith 1999, Xi et al. 1991, Selyanko 1992, Edwards et al. 1995, Gagliardi et al. 1988). Diese Neurone erhalten modifizierende Impulse von sympathischen, extrinsischen sensiblen und vagalen präganglionären Neuronen (Saito et al. 1986, Slavikova et al. 1993, Onuoha et al. 1999, Calupca et al. 2000, Calupca et al. 2003). Ebenso deuten pharmakologische Studien darauf hin, dass Neurotransmitter wie NA, SP, vasoaktives intestinales Peptid (VIP), pituitary adenylate cyclase-activated peptide (PACAP) und CGRP die neuronale Übertragung in Ganglien modifizieren können (Xu et al. 1993, Zhang et al. 2001). Richardson zeigte anhand immunhistochemischer Untersuchungen, dass in den Ganglien der Ratte drei neurochemische Klassen an kardialen Neuronen vorkommen (Richardson et al. 2003). Topographisch wurde hier gezeigt, dass drei bis vier große Ganglien am Eingang der Pulmonalvenen in den linken Vorhof liegen. Jedes dieser Ganglien enthält einige hundert Neurone. Die Verbindung untereinander wird durch einen die Pulmonalvenen zirkumskript umfassenden Plexus an feinen Nervensträngen hergestellt. Richardson zeigte weiterhin, dass in allen intrakardialen neuronalen Zellkörpern innerhalb der intrinsischen kardialen Ganglien ChAT und Neuropeptide Y

(NPY) vorkommen. NOS wurde gefunden in einer Subpopulation von Neuronen, welche ChAT koexpressieren und auch NPY-Immunreaktivität besitzen. (Richardson et al. 2003). Zusammenfassend fand Richardson drei neurochemische Klassen von Neuronen innerhalb kardialer Ganglien.

- A. ChAT- und NPY-enthaltende neuronale Somata
- B. ChAT- und NPY- und Calbindin-enthaltende neuronale Somata
- C. ChAT- und NPY- und NOS-enthaltende neuronale Somata

In den Somata der Neurone der Ganglien fand sich keine Immunreaktivität für VIP, SP, CGRP, PACAP. Allerdings kommen SP und CGRP kolokalisiert in terminalen Nervenfasern innerhalb des Ganglions vor (Richardson et al. 2003).

Vermutet wird, dass diese SP- und CGRP-enthaltenden Nervenfasern zu sensorischen Neuronen mit Zellkörper in den Spinalganglien gehören (Wiesenfeld-Hallin et al. 1984). Studien haben gezeigt, dass SP ACh-induzierte Impulse inhibieren kann (Cuevas et al. 2000). Insgesamt betrachtet könnten diese anatomischen Gegebenheiten eine Interaktion zwischen sensorischen und intrakardialen Neuronen erlauben.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Regulation des koronaren Blutflusses wird durch viele Faktoren und Mechanismen bestimmt. Einfluss haben nicht nur metabolische und myogene Faktoren sowie endotheliale und humorale Mechanismen, sondern zu einem erheblichen Anteil die nervale Versorgung der Koronargefäße.

Ziel der vorliegenden Studie war es folgende Fragen zu beantworten:

- Existieren eine cholinergere parasympathische perivaskuläre Innervation, eine sympathische perivaskuläre Innervation, eine viscerosensible perivaskuläre Innervation und eine perivaskuläre Innervation durch NOS-enthaltende Nervenfasern in allen Herzabschnitten der Ratte?
- Existieren Unterschiede im Ausmaß der Innervation der koronaren Strombahn durch auf der einen Seite autonome cholinerge und sympathische Nervenfasern und auf der anderen Seite durch viszerosensible Nervenfasern und NOS-enthaltende Nervenfasern?

- Ist die perivaskuläre Innervation von Gefäßen der koronaren Strombahn abhängig vom Kaliber der Gefäße?
- Existieren Unterschiede zwischen dem perivaskulären Innervationsmuster im Vorhof und im Ventrikel?

Daher wurde in der vorliegenden Studie die cholinerge Innervation der Koronararterien der Ratte immunhistochemisch mit einem Antiserum gegen den VAcHT dargestellt, quantitativ, auf den Gefäßdurchmesser bezogen, erfasst und der Gefäßinnervation durch noradrenerge sympathische Fasern (TH-immunreaktiv), CGRP-haltige sensible Fasern und NO- produzierende Axone gegenübergestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Immunhistochemische Untersuchungen

2.1.1 Versuchstiere und Gewebeaufbereitung

Fünf männliche adulte Wistar Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, D) mit einem Körpergewicht von 300-500 g wurden in einer geschlossenen Kammer durch eine Überdosis Chloroform getötet. Die Herzen wurden herauspräpariert und in Zamboni Lösung immersionsfixiert. Die Zamboni Lösung bestand aus 2%igem Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) und 15%iger Pikrinsäure. Die Herzen wurden anschließend in jeweils drei Abschnitte unterteilt: Vorhof [A], Ventilebene mit angrenzendem Ventrikel [B], Herzspitze [C]. Um eine vollständige Fixierung der 15 Gewebeblöcke zu erreichen, wurden sie dann

- in Zamboni Lösung über einen Zeitraum von sechs Stunden belassen.
- Mit einem 0.1 M PP wurde die überschüssige Fixationslösung ausgewaschen. Bei diesem Vorgang wurde der Puffer fünfmal innerhalb von 24 Stunden gewechselt.
- Für einen Tag wurden die Herzen in 18 %ige Saccharoselösung in 0.1 M PP gegeben,
- eingebettet in Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, N),
- mit der basalen Seite fixiert auf Filterpapier wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff gefroren,
- eine Stunde bei -20°C gelagert und
- bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.
- Die Art der Einbettung machte es dann möglich, die Gefrierschnitte so anzufertigen, dass sie einen Querschnitt durch das Rattenherz zeigten. Durch die oben beschriebene zusätzliche Einteilung in einzelne Herzabschnitte konnten verschiedene Abschnitte der Koronararterien vom Ursprung aus der Aorta bis zur Spitze des Herzens untersucht werden.

2.1.2 Immunhistochemische Inkubation

Für die immunhistochemische Inkubation wurde von den entsprechenden Herzabschnitten Gefrierschnitte am Kryostaten (CM 1900, Leica, Bensheim, D) mit einer Dicke von jeweils 10 µm in Serie angefertigt, auf Chromalaum-gelatinierte Objektträger (Menzel-Gläser, Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, D) aufgezogen und für eine Stunde luftgetrocknet. Beim Gelatinieren der Objektträger wurden 5 g Gelatine zusammen mit 1 l Reinstwasser auf 35°C erhitzt. Wenn die Gelatine gelöst war, wurde 0.5 g Chromalaum zugegeben und das Gemisch anschließend auf 40°C erwärmt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das Gemisch auf die in Küvetten einsortierten Objektträger gegeben (10 min Einwirkzeit). Für einige Stunden wurden die Objektträger abschließend bei 37°C getrocknet. Die Notwendigkeit des Gelatinierens bestand darin, dass so die Gewebeschnitte während der einzelnen Inkubationsschritte besser auf dem Objektträger haften blieben. Die Gewebeschnitte wurden dann entweder bei -20°C gelagert, oder direkt den entsprechenden Inkubationsschritten unterzogen. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Gewebeschnitte luftgetrocknet und anschließend mit der Blocklösung eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Blocklösung bestand aus 0.5 % Tween 20, 0.1 % Bovine Serum Albumin (BSA) und 10 % normalem Schweineserum (NSS). Die Blocklösung sättigt unspezifische Proteinbindungsstellen im Gewebe ab. Nachdem die überschüssige Blocklösung vorsichtig von den Schnitten abgesaugt worden war, wurden die Primärantikörper aufgebracht und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper und deren Arbeitsverdünnung sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Zur Verdünnung der Antikörper wurde Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.4) mit der doppelten NaCl-Konzentration verwendet. PBS bestand aus einem Gemisch von 28.75 ml der Lösung A (0.2 M NaH_2PO_4) und 96.20 ml der Lösung B (0.2 M Na_2HPO_4), versetzt mit 22.4 g NaCl. Dieses Gemisch wurde anschließend mit Reinstwasser auf 5 l aufgefüllt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Gewebeschnitte nun in PBS für zweimal zehn Minuten von dem verdünnten Primärantikörper gereinigt. Nach Absaugen der PBS von den Gewebeschnitten wurde der Sekundärantikörper aufgebracht und über eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper und deren Arbeitsverdünnung sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Sekundärantikörper dienten der

Markierung des Primärantikörpers. Es wurden hier ausschließlich Sekundärseren verwendet, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt waren. Erneut wurden die Schnitte zweimal zehn Minuten mit PBS gewaschen und anschließend nach Absaugung mit karbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8.6) eingedeckelt. Dieses Eindeckmedium führte zu einer Erhöhung der Transparenz des Gewebes durch das Glycerol und zu einer Stabilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes FITC durch den alkalischen pH-Wert. Dieser Puffer bestand aus zwei Anteilen, den Lösungen A (0.5 M Na₂CO₃) und B (0.5 M NaHCO₃). Die Lösung B wurde als Grundlösung genommen und Lösung A solange hinzutitriert, bis sich in dem Gemisch ein pH von 8.6 einstellte. Es wurde dann ein Verhältnis Glycerol:Puffer von 2:1 hergestellt. Um die Spezifität des Primärantikörpers gegen den vesikulären Azetylcholintransporter (VAChT) zu überprüfen, wurde dieser über Nacht bei 4°C mit dem für den Antikörper spezifischen Antigen (1 µg/µl) (Synthetic Vesicular Acetylcholine Transporter Protein (526-539), Biotrend, Köln, D) inkubiert. Nach Bindung des Antikörpers an das Antigen stand dieser bei einer nachfolgenden indirekten Immunfluoreszenz nicht mehr zur Bindung an ein Antigen im Gewebe zur Verfügung. Im Gewebeschnitt wurden somit keine spezifischen Markierungen sichtbar. Parallel wurden eine Positivkontrolle, Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper, und eine Negativkontrolle, nur Inkubation mit dem Sekundärantikörper, mitgeführt. Die Spezifität der Antiseren gegen die TH, die NOS und das CGRP wurde schon durch Präabsorption in früheren Arbeiten demonstriert. (Kummer et al. 1992, Heym et al. 1993).

Tabelle 1. Verwendete Primärantiseren

Antigen	Spezies	Verdünnung	Quelle
VACHT	Ziege (polyklonal)	1:1000	Biotrend, Köln, D
TH	Kaninchen (polyklonal)	1:400	Biotrend, Köln, D
CGRP	Kaninchen (polyklonal)	1:200	Peninsula Laboratories, Heidelberg, D
nNOS	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	Dr. B. Mayer, Graz, A

Tabelle 2. Verwendete Sekundärseren

Antigen	Konjugat	Wirts-Spezies	Verdünnung	Quelle
Ziegen-IgG	FITC	Maus (monoklonal)	1:160	Sigma, Deisenhofen, D
Kaninchen-IgG	FITC	Ziege (polyklonal)	1:160	MB Biomedicals GmbH (Cappel), Eschwege, D

2.2 Auswertung

2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

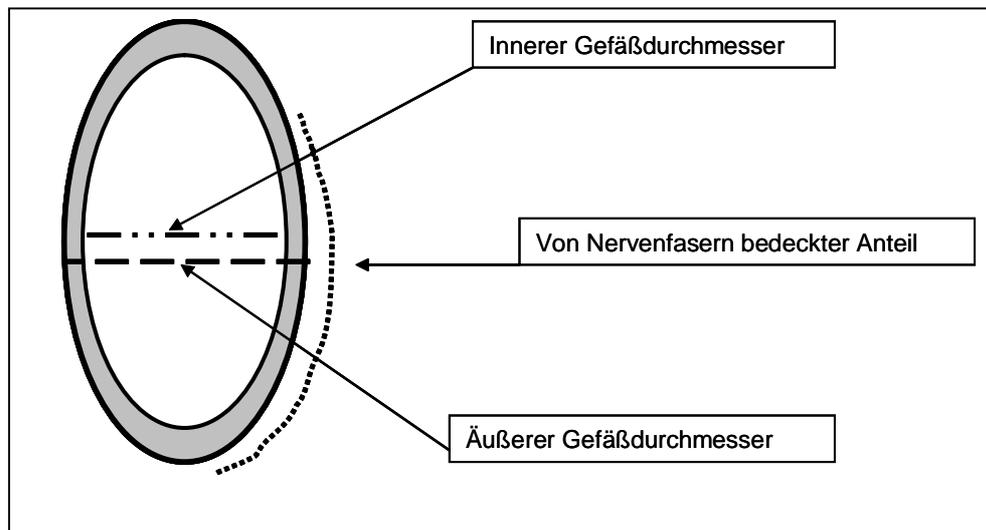
Die Betrachtung der immunhistochemisch markierten Herzpräparate erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus, Hamburg, D). Mit Hilfe eines Anregungsfilters im Wellenlängenspektrum von 470-490 nm und eines Sperrfilters im Spektrum von 510-550 nm wurden die FITC-markierten Strukturen dargestellt.

2.2.2 Digitale Auswertung der Gewebeschnitte

Von jedem der fünfzehn Herzblöcke wurden für jeden Primärantikörper jeweils zwei Schnitte (Dicke: 10 μm) im Abstand von 200 μm im Mikroskop betrachtet. Jede Arterie wurde erfasst und mit Hilfe der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera Hitachi KP-M1E/K (Hitachi Denshi (Europe), Garforth, UK) als Bilddatei im Computer gespeichert. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Scion Image (Version: Beta 3b, Scion Corporation, Maryland, USA) konnten die inneren Durchmesser (ohne Erfassung der Arterienwand), die äußeren Durchmesser, die Umfänge und der jeweilige Innervationsindex (derjenige Anteil in Prozent vom Gesamtumfang eines Gefäßes, welcher von immunreaktiven Nervenfasern umgeben ist) ermittelt werden. Abbildung 9 zeigt die einzelnen Auswertungsparameter. Da der innere Durchmesser denjenigen Parameter darstellt, welcher unabhängig von der Schnittführung nahezu konstant bleibt, wurden die Gefäßgrößen aus diesem ermittelt. Zudem besteht eine direkte Korrelation zwischen innerem Gefäßdurchmesser und der Wanddicke der Gefäße (Podesser et al. 1998).

Somit konnten die nicht in die Angaben der Gefäßgrößen einfließenden Wanddicken vernachlässigt werden.

Abbildung 9. Auswertungsparameter der Arterien



2.2.3 Statistische Methodik

Es wurden bei fünf Tieren die Herzen in drei Abschnitte unterteilt. Es wurden immer zwei Herzquerschnitte im Abstand von mindestens 200 μm pro Abschnitt und pro Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper ausgewertet. Der Innervationsindex wurde für jede Arterie bestimmt. Die Größe der Gefäße wurde durch den inneren Durchmesser bestimmt. Insgesamt kamen 402 Gefäße in die Auswertung. Es wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung des Innervationsindex für jeden der vier Nervenfasertypen für den jeweiligen Herzabschnitt bestimmt. Eine mögliche lineare Korrelation zwischen innerem Gefäßdurchmesser der Arterien und der Höhe des Innervationsindex wurde für jeden Nervenfasertyp (VACHT-, TH-, NOS-, CGRP-immunreaktiv) für jeden der Herzabschnitte (A, B, C) mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS (SPSS GmbH Software, München, D) ermittelt. Der Vergleich der Nervenfasertypen untereinander und der Vergleich des Innervationsindex in den unterschiedlichen Herzabschnitten wurden mit nichtparametrischen Tests (Friedman-Test und Wilcoxon-Test) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Perivaskuläre Nervenfasern in den verschiedenen Herzabschnitten

3.1.1 VAcHT-immunreaktive Axone

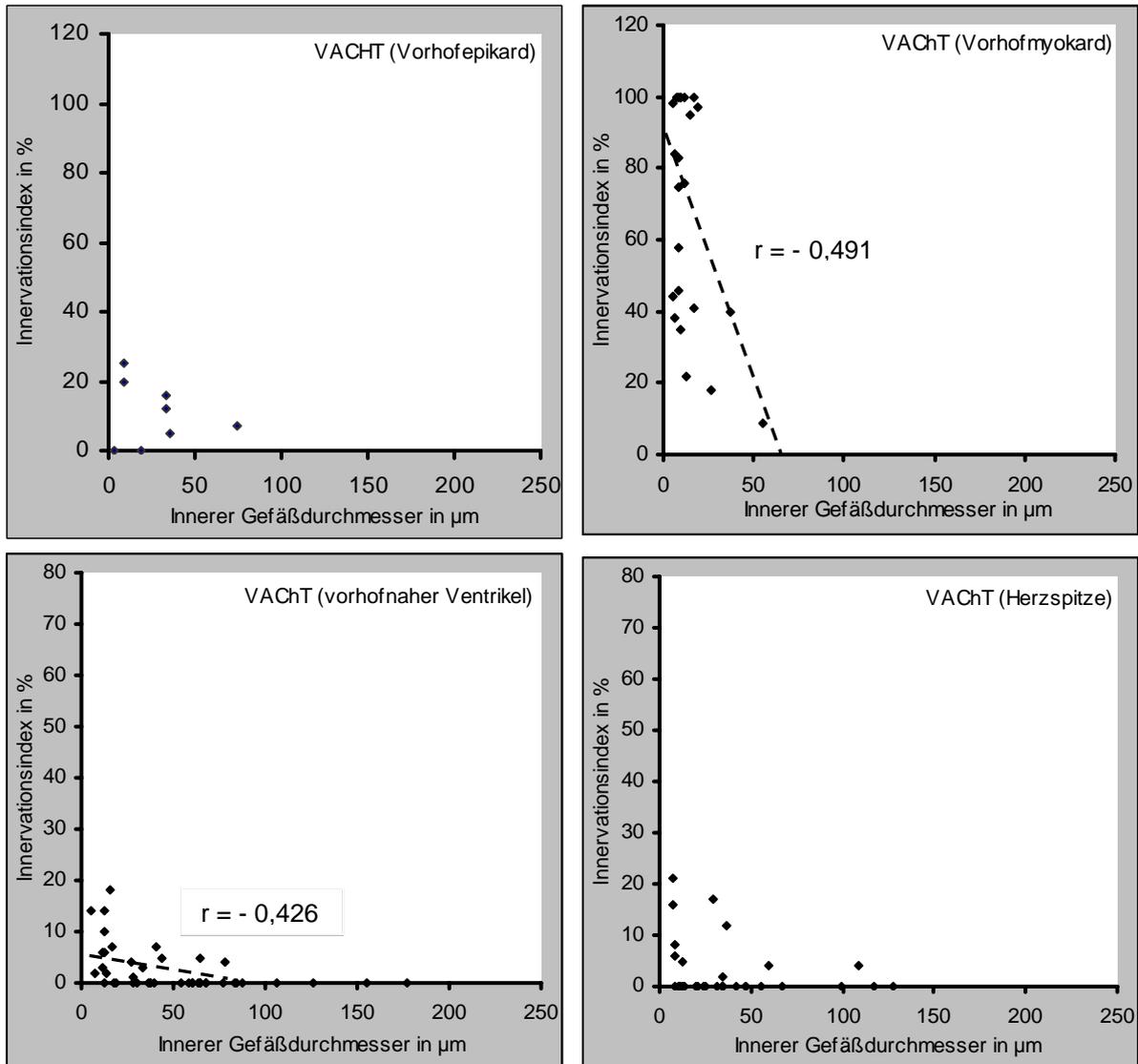
Am Ursprung der KoronargefäÙe aus der Aorta haben diese nur eine geringe perivaskuläre Versorgung durch VAcHT-enhaltende Axone. Die folgenden myokardialen GefäÙe, welche die Vorhöfe des Rattenherzens (Abschnitt A) versorgen, weisen hingegen einen hohen cholinergen Innervationsindex auf. Hier sind 27 von 28 ausgewerteten GefäÙen mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 55 µm cholinerg innerviert. Der Innervationsindex der GefäÙe beträgt im Mittel 68 %. Es findet sich eine signifikante ($p = 0.017$) negative Korrelation ($r = -0,491$) zwischen GefäÙgröße und Umfang der Innervation (Abbildung 10). Abbildung 11 zeigt, dass besonders kleine GefäÙe im Vorhofmyokard eine starke perivaskuläre Immunreaktivität für VAcHT aufweisen. GefäÙe mit einem inneren Durchmesser größer als 20 µm haben einen maximalen Innervationsindex von 40 %. Von 9 ausgewerteten epikardialen GefäÙen sind 7 cholinerg innerviert. Der Innervationsindex beträgt hier im Mittel 18 % (siehe Abbildung 12). Im Verlauf der KoronargefäÙe zur Herzspitze nimmt die cholinergen Innervation ab. GefäÙe, die im vorhofnahen Ventrikelbereich liegen (Abschnitt B), haben nur noch einen mittleren Innervationsindex von 2 % (siehe Abbildung 13). Von 45 ausgewerteten GefäÙen mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 195 µm sind 18 cholinerg innerviert. Auch hier findet sich eine signifikante ($p = 0.004$) negative Korrelation ($r = -0,426$) zwischen GefäÙgröße und Umfang der Innervation. GefäÙe mit einem inneren Durchmesser größer als 80 µm weisen keine cholinerge Innervation auf. Im Myokard der Herzspitze (Abschnitt C) sind von 33 ausgewerteten GefäÙen 10 von cholinergen perivaskulären Nervenfasern umgeben. Der innere Durchmesser der GefäÙe liegt zwischen 7 und 128 µm. Der mittlere Innervationsindex liegt in diesem Abschnitt des Herzens bei 3 % (siehe Abbildung 14). Die Graphiken der Abbildung 10 zeigen den Innervationsindex VAcHT immunreaktiver Fasern in den einzelnen Herzabschnitten in Relation zu den GefäÙgrößen. Abbildung 15 zeigt, dass der Innervationsindex von GefäÙen des Vorhofmyokards signifikant größer ist als der von GefäÙen beider untersuchter Ventrikelabschnitte ($p = 0.042$) bzw. ($p = 0,042$). Zwischen den GefäÙen

der Abschnitte B und C findet sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,893$).

Abbildung 10.

Innervationsindex für VACHT in Relation zur Gefäßgröße - aufgeteilt nach Herzabschnitten.

Die gestrichelte Linie stellt die Regressionsgrade und „r“ den Regressionskoeffizienten dar.



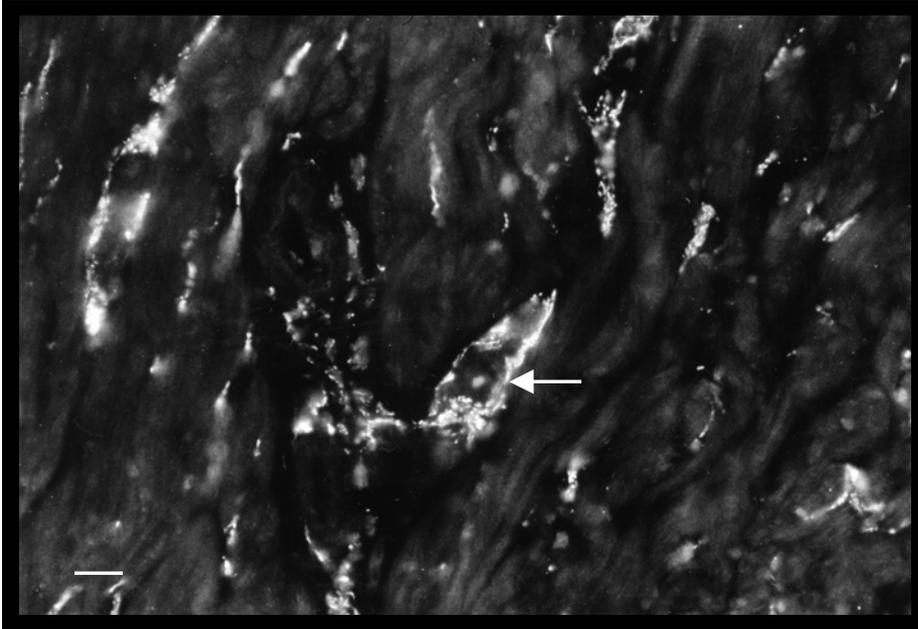


Abbildung 11. VAcHT-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) und in Nervenfasern des Myokards im Vorhof der Ratte (Maßstab = 20 μm)

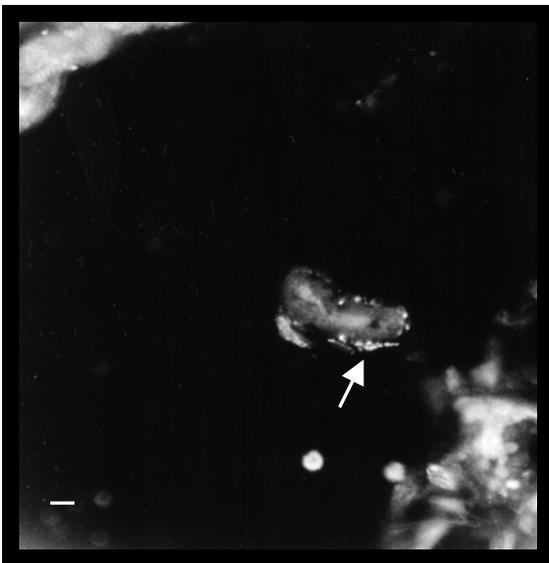


Abbildung 12. VAcHT-Immunreaktivität in perivaskulären Varikositäten (siehe Pfeil) epikardial in Höhe des Vorhofs der Ratte (Maßstab = 20 μm)

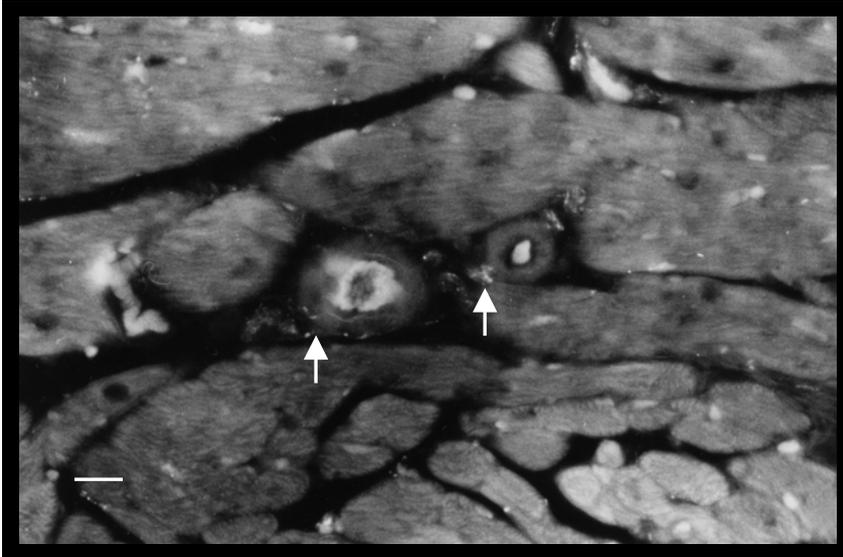


Abbildung 13. VAcHT-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (vorhofnah) der Ratte (Maßstab = 20 μ m)

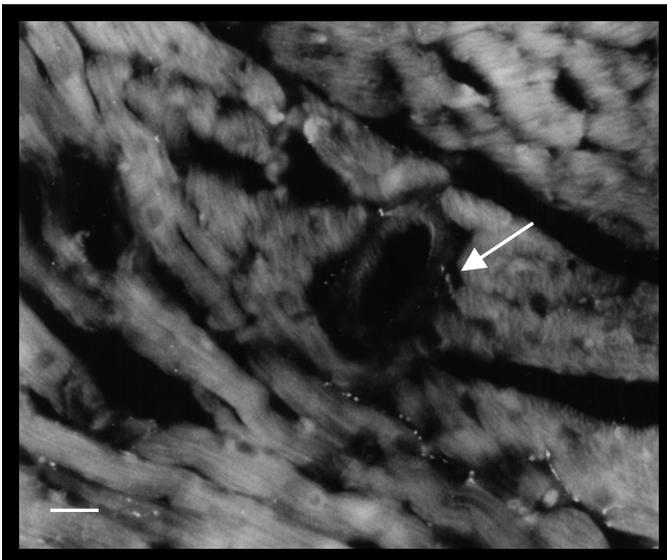
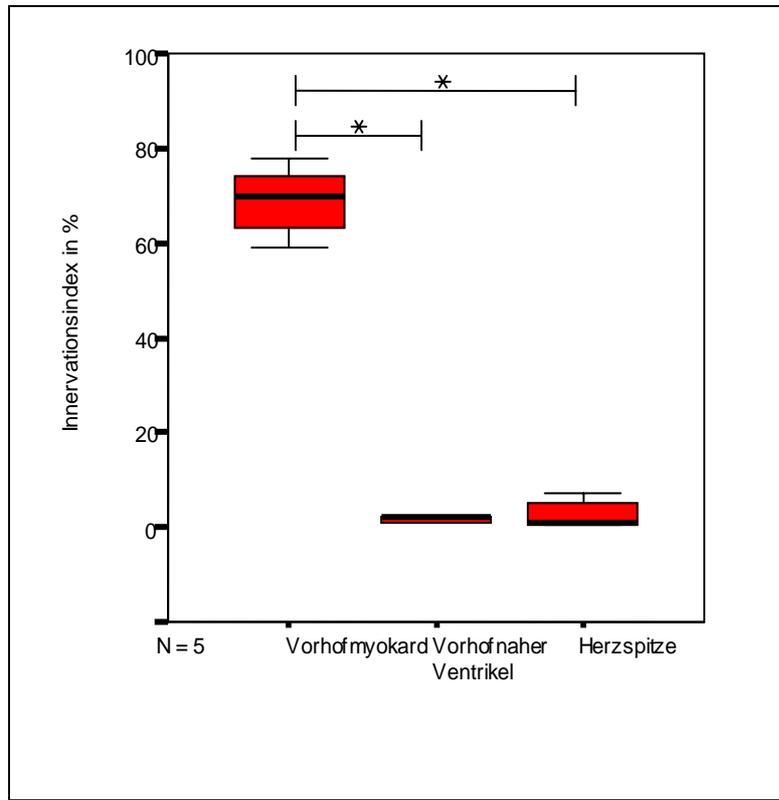


Abbildung 14. VAcHT-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (Herzspitze) der Ratte (Maßstab = 20 μ m)

Abbildung 15.

Innervationsindex für VAcHT in Relation zu den Herzabschnitten.

(* $p < 0,05$, Friedman-Test)



3.1.2 NOS-immunreaktive Axone

NOS-enhaltende Axone finden sich nur ganz unregelmäßig an den Koronargefäßen des Vorhofs (Abschnitt A). Von 31 ausgewerteten myokardialen Gefäßen mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 53 μm zeigen 8 eine perivaskuläre Versorgung mit NOS-enhaltenden Nervenfasern. Der durchschnittliche Innervationsindex aller ausgewerteten Gefäße liegt bei 6 %. Es findet sich keine Korrelation zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex. Abbildung 16 zeigt den Innervationsindex für NOS im Vorhofmyokard in Relation zu den Gefäßgrößen. Von 5 ausgewerteten epikardialen Gefäßen sind vier Gefäße nicht von NOS-enhaltenden Axonen umgeben. Ein Gefäß zeigt einen Innervationsindex von 17 %. Abbildung 17 zeigt perivaskuläre NOS-Immunreaktivität an einer Arterie des Vorhofes. Im Ventrikel (Abschnitte B und C) weisen die Gefäße bei drei untersuchten Tieren keine NOS-enhaltenden perivaskulären Nervenfasern auf.

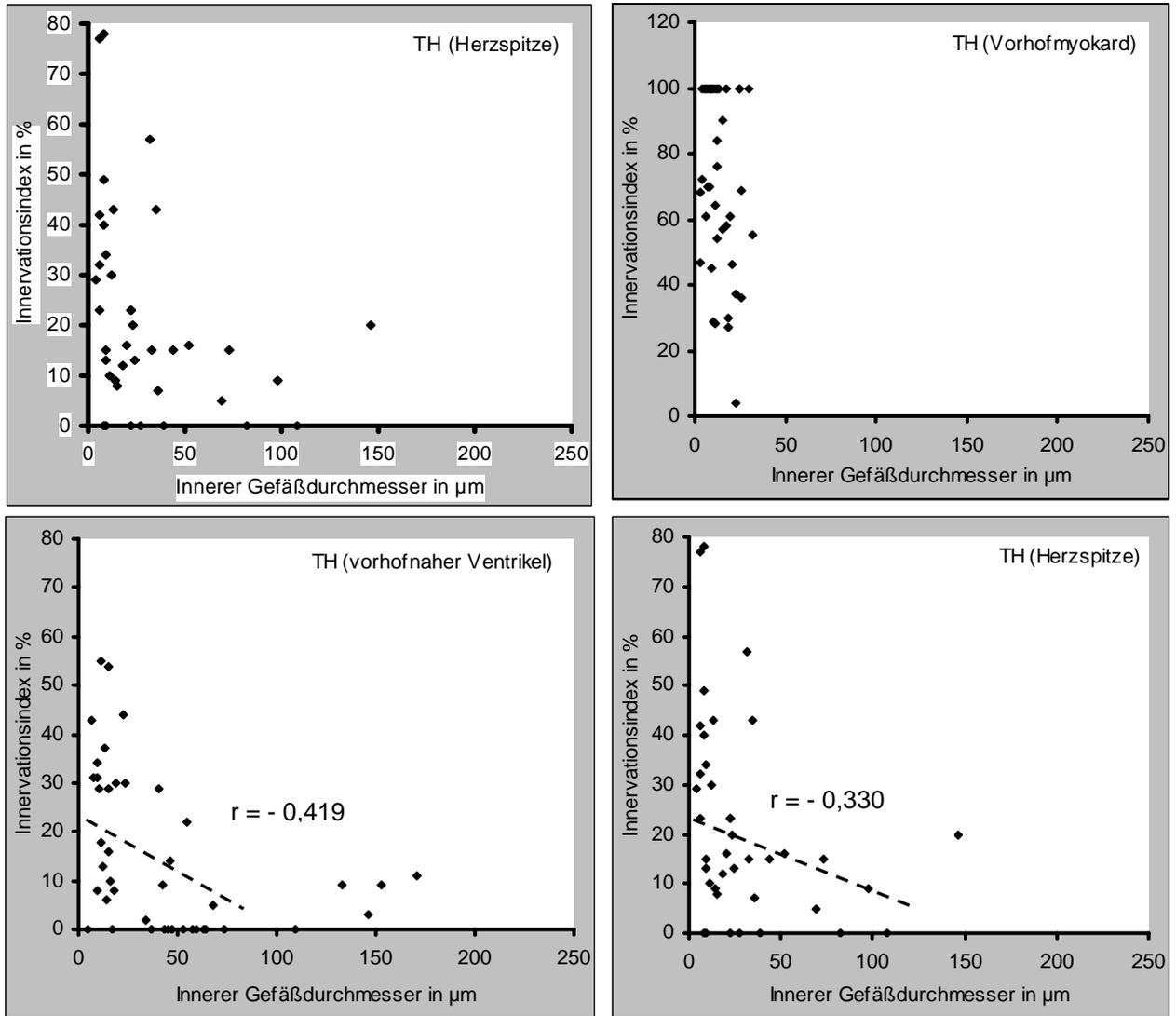
3.1.3 TH-immunreaktive Axone

Am Ursprung der Koronargefäße aus der Aorta weisen diese nur eine geringe perivaskuläre Versorgung durch TH-enthaltende Axone auf. Die sich abzweigenden myokardialen Gefäße der Vorhöfe (Abschnitt A) hingegen sind sehr stark sympathisch innerviert (Abbildung 18). Von 44 ausgewerteten Gefäßen mit einem inneren Durchmesser bis 32 μm sind alle durch TH-enthaltende perivaskuläre Axone versorgt. Der mittlere Innervationsindex dieser Gefäße beträgt 74 %. Abbildung 19 zeigt die starke Versorgung der Arterien des Vorhofes der Ratte durch TH-immunreaktive Axone. Von 5 ausgewerteten epikardialen Gefäßen weisen alle eine sympathische perivaskuläre Innervation auf. Der mittlere Innervationsindex liegt hier bei 80% (siehe Abbildung 20). Die Versorgung mit TH-enthaltenden perivaskulären Nervenfasern nimmt im Ventrikel ab. Im vorhofnahen Anteil (Abschnitt B) sind 30 von 44 Gefäßen mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 171 μm noradrenerg innerviert. Der mittlere Innervationsindex beträgt 15 %. Abbildung 21 zeigt die perivaskuläre Versorgung mit TH-immunreaktiven Axonen in diesem Bereich des Herzens. Es findet sich eine signifikante ($p = 0.006$) negative Korrelation ($r = -0,419$) zwischen Gefäßgröße und Umfang der Innervation. Im Myokard der Herzspitze (Abschnitt C) sind von 40 ausgewerteten Gefäßen 32 von noradrenergen perivaskulären Nervenfasern umgeben. Der innere Durchmesser der Gefäße liegt zwischen 4 und 146 μm . Der mittlere Innervationsindex liegt in diesem Abschnitt des Herzens bei 22 %. Es findet sich auch hier eine signifikante ($p = 0.04$) negative Korrelation ($r = -0,33$) zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex. Abbildung 22 zeigt eine Arterie der Herzspitze mit einem inneren Durchmesser von 60 μm , welche eine schwache TH-Immunreaktivität aufweist. Abbildung 23 zeigt, dass der Innervationsindex von Gefäßen des Vorhofmyokards signifikant größer ist als der von Gefäßen der Abschnitte B ($p = 0.043$) und C ($p = 0,043$). Zwischen den Gefäßen der Abschnitte B und C findet sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,176$).

Abbildung 18.

Innervationsindex für TH in Relation zur Gefäßgröße - aufgeteilt nach Herzabschnitten.

Die gestrichelte Linie stellt die Regressionsgrade und „r“ den Regressionskoeffizienten dar.



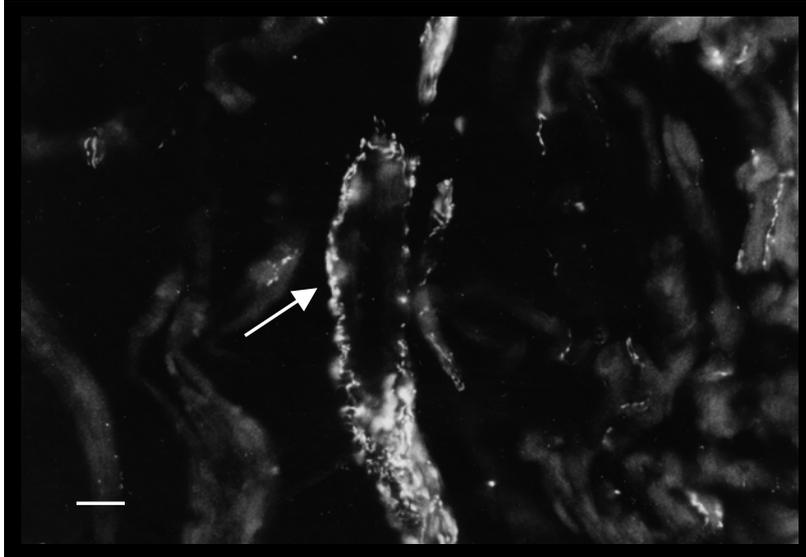


Abbildung 19. TH-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Vorhof der Ratte (Maßstab = 20 μm)

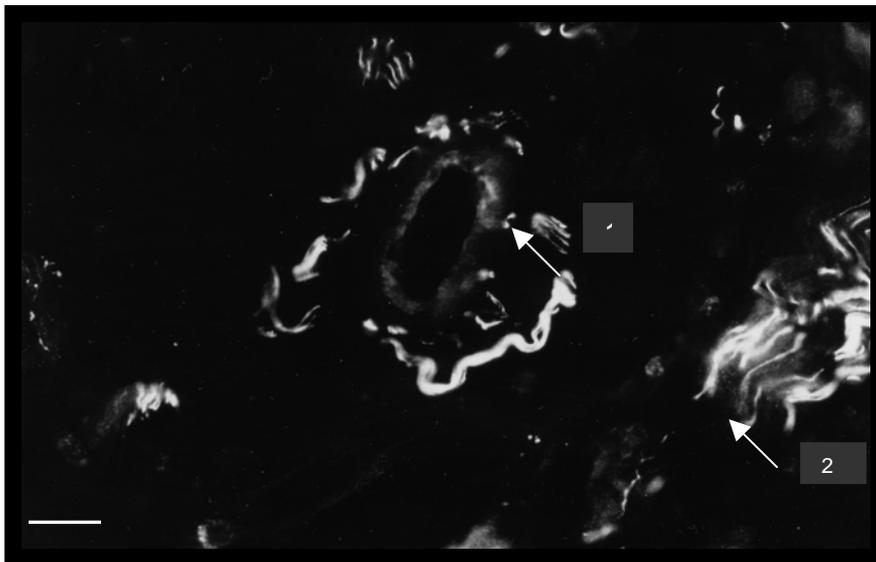


Abbildung 20. TH-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil 1) epikardial in Höhe des Vorhofs der Ratte (Maßstab = 20 μm). Pfeil 2 zeigt ein Nervenfaserbündel.

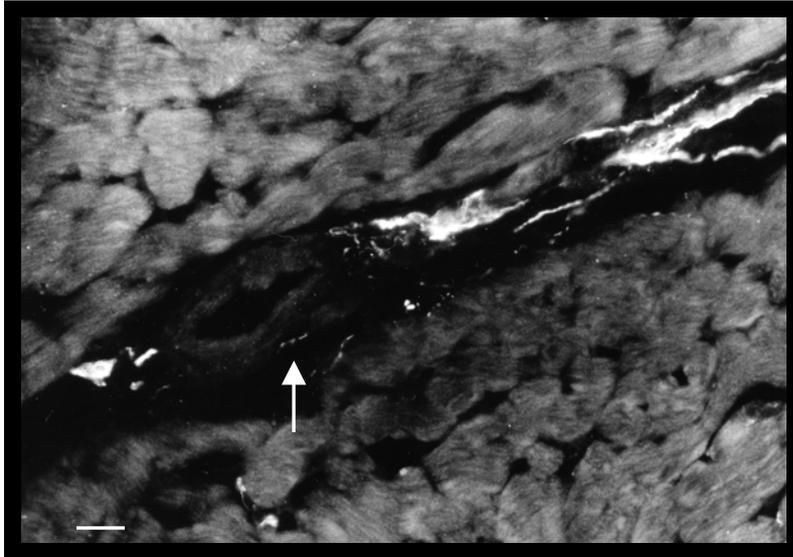


Abbildung 21. TH-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (vorhofnah) der Ratte (Maßstab = 20 μm)

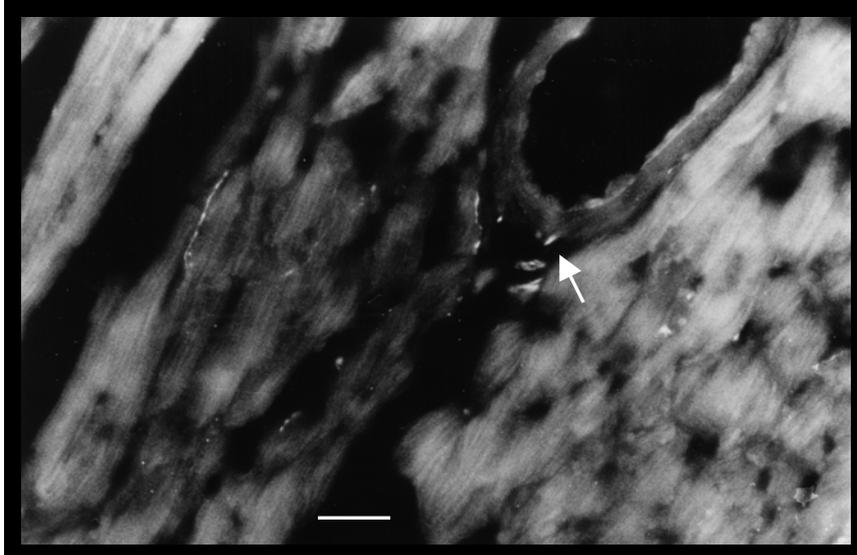
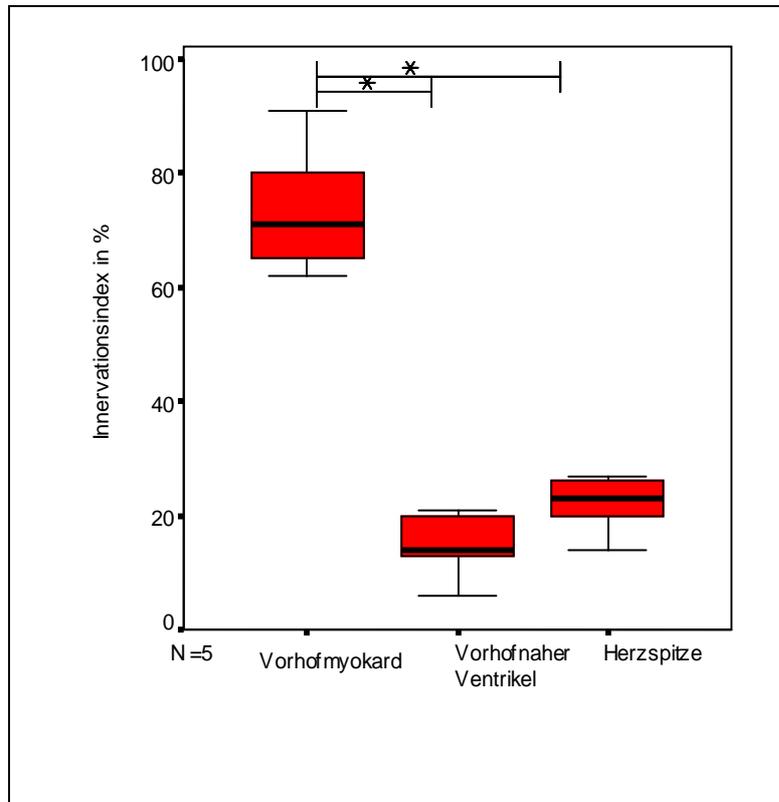


Abbildung 22. TH-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (Herzspitze) der Ratte (Maßstab = 20 μm)

Abbildung 23.

Innervationsindex für TH in Relation zu den Herzabschnitten.

(* $p < 0,05$, Friedman-Test)



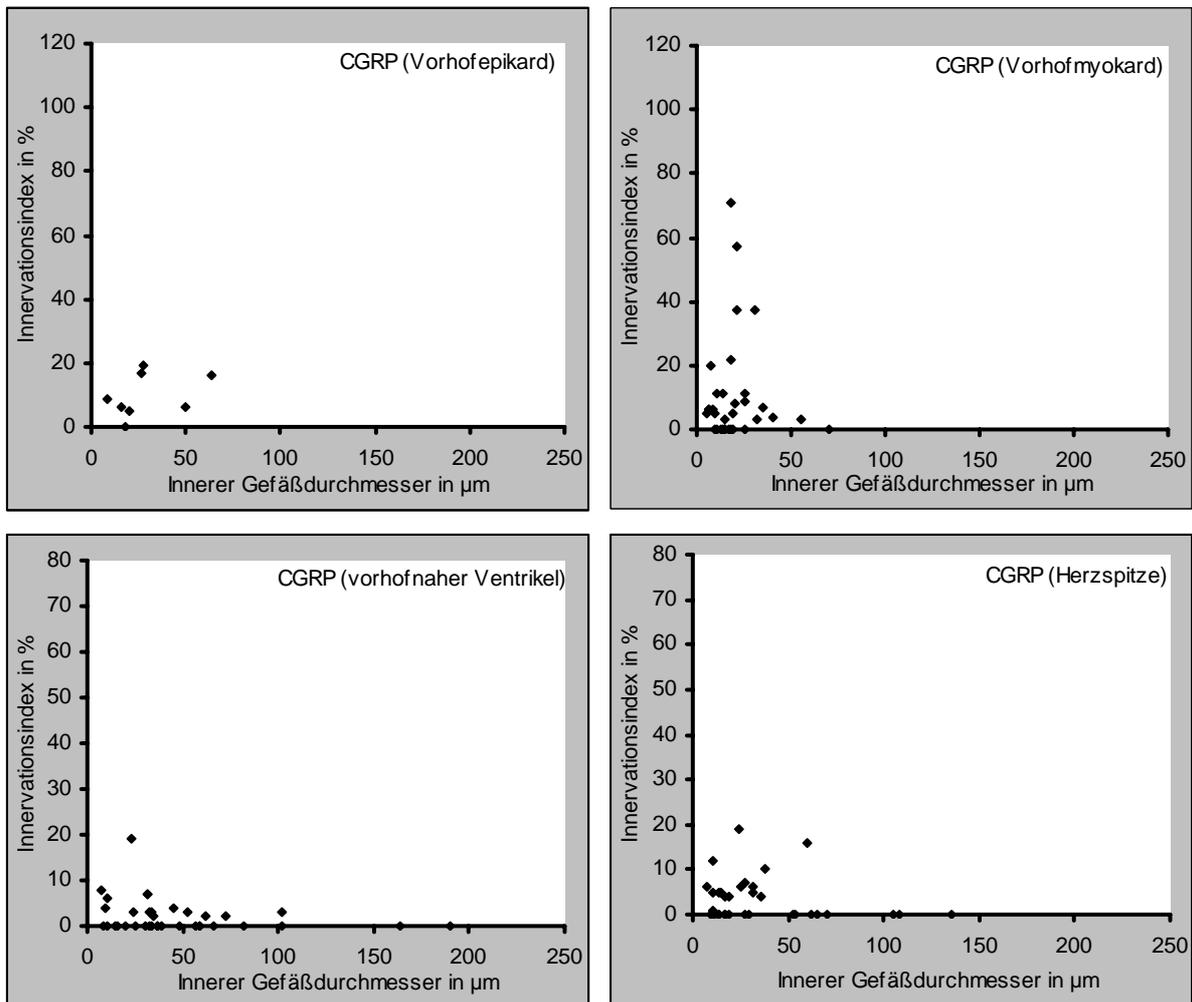
3.1.4 CGRP-immunreaktive Axone

Am Ursprung der Koronargefäße findet sich eine nur sehr geringe perivaskuläre Versorgung durch CGRP-enhaltende Axone. Die myokardialen Gefäße der Vorhöfe (Abschnitt A) haben einen mittleren Innervationsindex von 7 % (siehe Abbildung 24). Von 35 ausgewerteten Gefäßen mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 70 μm sind 22 von CGRP-immunreaktiven Nervenfasern umgeben (siehe Abbildung 25). Von 8 ausgewerteten epikardialen Gefäßen zeigen 7 perivaskuläre Nervenfasern mit einer CGRP-Immunreaktivität. Der mittlere Innervationsindex beträgt 10 %. Die Versorgung der Koronargefäße durch CGRP-immunreaktive Nervenfasern nimmt im Ventrikel ab. Im vorhofnahen Abschnitt (Abschnitt B) sind 19 von 40 ausgewerteten Gefäßen mit einem inneren Durchmesser von 7 bis 190 μm innerviert. Der mittlere Innervationsindex liegt hier bei 2 %. Abbildung 26 zeigt die schwache perivaskuläre Versorgung durch CGRP-immunreaktive Axone in diesem Bereich. Im Myokard der Herzspitze (Abschnitt C) findet sich um die Gefäße ebenfalls nur noch eine geringe Versorgung durch CGRP-immunreaktive Nervenfasern. Von 35 ausgewerteten

Gefäßen mit einem inneren Durchmesser von 7 bis 136 μm sind 16 sensibel innerviert. Der mittlere Innervationsindex beträgt hier 3 % (siehe Abbildung 27). In keinem der Herzabschnitte findet sich hier eine Korrelation zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex. Auch ein signifikanter Unterschied des Innervationsindexes zwischen den einzelnen Herzabschnitten existiert nicht ($p = 0,189$) (siehe Abbildung 28).

Abbildung 24.

Innervationsindex für CGRP in Relation zur Gefäßgröße - aufgeteilt nach Herzabschnitten.



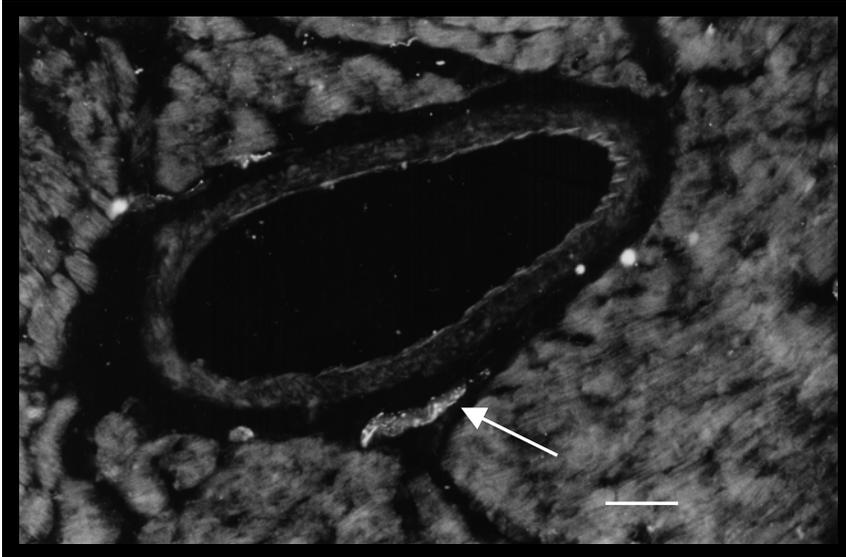


Abbildung 25. CGRP-Immunreaktivität in einem perivaskulären Nervenfaserbündel (siehe Pfeil) im Vorhof der Ratte (Maßstab = 20 μm)

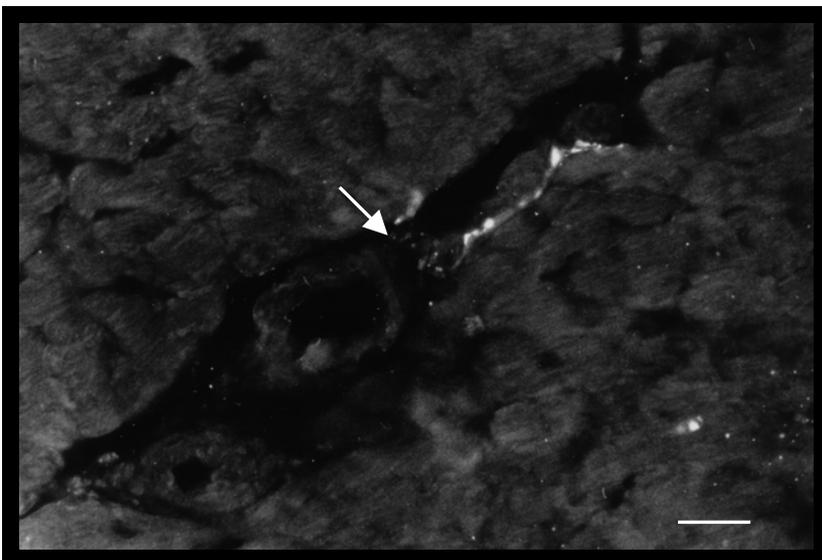


Abbildung 26. CGRP-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (vorhofnah) der Ratte (Maßstab = 20 μm)

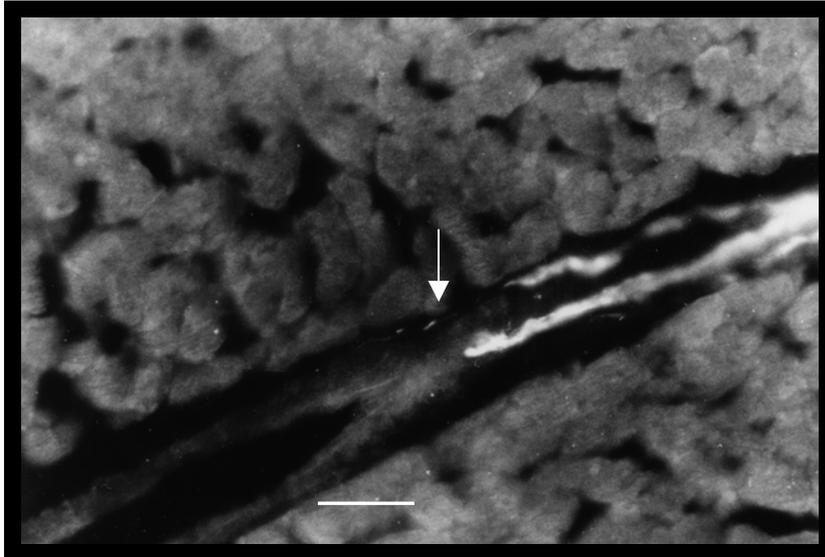
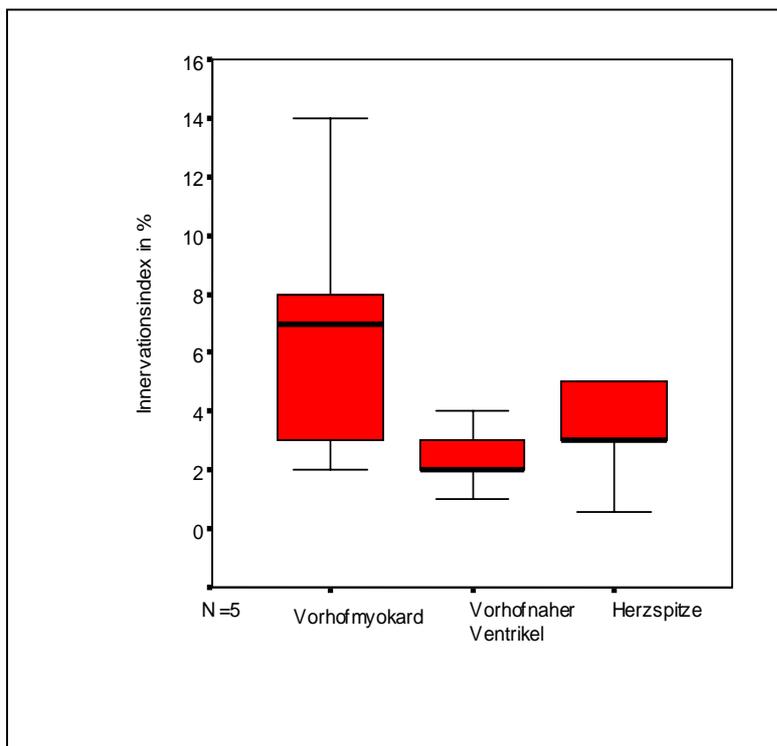


Abbildung 27. CGRP-Immunreaktivität in perivaskulären Nervenfasern (siehe Pfeil) im Ventrikel (Herzspitze) der Ratte (Maßstab = 20 µm)

Abbildung 28.

Innervationsindex für CGRP in Relation zu den Herzabschnitten



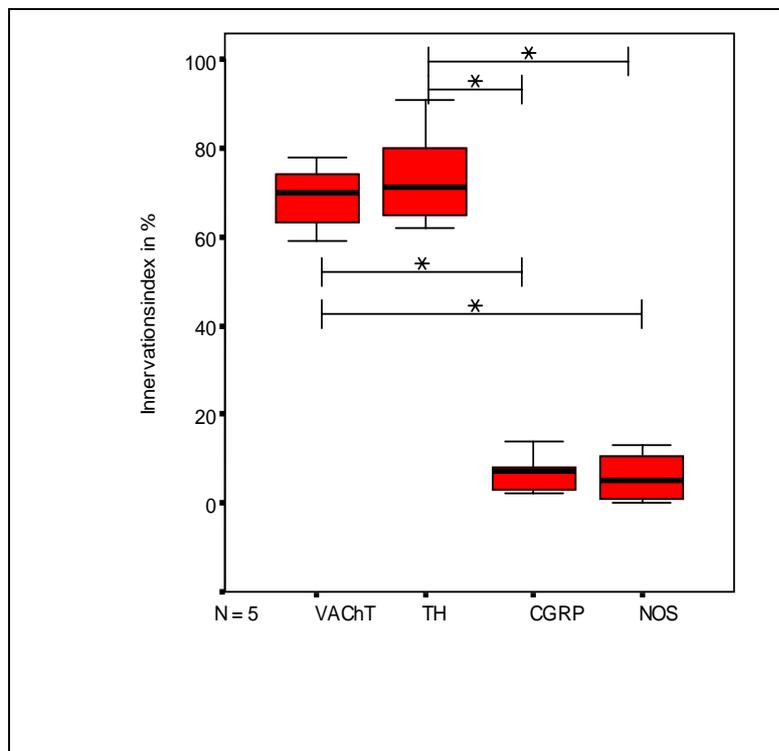
3.2 Vergleich der perivaskulären Innervation durch unterschiedliche Nervenfasertypen

Der Innervationsindex im Vorhof des Herzens ist für TH und VACHT im Vergleich zu dem Innervationsindex für NOS und CGRP am höchsten. Es findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Innervationsindex für VACHT im Vergleich zu dem Innervationsindex für NOS ($p = 0,043$) und CGRP ($p = 0,042$). Es findet sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen dem Innervationsindex für TH im Vergleich zu dem Innervationsindex für NOS ($p = 0,043$) und CGRP ($p = 0,043$). Kein signifikanter Unterschied findet sich diesbezüglich zwischen TH und VACHT ($p = 0,345$) und zwischen NOS und CGRP ($p = 0,102$). Abbildung 29 zeigt diesen Vergleich der perivaskulären Innervation zwischen den einzelnen Nervenfasertypen im Vorhofmyokard.

Abbildung 29.

Vergleich der verschiedenen Innervationsindices im Vorhof

(* $p < 0,05$, Friedman-Test)

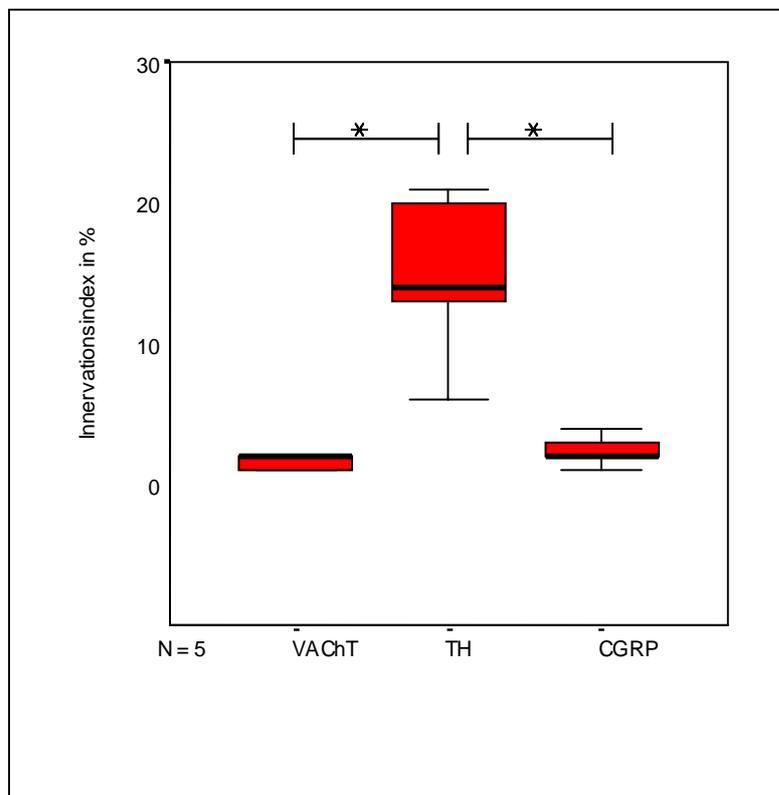


Der Innervationsindex im vorhofnahen Ventrikel ist für TH im Vergleich zu den Innervationsindices für VACHT und CGRP am höchsten. Es findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Innervationsindex für TH im Vergleich zu denen für VACHT ($p = 0,043$) und NOS ($p = 0,042$). Kein signifikanter Unterschied zeigt sich diesbezüglich zwischen CGRP und VACHT ($p = 0,783$). Abbildung 30 zeigt diesen Vergleich der perivaskulären Innervation zwischen den einzelnen Nervenfasertypen im vorhofnahen Ventrikel.

Abbildung 30.

Vergleich der verschiedenen Innervationsindices im vorhofnahen Ventrikel.

(* $p < 0,05$, Friedman-Test)

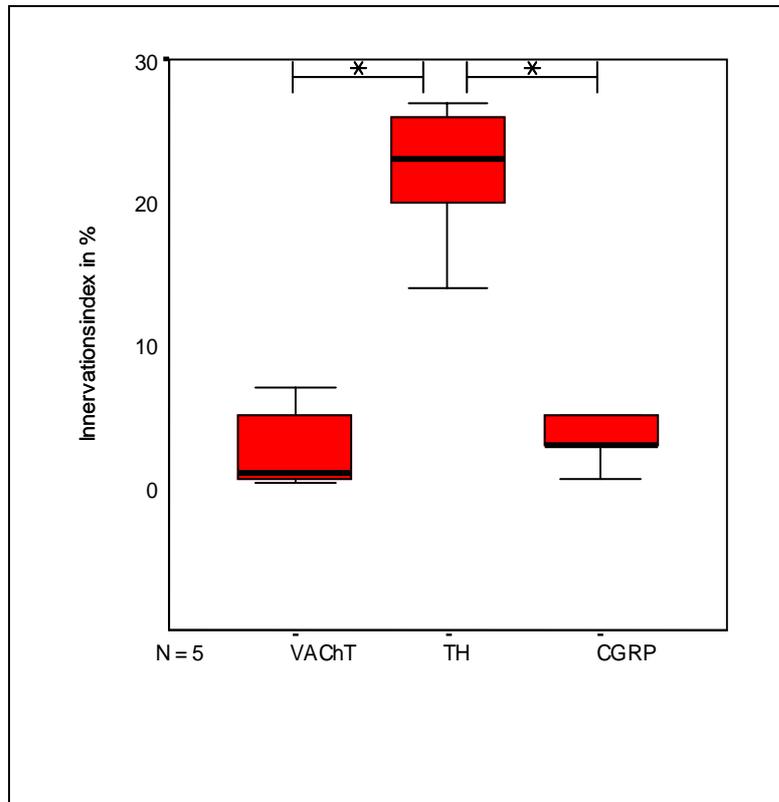


Der Innervationsindex in der Herzspitze ist ebenfalls für TH im Vergleich zu den Innervationsindices für VACHT und CGRP am höchsten. Es findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Innervationsindex für TH im Vergleich zu denen für VACHT ($p = 0,043$) und für NOS ($p = 0,043$). Kein signifikanter Unterschied zeigt sich diesbezüglich zwischen CGRP und VACHT ($p = 0,684$). Abbildung 31 zeigt diesen Vergleich der perivaskulären Innervation zwischen den einzelnen Nervenfasertypen in der Herzspitze.

Abbildung 31.

Vergleich der verschiedenen Innervationsindices in der Herspitze.

(* $p < 0,05$, Friedman-Test)



Der Vergleich der perivaskulären Nervenfasertypen zeigt :

- Noradrenerge perivaskuläre Nervenfasern sind in allen Herzabschnitten signifikant stärker vorhanden als sensible und NOS-enhaltende perivaskuläre Nervenfasern.
- Nur im Vorhofmyokard gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Innervationsindices von VACHT und TH. In den anderen Herzabschnitten ist der Innervationsindex für TH signifikant größer als für VACHT.
- VACHT hat nur im Vorhofmyokard einen signifikant größeren Innervationsindex als CGRP und NOS. In den anderen Herzabschnitten gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Innervationsindices für VACHT und CGRP.
- NOS-enhaltende perivaskuläre Nervenfasern kommen nur im Vorhofmyokard vor. Der Innervationsindex im Vorhofmyokard für NOS unterscheidet sich nicht signifikant von dem für CGRP.

Tabelle 3. Perivaskuläre VACHT-Immunreaktivität im Vorhof.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	7	7	63 \pm 34
2	6	5	59 \pm 43
3	5	5	70 \pm 20
4	5	5	78 \pm 20
5	5	5	74 \pm 20
Summe	28	27	68,8\pm3,5

Tabelle 4. Perivaskuläre VAcHT-Immunreaktivität im vorhofnahen Ventrikel.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	12	7	5 \pm 6
2	7	2	1 \pm 2
3	10	3	1 \pm 3
4	8	3	2 \pm 2
5	8	3	2 \pm 3
Summe	45	18	2,2\pm0,7

Tabelle 5. Perivaskuläre VAcHT-Immunreaktivität in der Herzspitze.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	6	1	0,3 \pm 0,8
2	8	1	0,6 \pm 1,8
3	8	4	7 \pm 9
4	5	2	5 \pm 7
5	6	2	1 \pm 2
Summe	33	10	2,8\pm1,4

Tabelle 7. Perivaskuläre TH-Immunreaktivität im Vorhof.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
------	-------------	--------------------	--

1	8	8	62±36
2	10	10	71±35
3	8	8	91±18
4	8	8	80±19
5	10	10	65±20
Summe	44	44	73,8±5,3

Tabelle 8. Perivaskuläre TH-Immunreaktivität im vorhofnahen Ventrikel.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) ± S.D.
1	11	5	14±20
2	8	5	6±8
3	7	5	13±15
4	9	8	21±15
5	9	7	20±18
Summe	44	30	14,8±2,7

Tabelle 9. Perivaskuläre TH-Immunreaktivität in der Herspitze.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) ± S.D.
1	9	6	20±20
2	10	5	27±33
3	4	4	26±19
4	8	8	23±12
5	9	9	14±4
Summe	40	32	22,0±2,3

Tabelle 10. Perivaskuläre CGRP-Immunreaktivität im Vorhof.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	6	3	3 \pm 3
2	9	4	2 \pm 3
3	5	4	8 \pm 8
4	5	3	7 \pm 6
5	10	8	14 \pm 14
Summe	35	22	6,8\pm2,1

Tabelle 11. Perivaskuläre CGRP-Immunreaktivität im vorhofnahen Ventrikel.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	7	4	3 \pm 3
2	6	3	2 \pm 2
3	8	3	2 \pm 3
4	9	3	1 \pm 3
5	10	6	4 \pm 6
Summe	40	19	2,4\pm0,5

Tabelle 12. Perivaskuläre CGRP-Immunreaktivität in der Herspitze.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) \pm S.D.
1	6	3	3 \pm 4
2	10	6	5 \pm 6
3	6	3	5 \pm 7
4	5	3	3 \pm 3
5	8	1	0,6 \pm 1,8
Summe	35	16	3,3\pm0,8

Tabelle 13. Perivaskuläre NOS-Immunreaktivität im Vorhof.

Tier	Gefäßanzahl	Innervierte Gefäße	Mittlerer Innervationsindex (%) ± S.D.
1	8	5	13±14
2	8	1	2±5
3	8	0	0±0
4	7	2	8±15
Summe	31	8	5,6±3,0

4. Diskussion

4.1 Perivaskuläre Innervation der koronaren Strombahn

4.1.1 VAcHT-immunreaktive Axone

Der Haupttransmitter postganglionärer parasympathischer Neurone ist ACh. Seine Wirkung an den Koronargefäßen ist speziesabhängig. Während bei Hunden auf exogen appliziertes ACh eine Vasodilatation der Koronargefäße, welche abhängig von einem intakten Endothel ist, beobachtet werden kann (Schipke et al. 1985), zeigt sich bei Pavianen eine Konstriktion der Koronargefäße, welche durch Atropin aufgehoben werden kann (Young et al. 1987). In gesunden Koronararterien beim Menschen erfolgt auf die intrakoronare Applikation von ACh eine Vasodilatation, während in atherosklerotischen Segmenten eine Konstriktion der Gefäße hervorgerufen wird (Ludmer et al. 1986). Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass sowohl eine exogene Applikation als auch die Freisetzung von ACh aus perivaskulären Nervenfasern eine Konstriktion der Koronargefäße hervorrufen (Nasa et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden cholinerge parasympathische perivaskuläre Nervenfasern in allen Abschnitten des Rattenherzens gefunden. Den größten Innervationsindex durch VAcHT-immunreaktive Axone weisen die Koronargefäße des Vorhofs auf (mittlerer Innervationsindex: 68%), wobei im Vergleich dazu die Arterien beider Abschnitte des Ventrikels einen signifikant kleineren Innervationsindex für VAcHT (Abschnitt B: mittlerer Innervationsindex: 2%; Abschnitt C: mittlerer Innervationsindex: 3%) aufweisen. Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie eine negative Korrelation zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex für VAcHT im Vorhof und im vorhofnahen Ventrikel gezeigt werden.

Die starke autonome Innervation insbesondere der Arterien mit einem kleinen Durchmesser bedeutet, dass besonders die Widerstandsgefäße stark innerviert sind. Diese regulieren zu einem erheblichen Anteil den koronaren Blutfluss. Da vor allem die kleinen Arterien des Vorhofs stark innerviert sind, muss davon ausgegangen werden, dass am Rattenherzen die cholinerge Regulation des Blutflusses im Vorhof eine erhebliche Rolle spielt, während die cholinerge nervale Regulation des Blutflusses der Ventrikel ein eher untergeordneter Mechanismus ist und hier die

koronare Durchblutung vielmehr durch metabolische, myogene, humorale und endotheliale Mechanismen gesteuert wird. Diese Annahme einer unterschiedlichen Blutflussregulation zwischen Vorhof und Ventrikel durch das autonome Nervensystem wird gestützt durch den - wie die vorliegende Studie zeigt - ebenfalls signifikant kleineren Innervationsindex der ventrikulären Arterien für TH im Vergleich zu den Gefäßen des Vorhofs. Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des cholinergen Systems in Bezug auf die Regulation des koronaren Blutflusses wird allerdings kontrovers diskutiert. Während Baumgart und Heusch vermuten, dass die parasympathische Regulation des koronaren Blutflusses eine eher untergeordnete Rolle spielt (Baumgart et al. 1995), sieht Nasa die Konstriktion der Koronargefäße als Antwort auf ACh als potenziellen pathologischen Faktor einer koronaren Gefäßerkrankung an (Nasa et al. 1997). Gestützt wird diese These durch Studien, welche eine Mitbeteiligung des parasympathischen Systems an Spasmen der Koronarien propagieren (Choi et al. 2003). Allerdings postulieren andere Autoren, dass das parasympathische System diesbezüglich eher eine protektive Funktion besitzt (Lanza et al. 1996, Yasue et al. 1974). Endogen appliziertes ACh bewirkt am intakten humanen Endothel über die Freisetzung von vasodilatatorischen Substanzen eine Vasodilatation, während das perivaskuläre freigesetzte ACh eine Vasokonstriktion hervorruft (Ludmer et al. 1986). Bei Schädigung des Endothels könnte das in geringen Mengen im Plasma vorkommende ACh direkt zu den muskarinischen Rezeptoren der Media gelangen und über diese eine Vasokonstriktion hervorrufen. Es würde demzufolge bei einer Schädigung des Endothels nicht nur zu einer Aufhebung der vasodilatatorischen Funktion von endogenem ACh kommen, sondern zu einer Verstärkung des vasokonstriktorischen Effektes des perivaskulär freigesetzten ACh. Die vorliegende Studie zeigt, dass besonders die kleinen Arterien des Vorhofs stark parasympathisch innerviert sind. Es liegt die Vermutung nah, dass in diesem Bereich bei einer Schädigung des Endothels, wie auch bei der Atherosklerose vorliegend, perivaskuläre parasympathische Nervenfasern beteiligt sind an Durchblutungsstörungen der Koronargefäße. Durch diese Durchblutungsstörungen könnten Komplikationen, wie z.B. Arrhythmien, auftreten, welche hervorgerufen werden könnten durch beispielsweise eine Minderdurchblutung des Atrioventrikular Knotens.

4.1.2 Versorgung durch NOS-immunreaktive Axone

Die drei Enzyme eNOS, iNOS und nNOS können im Herzen die Bildung von NO katalysieren (Smith et al. 1996). NO als gemeinsames Endprodukt aktiviert die Guanylatzyklase in glatten Muskelzellen, was zur Folge hat, dass die cGMP-Konzentration im Zytoplasma steigt und die glatten Muskelzellen relaxieren (Arnold et al. 1977, Rapoport et al. 1983). Die Aktivierung von eNOS hat einen erheblichen Einfluss auf den Grundtonus der Koronargefäße. Das gebildete endotheliale NO ist gemeinsam mit Prostazyklin ein potenter Vasodilatator, welcher zum Beispiel durch die endogene Applikation eines Statins über die Aktivierung von eNOS vermehrt gebildet wird und die endotheliale Funktion auf diesem Weg verbessern kann (Wolfrum et al. 2003). Der Einfluss der nNOS auf den Tonus der Koronargefäße ist bislang nicht hinreichend geklärt. Bei der Ratte sind NOS-enhaltende perivaskuläre kardiale Nervenfasern parasymphatisch und cholinerg (Richardson et al. 2003).

In der vorliegenden Studie findet sich eine perivaskuläre Versorgung mit NOS-enhaltenden Axonen nur an den Koronargefäßen des Vorhofs. Der durchschnittliche Innervationsindex liegt hier bei nur 5%, eine Korrelation zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex fand sich nicht. Es zeigten 26% der ausgewerteten Gefäße des Vorhofs NOS-Immunität. Der Vergleich des Innervationsindex für NO mit dem hohen Innervationsindex für VAcHt im Vorhof aber auch in den Ventrikeln weist darauf hin, dass der parasymphatische neuronale Transmitter ACh im Herzen der Ratte von größerer Bedeutung ist als der parasymphatische neuronale Transmitter NO. Eine durchgehende Kolokalisation in perivaskulären Nervenfasern von VAcHt und NOS konnte diese Studie somit nicht zeigen. Die Ergebnisse implizieren, dass perivaskulär freigesetztes NO im Gegensatz zu ACh in den Ventrikeln keinen Einfluss auf den Tonus der Koronargefäße besitzt.

Sosunov beschrieb (Sosunov et al. 1995), dass an den Gefäßen des Rattenherzens und des Meerschweinchenherzens NOS-immunreaktive Fasern unabhängig von deren Größe vorkommen. Allerdings waren bei diesen Untersuchungen 50% der ausgewerteten Koronargefäße von NOS-enhaltenden Nervenfasern umgeben. Klimaschewski (Klimaschewski et al. 1992) zeigte für 33% der epikardialen und für 13% der myokardialen Gefäße sowie für 4% der Neurone der kardialen Ganglien NOS-Immunität. Für diese Zellen beschrieb Richardson eine Kolokalisation von NOS mit ChAT und NPY (Richardson et al. 2003).

Da die NOS-enhaltenden Axone an den Gefäßen der Ratte eher unregelmäßig vorkommen, die Ergebnisse der einzelnen Studien diesbezüglich divergent sind und in der vorliegenden Arbeit auch nur die Gefäße des Vorhofs immunreaktiv sind, kann vermutet werden, dass im Vergleich zur erheblichen Bedeutung des endothelial gebildeten NO bezüglich der Modulation des Gefäßtonus das perivaskulär freigesetzte NO eine eher untergeordnete Rolle spielt.

4.1.3 Versorgung durch TH-immunreaktive Axone

Unter einer Stimulation von sympathischen kardialen Nervenfasern und unter einer intrakoronaren Applikation von Katecholaminen kann es sowohl über eine Aktivierung von α -Adrenorezeptoren zu einer konstriktorischen Antwort der Koronararterien als auch über eine Aktivierung von β -Adrenorezeptoren zu einer Vasodilatation kommen (Rudehill et al. 1976, Gerova et al. 1979).

Von den in dieser Studie untersuchten Nervenfasertypen weisen noradrenerge Axone den stärksten Innervationsindex auf. Den größten Innervationsindex durch TH-immunreaktive Axone weisen die Koronargefäße des Vorhofs auf (mittlerer Innervationsindex: 74%), wobei im Vergleich dazu die Arterien beider Abschnitte des Ventrikels einen signifikant kleineren Innervationsindex für TH (Abschnitt B: mittlerer Innervationsindex: 15%; Abschnitt C: mittlerer Innervationsindex: 22%) aufweisen. Dieses Innervationsmuster weist darauf hin, dass am Rattenherzen die noradrenerge Regulation des Blutflusses im Vorhof eine erhebliche Rolle spielt, während sie in den Ventrikeln zwar mitbeteiligt ist an der Regulation des Blutflusses, aber vermutlich andere Mechanismen, wie metabolische, myogene, humorale und endotheliale mehr in den Vordergrund treten. Im Vorhof existiert kein signifikanter Unterschied zwischen der cholinergen perivaskulären Innervation und der noradrenergen perivaskulären Innervation. Allerdings ist der Innervationsindex für TH in allen anderen Herzabschnitten signifikant größer im Vergleich zu VACHT. Es lässt sich daraus folgern, dass das noradrenerge System eine größere Bedeutung als das cholinerge System bei der Regulation des koronaren Blutflusses hat. Für die Koronargefäße der Ventrikel (Abschnitte B und C) konnte eine negative Korrelation zwischen Gefäßgröße und Innervationsindex für TH gezeigt werden. Da auch die cholinerge perivaskuläre Innervation ein ähnliches Muster aufweist, liegt die Vermutung nah,

dass der Gefäßtonus der Widerstandsgefäße des Herzens zu einem erheblichen Anteil durch das autonome Nervensystem zentral gesteuert wird.

Studien beim Hund zeigten unter einer maximalen Stimulation sympathischer kardialer Nervenfasern und gleichzeitiger β -adrenerger Blockade einen Anstieg des koronaren Widerstandes um 20-30% (Heusch et al. 1984), wobei der Anteil der epikardialen Gefäße am gesamten koronaren Widerstand nur 5% betragen soll (Fam et al. 1968, Mozumdar et al. 2003). Bezüglich des α -adrenergen Anteils am Tonus der Koronararterien gibt es divergierende Studienergebnisse: Orlick et al. (1978) zeigten, dass bei herztransplantierten Patienten ein geringerer koronaren Widerstand vorliegt als bei gesunden Probanden. Diese Differenz war aufhebbar durch eine an den gesunden Probanden induzierte nichtselektive α -adrenerge Blockade mit Phentolamin. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass noradrenerge perivaskuläre Nervenfasern den Gefäßtonus in Ruhe über die Stimulation von α -Adrenorezeptoren und damit konstriktorisch beeinflussen. Die Änderungsmessung des koronaren Blutflusses wurde in dieser Studie durch eine Temperaturmessung im Sinus coronarius durchgeführt. Im Gegensatz hierzu postulierten Hodgson et al. (1989) einen nur unwesentlichen Anteil des α -adrenergen Systems am Gefäßtonus in Ruhe. Zusammenfassend gibt es hier unter physiologischen Bedingungen konkurrierende Mechanismen: zum einen die metabolisch induzierte Vasodilatation, welche verstärkt wird durch eine β -adrenerge Vasodilatation, die eher einen geringen Einfluss zu haben scheint (Hamilton et al. 1976), und zum anderen eine durch α -Adrenorezeptoren hervorgerufene Vasokonstriktion.

Unter einer myokardialen Ischämie spielt das adrenerge System eine entscheidende Rolle. Über β -Rezeptoren kommt es zur Herzfrequenzsteigerung und zu einer verkürzten Diastole und damit zu einer verkürzten Füllungszeit der Koronargefäße. Zudem kommt es über die Stimulation von β -Adrenorezeptoren zu einer Umverteilung des koronaren Blutflusses weg vom ischämischen Subendokard hin zu nicht ischämischen Regionen. Bei Hunden wurde gezeigt, dass es bei Stenose des Ramus circumflexus unter der Gabe von Atenolol, Metoprolol und Propranolol zu einer Abnahme des Blutflusses in der nicht ischämischen Myokardregion zugunsten einer Zunahme des poststenotischen koronaren Perfusionsdruckes kam (Buck et al. 1981). Buffington et al. (1981) zeigten am Hund, dass eine poststenotische α -adrenerge Vasokonstriktion zu einem durch Sauerstoffmangel bedingten Herzversagen führen kann. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind besonders im

Ventrikulmyokard die kleineren Gefäße stark noradrenerg innerviert. Diese Tatsache macht eine genauere Untersuchung der Verteilung der unterschiedlichen adrenergen Rezeptoren in diesen Bereichen notwendig, um mögliche weitere physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen erkennen zu können.

4.1.4 Versorgung durch CGRP-immunreaktive Axone

Bei der perivaskulären Innervation der Koronararterien der Ratte ist der Transmitter CGRP auf viszerosensible Nervenendigungen beschränkt (Wharton et al. 1986, Katona et al. 2004). CGRP wurde als ein potenter dosisabhängiger Vasodilatator beschrieben (Franco-Cereceda et al. 1987).

In der vorliegenden Studie findet sich in allen Bereichen des Herzens eine schwach ausgeprägte CGRP-immunreaktive Innervation. Während die Gefäße des Vorhofs noch einen mittleren Innervationsindex von 7% aufweisen, haben die Gefäße der Ventrikel nur noch einen mittleren Innervationsindex von 2% bis 3%. Allerdings sind diese Differenzen der mittleren Innervationsindices nicht signifikant. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass 1) CGRP in den perivaskulären Nervenfasern des kardiovaskulären Systems vorkommt, 2) der Innervationsindex für CGRP in allen Herzabschnitten signifikant kleiner ist als der des noradrenergen Systems, 3) der Innervationsindex für CGRP im Vorhof kleiner ist als der für VACHT und 4) der Innervationsindex für CGRP im Vorhof keinen Unterschied zum Vorkommen von perivaskulärer NOS-Immunreaktivität aufweist. Es konnte eine gleichmäßige Verteilung der CGRP-immunreaktiven perivaskulären Axone am Herzen gezeigt werden.

Onuoha Phillips et al. (1998) zeigten, dass CGRP-haltige Nervenfasern am stärksten im linken Vorhof zu finden sind und im geringen Maße im rechten Vorhof und im rechten Ventrikel. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie fanden diese Untersucher keine CGRP-immunreaktiven Axone im linken Ventrikel der Ratte. Mulderry untersuchte bereits 1985 immunhistochemisch das Vorkommen von CGRP im Herzen und in den großen Gefäßen der Ratte (Mulderry et al. 1985). Zudem beschrieb er die Veränderung der CGRP-Konzentration nach Applikation von Capsaicin. Er fand in der A. renalis, der A. mesenterica superior, der Vena cava inferior und in der Vena femoralis eine starke Immunreaktivität für CGRP. Im Gegensatz dazu fand er im Herzen und in der Aorta thoracica nur eine geringe

Menge von CGRP. Er beschrieb, dass im linken und rechten Ventrikel die CGRP-enhaltenden Nervenfasern parallel zu den Koronararterien und ihren Kollateralen verlaufen. Im Gegensatz zu Onuoha Phillips et al. (1998) fand er zum einen CGRP-Immunreaktivität, wie auch in der vorliegenden Studie beschrieben, auch im linken Ventrikel und er beschrieb die höchste Konzentration an CGRP-enhaltenden Nervenfasern für den rechten Vorhof. Die mit Capsaicin vorbehandelten Ratten zeigten in Bezug auf die Konzentration von CGRP keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Während die perivaskuläre Freisetzung des parasympathischen Transmitters ACh und des noradrenergen Transmitters NA den jeweiligen Anforderungen entsprechend zentral gesteuert werden, richtet sich die Freisetzung des vasodilatatorischen CGRP nach den vorherrschenden lokalen Gegebenheiten. So scheint CGRP beteiligt zu sein an dem Phänomen der hypoxischen Präkonditionierung. Dieses Phänomen ist gekennzeichnet durch ein widerstandsfähigeres Myokard gegenüber einem ischämischen Ereignis, nachdem das Myokard zuvor kurzen Episoden einer myokardialen Ischämie ausgesetzt war (Murry et al. 1986). Du et al. (2004) konnten zeigen, dass nach einer Vorbehandlung von Ratten mit Nitroglycerin und anschließender induzierter kardialer Ischämie die Konzentrationen von CGRP und cGMP im Plasma steigen, die Expression von mRNA in sensorischen Nervenzellkörpern in Spinalganglien und die Expression und Aktivität der iNOS steigen und das Infarktareal signifikant kleiner wird. Du et al. (2004) gehen davon aus, dass nach der Induktion einer myokardialen Ischämie durch die Gabe von Nitroglycerin die Synthese von CGRP gesteigert wird und CGRP über eine Stimulierung der Bildung von iNOS für eine gesteigerte NO Produktion sorgt. Auch Luo et al. (2004) konnten zeigen, dass im Herzen der Ratte CGRP eine bedeutende Rolle bei der hypoxischen Präkonditionierung spielt. Luo geht davon aus, dass in der frühen Phase der Präkonditionierung eine gesteigerte nervale Freisetzung von CGRP bedeutsam ist, während in der späten Phase der Präkonditionierung auch eine vermehrte Synthese von CGRP stattfindet. Beide Autoren fanden erhöhte Plasmaspiegel von CGRP und NO nach der Induktion von kurzen hypoxischen Episoden. Vor dem Hintergrund einer möglichen kardioprotektiven Funktion von CGRP ist eine, wie die vorliegende Studie zeigt, homogene myokardiale Verteilung der perivaskulären CGRP-enhaltenden Nervenfasern sinnvoll. Auffällig erscheint allerdings, dass im Hinblick auf die kardioprotektive Bedeutung von nervallem CGRP

der Innervationsindex, wie die vorliegende Studie zeigt, mit 2% bis 7% eher gering ist. Eine elektrische Stimulation im Bereich der Hinterwurzel des Rückenmarks in Höhe von T1-T2 wirkt antianginös (Eliasson et al. 1996). Foreman hat an Hunden gezeigt, dass unter dieser Stimulation die Aktivität der intrinsischen kardialen Neurone gehemmt wird (Foreman et al. 2000). Er vermutet eine Beteiligung spinaler Afferenzen und Efferenzen an diesen Effekten. In Bezug auf die beschriebene Effektorfunktion der Capsaicin-sensitiven afferenten Nervenfasern könnte vermutet werden, dass diese antianginösen Effekte über eine Ausschüttung des dilatatorisch wirksamen CGRP im Ischämiegebiet mitverursacht werden .

Die in der vorliegenden Studie beschriebene homogene Verteilung der CGRP-immunreaktiven viszerosensiblen perivaskulären Nervenfasern gewährleistet in allen Herzregionen gleichmäßig die Nozizeption und eine Einleitung der hypoxischen Präkonditionierung durch die lokale Effektorfunktion.

4.2 Vergleich der perivaskulären Innervation der koronaren Strombahn mit dem Innervationsmuster in anderen arteriellen Gefäßregionen

Da jedes Organ spezifischen Anforderungen unterliegt, ist auch das Innervationsmuster der jeweiligen perivaskulären Nervenfasern darauf abgestimmt. Nicht in jeder arteriellen Gefäßregion spielen perivaskulären Nervenfasern eine entscheidende Rolle und nicht in jedem Organ sind die kleinen Gefäße stärker innerviert als die größeren Gefäße.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der cholinerge und noradrenerge Innervationsindex in jeweils zwei von drei Herzabschnitten an den kleineren Gefäßen signifikant größer ist als an den Gefäße mit einem größeren Durchmesser. Die kleinen Widerstandsgefäße, welche den koronaren Blutfluss zu einem erheblichen Anteil bestimmen, weisen den stärksten Innervationsindex auf.

Ähnliche Innervationsmuster fand McDonald (McDonald et al. 1983) für die arterielle Strombahn im Glomus caroticum der Ratte. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte er zeigen, dass an Arteriolen mit einem Durchmesser kleiner als 15 µm mit einer Anzahl von 37 pro Gefäßquerschnitt die meisten Nervenendigungen zu finden sind. An den größeren Gefäßen endigen dagegen weniger parasymphatische und sympathische Axone. Angrenzend an die Kapillaren befinden sich im Glomus caroticum Glomuszellen, welche sensorische

Chemorezeptoren besitzen. Nach McDonald wird durch die unmittelbar vorgeschaltete nervale Blutflussregulation die Aktivität der Chemorezeptoreinheiten moduliert.

Haberberger untersuchte die perivaskuläre Innervation des pulmonalen Gefäßbaumes des Meerschweinchens durch sensorische SP-enhaltende C-Fasern und durch cholinerge, noradrenerge und NOS-enhaltende Nervenfasern (Haberberger et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die perivaskuläre Innervation durch noradrenerge und cholinerge Nervenfasern abhängig vom Kaliber der pulmonalen Gefäße ist. Im Gegensatz zur hier untersuchten koronaren Strombahn und zu den Gefäßen des Glomus caroticum der Ratte sind im Lungenkreislauf des Meerschweinchens die großen Gefäße stärker durch cholinerge und noradrenerge Nervenfasern versorgt als die kleinen Gefäße. NOS-enhaltende Nervenfasern finden sich ebenfalls zu einem größeren Anteil an den Arterien mit einem größeren Durchmesser. Für die sensorischen SP-enhaltenden C-Fasern konnte allerdings ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Studie keine Kaliberabhängigkeit gefunden werden, sondern eine gleichmäßige Verteilung am pulmonalen Gefäßbaum. Anders als in der koronaren Strombahn wird die Regulation des Blutflusses innerhalb der Lunge nur non-neuronal gesteuert. So kommt es unter Sauerstoffmangel zu einer hypoxischen Vasokonstriktion, wodurch der Blutfluss von schlecht ventilerten Lungenabschnitten zu gut ventilerten Abschnitten umverteilt wird (Theissen et al. 1996). Lediglich die Gesamtperfusion der Lunge wird auch neural gesteuert und an die Gesamtventilation angepasst.

Ähnlich den Verhältnissen an der Lungenstrombahn konnte Henrich (Henrich et al. 2002) zeigen, dass am gesamten lingualen Gefäßbaum des Meerschweinchens die größeren Arterien eine stärkere Innervation durch cholinerge, noradrenerge, NOS-, SP-, VIP- und NPY-enhaltende Nervenfasern aufweisen als die kleinen Gefäße. Hier ist die nervale Regulation des Gefäßtonus großer Arterien von erheblicher Bedeutung vor dem Hintergrund, dass das Meerschweinchen über die Zunge seinen Wärmehaushalt reguliert. Daher ist es wichtig, wie auch bei der pulmonalen Strombahn, dass ganze Abschnitte des Organs situationsabhängig stärker oder schwächer durchblutet werden. An dem Gefäßbaum der A. lingualis konnte im Gegensatz zur pulmonalen Strombahn (Haberberger et al. 1997) und zur koronaren Strombahn eine erhebliche Kolo-kalisation von ChAT und NOS gezeigt werden (Henrich et al. 2002).

Die Studien zeigen zwar zum Teil Ähnlichkeiten der perivaskuläre Innervation zwischen verschiedenen Organen, wie zwischen dem Glomus caroticum und dem Herzen auf der einen Seite und der Lunge und der Zunge auf der anderen Seite, im Vordergrund steht jedoch ein an die Organfunktion adaptiertes individuelles perivaskuläres Innervationsmuster.

5. Zusammenfassung

Die Regulation des koronaren Blutflusses wird durch viele Faktoren und Mechanismen bestimmt. Eingeschlossen sind hier metabolische und myogene Faktoren, endotheliale und humorale Mechanismen sowie die Modifikation des Gefäßtonus durch perivaskuläre Nervenfasern. Die Bedeutung dieser neuronalen Steuerung ist organspezifisch und korreliert mit der Innervationsdichte. Quantitative Untersuchungen zur perivaskulären Innervationsdichte liegen nur für wenige Organe vor und fehlen für die koronare Strombahn.

Daher wurden in der vorliegenden Studie die cholinerge Innervation (VACHT-immunreaktiv), die noradrenerge sympathische Innervation (TH-immunreaktiv), die viszerosensible Innervation (CGRP-immunreaktiv) und die Innervation durch NO-produzierende Axone der Koronararterien der Ratte immunhistochemisch dargestellt. Das Herz wurde hierbei in drei Abschnitte unterteilt: A) Vorhof, B) vorhofnaher Ventrikel; C) Herzspitze. Jeweils die Gefäße von zwei Querschnitten, welche einen Abstand von 200 µm zueinander hatten, wurden für den einzelnen Herzabschnitt ausgewertet. Die Arterien wurden erfasst, mit Hilfe der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera als Bilddatei im Computer gespeichert und die Innervation wurde quantitativ auf den inneren Gefäßdurchmesser bezogen ermittelt. Als Maß für die Innervationsdichte wurde der Innervationsindex eingeführt. Er umfasst denjenigen Anteil in Prozent vom Gesamtumfang eines Gefäßes, welcher von immunreaktiven Nervenfasern umgeben ist.

Die vorliegende Studie zeigt, dass mit Ausnahme der NO-produzierenden Axone alle hier untersuchten Nervenfasertypen in allen Herzabschnitten arterielle Gefäße innervieren. NO-produzierende Axone konnten nur in Gefäßen des Vorhofs dargestellt werden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Innervationsindices der cholinergen und der noradrenergen sympathischen Nervenfasern auf der einen Seite und der viszerosensiblen Nervenfasern auf der anderen Seite. Während für die Größe des Innervationsindex für CGRP in allen Abschnitten des Herzens kein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte und auch keine Korrelation zur Gefäßgröße zu sehen war, waren die Innervationsindices für VACHT und TH in den Vorhöfen signifikant größer als in den Ventrikeln. Weiterhin konnte in jeweils zwei von drei Herzabschnitten eine negative Korrelation zwischen der Gefäßgröße und dem Innervationsindex für VACHT und TH gezeigt werden.

Noradrenerge sympathische perivaskuläre Nervenfasern sind im Ventrikel signifikant stärker vertreten als cholinerge und viszerosensible Nervenfasern. Nur im Vorhof ist der Innervationsindex für VAcHT signifikant größer als der für CGRP. In den Ventrikeln zeigt sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren, dass die Regulation des Blutflusses auf der Vorhofebene stärker neuronal gesteuert wird als in den Ventrikeln. Weiterhin konnte im Gegensatz zu Untersuchungen an der Lunge und der Zunge gezeigt werden, dass die kleinen Gefäße des Herzens stärker perivaskulär autonom innerviert werden als die größeren Gefäße. Daraus lässt sich schließen, dass hier über eine Regulation des Tonus insbesondere der Widerstandsgefäße der koronare Blutfluss entscheidend mitreguliert wird. Die nur geringe perivaskuläre Innervation durch NO-enhaltende Axone lässt den Schluss zu, dass im Gegensatz zur großen Bedeutung von endothelial gebildetem NO das perivaskuläre freigesetzte NO in der koronaren Strombahn eine eher untergeordnete Rolle spielt. Die vorliegende Studie zeigt eine homogene Verteilung von CGRP-enhaltenden perivaskulären viszerosensiblen Nervenfasern. Diese gewährleistet in allen Herzregionen gleichmäßig die Nozizeption und durch die lokale Effektorfunktion eine Einleitung der hypoxischen Präkonditionierung. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass die koronare Strombahn in allen Herzabschnitten, besonders aber im Vorhof, eine erhebliche perivaskuläre Innervation aufweist und impliziert damit eine große Bedeutung bei der Regulation des koronaren Blutflusses.

6. Summary

Arterial tone is under control of multiple determinants including circulating hormones, endothelial-derived factors, metabolic factors originating from the surrounding tissue and perivascular nerve fibers. The relative contribution of the perivascular nerves is highly specific for individual organs and vascular beds, and correlates with the extent of the perivascular innervation. Quantitative immunohistochemical investigations on vascular innervation are only available for a limited number of organs and are missing for the coronary circulation.

Hence, in the present immunohistochemical study set out to determine the extent of perivascular innervation in the rat heart. Sympathetic noradrenergic axons were visualized by an antiserum against the rate-limiting enzyme of catecholamine synthesis, tyrosine hydroxylase (TH). Parasympathetic cholinergic axons were labelled with an antiserum against the vesicular acetylcholine transporter (VACht). Also, an antiserum against the neuronal isoform of the nitric oxide synthase (nNOS) was used in this study. Viscerosensory axons were visualized by aid of an antiserum against calcitonin gene-related peptide (CGRP). For each of these antigens, the innervation density of arteries and arterioles was assed separately in A) the atria, B) the basal and C) the apical parts of the ventricles. Evaluation was performed in each specimen on 2 sections being 200 μm apart in depth. Images obtained from an epifluorescence microscope were captured with a digital camera and evaluated with Scion image software. For each of the cardiac regions, the "index of innervation", defined as that part (in percent) of the arterial circumference that was covered with immunoreactive nerve fibres, was plotted against the inner vascular diameter.

The present study showed that VACht, TH, and CGRP containing perivascular fibres occur in each part of the rat heart. In contrast, nNOS containing perivascular fibres are present only in the atria. Significant differences were observed between the index of innervation for TH-immunoreactive fibres and VACht-immunoreactive fibres on the one hand and CGRP-immunoreactive perivascular fibres on the other hand. While there was neither a significant difference of the index of innervation for CGRP between the different heart regions and nor a significant correlation between vascular diameter and index of innervation for CGRP, there was a significantly higher index of innervation for TH- and VACht-immunoreactive axons detected in the atria in comparison to the ventricles. Furthermore, in two of the three parts of the heart a negative linear correlation between index of innervation and vascular diameter was

observed for TH- and VAcHT-immunoreactive perivascular fibres. In both parts of the ventricles, there was a significantly higher index of innervation for TH-immunoreactive axons when compared with VAcHT- and CGRP-immunoreactive fibres. Only in the atrial myocardium arteries were more densely innervated by VAcHT-immunoreactive fibres than by CGRP-immunoreactive fibres, while there was no difference noted in both parts of the ventricle.

The results of the present study indicate that the role of neural regulation on coronary blood flow is higher in the atrial myocardium than in the myocardium of the ventricle. In contrast to results of investigations of the lung and tongue the present study demonstrates a higher perivascular innervation by parasympathetic cholinergic axons and sympathetic noradrenergic axons of small vessels compared with vessels with large diameters. This distribution indicates a dominating role of neural regulation on the coronary blood flow at the level of resistance vessels. The present study showed that perivascular axons with immunoreactivity against nNOS are very sparse. This result indicates that the nitrenergic component involved in the regulation of coronary blood flow originate from the endothelium rather than nerve endings. CGRP-immunoreactive perivascular fibres equally supply all parts of the coronary arterial tree. The described distribution pattern for CGRP-immunoreactive perivascular fibres ensure a homogeneous sensory system and it contributes to cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. Collectively, the present study shows that especially the atrial vessels are dense innervated by perivascular nerves. The findings indicate that perivascular nerve fibres strongly influence arterial tone.

7. Literaturverzeichnis

Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G., Ong E. S. and Evans R. M. (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products *Nature* 298 (5871): 240-4

Amezcuca J. L., Dusting G. J., Palmer R. M. and Moncada S. (1988) Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator *Br J Pharmacol* 95 (3): 830-4

Armour J. A. and Hopkins D. A. (1981) Localization of sympathetic postganglionic neurons of physiologically identified cardiac nerves in the dog *J Comp Neurol* 202 (2): 169-84

Armour J. A., Linderoth B., Arora R. C., DeJongste M. J., Ardell J. L., Kingma J. G., Jr., Hill M. and Foreman R. D. (2002) Long-term modulation of the intrinsic cardiac nervous system by spinal cord neurons in normal and ischaemic hearts *Auton Neurosci* 95 (1-2): 71-9

Arnold W. P., Mittal C. K., Katsuki S. and Murad F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (8): 3203-7

Arvidsson U., Riedl M., Elde R. and Meister B. (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems *J Comp Neurol* 378 (4): 454-67

Baumgart D. and Heusch G. (1995) Neuronal control of coronary blood flow *Basic Res Cardiol* 90 (2): 142-59

Berne R. M. (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow *Am J Physiol* 204 317-22

Berne R. M., Degeest H. and Levy M. N. (1965) Influence of the Cardiac Nerves on Coronary Resistance *Am J Physiol* 208 763-9

Buck J. D., Hardman H. F., Warltier D. C. and Gross G. J. (1981) Changes in ischemic blood flow distribution and dynamic severity of a coronary stenosis induced by beta blockade in the canine heart *Circulation* 64 (4): 708-15

Buffington C. W. and Feigl E. O. (1981) Adrenergic coronary vasoconstriction in the presence of coronary stenosis in the dog *Circ Res* 48 (3): 416-23

Calupca M. A., Vizzard M. A., Parsons R. L. (2000) Origin of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive fibers innervating guinea pig parasympathetic cardiac ganglia *Comp Neurol. Jul 17; 423 (1):26-39*

Chierchia S. (1983) The role of alpha-adrenergic receptors in the pathogenesis of coronary spasm *Clin Cardiol* 6 (10): 496-500

Choi S. S., Lim Y. J., Bahk J. H., Do S. H. and Ham B. M. (2003) Coronary artery spasm induced by carotid sinus stimulation during neck surgery *Br J Anaesth* 90 (3): 391-4

Coupe M. O., Mak J. C., Yacoub M., Oldershaw P. J. and Barnes P. J. (1990) Autoradiographic mapping of calcitonin gene-related peptide receptors in human and guinea pig hearts *Circulation* 81 (3): 741-7

Cuevas J. and Adams D. J. (2000) Substance P preferentially inhibits large conductance nicotinic ACh receptor channels in rat intracardiac ganglion neurons *J Neurophysiol* 84 (4): 1961-70

Davis M. J., Donovan J. A. and Hood J. D. (1992) Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells *Am J Physiol* 262 (4 Pt 1): C1083-8

Dinerman J. L., Lowenstein C. J. and Snyder S. H. (1993) Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease *Circ Res* 73 (2): 217-22

Du Y., Peng J., Huang Z., Jiang D., Deng H., Li Y. (2003) Delayed cardioprotection afforded by nitroglycerin is mediated by α -CGRP via activation of inducible nitric oxide synthase *International Journal of Cardiology* 93 49-54

Edwards F. R., Hirst G. D., Klemm M. F. and Steele P. A. (1995) Different types of ganglion cell in the cardiac plexus of guinea-pigs *J Physiol* 486 (Pt 2) 453-71

Eliasson T., Augustinsson L. E. and Mannheimer C. (1996) Spinal cord stimulation in severe angina pectoris--presentation of current studies, indications and clinical experience *Pain* 65 (2-3): 169-79

Ellwood A. J. and Curtis M. J. (1996) Mechanism of 5-hydroxytryptamine-induced coronary vasodilation assessed by direct detection of nitric oxide production in guinea-pig isolated heart *Br J Pharmacol* 119 (4): 721-9

Evans C., Baxi S., Neff R., Venkatesan P. and Mendelowitz D. (2003) Synaptic activation of cardiac vagal neurons by capsaicin sensitive and insensitive sensory neurons *Brain Res* 979 (1-2): 210-5

Falcone J. C., Davis M. J. and Meininger G. A. (1991) Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles *Am J Physiol* 260 (1 Pt 2): H130-5

Fam W. M. and McGregor M. (1968) Effect of nitroglycerin and dipyridamole on regional coronary resistance *Circ Res* 22 (5): 649-59

Ferrer M., Marin J., Encabo A., Alonso M. J. and Balfagon G. (1999) Role of K⁺ channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta *Gen Pharmacol* 33 (1): 35-41

Foreman R. D., Linderoth B., Ardell J. L., Barron K. W., Chandler M. J., Hull S. S., Jr., TerHorst G. J., DeJongste M. J. and Armour J. A. (2000) Modulation of intrinsic cardiac neurons by spinal cord stimulation: implications for its therapeutic use in angina pectoris *Cardiovasc Res* 47 (2): 367-75

Franco-Cereceda A. (1988) Calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to local sensory control of cardiac contractility and coronary vascular tone *Acta Physiol Scand Suppl* 569 1-63

Franco-Cereceda A. and Lundberg J. M. (1987) Potent effects of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide on human coronary vascular tone in vitro *Acta Physiol Scand* 131 (1): 159-60

Gagliardi M., Randall W. C., Bieger D., Wurster R. D., Hopkins D. A. and Armour J. A. (1988) Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons *Am J Physiol* 255 (4 Pt 2): H789-800

Gerova M., Barta E. and Gero J. (1979) Sympathetic control of major coronary artery diameter in the dog *Circ Res* 44 (4): 459-67

Haberberger R., Schemann M., Sann H. and Kummer W. (1997) Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter *J Appl Physiol* 82 (2): 426-34

Hagner S., Haberberger R., Kummer W., Springer J., Fischer A., Bohm S., Goke B., McGregor G. P. (2001) Immunohistochemical detection of calcitonin gene-related peptide receptor (CGRPR)-1 in the endothelium of human coronary artery and bronchial blood vessels *Neuropeptides. Feb; 35 (1): 58-64*

Halpern M. H. (1957) The dual blood supply of the rat heart *Am J Anat* 101 (1): 1-16

Hamilton F. N. and Feigl E. O. (1976) Coronary vascular sympathetic beta-receptor innervation *Am J Physiol* 230 (6): 1569-76

Henrich M., Haberberger R., Hempelmann G., Kummer W. (2003) Quantitative immunohistochemical investigation of the intrinsic vasodilator innervation of the guinea pig lingual artery *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 103 72-82

Heusch G., Deussen A., Schipke J. and Thamer V. (1984) Alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction of large and small canine coronary arteries in vivo *J Cardiovasc Pharmacol* 6 (5): 961-8

Heym C., Liu N., Gleich A., Oberst P., Kummer W. (1993) Immunohistochemical evidence for different pathways immunoreactive to substance P and calcitonin gene-

related peptide (CGRP) in the guinea-pig stellate ganglion *Cell Tissue Res. Jun*; 272 (3): 563-74

Hillis L. D. and Braunwald E. (1978) Coronary-artery spasm *N Engl J Med* 299 (13): 695-702

Hodgson J. M., Cohen M. D., Szentpetery S. and Thames M. D. (1989) Effects of regional alpha- and beta-blockade on resting and hyperemic coronary blood flow in conscious, unstressed humans *Circulation* 79 (4): 797-809

Ito T., Yasue H., Yoshimura M., Nakamura S., Nakayama M., Shimasaki Y., Harada E., Mizuno Y., Kawano H. and Ogawa H. (2002) Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm *Hum Genet* 110 (1): 89-94

Jänig W., Bräunig P. (1996) Vegetatives Nervensystem bei Vertebraten und Invertebraten, *Kap. 9: S. 215 -226, Neurowissenschaft, Springer Verlag*

Jones C. J., Kuo L., Davis M. J. and Chilian W. M. (1995) Regulation of coronary blood flow: coordination of heterogeneous control mechanisms in vascular microdomains *Cardiovasc Res* 29 (5): 585-96

Kanatsuka H., Sekiguchi N., Sato K., Akai K., Wang Y., Komaru T., Ashikawa K. and Takishima T. (1992) Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart *Circ Res* 71 (4): 912-22

Katona M., Boros K., Santha P., Ferdinandy P., Dux M., Jancso G. (2004) Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370: 436-443

King T. S. and Coakley J. B. (1958) The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man *J Anat* 92 (3): 353-76

Klimaschewski L., Kummer W., Mayer B., Couraud J. Y., Preissler U., Philippin B. and Heym C. (1992) Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart *Circ Res* 71 (6): 1533-7

Klocke F. J., Kaiser G. A., Ross J., Jr. and Braunwald E. (1965) An Intrinsic Adrenergic Vasodilator Mechanism in the Coronary Vascular Bed of the Dog *Circ Res* 16 376-82

Knowles R. G. and Moncada S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels *Trends Biochem Sci* 17 (10): 399-402

Konidala S. and Gutterman D. D. (2004) Coronary vasospasm and the regulation of coronary blood flow *Prog Cardiovasc Dis* 46 (4): 349-73

- Kotani H., Hoshimaru M., Nawa H. and Nakanishi S. (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (18): 7074-8
- Kummer W., Fischer A., Mundel P., Mayer B., Hoba B., Philippin B., Preissler U. (1992) Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig *Neuroreport. Jul; 3(7): 653-5*
- Kuo L., Chilian W. M. and Davis M. J. (1990) Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium *Circ Res* 66 (3): 860-6
- Kuo L., Davis M. J. and Chilian W. M. (1988) Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles *Am J Physiol* 255 (6 Pt 2): H1558-62
- Lanza G. A., Pedrotti P., Pasceri V., Lucente M., Crea F. and Maseri A. (1996) Autonomic changes associated with spontaneous coronary spasm in patients with variant angina *J Am Coll Cardiol* 28 (5): 1249-56
- Liebich H. G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere *Schattauer Verlag, 2 Auflage, Kap. VI*
- Ludmer P. L., Selwyn A. P., Shook T. L., Wayne R. R., Mudge G. H., Alexander R. W. and Ganz P. (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries *N Engl J Med* 315 (17): 1046-51
- Lundberg J. M., Franco-Cereceda A., Hua X., Hokfelt T. and Fischer J. A. (1985) Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin *Eur J Pharmacol* 108 (3): 315-9
- Luo D., Deng P. Y., Ye F., Peng W. J., Deng H, W., Li Y.J. (2004) Delayed preconditioning by cardiac ischemia involves endogenous calcitonin gene-related peptide via the nitric oxide pathway *Eur J Pharmacol. Oct 11; 502 (1-2): 135-41*
- Löffler G., Kellerer M. and Häring H. U. (2003) Endokrine Funktionen III: Die schnelle Stoffwechselregulation/*Biochemie und Pathobiochemie, 7.Aufl., S. 854, Abb. 29.18 Springer Verlag*
- Malmsjö M., Erlinge D., Hogestatt E. D. and Zygmunt P. M. (1999) Endothelial P2Y receptors induce hyperpolarisation of vascular smooth muscle by release of endothelium-derived hyperpolarising factor *Eur J Pharmacol* 364 (2-3): 169-73
- Mannheimer C., Eliasson T., Andersson B., Bergh C. H., Augustinsson L. E., Emanuelsson H. and Waagstein F. (1993) Effects of spinal cord stimulation in angina pectoris induced by pacing and possible mechanisms of action *Bmj* 307 (6902): 477-80

- Mark A. L., Abboud F. M., Schmid P. G., Heistad D. D. and Mayer H. E. (1972) Differences in direct effects of adrenergic stimuli on coronary, cutaneous, and muscular vessels *J Clin Invest* 51 (2): 279-87
- McDonald D. (1983) A morphometric analysis of blood vessels and perivascular nerves in the rat carotid body *Journal of Neurocytology* 12, 155-199
- McRaven D. R., Mark A. L., Abboud F. M. and Mayer H. E. (1971) Responses of coronary vessels to adrenergic stimuli *J Clin Invest* 50 (4): 773-8
- Miller W. L., Belardinelli L., Bacchus A., Foley D. H., Rubio R. and Berne R. M. (1979) Canine myocardial adenosine and lactate production, oxygen consumption, and coronary blood flow during stellate ganglia stimulation *Circ Res* 45 (6): 708-18
- Mohrman D. E. and Feigl E. O. (1978) Competition between sympathetic vasoconstriction and metabolic vasodilation in the canine coronary circulation *Circ Res* 42 (1): 79-86
- Mozumdar B. C., Hornsby D. N., Gogate A. S., Intriore L. A., Hanson R., McGreal K., Kelly P. and Ros P. (2003) Radiology scheduling: preferences of users of radiologic services and impact on referral base and extension *Acad Radiol* 10 (8): 908-13
- Mulderry P. K., Ghatei M. A., Rodrigo J., Allen J. M., Rosenfeld M. G., Polak J. M. and Bloom S. R. (1985) Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat *Neuroscience* 14 (3): 947-54
- Murray P. A. and Vatner S. F. (1979) alpha-Adrenoceptor attenuation of the coronary vascular response to severe exercise in the conscious dog *Circ Res* 45 (5): 654-60
- Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium *Circulation. Nov*; 74(5): 1124-36
- Nakane T., Tsujimoto G., Hashimoto K. and Chiba S. (1988) Beta adrenoceptors in the canine large coronary arteries: beta-1 adrenoceptors predominate in vasodilation *J Pharmacol Exp Ther* 245 (3): 936-43
- Nasa Y., Kume H. and Takeo S. (1997) Acetylcholine-induced vasoconstrictor response of coronary vessels in rats: a possible contribution of M2 muscarinic receptor activation *Heart Vessels* 12 (4): 179-91
- Nawa H., Hirose T., Takashima H., Inayama S. and Nakanishi S. (1983) Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor *Nature* 306 (5938): 32-6
- Nawa H., Kotani H. and Nakanishi S. (1984) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing *Nature* 312 (5996): 729-34

- Onuoha Phillips G. N., Ritchie A. and Nicholls D. P. (1998) Distribution of calcitonin gene-related peptide, atrial natriuretic peptide and neuropeptide Y in the rat heart *Cardiology* 90 (2): 95-100
- Orlick A. E., Ricci D. R., Alderman E. L., Stinson E. B. and Harrison D. C. (1978) Effects of alpha adrenergic blockade upon coronary hemodynamics *J Clin Invest* 62 (2): 459-67
- Palmer R. M., Rees D. D., Ashton D. S. and Moncada S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation *Biochem Biophys Res Commun* 153 (3): 1251-6
- Petrides P. E. and Becker C. M. (2003) *Gehirn und Nervengewebe/Biochemie und Pathobiochemie, 7 Aufl., S. 1069, Abb. 34.17 Springer Verlag*
- Podesser B. K., Neumann F., Neumann M., Schreiner W., Wollenek G. and Mallinger R. (1998) Outer radius-wall thickness ratio, a postmortem quantitative histology in human coronary arteries *Acta Anat (Basel)* 163 (2): 63-8
- Randal W., Wurster R., Randall D. and Xi-Moy S. (1995) From cardioaccelerator and inhibitor nerves to a "heart brain": an evolution of concepts/Nervous control of the heart, pp. 173-199 *Harwood Academic, London*
- Rapoport R. M., Draznin M. B. and Murad F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation *Nature* 306 (5939): 174-6
- Rasmussen K., Bagger J. P., Bottzauw J. and Henningsen P. (1984) Prevalence of vasospastic ischaemia induced by the cold pressor test or hyperventilation in patients with severe angina *Eur Heart J* 5 (5): 354-61
- Richardson R. J., Grkovic I. and Anderson C. R. (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart *Cell Tissue Res* 314 (3): 337-50
- Rudehill A., Sollevi A., Franco-Cereceda A. and Lundberg J. M. (1986) Neuropeptide Y (NPY) and the pig heart: release and coronary vasoconstrictor effects *Peptides* 7 (5): 821-6
- Saito A., Kimura S. and Goto K. (1986) Calcitonin gene-related peptide as potential neurotransmitter in guinea pig right atrium *Am J Physiol* 250 (4 Pt 2): H693-8
- Sanderson J. E., Brooksby P., Waterhouse D., Palmer R. B. and Neubauer K. (1992) Epidural spinal electrical stimulation for severe angina: a study of its effects on symptoms, exercise tolerance and degree of ischaemia *Eur Heart J* 13 (5): 628-33
- Schaible H. G. (1996) On the role of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in the spinal mechanisms of nociception and in the induction and maintenance of

inflammation-evoked hyperexcitability in spinal cord neurons (with special reference to nociception in joints) *Prog Brain Res* 113 423-41

Schipke J. D., Heusch G., Deussen A. and Thamer V. (1985) Acetylcholine induces constriction of epicardial coronary arteries in anesthetized dogs after removal of endothelium *Arzneimittelforschung* 35 (6): 926-9

Schmidt H. H., Lohmann S. M. and Walter U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action *Biochim Biophys Acta* 1178 (2): 153-75

Selyanko A. A. (1992) Membrane properties and firing characteristics of rat cardiac neurones in vitro *J Auton Nerv Syst* 39 (3): 181-9

Selyanko A. A. and Skok V. I. (1992) Synaptic transmission in rat cardiac neurones *J Auton Nerv Syst* 39 (3): 191-9

Sigrist S., Franco-Cereceda A., Muff R., Henke H., Lundberg J. M. and Fischer J. A. (1986) Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide *Endocrinology* 119 (1): 381-9

Slavikova J., Goldstein M., Dahlstrom A. (1993) The postnatal development of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerves in rat atrium, studied with immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy *J Auton Nerv Syst. May; 43 (2): 159-70*

Smith T. W., Balligand J. L., Kaye D. M., Wiviott S. D., Simmons W. W., Han X., Michel T., Singh K. and Kelly R. A. (1996) The role of the NO pathway in the control of cardiac function *J Card Fail* 2 (4 Suppl): S141-7

Smith F. M. (1999) Extrinsic inputs to intrinsic neurons in the porcine heart in vitro *Am J Physiol* 276 (2 Pt 2): R455-67

Sosunov A. A., Hassall C. J., Loesch A., Turmaine M. and Burnstock G. (1995) Ultrastructural investigation of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves associated with coronary blood vessels of rat and guinea-pig *Cell Tissue Res* 280 (3): 575-82

Takanaga A., Hayakawa T., Tanaka K., Kawabata K., Maeda S. and Seki M. (2003) Immunohistochemical characterization of cardiac vagal preganglionic neurons in the rat *Auton Neurosci* 106 (2): 132-7

Theissen I. L., Meissner A. (1996) Hypoxic pulmonary vasoconstriction *Anaesthesist. Jul; 45 (7): 643-52*

Vaishnava P. and D.H. W. (2003) Capsaicin sensitive-sensory nerves and blood pressure regulation *Current Medicinal chemistry -Cardiovascular & Hematological Agents* 1 177-188

Vanhoutte P. M. and Mombouli J. V. (1996) Vascular endothelium: vasoactive mediators *Prog Cardiovasc Dis* 39 (3): 229-38

Vatner D. E., Knight D. R., Homcy C. J., Vatner S. F. and Young M. A. (1986) Subtypes of beta-adrenergic receptors in bovine coronary arteries *Circ Res* 59 (4): 463-73

Vatner S. F., Hintze T. H. and Macho P. (1982) Regulation of large coronary arteries by beta-adrenergic mechanisms in the conscious dog *Circ Res* 51 (1): 56-66

Verity (1988) Peripheral Nervous System (Handbook of Chemical Neuroanatomy), Chapter IX, p.344, Fig. 4

Vincent S. R. (1994) Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system *Prog Neurobiol* 42 (1): 129-60

von Restorff W. and Bassenge E. (1977) Transient effects of norepinephrine on myocardial oxygen balance *Pflugers Arch* 370 (2): 131-7

Wellman G. C., Bonev A. D., Nelson M. T. and Brayden J. E. (1996) Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels *Circ Res* 79 (5): 1024-30

Wharton J., Gulbenkian S., Mulderry P. K., Ghatei M. A., McGregor G. P., Bloom S. R. and Polak J. M. (1986) Capsaicin induces a depletion of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive nerves in the cardiovascular system of the guinea pig and rat *J Auton Nerv Syst* 16 (4): 289-309

Wiesenfeld-Hallin Z., Hokfelt T., Lundberg J. M., Forssmann W. G., Reinecke M., Tschopp F. A. and Fischer J. A. (1984) Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat *Neurosci Lett* 52 (1-2): 199-204

Wolfrum S., Grimm M., Heidbreder M., Dendorfer A., Katus H. A., Liao J. K., Richardt G. (2003) Acute reduction of myocardial infarct size by hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase *J Cardiovasc Pharmacol. May*; 41 (3): 474-80

Xi X., Randall W. C. and Wurster R. D. (1991) Intracellular recording of spontaneous activity of canine intracardiac ganglion cells *Neurosci Lett* 128 (1): 129-32

Xi X. H., Thomas J. X., Jr., Randall W. C. and Wurster R. D. (1991) Intracellular recordings from canine intracardiac ganglion cells *J Auton Nerv Syst* 32 (2): 177-82

Xu Z. J. and Adams D. J. (1993) Alpha-adrenergic modulation of ionic currents in cultured parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia *J Neurophysiol* 69 (4): 1060-70

Yasue H., Touyama M., Shimamoto M., Kato H. and Tanaka S. (1974) Role of autonomic nervous system in the pathogenesis of Prinzmetal's variant form of angina *Circulation* 50 (3): 534-9

Young M. A., Knight D. R. and Vatner S. F. (1987) Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels *Prog Cardiovasc Dis* 30 (3): 211-34

Zhang L., Tompkins J. D., Hancock J. C. and Hoover D. B. (2001) Substance P modulates nicotinic responses of intracardiac neurons to acetylcholine in the guinea pig *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281 (6): R1792-800

8. Veröffentlichungen

Abstract:

Die vorliegende Studie wurde im September 1999 im Rahmen der 16. Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft in Würzburg vorgestellt:

I. Sequeira, R. Haberberger und W. Kummer

Quantitative immunhistochemische Untersuchung der

Innervation der Koronararterien der Ratte

Ann. Anat. 182 (Suppl.), S. 217-218, 2000.

Originalarbeit:

„Atrial and ventricular rat coronary arteries are differently supplied by noradrenergic, cholinergic and nitrenergic, but not sensory nerve fibres.“

Indira M. Sequeira, Rainer V. Haberberger, Wolfgang Kummer
submitted (Annals of Anatomy, march 2005)

9. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Angaben beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“, niedergelegt sind, eingehalten.“

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit und für seine Unterstützung bei allen im Verlauf der Arbeit auftretenden Problemen. Außerdem möchte ich ihm für die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen danken und für das angenehme Arbeitsklima in seinem Institut.

Bei Herrn PD Dr. Rainer Haberberger möchte ich mich herzlich für seine Hilfsbereitschaft und die zahlreichen fachlichen Anregungen bedanken.

Ebenso danken möchte ich Frau Tamara Papadakis, Herrn Martin Bodenbenner, Frau Silke Wiegand, Frau Petra Hartmann und Frau Claudia Tag für die Unterstützung bei der Bewältigung labortechnischer Aufgaben.

Frau Karola Michael danke ich für die häufigen Hilfestellungen bei der graphischen Gestaltung der Arbeit.

Außerdem bedanken möchte ich mich beim Institut Basketball Team, insbesondere bei Frau Heidrun Sust für den Spaß und die körperliche Fitness während der Erstellung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums. Ich möchte Ihnen und Andreas für Ihre liebevolle Unterstützung danken.