

**Einfluss der Stimulation kardialer  $\kappa$ -Opioidrezeptoren auf die Kontraktion isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten der Ratte unter Berücksichtigung der Signaltransduktion über Stickstoffmonoxid-Synthasen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

**Rita Wilkens**

aus Heede

Giessen, 2006

Aus dem

Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Florian Dreyer

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Gutachter: PD Dr. Th. Noll

Tag der Disputation: 12. 03. 2007

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Opioide und ihre Wirkung auf das Herz .....	1
1.2	Die Signaltransduktion kardialer $\kappa$ -Opioidrezeptoren .....	3
1.3	Aufgabenstellung .....	5
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>6</b>
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	6
2.2	Computerprogramme .....	7
2.3	Substanzen .....	7
2.4	Lösungen .....	9
2.5	Präparation der Kardiomyozyten .....	10
2.5.1	Gewinnung der Herzen .....	10
2.5.2	Separation der kardialen Zellen .....	10
2.5.3	Gewinnung der Kardiomyozyten .....	11
2.6	Messung der Kontraktion der Kardiomyozyten .....	12
2.6.1	Vorbereitung .....	12
2.6.2	Qualität der Zellen .....	12
2.6.3	Superfusion der Zellen .....	13
2.6.4	Stimulation der Zellen .....	14
2.6.5	Aufzeichnung der Zellkontraktionen .....	15
2.6.6	Bestimmung der $EC_{50}$ .....	16
2.7	Statistik .....	16
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>17</b>
3.1	Effekte des $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin auf das Kontraktionsverhalten elektrisch stimulierter Kardiomyozyten .....	17

3.1.1	Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Zeit .....	17
3.1.2	Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Isoprenalin-Konzentration	18
<b>3.2</b>	<b>Effekte von <math>\kappa</math>-Opioidrezeptor-Agonisten (-)-U-50,488 auf das Kontraktionsverhalten Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	Kontraktionsverhalten der Myozyten in Abhängigkeit von der Zeit .....	20
3.2.2	Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der (-)-U-50,488- Konzentration .....	21
<b>3.3</b>	<b>Effekte des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME auf das Konzentrationsverhalten Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten.....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Konzentrationsabhängige Wirkung auf mit (-)-U-50,488 behandelte Myozyten .....	25
3.3.2	Konzentrationsabhängige Wirkung von (-)-U-50,488 auf mit L-NAME behandelte Myozyten .....	27
3.3.3	Vergleich der Effekte von L-NAME- und D-NAME auf die Kontraktion Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten.....	29
<b>3.4</b>	<b>Effekte von L-NAME und D-NAME auf das Kontraktionsverhalten nicht Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Effekte des Guanylylcyclase Inhibitors ODQ auf das Kontraktionsverhalten nicht Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Agonismus am kardialen <math>\beta</math>-Adrenorezeptor .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Agonismus am kardialen <math>\kappa</math>-Opioidrezeptor .....</b>	<b>38</b>
4.2.1	Die (-)-U-50,488-Wirkung in Abhängigkeit von der Zeit .....	39
4.2.2	Kontraktionsverhalten isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der (-)-U50,488-Konzentration .....	40
4.2.3	Vergleich zwischen Enantiomer und Racemat der Substanz U-50,488.....	41
4.2.4	Die Signalkaskade.....	42

<b>4.3</b>	<b>Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthase-Inhibitoren.....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Konzentrationsabhängige Wirkung des NOS-Inhibitors L-NAME .....	44
4.3.2	Die spezifische Hemmung der NOS durch L-NAME .....	45
4.3.3	Wirkmechanismen von NO .....	45
<b>4.4</b>	<b>ODQ als Inhibitor der löslichen Guanylylcyclase .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblicke.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>53</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Aqua dem.	demineralisiertes Wasser, geeignet zur Zellkultur
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AC	Adenylylcyclase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Äthylenglykol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N'-tetraessigsäure Säure
EC <sub>50</sub>	Konzentration einer Substanz, die 50% des maximal möglichen Effektes hervorruft
FCS	fötale Kälber-Serum
GC	Guanylylcyclase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
Na <sub>2</sub> ATP	Dinatrium-Adenosin-5'-triphosphat
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	Dinatriummethylen-diamintetraacetat
D-NAME	N-Nitro-D-Arginin Methyl Ester
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methyl Ester
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase

nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration in mol/l
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis-Toxin
ODQ	1 H-(1,2,4) Oxadiazole (4,3-a) quinoxalin-1-on
U	Einheit
(-)-U-50,488	(-)-trans-U-50,488 HCL, trans-(1S,2S)-3,4-Dichloro-N-methyl-N-(2-(1-pyrrolidiny)-cyclohexyl)benzenacetamidhydrochlorid
x g	x-fache Erdbeschleunigung

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Opioide und ihre Wirkung auf das Herz

Opioidepeptide gehören zur Familie der endogenen Neuromodulatoren. Zu den zuerst charakterisierten Peptiden gehören Met- und Leu-Enkephalin, die aus dem Gehirn, wo sie am häufigsten vorkommen, isoliert wurden (Hughes et al., 1975). Sie entstehen durch Abspaltung aus drei großen, von unterschiedlichen Genen codierten Vorläuferproteinen: Präproopiomelanocortin (POMC) ( $\beta$ -Endorphin), Präproenkephalin A (Enkephalin) und Prodynorphin (Dynorphin) (Day et al., 1993; Rossier, 1993; Young et al., 1993). Opioidepeptide (Enkephaline, Dynorphin) spielen eine große Rolle im Bereich der Schmerzvermittlung (Fields, 1993). Sie scheinen am postsynaptischen Spalt der primären afferenten Nervenbahnen die Fortleitung der Impulse von Schmerzrezeptoren zu hemmen (Minami und Satoh, 1995). Außerdem sind Opioidepeptide an einer immensen Bandbreite von biologischen, zum Teil lebenswichtigen Prozessen (Olson et al., 1994) wie Atmung, Thermoregulation, gastrointestinaler Motilität, Nahrungsaufnahme, Stressverarbeitung etc. beteiligt (Kieffer, 1995). Die Wirkung der Opioide wird über Opioidezeptoren vermittelt. Diese werden in  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren unterteilt. Von den endogenen Opioiden hat Dynorphin eine sehr hohe Affinität zu  $\kappa$ -Rezeptoren, Enkephalin zu  $\delta$ -Rezeptoren und  $\beta$ -Endorphin zu  $\mu$ -Rezeptoren (Kieffer, 1995). Diese Rezeptoren zeigen unterschiedliche biochemische Eigenschaften (Goldstein und Naidu, 1989; Kieffer, 1995) und Verteilungen im Gewebe des Herzens, der Gefäße, des peripheren Nervensystems, des Zentralnervensystems etc.; z. B. wurde in der Hirnrinde der Ratte nur eine geringe Menge mRNA des  $\mu$ -Rezeptors gefunden, während  $\delta$ -Rezeptoren dort ausgeprägt entdeckt wurden (Mansour et al., 1987). Die verschiedenen Rezeptortypen sind vorwiegend im ZNS lokalisiert. Sie sind jedoch auch multipel in der Körperperipherie, z. B. in der glatten Muskulatur der Gefäße, des Gastrointestinaltraktes (Olson et al., 1994), im Lymphsystem (Lymphozyten) (Taub et al., 1990) sowie im Atrium- und Ventrikelgewebe des Herzens zu finden.

Bindungsstudien zeigen, dass es bei der Ratte nur  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidezeptoren auf den Kardiomyozyten gibt (Krumins et al., 1985; Krumins, 1987; Ventura et al., 1989). So

zeigten Ventura et al. (1989), dass nur die  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten [ $^3\text{H}$ ]DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]U69593 in Sarkolemm-Präparationen von Kardiomyozyten gebunden werden, während der  $\mu$ -Agonist [ $^3\text{H}$ ]DAGO nicht gebunden wird. Zimlichmann et al. (1996) führten jedoch den Beweis, dass  $\mu$ -Rezeptoren sehr wohl in dem Herzgewebe der Ratte vorkommen. Sie sind nur bis zum siebten Lebenstag auf den Kardiomyozyten der Ratte nachweisbar, bei den adulten Ratten dagegen nicht.  $\kappa$ -Opioidrezeptoren bilden die Mehrzahl der kardialen Rezeptoren (Tai et al., 1991; Jin et al., 1995; Zimlichmann et al., 1996). Diese werden auch in  $\kappa_1$ - und  $\kappa_2$ -Subtypen klassifiziert (Zukin et al., 1988; Zhang et al., 1999), wobei der erstere am häufigsten im Rattenherz vorkommt (Jin et al., 1995). Die meisten  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten, wie auch U-50,488 (trans-3,4-dichloro-N-methyl-N-(2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl)-benzeneacetamid) binden an beide Subtypen.

Seit längerer Zeit ist schon bekannt, dass Opiate und Opioidpeptide Einfluss auf das kardiovaskuläre System ausüben (Holaday, 1983; Feuerstein und Siren, 1987; Faden, 1993). Es werden Änderungen der Herzfrequenz und des Blutdrucks, verursacht durch die Aktivierung des Zentralnervensystems, beschrieben. Jedoch üben Opioide neben ihrer zentralen Wirkung auch direkten Einfluss auf das Herz aus (Gautret und Schmitt, 1985; Feuerstein und Siren, 1987). So wird durch Agonismus am  $\delta$ -Opioidrezeptor die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten reduziert (Ventura et al., 1992). Einige Forschungsarbeiten berichten im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung über eine kardioprotektive Rolle des  $\delta$ - und des  $\kappa$ -Opioidrezeptors bezüglich der Infarktausdehnung (Wang et al., 2001). Die Stimulation des  $\kappa$ -Opioidrezeptors führt zu Arrhythmien (Wong et al., 1990; McIntosh et al., 1992) und zu einer Verminderung der Kontraktionsamplitude von isolierten, elektrisch stimulierten Rattenkardiomyozyten (Ventura et al., 1992; Wenzlaff et al., 1998a). Die Aktivierung des Rezeptors führt innerhalb der Zelle zu einer Abfolge von biochemischen Prozessen, die darauf hin ein bestimmtes Zellverhalten wie eine Abschwächung der Zellkontraktionen hervorrufen. Bezüglich des  $\kappa$ -Opioidrezeptors gibt es schon verschiedene Arbeiten, die über mögliche Wege der Signalvermittlung berichten.

## 1.2 Die Signaltransduktion kardialer $\kappa$ -Opioidrezeptoren

Bislang ist bekannt, dass an der Signalvermittlung des  $\kappa$ -Opioidrezeptors am Herzen ein Pertussis-Toxin (PTX)-sensitives G-Protein beteiligt ist (Sheng et al., 1997; Xiao et al., 1997; Bian et al., 1998a; Wenzlaff et al., 1998a; Yu et al., 1998; Zhang und Wong, 1998). Zudem ist anhand von Zellpräparationen herausgefunden worden, dass die Konzentration von cyclischem AMP (cAMP) infolge der Stimulation des  $\kappa$ -Opioidrezeptors vermindert wird (Bian et al., 1998b; Zhang und Wong, 1998; Zhang et al., 1999) und der Calciumspiegel der Zelle sich erhöht (Sheng et al., 1997).

Eine direkte Verbindung zwischen der Adenylylcyclase (AC) der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade mit dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor über ein Gi/o-Protein besteht nicht. Das bestätigten sowohl Niroomand et al. (1996) mittels Membranpräparationen aus dem Ventrikelgewebe von Hundeherzen als auch frühere Untersuchungen unseres Labors (Wenzlaff et al., 1999). Diese haben gezeigt, dass U-50,488 als  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist die Zellkontraktion sowohl in Gegenwart von Isoprenalin als auch ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation vermindert. Prozentual zur Zellausgangslänge präsentiert sich der gleiche Effekt. Darüber hinaus wurde, um eine mögliche Interaktion der Signalwege von  $\kappa$ -Opioid- und Adrenorezeptor auf der Ebene der Adenylylcyclase auszuschließen, Forskolin verwandt. Forskolin ist im Gegensatz zu Isoprenalin ein direkter und stärkerer Adenylylcyclasen-Aktivator. U-50,488 führte nicht zur Verminderung der AC-Aktivität. Zum direkten Vergleich wurde die Wirkung von Forskolin unter Einfluss des M-Acetylcholinrezeptor-Agonisten Carbachol getestet. Carbachol, von dem bekannt ist, dass es über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor agiert, führte dahingegen zu einer Verminderung der Adenylylcyclase-Aktivität. Deshalb müssen andere Mechanismen infolge  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation für die Erniedrigung der cAMP-Konzentration in der Herzzelle verantwortlich gemacht werden.

Eine Möglichkeit zur Vermittlung der Effekte infolge Rezeptoraktivierung liegt in einem Phospholipase C (PLC)- oder Proteinkinase C (PKC)-vermittelten Weg. Wenzlaff et al. (1999) fanden heraus, dass der PLC-Inhibitor U73,122 (1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-methoxyestra-1,3,5,(10)-trien-17-yl]-amino]hexyl]-2,5-pyrrolidinedion) die Wirkung von U-50,488 auf das kontraktile Verhalten der Kardiomyozyten abschwächt. Auch andere Studien

untersuchten diesen Weg (Sheng et al., 1997; Zhang und Wong, 1998). Demnach reguliert PLC über einen Anstieg von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) den intrazellulären Calciumspiegel durch Freisetzung von Calcium aus dem sarcoplasmatischen Reticulum und führt zu einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration und zu einer Veränderung der Kontraktionsfähigkeit der Herzzelle.

Auch die Proteinkinase C ist an der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-vermittelten Wirkung beteiligt (Bian et al., 1998b; Wenzlaff et al., 1999). Es wird beschrieben, dass die PKC den intrazellulären cAMP-Konzentrationsspiegel über eine Phosphodiesterase IV beeinflusst (Bian et al., 2000). Für diese Arbeit ist es besonders interessant, dass die Proteinkinase C in einigen Fällen Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aktiviert. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass Lipopolysaccharide (LPS) PKC-abhängig die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten von Ratten über einen NOS-vermittelten Weg vermindern (McKenna et al., 1995). Darüber hinaus zeigen direkte Untersuchungen mit NO-Donatoren, wie SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamin) oder DEA/NO (1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazin), ebenfalls eine durch NO-vermittelte Reduktion der Kardiomyozyten-Kontraktilität (Sandrasegarane und Diamond, 1999).

Im Bereich der Schmerzforschung gibt es schon seit längerem Studien, die dafür sprechen, dass Stickstoffmonoxid (NO) bei Opioid-vermittelten Effekten eine Rolle spielt. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein lipophiles, hochreaktives und chemisch instabiles Molekül. Pharmakologisch ist NO der aktive Metabolit von Nitro-Vasodilatoren und wird therapeutisch eingesetzt (Ahlner et al., 1991). NO ist nicht nur von außen zuführbar, sondern wird auch in nahezu fast allen Körpergewebszellen gebildet und als endogener Mediator gebraucht. Gebildet wird NO in den Körperzellen durch NO-Synthasen (NOS), von denen bisher zwei konstitutive, die endotheliale NOS (eNOS, auch NOS III genannt) sowie die neuronale NOS (nNOS, auch NOS I genannt), und eine induzierbare Form (iNOS, oder NOS II) bekannt sind (Nathan und Xie, 1994; Balligand, 2000).

Die NO-Synthasen verwenden L-Arginin als Substrat und katalysieren in einer oxireduktiven Reaktion die Bildung von NO und Citrullin:



### **Schema 1: Stickstoffmonoxid-Synthase-Reaktion**

Schmerzforscher zeigten, dass die Hemmung der NO-Synthase die spinale Morphin-induzierte Analgesie bei Ratten steigert (Przewlocki et al., 1993), ja sogar die  $\mu$ -,  $\delta$ - und in einem geringeren Umfang die  $\kappa$ -Rezeptor-vermittelte spinale Analgesie bei akutem und chronischem Schmerz potenziert (Machelska et al., 1997).

## **1.3 Aufgabenstellung**

Vor diesem Hintergrund versucht die vorliegende Arbeit den Einfluss der Stimulation kardialer  $\kappa$ -Opioidrezeptoren auf die Kontraktion isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten der Ratte und die Rolle der Stickstoffmonoxid-Synthasen bei der Vermittlung innerhalb des Signalnetzwerkes zu klären.

Getestet wurde die Kontraktionsfähigkeit der elektrisch stimulierten Myozyten durch Messung der Änderung der Kontraktionsamplitude unter Einfluss des Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin und von U-50,488 als  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten. Darüber hinaus wurde die Einwirkung von (-)-U-50,488 mit Zusatz des NO-Synthasehemmers L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Methyl Ester) sowie dessen inaktiv optischen Enantiomer D-NAME (N-Nitro-D-Arginin Methyl Ester) untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob innerhalb des dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor nachgeschalteten Signalnetzwerkes NO involviert ist. Am Ende der Versuchsreihen wurde die Beteiligung der löslichen Guanylylcyclase, bekannt als klassischer Mediator für NO, mittels des spezifischen cGMP-Inhibitors ODQ (1 H-[1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-on) getestet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank:	B 5060 EK, Heraeus, Hanau, Deutschland
Kamera:	Camera Adaptor CMA-D1CE, Sony DXC-101P, Köln, Deutschland
Mikroskop (invers):	Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Monitor:	PVM 1440 QM, Sony Triniton, Köln, Deutschland
Nylonnetz:	Heidland, Gütersloh, Deutschland
Petrischalen, 35x10 mm:	Falcon 353001, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pipetten (Einweg), 10 ml:	Falcon 357551, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pipettierhilfe:	pipetus-akku, Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pumpe:	Minipuls HP2, Abimed, Langenfeld, Deutschland
Pumpe:	STA multipurpose pump, Desaga, Heidelberg, Deutschland
Pumpen (2 Stck.):	Varioplex 2120 II Pump, LKB Bromma, München, Deutschland
Stimulator:	Pulsar 6i, Frederick Haer &Co, Brunswick, USA
Thermostat:	K5, ultra, Colora, Lorch, Deutschland
Thermostat:	Typ T50, Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Videokassetten:	E-240 DXF, Sony, Köln, Deutschland
Videorecorder:	VC-MH 641, Sharp, Hamburg, Deutschland
Wasserbad:	Wasserbad Typ 3047, Köttermann, Uetze, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen, steril, 50 ml:	PP-Röhrchen, Frickenhausen, Deutschland

Zentrifuge: MSESK 1, Measuring Scientific Equipment, London, England

## 2.2 Computerprogramme

Berechnungen: Excel 97 für Windows – Microsoft

Diagramme: Origin, Version 3.5 - Microcal

Textverarbeitung: Word 2000 für Windows–Microsoft

## 2.3 Substanzen

Ascorbinsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland

Bernsteinsäure: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Bovines Serumalbumin: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Brenztraubensäure: ICN, Eschwege, Deutschland

CaCl<sub>2</sub>: Merck, Darmstadt, Deutschland

Collagenase CLS II,  
C2-22, (215 U/mg): Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland

Creatin•1H<sub>2</sub>O: ICN, Eschwege, Deutschland

DMSO: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

EGTA: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Fötale Kälberserum,

FCS Lot-Nummer 555x: Biochrom, Berlin, Deutschland

Glucose•H<sub>2</sub>O: Merck, Darmstadt, Deutschland

HEPES: Roth, Karlsruhe, Deutschland

β-Hydroxybuttersäure: Merck, Darmstadt, Deutschland

Isoprenalin 98% N-Isopropyl-  
noradrenalin Hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

KCl: Merck, Darmstadt, Deutschland

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Merck, Darmstadt, Deutschland

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Merck, Darmstadt, Deutschland

MgCl<sub>2</sub>•6 H<sub>2</sub>O: Merck, Darmstadt, Deutschland

MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O: Merck, Darmstadt, Deutschland

MOPS: Serva/Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Deutschland

Nährmedium Medium 199,  
Lot-Nummer 126H46642,

Serum-frei: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Na<sub>2</sub>ATP: Serva/Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Deutschland

NaCl: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Na<sub>2</sub>EDTA•2H<sub>2</sub>O: Merck, Darmstadt, Deutschland

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O: Merck, Darmstadt, Deutschland

D-NAME: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

L-NAME: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

ODQ: Alexis, Grünberg, Deutschland

Penicillin G, 1610 U/mg: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Streptomycinsulfat  
759 U/mg: Serva/Boehringer Ingelheim, Deutschland

Taurin: Fluka/Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

(-)-U-50,488: RBI/Sigma, Taufkirchen, Deutschland

## 2.4 Lösungen

### Lösung 1

MOPS-Puffer (in mmol/l):

NaCl (100,0); KCl (10,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2);  $\text{MgSO}_4$  (5,0); Glucose (20,0); Taurin (50,0);  
3-(N-morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (10,0)

pH=6,9

### Lösung 2

Kraftbrühe (in mmol/l):

KCl (70,0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (30,0);  $\text{MgSO}_4$  (5,0); Taurin (20,0); Bernsteinsäure (5,0); Creatin (5,0);  
EGTA (1,0);  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (7,3); Benztraubensäure (5,0);  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (5,0)

pH=7,4

### Lösung 3

Modifizierte Tyrodelösung [kurz: Tyrode] (in mmol/l):

NaCl (119,8); KCl (5,4);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,42);  $\text{MgCl}_2$  (1,05); Glucose (5,0);  
N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure (HEPES) (5,0);  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0,05);  
Ascorbinsäure (0,28);  $\text{CaCl}_2$  (1,8)

pH=7,4

### Lösung 4

Tyrodelösung mit Isoprenalin (20 nmol/l) [Isoprenalin-Tyrode, kurz: Isotyrode]

## **2.5 Präparation der Kardiomyozyten**

### **2.5.1 Gewinnung der Herzen**

Für die Versuche wurden ausgewachsene männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300 und 400 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konstanten Bedingungen [künstliches Licht mit Hell-Dunkelphasen (12:12 h) und einer Raumtemperatur von 25°C]. Sie hatten freien Zugang zu Futter (Standardfutter Altromin<sup>®</sup>) und Wasser.

Mindestens eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in eine reizarme Umgebung gebracht, um konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Die Ratten wurden mit Hilfe eines Genickschlags betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Eröffnung der Karotiden wurde das noch schlagende Herz durch Öffnung des Brustkorbs freigelegt. Während es atraumatisch angehoben wurde, wurde der Herzbeutel geöffnet und die Aorta freipräpariert. Bis auf die Aorta wurden alle zum Herzen hinführenden Gefäße und alle vom Herzen wegführenden Gefäße direkt am Herzen abgesetzt. Die Aorta wurde am Aortenbogen durchtrennt, um für die folgende retrograde Perfusion einen Gefäßstumpf zu erhalten. Das auf diese Weise isolierte Herz wurde für einen kurzen Zeitraum von maximal 30 s, der für das Fassen des Herzens an der Aorta mittels einer Pinzette benötigt wurde, in ein Gefäß mit sauerstoffbegaster Lösung 1 (37°C) überführt.

### **2.5.2 Separation der kardialen Zellen**

Das Herz wurde nun schnellstmöglich mit dem Aortenstumpf über die Kanüle einer modifizierten Langendorff-Apparatur gezogen und fixiert. Diese Apparatur bestand aus einem Schlauchsystem mit einer Aortenkanüle zum Fixieren und Perfundieren des Herzens. Darunter befand sich ein Organbad, das die Spülflüssigkeit des Herzens wieder auffing. Eine Schlauchpumpe sorgte für eine konstante Fließgeschwindigkeit der verwendeten Lösungen zum Herzen, während mit Hilfe eines wasserbeheizten Wärmeaustauschers und eines Thermostats die Temperatur des Systems konstant gehalten wurde. Im Gegensatz zur üblichen Langendorff-Anlage fehlte eine Vorrichtung

zum Messen des Perfusats- und des Ventrikeldrucks. Um das Herz von Blutresten zu befreien, wurde es mit der Lösung 1 ( $O_2$  begast,  $37^\circ C$ , pH 6,9) für drei Minuten retrograd mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min nicht rezirkulierend gespült, d. h. die aufgefangene Spülflüssigkeit des Herzens wurde dem Perfusionssystem entzogen. Danach wurde das Herz bei einer Geschwindigkeit von 30 ml/min ca. 14,5 Minuten lang rezirkulierend, d. h. in einem geschlossenen Perfusionssystem mit 0,1% Collagenasepuffer (20 mg Collagenase in 20 ml Lösung 1 mit 18  $\mu$ l 0,1 mol/l  $CaCl_2$ -Lösung) perfundiert. Der Calciumzusatz steigerte die Enzymaktivität. Die Dauer der Verdauungsreaktion richtete sich nach dem Herzgewicht.

### **2.5.3 Gewinnung der Kardiomyozyten**

Nachdem die Vorhöfe mitsamt der Herzklappen von den Ventrikeln abgetrennt worden waren, wurde das Kammergewebe für ungefähr fünf Minuten mit Hilfe zweier Skalpell in einem Uhrglas, gefüllt mit etwas Lösung 2 (KB-Medium, Isenberg und Klockner, 1982), zerkleinert. Durch mehrmaliges behutsames Auf- und Absaugen mit einer 10-ml-Sterilpipette gelang es, weitere Kardiomyozyten zu vereinzeln, so dass die Zahl der größeren Gewebestücke reduziert wurde. Die gesamte Zellsuspension wurde in die Lösung 2 ( $O_2$  begast,  $37^\circ C$ , pH 7,4) aufgenommen.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Wasserbad ( $37^\circ C$ , mit  $O_2$  begast) mit einem langsamen Schüttelmodus (Stufe 3) wurde die Zellsuspension durch ein 200  $\mu$ m-Maschen-Nylonnetz filtriert und für drei Minuten bei 50 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das resultierende Pellet in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. 37  $\mu$ l einer 0,1 mol/l  $CaCl_2$ -Lösung wurden dazugegeben. Anschließend wurde das Ganze bei  $37^\circ C$  im Wasserbad geschüttelt. Durch den Zusatz von Calcium wurden die Calcium-toleranten, d. h. versuchstauglichen Myozyten von den defekten Zellen weiter getrennt. Denn die Kardiomyozyten, die einen Calciumeinfluss nicht tolerierten (Isenberg und Klockner, 1982), verloren ihre Stäbchenform und gingen zu Grunde.

Nach ca. fünf Minuten erfolgte die Aufschichtung der Zellsuspension auf eine 6%ige Albuminlösung (3 g Rinderalbumin auf 50 ml Lösung 1). Durch anschließende Zentrifugation der Zellsuspension durch den Albumingradienten (50 x g, 2 min) konnte

der Anteil an Nicht-Kardiomyozyten maximal reduziert werden. Zusätzlich wurde ein großer Teil der abgerundeten Zellen aus der Präparation entfernt. Der Überstand wurde verworfen.

Das resultierende Zellpellet wurde in Serum-freiem Medium 199 aufgenommen, welchem 100 µg/l Streptomycin und 100000 U/l Penicillin zugesetzt worden waren. Die Kardiomyozyten waren nun für die Kontraktionsmessung vorbereitet.

## **2.6 Messung der Kontraktion der Kardiomyozyten**

### **2.6.1 Vorbereitung**

Am Vorabend der Präparation wurden für die Aufnahme der Kardiomyozyten Zellkulturschalen folgendermaßen vorbereitet: Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellkulturschalen mit 1 ml fötalem Kälberserum (FCS) benetzt, um die Anheftung der Kardiomyozyten auf den im späteren Versuchsabschnitt verwendeten Schalen zu gewährleisten. Diese kamen zur Aufbewahrung bis zum Ausplattieren über Nacht in einen Brutschrank (37°C, CO<sub>2</sub>-Gasanteil von 5%, Luftfeuchtigkeit von 95%).

Am Präparationstag wurden die aufbereiteten Myozyten unter sterilen Bedingungen mit dem Ziel, eine Zellkonzentration von 2-2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml zu erreichen, in das Medium gegeben. Daraufhin erfolgte unter sterilen Bedingungen die Verteilung von jeweils 1 ml Zellsuspension auf die Zellkulturschalen. Diese mussten anschließend mindestens eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert werden, damit die Zellen sich besser an den Schalenboden anheften und zur Ruhe kommen konnten. So waren während der Versuche in Bezug auf die Zellen gleichartige Bedingungen gewährleistet.

### **2.6.2 Qualität der Zellen**

Bis zur jeweiligen Messung blieben die Zellen eine bis fünf Stunden im Brutschrank. Die letztendliche Zellpräparation sollte 65-90% stabförmige Kardiomyozyten beinhalten. Diese wurden als lebensfähig, d. h. als versuchstauglich betrachtet, wenn sie in Gegenwart einer physiologischen Calciumkonzentration (1,8 mmol/l) länglich, klar

begrenzt und gestreift, sowie ohne Granulationen und Bläschen vorlagen (Capogrossi et al., 1986). Zudem sollte die maximale und minimale Kontraktionsamplitude bei 2 bzw. 4  $\mu\text{m}$  liegen. Die Zellsuspension enthielt weniger als 1% Nicht-Kardiomyozyten.

### **2.6.3 Superfusion der Zellen**

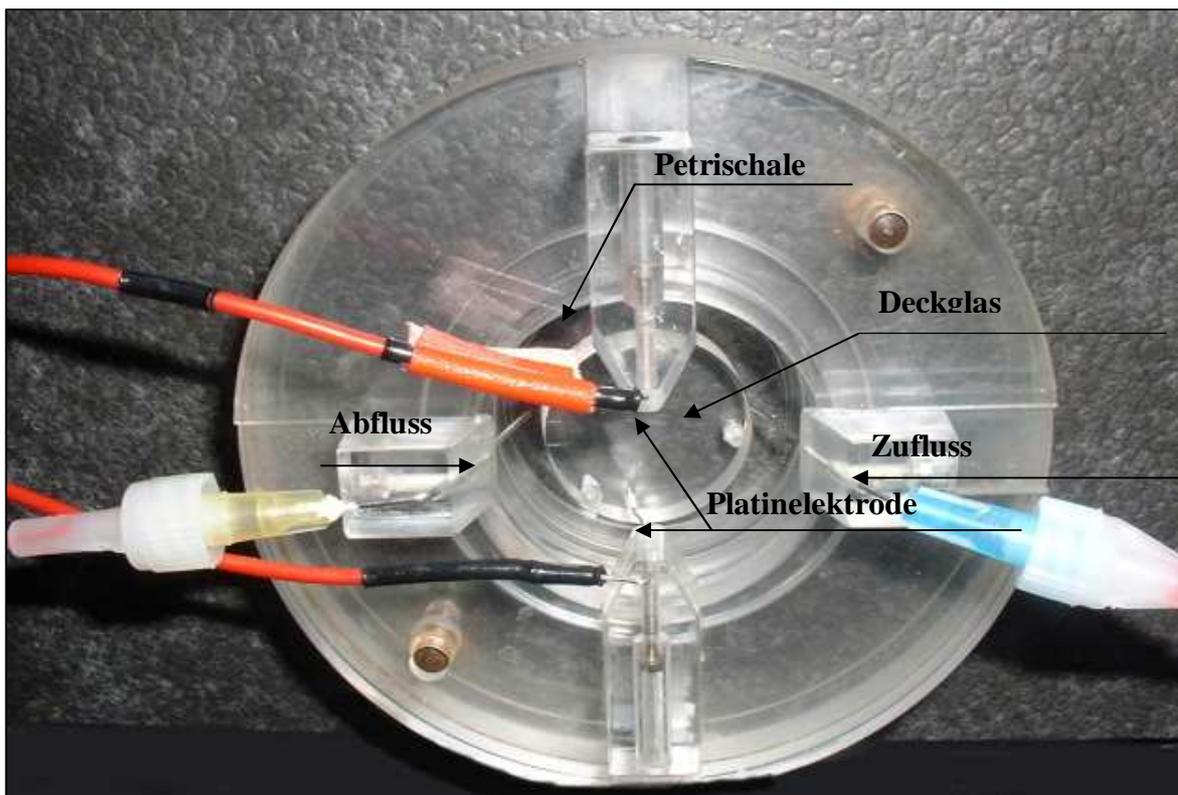
Zur Kontraktionsmessung wurde jeweils eine Petrischale mit Zellen in die Messkammer auf den Tisch eines inversen Lichtmikroskops gesetzt (Abb. 1). Die Kardiomyozyten wurden dabei ständig mit Hilfe einer Superfusionsanlage (Fließgeschwindigkeit: 2 ml/min) mit modifizierter Tyrode-Lösung (Lösung 3) überspült. Diese Lösung, vorgewärmt auf 35°C, wurde als Standard verwendet. Der Superfusionspuffer (pH 7,4) wurde mit O<sub>2</sub> begast und fünf Minuten lang äquilibriert, so dass zu Beginn jedes Versuchs das Medium 199, welches für die Aufbewahrung der Zellen verwendet wurde, durch Tyrode ersetzt wurde. Die Zellen befanden sich stets in einem Volumen von 1 ml, das durch ständigen Zu- und Abfluss (siehe Abb. 1) der Lösungen mittels zweier Pumpsysteme konstant gehalten wurde. Bei dem Wechsel von Tyrode zu Tyrode mit einer zu untersuchenden Substanz wurde stets auch das Reservoir verändert. Stark lipophile Verbindungen wie Opioide wurden wegen der Gefahr der Verunreinigung durch Rückstände der Testsubstanz im Schlauchsystem über separate Schläuche zugeführt. Außerdem fand regelmäßiges Spülen und Erneuern des Schlauchsystems statt, um Verschmutzungen zu vermeiden.

Beim erstmaligem Einsatz einer Substanz wurde der pH-Wert der Lösung (pH=7,4) mittels eines Teststreifens kontrolliert, damit pH-bedingte Effekte auf das Kontraktionsverhalten ausgeschlossen werden konnten.

Bis auf ODQ konnte für alle verwendeten Substanzen Tyrode als Lösungsmittel verwendet werden. Da ODQ in Wasser und Ethanol nicht ausreichend lösbar war, wurde das organische Lösungsmittel DMSO verwendet. Die Kontrollen enthielten entsprechende Konzentrationen von DMSO, um einen Einfluss von DMSO auszuschließen.

#### 2.6.4 Stimulation der Zellen

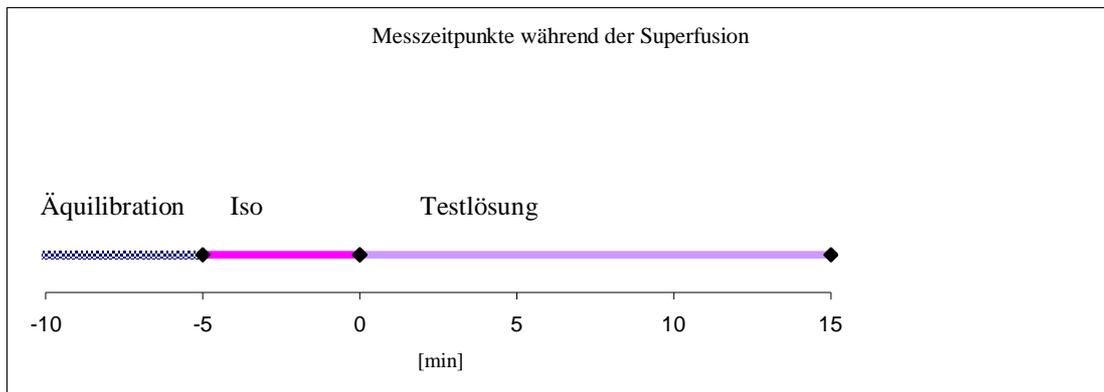
Ein Pulsgenerator erzeugte über angeschlossene Reizelektroden aus Platindraht, die jeweils gegenüberliegend im Abstand von 1 cm durch ein Deckglas hindurch in die Zellschale eingetaucht waren, ein elektrisches Feld. Durch dieses wurden die Kardiomyozyten zur Kontraktion stimuliert (1 Hz, 15 ms, 100 V). Um die benötigte Spannung für das für die Reizung verwendete elektrische Feld so niedrig wie möglich zu halten, wurde der Flüssigkeitsraum zwischen den beiden Platinelektroden durch ein „Plexiglas-Deckglas“ auf 1 mm Abstand vom Schalenboden eingengt. Die Zellen hatten eine durchschnittliche Länge zwischen 120 und 170  $\mu\text{m}$ . Unter Tyrode-Superfusion wurden infolge der Stimulation Zelllängenänderungen zum Zeitpunkt  $t=0$  von ca. 2-4  $\mu\text{m}$  hervorgerufen. Dieser Wert entspricht der basalen Kontraktionsamplitude.



**Abb. 1:** Messkammer mit Petrishale und Deckglas, Zu- und Abfluss und Platinelektroden;  
Maßstab 2,5:1

## 2.6.5 Aufzeichnung der Zellkontraktionen

Die Kontraktionen der Kardiomyozyten wurden mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet und über eine Kamera auf einen Monitor projiziert. Kontraktionsänderungen der Myozyten in Abhängigkeit von der Zeit wurden simultan auf einem Videoband aufgezeichnet. Die Zelllängenänderungen wurden zu den Messzeitpunkten, die für den Versuch relevant waren, ausgewertet (Abb. 2).



**Abb. 2:** Messzeitpunkte der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der jeweiligen Testsubstanz nach Äquilibration und Isoprenalinsuperfusion (Iso, 20 nmol/l). Die Äquilibration entspricht der Superfusion mit Tyrode.

Bei den Untersuchungen wurde die jeweilige Testsubstanz entweder in reiner Tyrodelösung oder mit Isoprenalinzusatz gelöst. Anhand der 5-minütigen Superfusion mit Isoprenalin konnte überprüft werden, ob alle Zellen innerhalb des Messzeitraums vergleichbare Eigenschaften aufwiesen und funktionell unversehrt waren: Bei Versuchstauglichkeit konnte unter Isoprenalineinfluss eine regelrechte Kontraktion (Amplitude von 4-6  $\mu\text{m}$ , gleichmäßig im Kontraktionsverlauf für die Zeit der Superfusion) beobachtet werden.

Zur Auswertung wurden Monitor, Videoband und Recorder genutzt. Mit Hilfe des Standbildes konnte die maximale Zellverkürzung während der Kontraktion im Vergleich zur Zelllänge während der Relaxation mittels eines Maßbandes in mm bestimmt werden. Anschließend wurden die Werte über einen Umrechnungsfaktor, der durch Eichung anhand einer Eichskala zu Beginn der Versuchsreihe festgelegt worden war, in  $\mu\text{m}$ -Längeneinheiten umgewandelt.

Es erfolgte eine tabellarische Dokumentation der Werte, d. h. die Versuchsbedingung, die Schalennummer, die Superfusionszeitdauer, die Messzeit mit dem entsprechenden Zählerstand des Videobandes und die Zelllängenänderung auf dem Bildschirm [mm] wurden schriftlich festgehalten. Die durchschnittliche Zelllängenänderung ergab sich aus dem Kontraktionsverhalten von vier bis sechs Myozyten pro Schale und Bedingung. Die Werte [ $\mu\text{m}$ ] wurden in Microsoft Excel gespeichert und ausgewertet.

#### **2.6.6 Bestimmung der $EC_{50}$**

Anhand der Bestimmung des Wendepunktes einer sigmoidalen Fitkurve durch die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin wurde mit Hilfe des Programms Microcal Origin die  $EC_{50}$  von 20 nmol/l für Isoprenalin ermittelt.

#### **2.7 Statistik**

Die Daten bestehen aus  $n \pm \text{SEM}$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für unpaare abhängige bzw. unabhängige Stichproben festgelegt; ein p-Wert von  $<0,05$  wird als statistisch signifikant betrachtet.

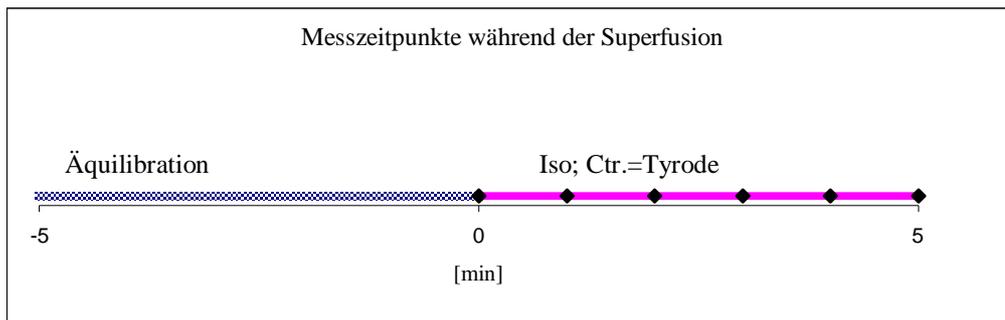
### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Effekte des $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin auf das Kontraktionsverhalten elektrisch stimulierter Kardiomyozyten**

Beta-Adrenorezeptor-Agonisten wie Isoprenalin stimulieren die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten der Ratte (Brodde et al., 1995; Xiao et al., 1997; Wenzlaff et al., 1998b). Die Kontraktionssteigerung beträgt bis zu 300% des Ausgangswertes (Xiao et al., 1997). Die Qualität der Zellpräparationen, das Versuchssystem und die Ergebnisse konnten anhand anderer Arbeiten, bei denen ebenfalls die  $\beta$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten angewandt worden waren (Xiao et al., 1997; Wenzlaff et al., 1998b), überprüft und verglichen werden. Aus diesem Grunde wurden Zeitverläufe erhoben, anhand derer die nötige Superfusionsdauer mit Isoprenalin bestimmt wurde. Als zweites wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin untersucht und die  $EC_{50}$  (Konzentration, die zu einer Kontraktionsamplitude der Kardiomyozyten führt, die 50% der maximal unter  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten-Einfluss möglichen Amplitude beträgt) bestimmt.

##### **3.1.1 Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Zeit**

Isoprenalin wirkte in einer Konzentration von 20 nmol/l, welche in gleichem Maße eine Zu- und Abnahme der Kontraktionsamplitude ermöglicht, auf die Kardiomyozyten ein. Während dieser Zeit wurden zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5 min Messungen (Abb. 3) hinsichtlich der Zelllängenänderung vorgenommen. Die Ausgangszellamplitude unter Tyrode-Einfluss betrug  $2,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$ . Nach einer 2-minütigen Superfusion mit Isoprenalin nahm die Kontraktionsamplitude der Kardiomyozyten signifikant zu. Nach vier Minuten war keine weitere signifikante Zelllängenänderung in Bezug auf den Ausgangswert unter Tyrode-Einfluss und den vorherigen Messwert mehr zu verzeichnen. Es stellte sich ein „Steady state“ zwischen Konzentration und Wirkung ein. Der Kontraktionsamplituden-Wert nach 5 Minuten betrug  $6,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$ . Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Versuche eine Isoprenalin-Superfusionszeit von 5 min festgelegt.



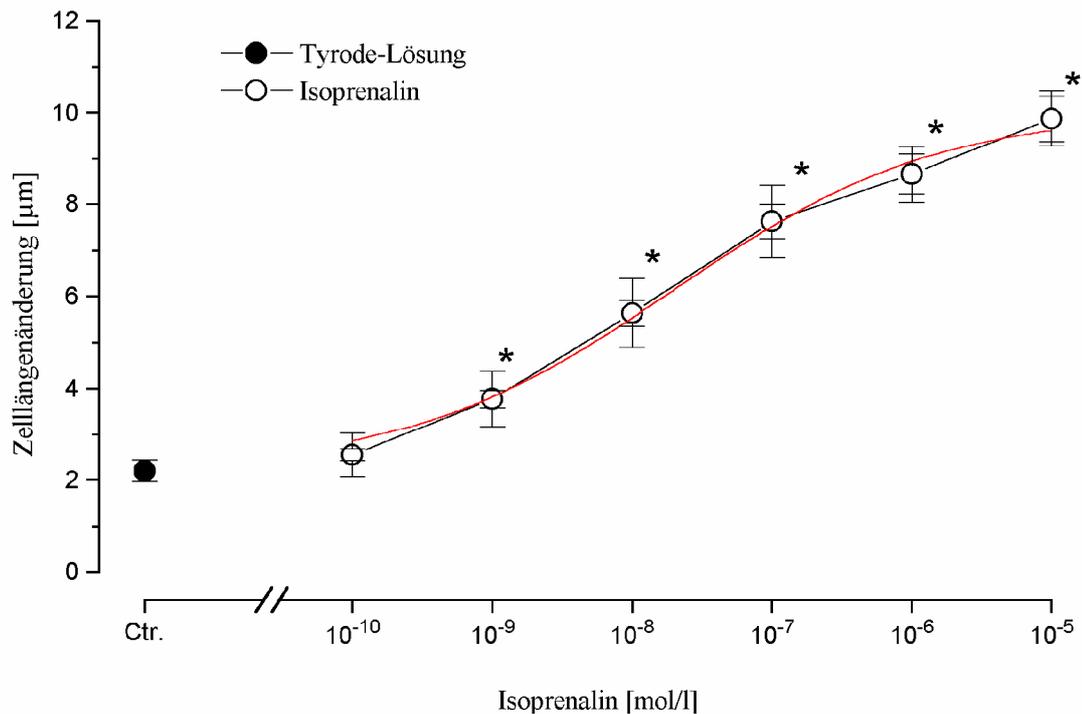
**Abb. 3:** Messzeitpunkte im Zeitverlauf von Isoprenalin. Superfusion von Tyrode mit Isoprenalinzusatz (Iso, 10 nmol/l - 0,1  $\mu$ mol/l). Die Superfusion mit Tyrode entspricht der Äquilibration. Zur Kontrolle (Ctr.) wurde Tyrode verwendet. Für die Konzentrationswirkungskurve ist nur der 5-Minuten-Wert relevant.

### 3.1.2 Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Isoprenalin-Konzentration

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Effekt von Isoprenalin auf die kontraktile Antwort bei Konzentrationen von 0,1 nmol/l bis 10  $\mu$ mol/l in Konzentrationsschritten von einer Zehnerpotenz nicht kumulativ untersucht.

Unter Tyrode-Einfluss betrug die Ausgangszelllängenänderung  $2,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Die Erhöhung der Isoprenalinkonzentration führte zu einer Zunahme der Kontraktionsamplitude (Abb. 4). Bei einer Konzentration von 1 nmol/l wurde eine erste signifikante Zunahme der Zelllängenänderung festgestellt. Maximale Effekte auf die Kontraktion der Zellen wurden bei einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l erreicht, die durch höhere Konzentrationen nicht mehr steigerbar waren (nicht dargestellt). Die Kontraktionsamplitude wurde auf  $9,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$  vergrößert, was einer relativen Zunahme von 450% gegenüber der Zelllängenänderung unter Tyrodesuperfusion ohne Isoprenalin entspricht. Anhand der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 4) wurde die  $EC_{50}$  von Isoprenalin (Konzentration, die zu einer Kontraktionsamplitude der Kardiomyozyten führt, die 50% der maximal unter  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten-Einfluss möglichen Amplitude beträgt) bestimmt. Sie betrug 20 nmol/l. Diese Konzentration wurde für alle nachfolgenden Versuche eingesetzt, da für eine Substanz wie U-50,488 bei zusätzlicher Superfusion mit anderen Substanzen sowohl in gleichem Maße eine Erhöhung als auch

eine Erniedrigung der Kontraktionsamplitude beschrieben worden sind (Ventura et al., 1992; Wenzlaff et al., 1998a, 1999).



**Abb. 4:** Effekt von Isoprenalin auf die Zelllängenveränderung (in µm) von isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz) Rattenkardiomyozyten. Als Kontrolle wurde die Kontraktionsamplitude der Zellen in Tyrode-Lösung gemessen. Die Anzahl der Präparationen betrug n=6. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber der Kontrolle (Tyrode-Lösung) (p< 0,05). Erstellung der sigmoidalen Fitkurve (rot) zur Bestimmung der EC<sub>50</sub> von Isoprenalin (20 nmol/l).

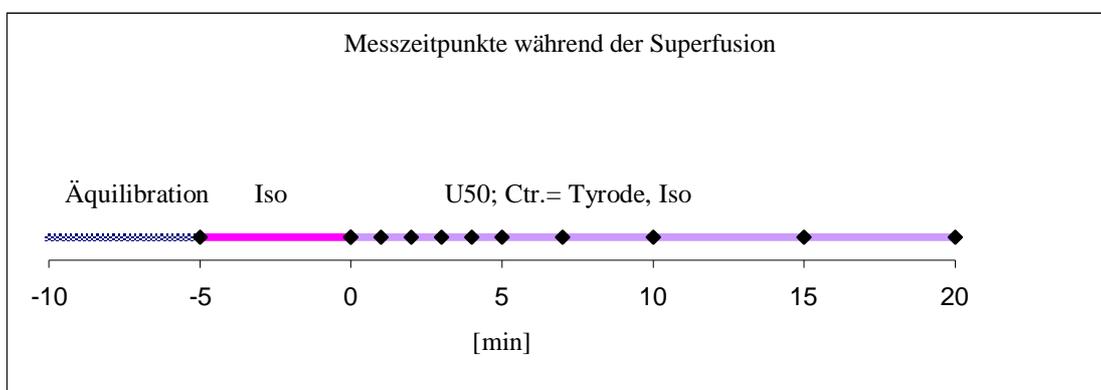
### 3.2 Effekte von $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten (-)-U-50,488 auf das Kontraktionsverhalten Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, befinden sich auf dem Herzen der adulten Ratte vor allem  $\kappa$ -Opioidrezeptoren. U-50,488 ist ein selektiver Agonist für diese Rezeptoren (Lahti et al., 1982; Vonvoigtlander et al., 1983). Um Artefakte wie einen Agonismus an  $\mu$ -Rezeptoren durch die Benutzung des Racemat von U-50,488 zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen das um den Faktor 2 potentere

Enantiomer (-)-U-50,488 (Rothman et al., 1989) eingesetzt. In Bezug auf (+)-U-50,488 ist (-)-U-50,488 um den Faktor 336 potenter.

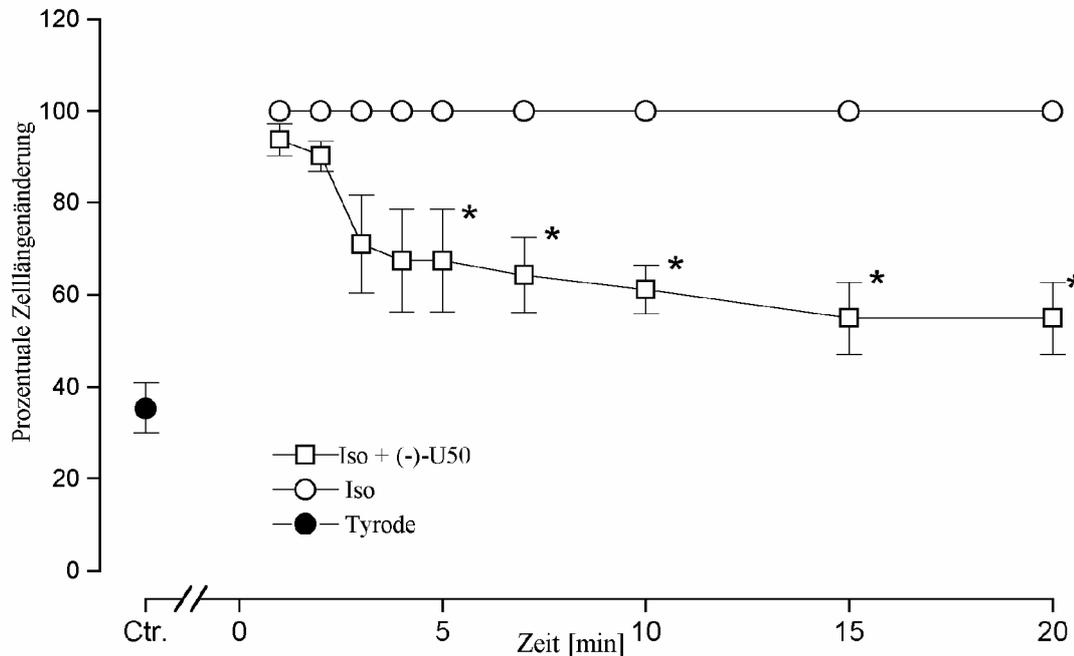
### 3.2.1 Kontraktionsverhalten der Myozyten in Abhängigkeit von der Zeit

Es wurden Zeitverläufe erhoben, um die Dauer der Superfusion zu bestimmen, die für die Einstellung eines „steady state“ zwischen Konzentration und Wirkung benötigt werden würde. Es erfolgte die Bestimmung der Zelllängenänderungen zu den Zeiten  $t = -5, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20$  min (Abb. 5) bei einer (-)-U-50,488-Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$ .



**Abb. 5:** Messzeitpunkte im Zeitverlauf von (-)-U-50,488: Superfusion Isoprenalin-stimulierter Zellen mit (-)-U-50,488 (U50,  $10 \mu\text{mol/l}$ ). Zur Kontrolle (Ctr.) fanden Messungen der Kontraktionsamplitude in Tyrode bzw. Isoprenalin (Iso,  $20 \text{ nmol/l}$ ) statt.

In Gegenwart von Isoprenalin ( $20 \text{ nmol/l}$ ) führte (-)-U-50,488 ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) nach 5 Minuten zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsamplitude. Die Zelllängenänderung fiel zu diesem Zeitpunkt auf  $67 \pm 11\%$  der maximalen Kontraktionsamplitude unter Isoprenalin-Einfluss ab. Während es in Gegenwart von Isoprenalin über einen Zeitraum von 20 Minuten (Abb. 6) nicht zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsamplitude kam, wurde in Gegenwart von (-)-U-50,488 die kontraktile Antwort im Zeitverlauf reduziert (Abb. 6). Nach 15 Minuten Superfusion ergaben sich bei einer Reduktion auf  $55 \pm 8\%$  der Ausgangszelllänge unter Isoprenalinstimulation keine weiteren signifikanten Veränderungen der Kontraktionsfähigkeit der Zelle. Dies bedeutete für weitere Untersuchungen in Bezug auf die Konzentration und die Wirkung von (-)-U-50,488, dass der Effekt von U-50,488 nach 15 Minuten Superfusionszeit gemessen werden musste.

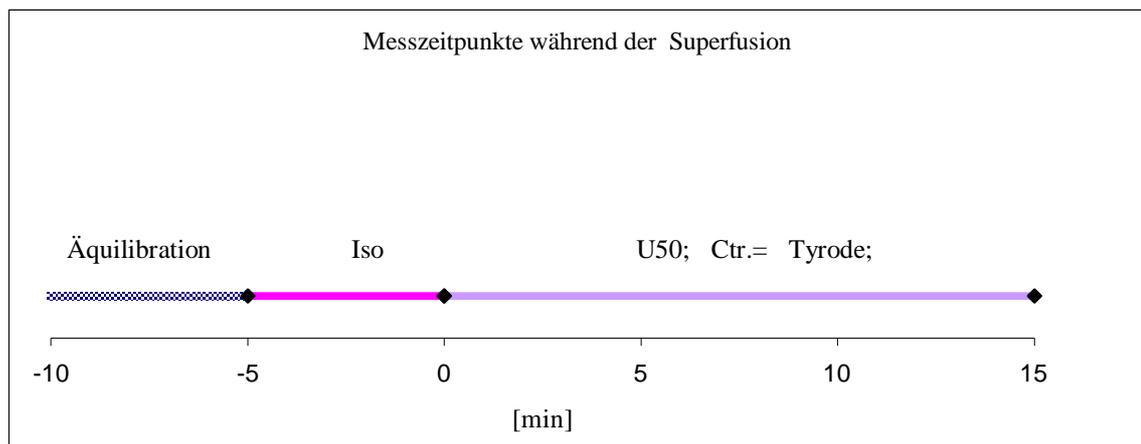


**Abb. 6:** Zeitabhängige Effekte von (-)-U-50,488 ((-)-U50, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) in Anwesenheit von Isoprenalin (20  $\text{nmol/l}$ ) und Isoprenalin (Iso, 20  $\text{nmol/l}$ ) auf die Zelllängenänderungen (prozentual zum Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t=0$ ) in isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz) Rattenkardiomyozyten. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Werten unter Ausschluss von (-)-U-50,488 (Iso, 20  $\text{nmol/l}$ ) ( $p < 0,05$ ). Als Kontrolle (Ctr.) diente die Tyrodelösung ohne Zusatz von Isoprenalin und (-)-U-50-488. Die Anzahl der präparierten Rattenherzen betrug  $n=4$ .

### 3.2.2 Kontraktionsverhalten in Abhängigkeit von der (-)-U-50,488-Konzentration

Da der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist (-)-U-50,488 nicht mit Isoprenalin interagiert und die  $\beta$ -adrenerge Stimulation keinen Einfluss auf die relative Reduktion der Kontraktilität hat (Wenzlaff et al., 1998b), wurde (-)-U-50,488 in Isoprenalin-Tyrode (Lösung 4) gelöst. Die Erhöhung der Zellausgangslänge war wegen der einfacheren Handhabung der Messungen für die folgenden Versuchsreihen von Nutzen, da so der Effekt von (-)-U50,488 auf die Kontraktionsamplitude deutlicher wurde.

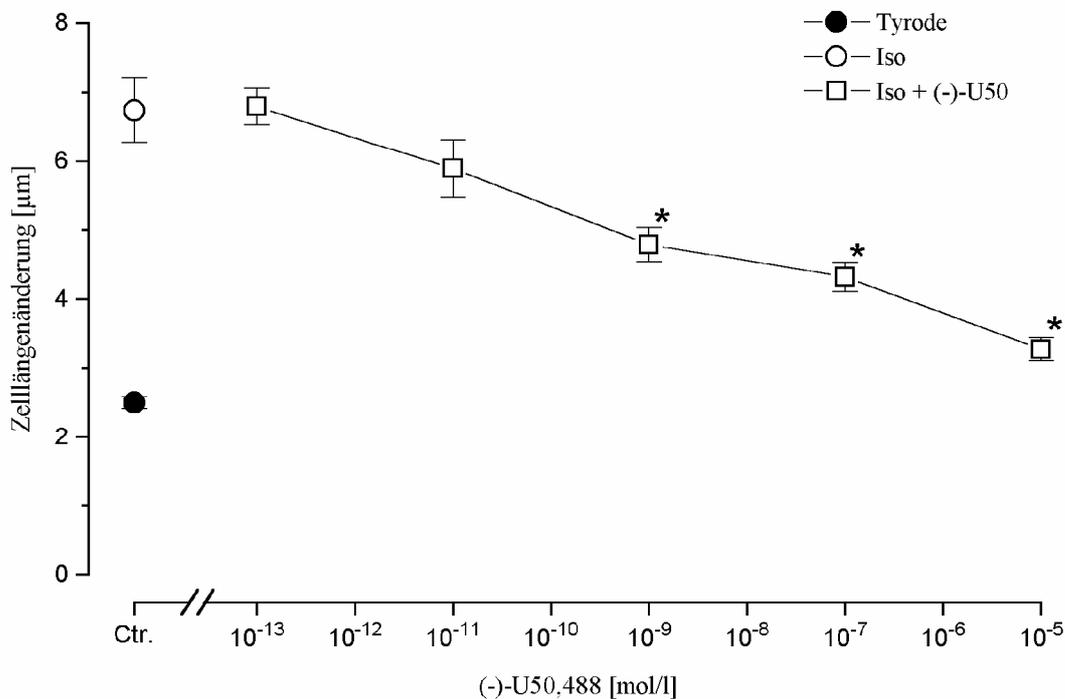
Zur Erhebung der Konzentrations-Wirkungskurve erfolgte nach einer 5-minütigen Superfusionszeit mit Isotyrode die Überspülung der Zellen über einen Zeitraum von 15 Minuten mit (-)-U-50,488 (Abb. 7).



**Abb. 7:** Messzeitpunkte der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von (-)-U-50,488: Superfusion Isoprenalin-stimulierter Zellen mit (-)-U50,488 (U50, 0,1 pmol/l – 10 µmol/l). Zur Kontrolle fanden Messungen mit Tyrode bzw. Isoprenalin (Iso, 20 nmol/l) statt. Die Messpunkte der (-)-U-50,488-Superfusion von mit L-NAME-vorbehandelten Kardiomyozyten (Abb. 9, 10) sind identisch. Die Myozyten werden in allen Phasen nach einer Vorbehandlung (30 min) mit L-NAME superfundiert.

Es wurden die Konzentrationen 10 µmol/l, 0,1 µmol/l, 1 nmol/l, 10 pmol/l und 0,1 pmol/l verwendet und die dazugehörigen Kontraktionsamplituden bestimmt. Mit Hilfe dieser Ergebnisse sollte die (-)-U-50,488-Konzentration bestimmt werden, die bei weiteren Versuchen im Rahmen der Signaltransduktion des κ-Opioidrezeptors Verwendung finden sollte, also die maximal effektive Konzentration.

Abhängig von der (-)-U-50,488-Konzentration kam es zu einer Verringerung der kontraktiven Antwort in Gegenwart von Isoprenalin (20 nmol/l) (Abb. 8). Zum Vergleich wurden die Effekte von Tyrode unmittelbar nach der Äquilibration und von Isoprenalin nach Isoprenalin-Superfusion (5 Minuten), d. h. die durchschnittliche Höhe der Kontraktionsamplitude unter Stimulation, bestimmt. Die Effekte des Opioidrezeptor-Agonisten in den verschiedenen Konzentrationen lagen bezüglich der Höhe zwischen denen der Tyrode- bzw. Isotyrode-vermittelten Kontraktionsamplituden. Bei einer Konzentration von 1 nmol/l war die Wirkung von (-)-U-50,488 signifikant unterschiedlich gegenüber dem Wert der Isoprenalin-Kontrolle. Die Kontraktionsamplitude betrug nur noch  $4,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$  im Vergleich zum Ausgangswert von  $6,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . In Gegenwart der höchsten untersuchten Konzentration von (-)-U-50,488 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) kam es zu einer Verringerung der Zelllängenänderung auf  $3,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (ca. 50% des Ausgangswertes). Bei höheren Konzentrationen wären unspezifische Effekte auf Calciumkanäle nicht sicher auszuschließen gewesen (Utz et al., 1995). Deshalb wurde später bei der Austestung weiterer Substanzen die Konzentration 10  $\mu\text{mol/l}$  verwendet.



**Abb. 8:** Konzentrationsabhängige Wirkung von (-)-U-50,488 (Iso + (-)-U50) auf die Zelllängenänderung (in µm) isolierter, elektrisch stimulierter (1 Hz) Rattenkardiomyozyten in Gegenwart von Isoprenalin (20 nmol/l). Als Kontrolle (Ctr.) wurden die Kontraktionsamplitude in Tyrode-Lösung (Tyrode) und Isoprenalin (Iso, 20 nmol/l) gemessen. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Isoprenalin-Kontrolle (Iso,  $p < 0,05$ ). Die Zahl der Präparationen betrug  $n=4$ .

### 3.3 Effekte des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME auf das Konzentrationsverhalten Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten

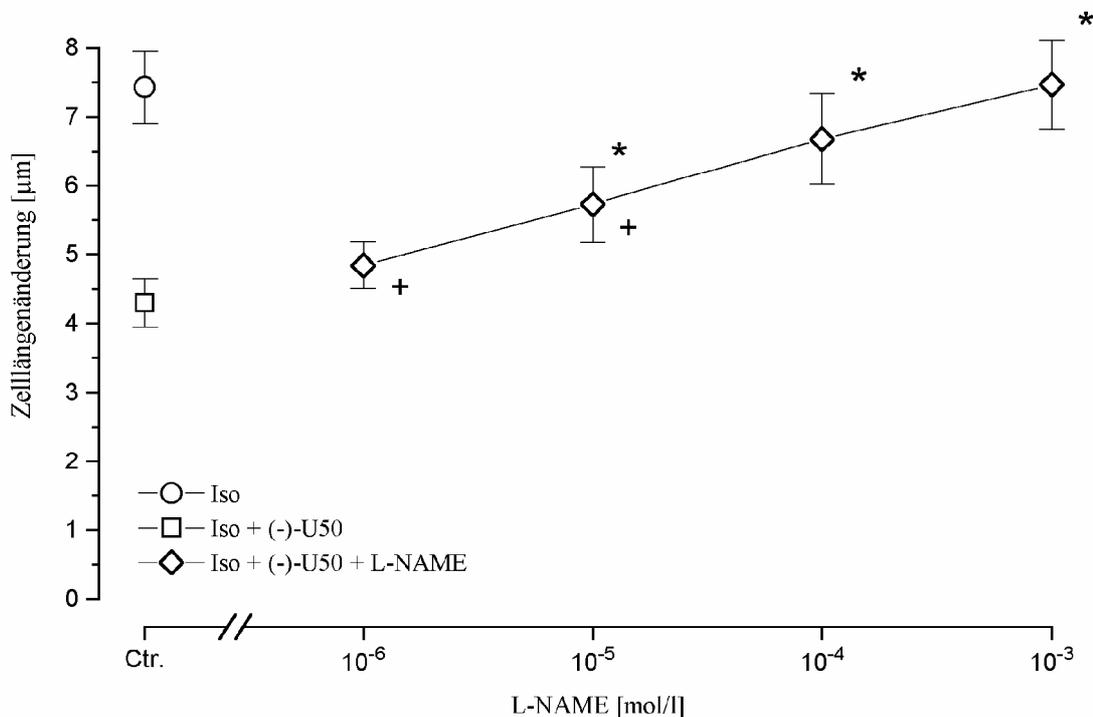
Die bisher erforschten Schritte der Signalvermittlung des  $\kappa$ -Opioidrezeptors erklären nicht vollständig die Verminderung der Kontraktilität der Kardiomyozyten unter dem Einfluss von (-)-U-50,488. Untersuchungen mit Stickstoffmonoxid (NO)-Donatoren zeigten ähnliche zeitabhängige Effekte auf die Zelllängenänderung der Myozyten (Sandirasegarane und Diamond, 1999) wie die Verwendung von  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten (Wenzlaff et al., 1999). Dies könnte darauf hinweisen, dass endogenes NO an dem Signaltransduktionsweg des  $\kappa$ -Opioidrezeptors beteiligt ist. Stickstoffmonoxid wird in der Zelle von NO-Synthasen gebildet. Es gibt drei verschiedene Typen dieses Enzyms:

die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Nur die induzierbare und die endotheliale NO-Synthase wurden in den Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen (Balligand, 2000). Die neuronale NOS findet sich vor allem im Nervengewebe. Deshalb konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf die Isoenzyme eNOS und iNOS. Aus diesem Grund wurde die Substanz L-NAME, die ein Inhibitor der NO-Synthasen ist (Rees et al., 1990), verwendet. L-NAME ist ein Methyl-Ester-Prodrug von L-NNA (N-Nitro-L-Arginin). Die  $IC_{50}$ -Werte dieses Wirkstoffes betragen  $3,1 \mu\text{mol/l}$  bezüglich der iNOS und  $0,35 \mu\text{mol/l}$  bezogen auf die eNOS (Alderton et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihen erfolgte eine Präinkubation der Zellen mit der Testsubstanz L-NAME in den Konzentrationen  $1 \mu\text{mol/l}$  bis  $1 \text{mmol/l}$ . Die Kontrollen mit Tyrode, Isoprenalin und (-)-U-50,488 wurden nur mit dem Lösungsmittel (Tyrode) vorbehandelt. Es war eine Vorbehandlung von 30 Minuten nötig, um stabile Effekte auf das Verhalten der Kardiomyozyten zu erreichen (Alderton et al., 2001). Darauf hin wurden die Zellen mit Isoprenalin ( $20 \text{nmol/l}$ ) und L-NAME in den entsprechenden Konzentrationen superfundiert. Nach 5 Minuten wurden (-)-U-50,488 bzw. die Kontrolllösungen zugegeben (Abb. 7, mit Zusatz L-NAME ( $10 \mu\text{mol/l}$ )-Vorbehandlung und -Superfusion in allen Phasen des Versuchs). Bei Verwendung der Substanzen (-)-U-50,488, L-NAME oder D-NAME mit Zusatz von Tyrode und Isoprenalin (Abb. 7, 11) fand eine Bestimmung der Messwerte bezüglich der konzentrationsabhängigen Veränderung der Kontraktionsamplitude jeweils zu den Zeitpunkten -5, 0 und 15 min statt.

### **3.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung auf mit (-)-U-50,488 behandelte Myozyten**

Der NOS-Inhibitor L-NAME verminderte konzentrationsabhängig von  $1 \mu\text{mol/l}$  bis  $1 \text{mmol/l}$  in Konzentrationsschritten von einer Zehnerpotenz die hemmende Wirkung von (-)-U-50,488 ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) (Abb. 9). Die Zelllängenänderung der mit (-)-U-50,488 behandelten Zellen betrug  $4,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ . L-NAME hatte in der Konzentration von  $1 \text{mmol/l}$  einen maximalen Hemmeffekt auf den (-)-U-50,488-Einfluss. So erreichte die Kontraktionsamplitude mit  $7,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$  ohne signifikanten Unterschied die Ausgangszelllängenänderung unter Isoprenalineinfluss ( $20 \text{nmol/l}$ ,  $7,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ). Der

Effekt von (-)-U-50,488 wurde ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  L-NAME signifikant antagonisiert (Abb. 9).



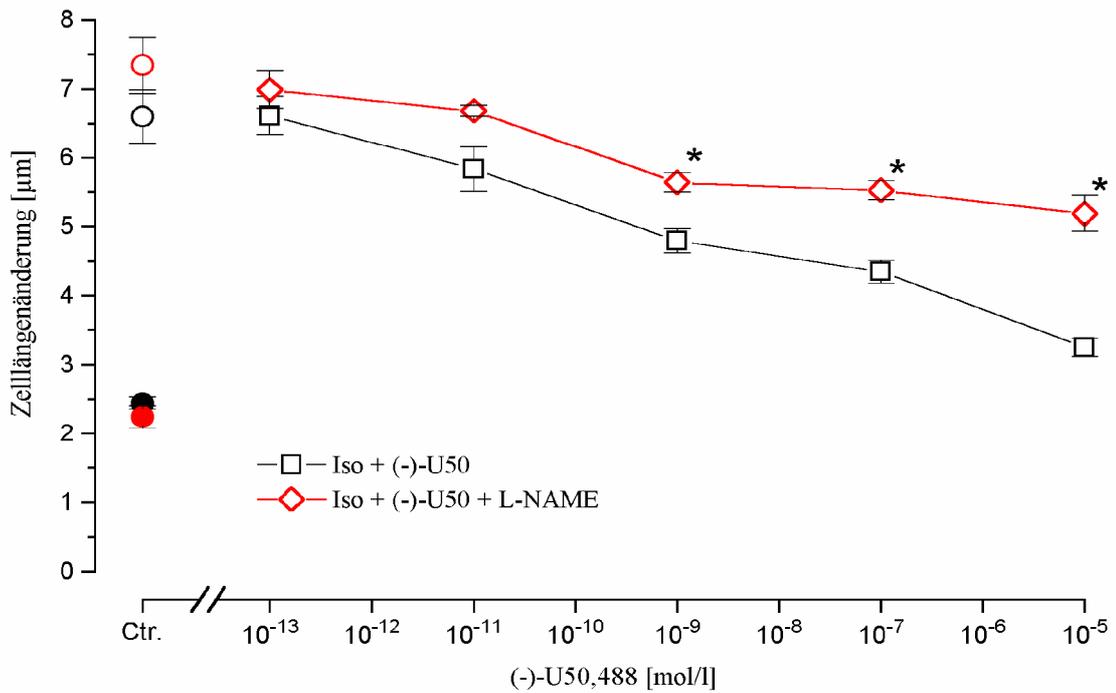
**Abb. 9:** Konzentrationsabhängige Wirkung von L-NAME auf die Zelllängenänderung (in  $\mu\text{m}$ ) isolierter, elektrisch stimulierter (1 Hz) Rattenkardiomyozyten in Gegenwart von (-)-U-50,488 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und Isoprenalin (20 nmol/l) (Iso + (-)-U50 + L-NAME). Als Kontrollen (Ctr.) dienen Isoprenalin (Iso, 20 nmol/l) ohne und mit Zusatz von (-)-U-50,488 ((-)-U50, 10  $\mu\text{mol/l}$  + Iso, 20 nmol/l). Die Anzahl der Rattenherzen betrug  $n=4$ . \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle (-)-U50 ((-)-U-50,488, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) ( $p < 0,05$ ). +: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle Isoprenalin (Iso, 20 nmol/l) ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Konzentrationsabhängige Wirkung von (-)-U-50,488 auf mit L-NAME behandelte Myozyten

Um Mechanismen der (-)-U-50,488-Wirkung beurteilen zu können, wurden die Effekte von L-NAME auf die Konzentrations-Wirkungsbeziehung des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten untersucht. Dazu wurden mit L-NAME (10  $\mu\text{mol/l}$ , 30 min) vorbehandelte Herzzellen mit (-)-U-50,488 in den Konzentrationen von 0,0001 nmol/l bis 10  $\mu\text{mol/l}$  in Konzentrationsschritten von zwei Zehnerpotenzen superfundiert (Abb. 7, mit L-NAME (10  $\mu\text{mol/l}$ )-Vorbehandlung und -Superfusion in allen Phasen des Versuchs). Als Kontrollen wurden Tyrode und Isotyrode verwandt. L-NAME fand in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  Verwendung, da es so einen fast halbmaximalen Hemmeffekt auf die (-)-U-50,488-Wirkung hatte (Abb. 9). Diese Kontraktionsamplitude unterschied sich signifikant von der unter Einfluss von Isoprenalin und (-)-U-50,488 entstandenen Amplitude (Abb. 10). Von diesem Wert ausgehend war eine Zu- und Abnahme der Zelllängenänderung möglich.

Zum Vergleich wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von (-)-U-50,488 ohne L-NAME-Vorbehandlung ebenfalls in den Konzentrationen von 0,0001 nmol/l bis 10  $\mu\text{mol/l}$  in Konzentrationsschritten von zwei Zehnerpotenzen untersucht (Abb. 10). Die Werte der Kontraktionsamplituden unter Isotyrode- bzw. Tyrode-Superfusion dienten als Kontrollen. Es stellte sich heraus, dass je größer die (-)-U-50,488-Konzentration war, desto stärker war auch die Wirkung von L-NAME. Die Unterschiede zwischen den Messpunkten der beiden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden ab einer (-)-U-50,488-Konzentration von 1 nmol/l (mit L-NAME  $5,64 \pm 0,14 \mu\text{m}$ , ohne  $4,79 \pm 0,18 \mu\text{m}$ ) signifikant. Diese Differenz der Kontraktionsamplituden nimmt jedoch mit steigenden (-)-U-50,488-Konzentrationen unverhältnismäßig zu. Die Zelllängenänderungen bei einer (-)-U-50,488-Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  betragen mit L-NAME  $5,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  und ohne L-NAME  $4,3 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ; bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  mit L-NAME  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$  und ohne L-NAME  $3,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Es bildet sich unter Einfluss von L-NAME ein Plateau. Vergleicht man die Kurven (Abb. 10), so zeigen sie eine Rechtsverschiebung zueinander, die nicht parallel ist. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der nicht rein

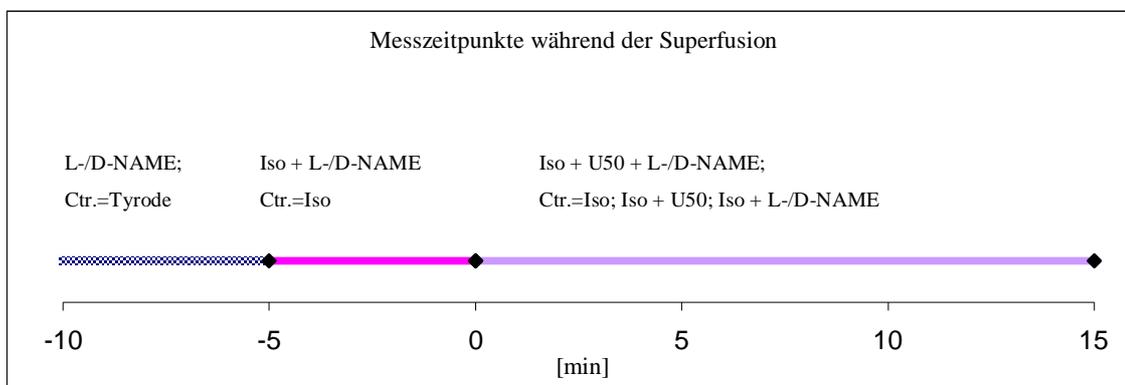
kompetitiv ist. Möglicherweise spielen mehrere unterschiedliche Mechanismen eine Rolle.



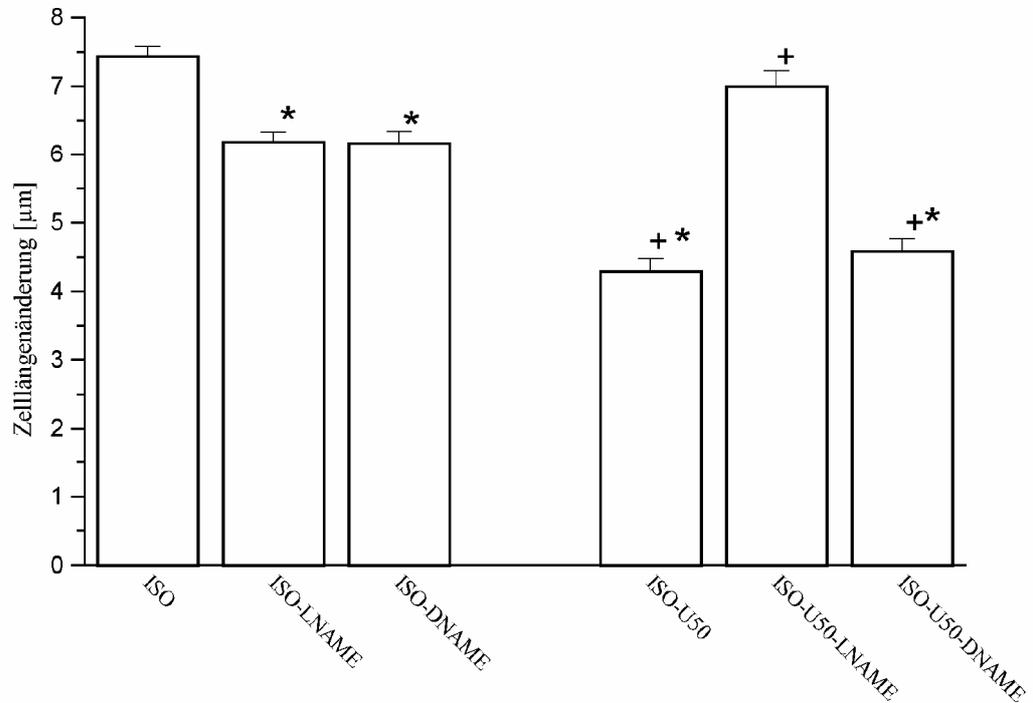
**Abb. 10:** Effekt von (-)-U-50,488 ((-)-U-50) auf die Zelllängenänderung (in  $\mu\text{m}$ ) isolierter, elektrisch stimulierter (1 Hz) Kardiomyozyten in Gegenwart von Isoprenalin (20 nmol/l) (Iso + (-)-U50) und Isoprenalin (20 nmol/l), vorbehandelt mit L-NAME (10  $\mu\text{mol/l}$ , 30 min) (Iso + (-)-U50 + L-NAME). Als Kontrollen (Ctr.) dienten die Tyrode-(●) -und Isoprenalin-Tyrode-Lösung (○, Iso, 20 nmol/l) ohne und mit Zusatz von L-NAME (10  $\mu\text{mol/l}$ ) (●, Tyrode + L-NAME; ○, Iso + L-NAME). Die Zahl der Rattenherzen für die Messreihen mit L-NAME betrug  $n=4$ , ohne L-NAME  $n=5$ . \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber der entsprechenden Konzentration ohne L-NAME-Vorbehandlung ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Vergleich der Effekte von L-NAME- und D-NAME auf die Kontraktion Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten

L-NAME hob die Kontraktionseffekte von (-)-U-50,488 vollständig auf (Abb. 9). Um die Hemmung der NO-Synthase zu beurteilen, wurde zusätzlich das funktionell inaktive, optische Enantiomer D-NAME untersucht. Unspezifische Reaktionen der Verbindung und seiner Zusammensetzung sollten dadurch ausgeschlossen werden. Handelt es sich um die spezifische Wirkung von L-NAME, d. h. um die Hemmung der NOS, ist keine Änderung der Zellkontraktionsamplitude durch D-NAME zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit L-NAME (1 mmol/l) präinkubiert (30 min) und danach mit Isoprenalin (20 nmol/l), (-)-U-50,488 (10 µmol/l) und L-NAME superfundiert (Abb. 11). Zum Vergleich wurde statt L-NAME D-NAME (1 mmol/l) verwendet. Die Kontrolluntersuchungen wurden ohne L- und D-NAME bzw. (-)-U-50,488 durchgeführt (Abb. 12).

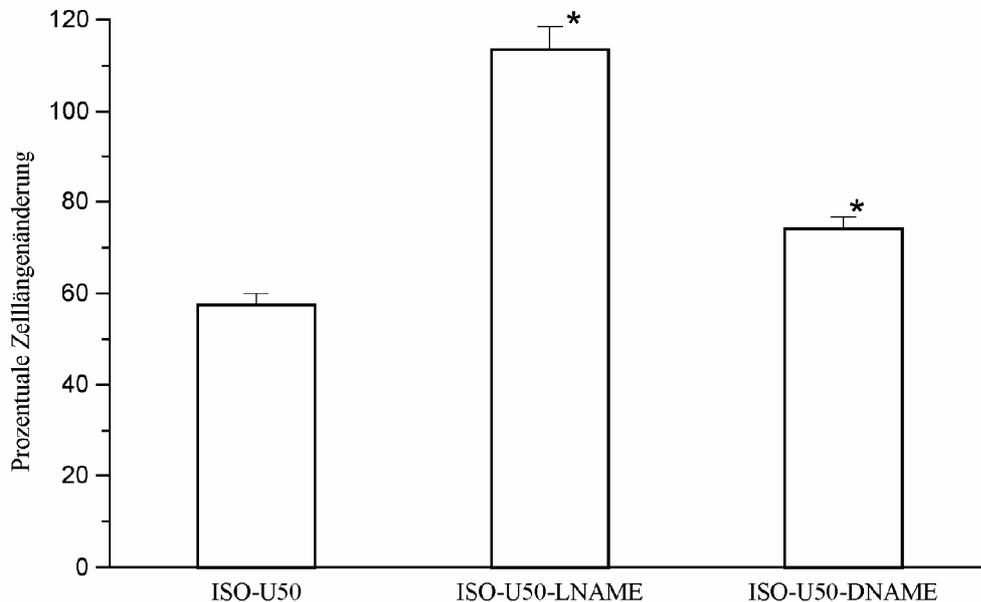


**Abb. 11:** Messzeitpunkte der Wirkungs-Beziehung zwischen L-NAME bzw. D-NAME mit (-)-U-50,488. Superfusion Isoprenalin-stimulierter (Iso, 20 nmol/l) Kardiomyozyten mit (-)-U-50,488 (U50, 10 µmol/l) in Gegenwart von L-NAME bzw. D-NAME (1 mmol/l, Vorbehandlung 30 min). Zur Kontrolle (Ctr.) fanden Messungen ohne L-NAME und D-NAME bzw. ohne (-)-U-50,488 statt.



**Abb. 12:** Einfluss von L-NAME- und D-NAME-Vorbehandlung (1 mmol/l, 30 min) auf die Zelllängenänderung (in  $\mu\text{m}$ ) der Kardiomyozyten, superfundiert mit Isoprenalin (Iso, 20 nmol/l) und Isoprenalin mit (-)-U-50,488 (Iso/(-)-U50, 20 nmol/l/10  $\mu\text{mol/l}$ ). Die Zahl der Rattenherzen betrug  $n=5$ . \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Isoprenalin Kontrolle (Iso, 20 nmol/l) ( $p < 0,05$ ). +: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne (-)-U-50,488-Zusatz (U50) ( $p < 0,05$ ).

Während durch D-NAME keine signifikanten Änderungen der (-)-U-50,488-Wirkung in Gegenwart von Isoprenalin hervorgerufen wurden, antagonisierte L-NAME den Effekt von (-)-U-50,488 (Abb. 12, rechts). So nahm die Kontraktionsamplitude von  $4,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$  auf  $7,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$  signifikant zu. Sowohl L-NAME als auch D-NAME riefen jedoch eine Abnahme der Kontraktion in Gegenwart von Isoprenalin hervor (Abb. 12, links).



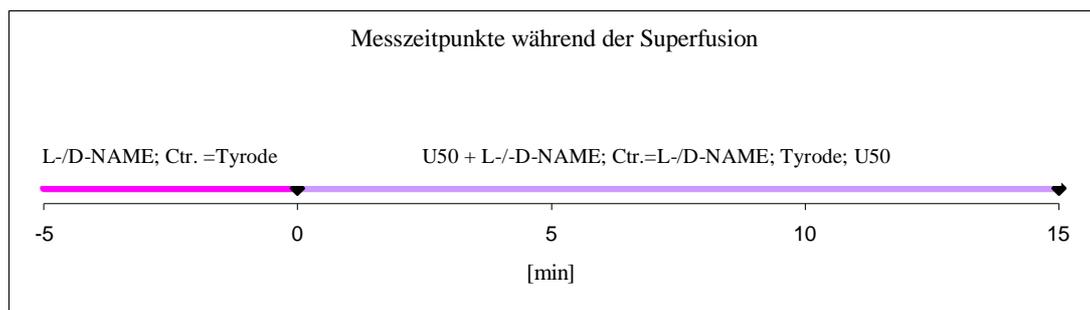
**Abb. 13:** Prozentual zur Kontrolle (Isoprenalin, 20 nmol/l, Isoprenalin und L-NAME, Isoprenalin und D-NAME) angegebene Zelllängenänderung von isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz) Rattenkardiomyozyten unter Einfluss von Isoprenalin (20 nmol/l) in Gegenwart von (-)-U-50,488 (10  $\mu$ mol/l) (ISO-U50), Isoprenalin, (-)-U-50,488 und L-NAME (1 mmol/l) (ISO-U50-LNAME), Isoprenalin, (-)-U-50,488 und D-NAME (1 mmol/l) (ISO-U50-DNAME). Die Zahl der verwendeten Rattenherzen betrug n=5. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle Iso-U50 ( $p < 0,05$ ).

Prozentual bezogen auf die jeweiligen Kontrollen (Abb. 13) treten die Veränderungen noch deutlicher hervor. Die Vorbehandlung mit L-NAME (1 mmol/l, 30 min) führte in Gegenwart von (-)-U-50,488 (10  $\mu$ mol/l) und Isoprenalin zu einer Zunahme der Kontraktion (Abb. 13). Sie betrug ca. 115% der Ausgangszelllängenänderung unter Isoprenalin (20 nmol/l)- und L-NAME-Einfluss. Der (-)-U-50,488-Effekt wurde vollständig antagonisiert. Auch D-NAME rief in Gegenwart von (-)-U-50,488 und Isoprenalin eine signifikante Vergrößerung (116%) der Kontraktionsamplitude gegenüber der ohne D-NAME-Einfluss hervor. Da im Bezug auf die Kontrollen D-NAME als inaktive Verbindung den gleichen steigernden Effekt wie L-NAME hervorruft, ist dieser nicht NO-Synthase vermittelt. Es liegen hier unspezifische bzw. NOS-unabhängige Effekte der Verbindung vor, die durch den Ausschluss von

Isoprenalin aufgehoben werden könnten. Dessen ungeachtet konnte die spezifische Hemmung der NOS durch L-NAME nachgewiesen werden, denn während L-NAME den (-)-U50,488- Effekt vollständig aufhob, zeigte D-NAME keine Wirkung.

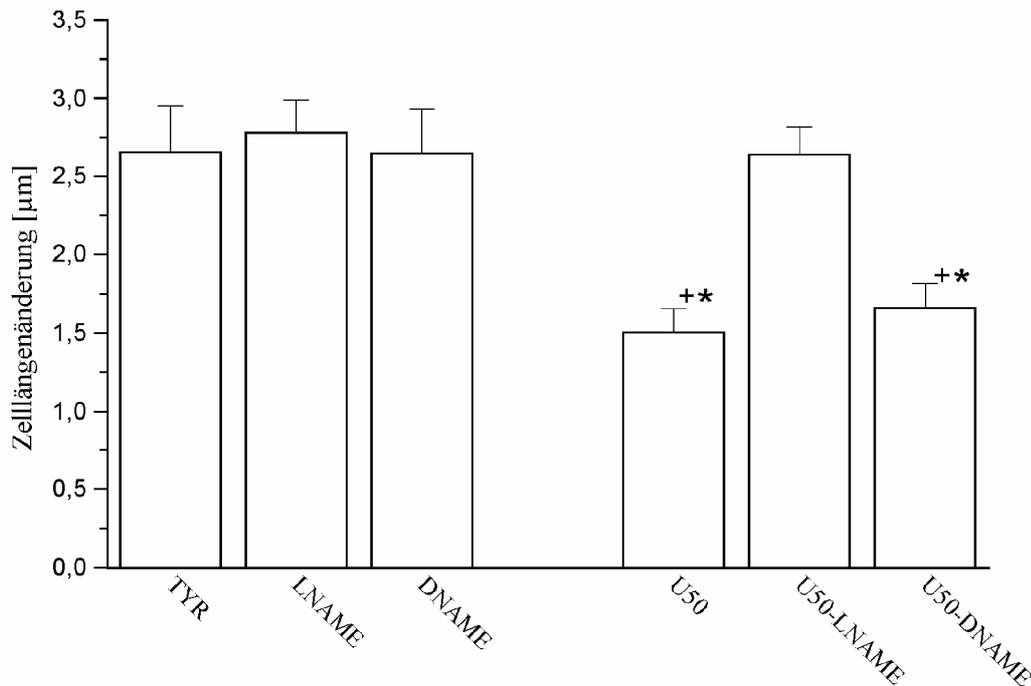
### 3.4 Effekte von L-NAME und D-NAME auf das Kontraktionsverhalten nicht Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten

Da die Ergebnisse darauf hindeuten, dass der unspezifische Effekt von L-NAME und D-NAME mit der Isoprenalin-Stimulation assoziiert ist, wurde der gleiche Versuch ohne Stimulation mit Isoprenalin durchgeführt (Abb. 14). Es wurden Messungen nach 0 und 15 min vorgenommen.



**Abb. 14:** Messzeitpunkte der Wirkungs-Beziehung von L-NAME bzw. D-NAME auf mit (-)-U-50,488 vorbehandelte Kardiomyozyten. Superfusion mit L-NAME bzw. D-NAME (1 mmol/l) vorbehandelter (30 min) Zellen mit (-)-U-50,488 (U50, 10  $\mu$ mol/l) ohne Isoprenalin-Stimulation. Zur Kontrolle (Ctr.) fanden Messungen ohne (-)-U-50,488 sowie ohne (-)-U-50,488 und L-NAME- bzw. D-NAME-Vorbehandlung statt.

Ohne Isoprenalinzusatz zeigten sich nach der Vorbehandlung der Zellen mit D- oder L-NAME (1 mmol/l, 30 min) keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontraktionsamplituden-Messwerten der Zellen, die lediglich mit Tyrode superfundiert worden waren (Abb. 15). Die Verminderung der Kontraktilität, die in den Vorversuchen mit Isoprenalinzusatz zu sehen war, trat nicht auf.

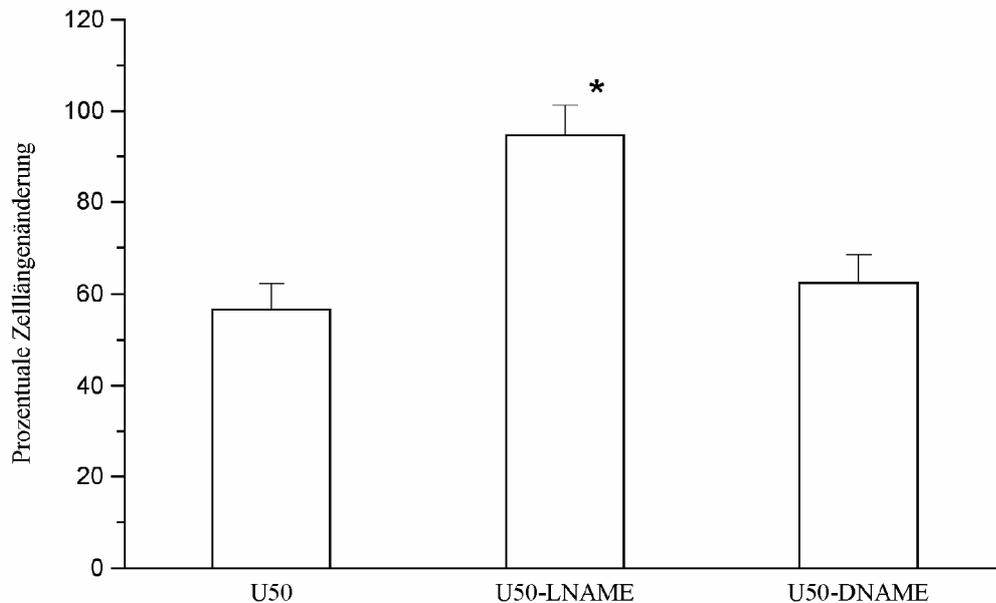


**Abb. 15:** Einfluss von L-NAME- und D-NAME-Vorbehandlung (1 mmol/l, 30 min) auf die Zelllängenänderung (in µm) der Kardiomyozyten, superfundiert mit Tyrode (TYR) und (-)-U-50,488 (U50, 10 µmol/l). Die Anzahl der verwendeten Rattenherzen betrug n=5. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle ohne L-NAME oder D-NAME ( $p < 0,05$ ). +: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle ohne (-)-U-50,488-Zusatz ( $p < 0,05$ ).

(-)-U-50,488 allein und (-)-U-50,488 in Verbindung mit D-NAME reduzierten die basale Kontraktionsamplitude unter Einfluss der Kontrolllösungen Tyrode und D-NAME (1 mmol/l) signifikant auf  $56,6 \pm 2,5\%$  und  $62,5 \pm 2,7\%$  der jeweiligen Kontrollen Tyrode und D-NAME (Abb. 16). Dahingegen antagonisierte L-NAME die Wirkung von (-)-U-50,488 vollständig. Es trat keine Erhöhung der Kontraktionsamplitude durch unspezifische Effekte von L- und D-NAME wie unter Isoprenalin-Stimulation auf. Nur durch Superfusion mit L-NAME wurde der Effekt von (-)-U-50,488 signifikant vermindert. D-NAME zeigte keine Wirkung.

L-NAME antagonisierte die Wirkung von (-)-U-50,488 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Isoprenalin (20 nmol/l). Bei letztgenannter Versuchsreihe kam es nicht zu einer Erhöhung der Kontraktionsamplitude durch (-)-U-50,488 und

L-NAME (1 mmol/l) über den Kontrollwert hinaus (Abb. 16). Daraus ließ sich schließen, dass die Aufhebung des Effektes von (-)-U-50,488 auf die Kontraktion durch L-NAME nicht einem Artefakt zuzuordnen war.



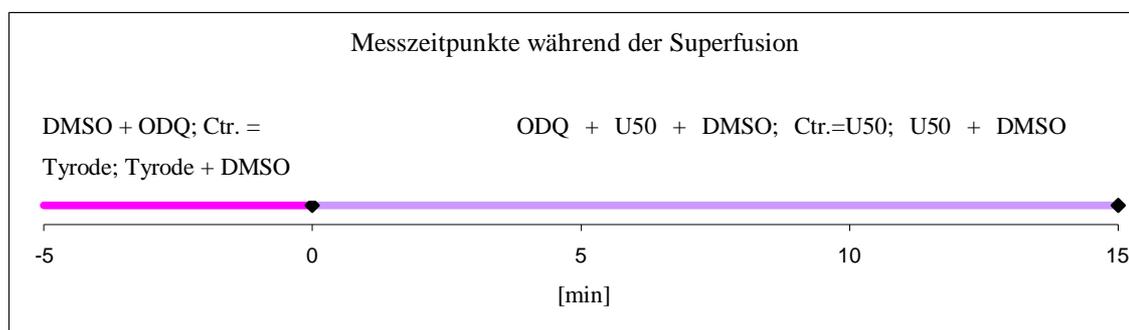
**Abb. 16:** Prozentual zur Kontrolle (Tyrode, L-NAME, D-NAME) angegebene Zelllängenänderung von isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz) Rattenkardiomyozyten unter (-)-U-50,488-Einfluss (10  $\mu$ mol/l) (U50) und L-NAME (1 mmol/l) (U50-LNAME) oder D-NAME (1 mmol/l) (U50-DNAME). Die Zahl der verwendeten Rattenherzen betrug n=5. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle U50 ((-)-U-50,488) ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Effekte des Guanylylcyclase Inhibitors ODQ auf das Kontraktionsverhalten nicht Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten

Da bekannt war, dass die lösliche Guanylylcyclase sehr häufig das klassische Modul für die Signalvermittlung durch NO ist (Waldmann und Murad, 1987; Kelly et al., 1996; Kojda et al., 1996), wurden die Effekte von ODQ (1 H-[1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-on), einem selektiven Inhibitor der NO-sensitiven Guanylylcyclase,

untersucht.

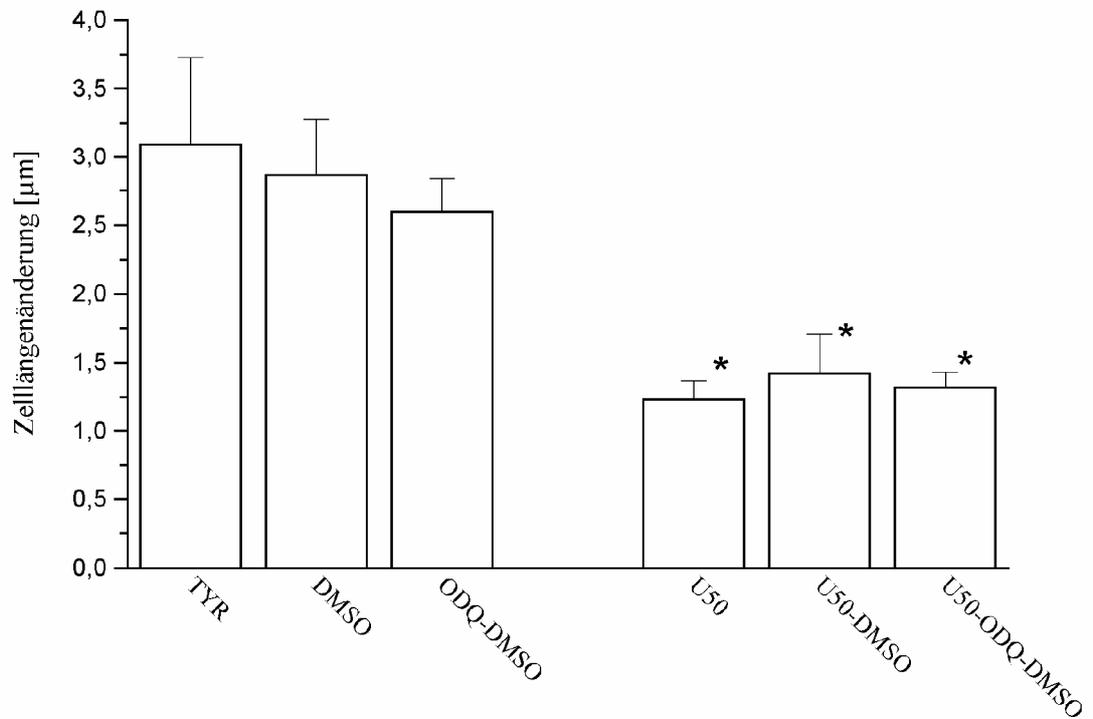
ODQ benötigt eine längere Inkubationszeit für pharmakologische Wirkungen (Garthwaite et al., 1995). Deshalb wurden die Zellen 30 Minuten lang mit ODQ in DMSO (0,1%) vorbehandelt. Es wurden Messungen nach 0 und 15 Minuten vorgenommen (Abb. 17). ODQ fand Verwendung in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ , da in dieser Höhe maximale Hemmeffekte auf die Guanylylcyclase erzielt werden konnten, ohne die NO-Synthase zu beeinflussen (Garthwaite et al., 1995).



**Abb. 17:** Messzeitpunkte der Wirkungs-Beziehung von ODQ auf mit (-)-U-50,488-vorbehandelte Kardiomyozyten. Superfusion mit ODQ (10  $\mu\text{mol/l}$ , in DMSO, 0,1%, gelöst) vorbehandelter Zellen (30 min) mit (-)-U-50,488 (U50, 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Zur Kontrolle fanden alle Messungen ohne (-)-U50,488 bzw. ohne ODQ und DMSO statt.

Für die Kontrollversuchsreihen wurden nur Tyrode bzw. Tyrode mit DMSO (0,1%) verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen je nach Versuchsreihe mit (-)-U-50,488 (10  $\mu\text{mol/l}$ ), (-)-U-50,488 mit DMSO (0,1%) oder (-)-U-50,488 mit ODQ (10  $\mu\text{mol/l}$ ), in DMSO (0,1%) gelöst, überspült. Zur Kontrolle wurden Zellen für jede Bedingung ohne den Zusatz von (-)-U-50,488 untersucht.

Sowohl mit als auch ohne Zugabe des Guanylylcyclasen-Inhibitors ODQ wurde der gleiche Effekt auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten erreicht (Abb. 18). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ähnlich wie bei den Vorversuchen reduzierte (-)-U-50,488 ohne Zusatz von DMSO die Kontraktionsamplitude von  $3,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$  auf  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . ODQ, gelöst in DMSO, beeinflusste diese Wirkung nicht (Amplitude  $2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ; mit (-)-U-50,488  $1,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ). Die durch ODQ inhibierbare Guanylylcyclase ist somit nicht in die Übermittlung der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Signale bezüglich der Kontraktion involviert.



**Abb. 18:** Einfluss von ODQ (10 µmol/l) in Verbindung mit DMSO (0,1%) und DMSO (Vorbehandlung 30 min) auf die Wirkung von Tyrode (TYR) und (-)-U-50,488 (U50, 10 µmol/l) bezüglich der Zelllängenänderung (in µm) der Kardiomyozyten unter elektrischer Stimulation (1 Hz). Die Anzahl der Herzen betrug n=3. \*: signifikant unterschiedliche Messwerte gegenüber Kontrolle ohne (-)-U-50,488-Zusatz (p < 0,05).

## 4 DISKUSSION

Viele Forschungsarbeiten behandeln die Effekte von  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation mit U-50,488 in Kardiomyozyten (Ventura et al., 1992; Sheng et al., 1997; Wenzlaff et al., 1998a, b, 1999; Bian et al., 2000). Mittelpunkt der Überlegungen der vorliegenden Arbeit ist die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) für den Übertragungsweg des  $\kappa$ -Opioidrezeptors. Spielt NO eine Rolle in dem Signalablauf, der den  $\kappa$ -Opioidrezeptoren nachgeschaltet ist? Und wenn ja, wie ist es in diesen eingebettet? In den nun folgenden Ausführungen werden Forschungsschritte und Überlegungen in aufeinander aufbauender Weise dargestellt.

### 4.1 Agonismus am kardialen $\beta$ -Adrenorezeptor

Die  $\beta$ -Adrenorezeptor-gekoppelte Modulation der myokardialen Leistung nimmt einen großen Anteil bezüglich der kardiovaskulären Reserve ein. Sie bleibt eines der stärksten Mittel zur physiologischen Regulation und Aufrechterhaltung der Herzfrequenz sowie der Kontraktilität (Brodde et al., 1992). Unter Isoprenalineinfluss war die Zelle in der Lage, über fünf Konzentrationsstufensteigerungen von 0,1 nmol/l bis 10  $\mu$ mol/l die Kontraktionsamplitude um ca. 350% gegenüber dem Kontrollwert zu steigern (Abb. 4). Dieses Ergebnis entsprach dem anderer Arbeiten, die die  $\beta$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten verwendeten (Xiao et al., 1997; Wenzlaff et al., 1998b). So konnten die Korrektheit des Systems dieser Versuche überprüft und die Ergebnisse der Messungen validiert werden.

Durch endogene Liganden von Sarkolemm-Rezeptoren kann der Mechanismus der adrenergen Signaltransduktion moduliert werden. Auch in Bezug auf die  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptor-Stimulation kann eine Interaktion dieser beiden Signaltransduktions-Systeme eine Rolle spielen (Pepe et al., 1997; Xiao et al., 1997; Yu et al., 1998). Untersuchungen haben aber gezeigt, dass bei der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation die Effekte sowohl ohne als auch mit Isoprenalin gleich sind (Wenzlaff et al., 1998b). Wenzlaff et al. (1998b) wiesen nach, dass - bezogen auf den Absolutwert der Zelllängenänderung - Unterschiede zwischen Isoprenalin-stimulierten Kardiomyozyten und nicht adrenerg stimulierten hinsichtlich der Wirkung von U-50,488 bestehen.

Normalisiert auf die Ausgangslage hat U-50,488 in An- und Abwesenheit von Isoprenalin prozentual den gleichen Effekt. Deshalb lag die Schlussfolgerung nahe, dass die Signaltransduktionswege des  $\beta$ -Adreno- und des  $\kappa$ -Opioidrezeptors nicht unmittelbar miteinander in Verbindung standen. So wurden die Zellen mit Isoprenalin (20 nmol/l, entsprechend der  $EC_{50}$ -Konzentration) stimuliert. Auf diese Weise konnten größere Kontraktionsamplituden erreicht werden, was die Bestimmung der (-)-U-50,488-Wirkung auf die Zelllängenänderung messtechnisch erleichterte.

## **4.2 Agonismus am kardialen $\kappa$ -Opioidrezeptor**

Es gibt im Herzmuskelgewebe der Ratte zwei Opioidrezeptoren:  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren (Krumins et al., 1985; Ventura et al., 1989). Unter diesen nehmen die  $\kappa$ -Opioidrezeptoren den größten Anteil ein (Tai et al., 1991; Jin et al., 1995; Zimlichmann et al., 1996). Während  $\mu$ -Rezeptoragonisten ohne Wirkung sind (Ventura et al., 1989), führt die Stimulation der  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren zu einer Verminderung der kontraktilen Antwort (Ventura et al., 1992; Xiao et al., 1997; Wenzlaff et al., 1998a) und zu einer Änderung des  $[Ca]_i$ -Ausgleichvorgangs (Ventura et al., 1992; Sheng et al., 1997). Weitere Studien unterstreichen die Bedeutung des  $\kappa$ -Opioidrezeptors am Herzen. Es wurde z. B. herausgefunden, dass der selektive (Vonvoigtlander et al., 1983)  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist U-50,488 (1-10  $\mu$ mol/l) in höherem Maße Rhythmusstörungen hervorruft als Agonisten der beiden anderen Opioidrezeptor-Typen. Dagegen blockiert der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Antagonist MR2266 wirkungsvoll Arrhythmien infolge Ischämie und Reperfusion (Wong et al., 1990). Gleichermäßen ist an isolierten Rattenherzen beobachtet worden, dass der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Antagonist nor-BNI (Nor-Binaltorphimin) die positive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung auf Infarktgröße und Arrhythmie infolge Ischämie abschwächt (Wang et al., 2001). Der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist U-50,488 (10 nmol/l-1  $\mu$ mol/l) ruft entsprechende Effekte der ischämischen Präkonditionierung hervor und beeinflusst dosisabhängig die Infarktgröße und den Rhythmus, während die Stimulation der  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren nicht auf die Arrhythmie einwirkt (Wang et al., 2001). Diese Befunde sprechen dafür, dass bei exogener Stimulation bzw. Inhibition von den Opioidrezeptoren besonders  $\kappa$ -Opioidrezeptoren in die Regulation der kardialen Funktionen involviert sind.

#### 4.2.1 Die (-)-U-50,488-Wirkung in Abhängigkeit von der Zeit

Nach fünf Minuten  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation mit (-)-U-50,488 verringerte sich die Kontraktionsamplitude signifikant (Abb. 6). Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem aus einer ähnlichen Untersuchung (Ventura et al., 1992), so stellt sich heraus, dass unterschiedliche Zeitverläufe unter U-50,488-Einfluss (10  $\mu\text{mol/l}$ ) beobachtet wurden: Während die vorliegende Untersuchung (Abb. 6) eine stetige Abnahme der Zelllängenänderung, die nach 15 Minuten keine weitere Abweichung mehr erfuhr, vermittelt, zeigt sich die Kurve von Ventura biphasisch. In ihrem Verlauf kam es zuerst für ca. eine Minute zu einer schnellen Zunahme der Kontraktionsamplitude, bevor eine langsame Verringerung einsetzte. Zusätzlich wurden parallel dazu die Calciumströme gemessen, wobei sich zeigte, dass die Kontraktionsabnahme mit einem geringer werdenden intrazellulären Calcium-Transport korreliert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Kardiomyozyten in der Ventura-Studie (1992) auch ohne Stimulation durch Isoprenalin eine Ausgangsamplitude von 10  $\mu\text{m}$  aufweisen. Zur Klärung der Differenzen können die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen herangezogen werden: Ventura verwandte eine Superfusionslösung mit geringerem Calciumgehalt (1,5  $\text{mmol/l}$ ), niedrigerer Temperatur (23°C) und Pulsdauer (1 Hz, 2-4 msec) bei gleicher Frequenz 1 Hz. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Studienergebnisse von Ventura et al. (1992) wie auch Untersuchungen mit ( $\pm$ )-U-50,488 von Wenzlaff et al. (1998a) mit dieser Arbeit dahingehend übereinstimmen, dass U-50,488 über eine Stimulation der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren zu einer Verminderung der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten führt. In anderen Arbeiten z. B. von Yu et al. (1998) wird ebenfalls bei  $\beta$ -adrenerg-stimulierten Kardiomyozyten eine Verringerung des Calciumstroms und der Kontraktilität infolge Superfusion mit (-)-U-50,488 beschrieben. Eine vorübergehende Steigerung des Calciumflusses und der Kontraktilität fand nicht statt. Allerdings rief U-50,488 ohne Stimulation der  $\beta$ -Adrenorezeptoren bei dieser Untersuchung keinen Effekt hervor.

#### **4.2.2 Kontraktionsverhalten isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der (-)-U50,488-Konzentration**

Der selektive  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist (-)-U-50,488 verminderte konzentrationsabhängig die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten. Ab einer Konzentration von mehr als 1 nmol/l stellte sich nach einer 15-minütigen Superfusion eine signifikante Verringerung der Kontraktionsamplitude ein (Abb. 8). Dies bestätigen frühere Untersuchungen des Labors, bei denen das Racemat ( $\pm$ )-U-50,488 verwendet wurde (Wenzlaff et al., 1998b). Bei Ventura et al. (1992) kam es nach 15 Minuten Superfusion ab einer U-50,488-Konzentration von 0,1  $\mu$ mol/l zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsamplitude, bei 10  $\mu$ mol/l stellte sich ebenfalls ein maximaler Effekt ein. Die Kontraktionsamplitude verringerte sich von ca. 12  $\mu$ m auf 2  $\mu$ m. In der vorliegenden Arbeit dagegen reduzierte (-)-U-50,488 unter Isoprenalin-Stimulation bei einer niedrigeren Ausgangszelllängenänderung die Kontraktionsamplitude um ca. 50%. Diese Abweichungen könnten auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden.

### 4.2.3 Vergleich zwischen Enantiomer und Racemat der Substanz U-50,488

Da das Enantiomer (-)-U-50,488 potenter (Rothman et al., 1989) ist als das Racemat ( $\pm$ )-U-50,488, welches bei früheren Untersuchungen des hiesigen Labors (Wenzlaff et al., 1998b) Anwendung fand, wurde die Substanz (-)-U-50,488 (Abb. 8) verwendet. Die Potenzen unterscheiden sich um den Faktor 2 ((-)-U-50,488:  $K_d$ -Wert=0,89 nmol/l; ( $\pm$ )-U-50,488:  $K_d$ -Wert=1,8 nmol/l; Rothmann et al., 1989). Vergleicht man die ( $\pm$ )-U-50,488-Konzentrationswirkungskurve von Wenzlaff et al. (1998b) mit der Kurve (Abb. 8), die in dieser Arbeit von (-)-U-50,488 erhoben wurde, so fällt eine annähernde Deckungsgleichheit der Kurven auf. Dies entspricht der geringen Potenzdifferenz. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten bei den untersuchten Konzentrationen von 0,0001 nmol/l bis 10  $\mu$ mol/l. Dies spricht dafür, dass der untypisch langgezogene Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve nicht auf das Racemat der Substanz zurückzuführen ist, sondern dass die Ursache dafür wahrscheinlich im Bereich der auf den Rezeptor folgenden Signalkaskade liegt. Dies kann durch Untersuchungsergebnisse bestätigt werden, die beschreiben, dass der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Antagonist Norbinaltorphimin die Wirkung von U-50,488 vollständig aufzuheben vermag (Wenzlaff et al., 1998a, b). Die Spezifität von U-50,488 als  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist wird dadurch bestätigt. Ein vollständiger Agonismus an anderen Opioidrezeptoren, z. B. an  $\delta$ -Rezeptoren, kommt allein deshalb nicht in Betracht, weil bekannt ist, dass die  $\delta$ -Opioidrezeptoren durch die Zellpräparation leicht zerstört werden. (Ed Lakatta, persönliches Gespräch). In dem Signaltransduktionsweg sind verschiedene Systeme wie die Proteinkinase C und die Phospholipase C eingebettet, die den Calciumhaushalt der Zelle und NO-Synthasen beeinflussen, wie in dieser Arbeit gezeigt wird. Inwiefern sie die Wirkung des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten beeinflussen, müsste noch genauer untersucht werden. Nicht außer Acht zu lassen ist auch die Tatsache, dass (-)-U-50,488 an beide Subtypen des  $\kappa$ -Opioidrezeptors ( $\kappa_1$ - und  $\kappa_2$ -Opioidrezeptor) bindet (s. Einleitung).

#### 4.2.4 Die Signalkaskade

Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist bisher bekannt, dass die Signaltransduktion des kardialen  $\kappa$ -Opioidrezeptors ein Pertussis-Toxin (PTX)-sensitives G-Protein benötigt (Sheng et al., 1997; Xiao et al., 1997; Bian et al., 1998a; Wenzlaff, et al., 1998a; Yu, et al., 1998; Zhang und Wong, 1998). Nach Stimulation des Rezeptors verringert sich der cAMP-Spiegel der Zelle (Bian et al., 1998b; Zhang und Wong, 1998; Zhang et al., 1999). Eine direkte Beziehung über ein G-Protein zur Adenylylcyclase und der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade besteht nicht (Niroomand et al., 1996; Wenzlaff et al., 1999).

Denkbar ist eine Ankopplung von PLC über das PTX-sensitive G-Protein (Sheng et al., 1997) an den  $\kappa$ -Opioidrezeptor. Studien belegen, dass Phospholipase C (PLC) in die Signalkaskade des  $\kappa$ -Opioidrezeptors involviert ist. Es führt über einen Anstieg von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) zu einer Regulation des intrazellulären Calciumspiegels durch Freisetzung von Calcium aus dem sarcoplasmatischen Reticulum und damit zu einer Veränderung der kontraktile Antwort der Herzzelle (Sheng et al.; 1997, Zhang und Wong, 1998; Wenzlaff et al., 1998b). Die PLC kann über Diacylglycerol die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. PKC ist an der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-vermittelten Wirkung beteiligt (Bian et al., 1998b; Wenzlaff et al., 1999). PKC vermittelt sowohl positive als auch negative Inotropie (Capogrossi et al., 1990). Den intrazellulären cAMP-Gehalt beeinflusst sie über eine Phosphodiesterase IV (Bian et al., 2000). Einige Studien vergleichen den Effekt von U-50,488 mit der Wirkung der ischämischen Präkonditionierung. Hierbei stellt sich heraus, dass PKC in die Kardioprotektion über  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation involviert ist (Miki et al., 1998; Wang et al., 2001) und zwar interessanterweise nur in die Infarktgrößenbegrenzung und nicht in die Arrhythmie-Prävention (Wang, et al., 2001). Zudem wird die Beteiligung von ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen diskutiert: Sie sollen in die kardioprotektive Wirkung von U-50,488 bezüglich Reduktion der Infarktgröße und des Arrhythmie-Risikos verwickelt sein (Wang et al., 2001). Der Aktivierungsweg ist bisher noch unklar.

Weiterhin gibt es dahingehend Untersuchungen, dass U-50,488 über eine PKC-Aktivierung des  $Na^+/H^+$ -Austausches den pH-Wert der Zelle ansteigen lässt und die Myofilament-Sensitivität für Calcium steigert. Beide Faktoren sollen zu einer Veränderung der Kontraktilität unter U-50,488-Einfluss führen (Ventura et al., 1991).

Ähnliche Beobachtungen werden von Gan et al. (2000) beschrieben: Sie fanden eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes im Rattenherzen, vermittelt durch eine vermehrte Expression eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transport-Gens. Das Gen wurde in Gegenwart von U-50,488 über einen PKC-abhängigen Weg vermehrt exprimiert. Bei einer U-50,488-Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  handelte es sich um pH-Schwankungen von  $< 0,2$  in einem Bereich um pH 7,0. Darüber hinaus aktiviert die Proteinkinase C in einigen beobachteten Fällen Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), zum Beispiel in Gegenwart von Lipopolysacchariden (LPS) (McKenna et al., 1995). Demgegenüber gibt es Hinweise dafür, dass NO die PKC-Aktivitäten reversibel hemmt (Gopalakrishna et al., 1993).

Im Bereich der Schmerzforschung gibt es schon seit längerem Studien, die dafür sprechen, dass Stickstoffmonoxid (NO) bei Opioid-vermittelten Effekten eine Rolle spielt. Machelska et al. (1997) beschreiben, dass durch Inhibition der NO-Synthase im Rückenmark der Ratte die über den  $\kappa$ -Opioidrezeptor vermittelte Schmerzhemmung verstärkt wird. Berücksichtigt man, dass NO je nach Konzentrationshöhe scheinbar eine unterschiedliche Wirkung hervorruft (Kojda et al., 1996; Hare, 2003), ist sowohl eine Verstärkung als auch eine Aufhebung der  $\kappa$ -Opioid-Effekte durch Hemmung der NOS möglich. Beim Herzen gibt es für eine Verbindung von Opioidrezeptoren und NO noch keine eindeutigen Beweise, aber einige Forschungsergebnisse deuten darauf hin: Dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten U-50,488 wird ein positiver Einfluss auf die Reduktion der Infarktgröße zugesprochen (Wang et al., 2001). Ähnlichkeiten zeigten Untersuchungen an Mäuseherzen, die nur die endotheliale NOS (eNOS) exprimierten. Im Gegensatz zu Herzen, denen das eNOS-Gen fehlte, wiesen diese ein weniger ausgeprägtes Infarktgebiet infolge Ischämie auf (Sumeray et al., 2000). Auch bei Rattenherzen wird eine Infarktverringerng durch NO nach Ischämie-Reperfusion beschrieben (Siegfried et al., 1992; Richard et al., 1995).

Als weiterer Hinweis für eine mögliche Verbindung zwischen Opioidrezeptor und NO könnte die Ähnlichkeit der Zeit-Wirkungs-Kurven in Bezug auf die Kontraktilität der Myozyten unter NO-Donatoren-Einfluss (Sandirasegarane und Diamond, 1999) und in Gegenwart von U-50,488 (Abb. 6) gelten. Beide Untersuchungen zeigen eine Abnahme der Kontraktionsamplitude. Nach 4 bzw. 5 Minuten stellt sich jeweils ein signifikanter Effekt ein. Die Kontraktionsamplitude wird in beiden Fällen nahezu auf Werte der Kontrolle vor der Isoprenalinstimulation reduziert. Wie anhand dieser Untersuchung

nachgewiesen wurde, scheinen Opioide eine NO-aktivierende Wirkung zu haben, denn durch Hemmung der NO-Synthase wird die Wirkung des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten aufgehoben.

### **4.3 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthase-Inhibitoren**

In den Kardiomyozyten sind zwei der NO-Synthasen nachgewiesen worden: die iNOS (Balligand et al., 1994) und die eNOS (Balligand et al., 1995). L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Methyl Ester) ist als eNOS-Inhibitor bekannt (Rees et al., 1990). In mikromolaren Konzentrationen inhibiert die Substanz sowohl die endotheliale als auch die induzierbare NOS:  $EC_{50}=0,35 \mu\text{mol/l}$  für eNOS und  $EC_{50}=3,1 \mu\text{mol/l}$  für iNOS (Alderton et al., 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass in unbehandelten gesunden Kardiomyozyten nur die endotheliale NO-Synthase exprimiert wird (Balligand, 2000), während nach Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit Zytokinen nach ca. sechs Stunden auch eine Expression der induzierbaren NO-Synthase messbar ist (Schulz et al., 1992; Kelly et al., 1996; Ji et al., 1999). Vor diesem Hintergrund und anhand der Tatsache, dass die Versuchsdauer teilweise bis zu 6 Stunden betrug, ist nicht sicher auszuschließen, dass nach der Vorbereitung der Zellen auch die iNOS gehemmt wurde.

#### **4.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung des NOS-Inhibitors L-NAME**

L-NAME hob die hemmende Wirkung des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten (-)-U-50,488 ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) auf Isoprenalin-stimulierte Zellen vollständig auf (Abb. 9, 10). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Wirkung von (-)-U-50,488 über NO vermittelt wird. Betrachtet man in diesem Sinne die Konzentrationswirkungskurven von (-)-U-50,488 mit und ohne L-NAME-Zusatz (Abb. 10), so wird deutlich, dass L-NAME eine antagonisierende Wirkung auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter (-)-U-50,488-Einfluss hat. Es vermag besonders den Effekt der hohen Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$ ) abzuschwächen. Die Kurve unter L-NAME-Einfluss war bezüglich der (-)-U-50,488-Kurve nach rechts jedoch nicht parallel verschoben. Dies spricht ähnlich wie der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve von (-)-U-50,488 (Abb. 8) dafür, dass es neben NO noch mehrere Elemente der Signalkaskade gibt, die ebenfalls Einfluss auf die Vermittlung der Effekte des  $\kappa$ -Opioidrezeptors haben, so dass es durch NOS-Inhibition

zu keiner gleichmäßigen bzw. vollständigen Aufhebung des (-)-U-50,488-Effektes kommt.

#### **4.3.2 Die spezifische Hemmung der NOS durch L-NAME**

Der Beweis für eine spezifische Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME lag darin begründet, dass D-NAME, das funktionell inaktive optische Enantiomer, keine Wirkung auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten hatte (Rees et al., 1990). Dies zeigten die Untersuchungsbefunde sowohl mit als auch ohne Isoprenalinstimulation (Abb. 12, 13, 15, 16).

L-NAME und D-NAME vermindern die Zelllängenamplitude von mit Isoprenalin stimulierten Zellen (Abb. 12). Im Gegensatz dazu kam dieser Effekt bei früheren Untersuchungen nicht zum Tragen (Abb. 9). Da beide Substanzen eine Abschwächung der Kontraktion hervorrufen, handelt es sich um eine unspezifische und nicht durch Hemmung der NOS hervorgerufene spezifische Wirkung. Auch Weyrich et al. (1994) beschreiben keinen Effekt von NO in physiologischen Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Ohne Isoprenalin treten derartige Wechselwirkungen nicht auf (Abb. 15).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen zusammenfassend dafür, dass NO in die Signalkaskade unterhalb des  $\kappa$ -Opioidrezeptors involviert ist, und die hemmende Wirkung von (-)-U-50,488 auf die Zellkontraktion funktionell agonisiert.

#### **4.3.3 Wirkmechanismen von NO**

Es werden vom cyclischen GMP abhängige und unabhängige Mechanismen bei der Regulation der kardialen Funktionen an unterschiedlichen Spezies durch Stickstoffmonoxid (NO) beschrieben (Balligand, 2000; Hare, 2003). Diese Mechanismen sind abhängig von der jeweiligen NO-Konzentration und rufen dadurch unterschiedliche Wirkungen hervor (Kojda et al., 1996; Hare, 2003). Zu den cGMP-unabhängigen Mechanismen gehören die Hemmung der Atmungskette (Komplex I, II, IV), die Inhibition der Kreatinkinase über S-Nitrosatierung des Enzyms sowie die Hemmung und Steigerung des Calciumflusses durch Ca-Kanäle vom L-Typ, die eine S-

Nitrosatierung oder eine Oxidation erfahren. Eine direkte Hemmung kardialer spannungsabhängiger Calciumkanäle wird von Untersuchungen gezeigt, die NO-Donatoren in einer Konzentration von mehr als 100  $\mu\text{mol/l}$  verwendeten (Hu et al., 1997). Durch Verwendung von NO-Donatoren (SNAP und DEA/NO) in ähnlichen Konzentrationen beschreiben Sandirasegarane und Diamond (1999) eine Verminderung der Kontraktilität von Rattenkardiomyozyten. Darüber hinaus ist es möglich, dass Ryanodin-Rezeptoren über Stickstoffmonoxid (NO) und verbundene Moleküle (Peroxynitrit und S-Nitrosothiol) (Paolucci et al., 2000) kontrolliert werden. Ryanodin-Rezeptoren sind Calcium-Kanäle, die den intrazellulären Calciumspiegel regulieren, indem sie Calcium aus intrazellulären Speicherorganellen freigeben. Dies ist möglicherweise ein Weg, durch Stimulation des  $\kappa$ -Opioidrezeptors über NO eine Verminderung der Kontraktilität der Kardiomyozyten durch Beeinflussung des Calciumspiegels zu erreichen. Um dies zu beweisen, müssten allerdings noch genauere Untersuchungen durchgeführt werden. Auch eine toxische Wirkung über die Bildung von NO-Radikalen mit der Folge von Zellschädigungen ist denkbar. Als wichtigstes Ziel für Stickstoffmonoxid wird jedoch die lösliche Guanylylcyclase beschrieben (Koesling und Friebe, 2000).

#### **4.4 ODQ als Inhibitor der löslichen Guanylylcyclase**

NO würde in diesem Fall die Effekte des Opioidrezeptors abhängig vom cyclischen Guanosin Monophosphat (cGMP) vermitteln. cGMP (Balligand, 2000) wird über eine Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) durch NO gebildet. sGC hat eine prosthetische Häm-Gruppe, an die das NO-Radikal bindet und so zu einer 400-fachen Aktivierung des Enzyms führt. Es katalysiert die Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) zu cGMP. cGMP hat verschiedene Angriffspunkte innerhalb der Zelle. Über allosterische Interaktionen wirkt es auf spezifische Isoformen der Phosphodiesterase, die cyclisches AMP hydrolysieren: cGMP stimuliert die Phosphodiesterase PDE II und inhibiert die PDE III. Außerdem aktiviert cGMP die Proteinkinase G (PKG), welche entweder Troponin-I phosphoryliert, so dass die Calcium-Sensitivität der Myofilamente herabgesetzt wird, oder den Calcium-Kanal vom L-Typ mit der Folge eines verminderten Calcium-Transports verändert, was zu einer negativ inotropen Reaktion der Herzzelle führt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit,

dass die Bildung von cyclischer Adenosin Diphosphat Ribose (cADPR) mittels cGMP stimuliert wird. Diese provoziert eine Calcium-Ausschüttung durch Ryanodin-sensitive Kanäle und letztendlich eine negative Lusitropie. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass auch in diesem Fall cGMP-abhängige Mechanismen für die Verminderung der Myozyten-Kontraktionsfähigkeit infolge  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation verantwortlich sind. Aus diesem Grunde wurde in dem letzten Versuchsteil dieser Arbeit nach einer möglichen Beteiligung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) an der  $\kappa$ -Opioidrezeptor gekoppelten Signalkaskade geforscht.

ODQ (1 H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-on) ist ein starker, selektiver Inhibitor der durch Stickstoffmonoxid (NO) stimulierten Guanylylcyclase. Es inaktiviert weder die endotheliale, neuronale und induzierbare NO-Synthase noch NO. Nur die lösliche Form der Guanylylcyclase wird inhibiert (Garthwaite et al., 1995).

Wurden die Kardiomyozyten mit dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten (-)-U-50,488 behandelt, so kam es zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionsamplitude. Die DMSO-Lösung, sowohl ohne als auch mit ODQ-Zusatz veränderte dagegen nicht signifikant die Höhe der Zelllängenänderung der Tyrode-Kontrollmessungen (Abb. 18).

Der Zusatz von ODQ hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die durch (-)-U-50,488 beeinflusste Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten (Abb. 18). Folglich war die lösliche Guanylylcyclase nicht in den Signaltransduktionsweg der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren integriert.

Andere Studien, die NO-Donatoren verwendeten (Sandrasegarane und Diamond, 1999), berichten ebenfalls von einer NO vermittelten negativen Inotropie der Ratten-Kardiomyozyten, die nicht mittels ODQ aufgehoben werden konnte. Sie fanden heraus, dass es zu keiner Zunahme der Kontraktilität der Myozyten kam, obwohl ODQ komplett die cGMP-Erhöhung auf Grund des NO-Donatoren-Einflusses blockiert. Kojda et al. (1997) dagegen berichten von einem positiven Effekt auf die myokardiale Kontraktilität, vermittelt über NO und Aktivierung der Guanylylcyclase. Sie verwandten im Vergleich zu anderen Laboren niedrigere Konzentrationen von NO-Donatoren.

## 4.5 Ausblicke

Auf welchem weiteren Weg neben dem der löslichen Guanylylcyclase können nun Opioide bzw. NO die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten beeinflussen? Neben der Bildung von Peroxynitrat könnte auch mit Hilfe von reaktiven  $O_2^-$ - und  $NO_2^-$ -Spezies sowie von  $H_2O_2$  die Kontraktilität der Herzzelle verändert werden. Die Abschwächung der Kontraktionsfähigkeit von Rattenkardiomyozyten durch  $H_2O_2$  (Wei et al., 2001) ähnelt der Wirkung der Opioide. Die bisher beschriebenen Aspekte weisen darauf hin, dass es unterschiedliche Wirkmechanismen von Stickstoffmonoxid gibt. Es ist denkbar, dass wie oben beschrieben je nach Konzentrationshöhe unterschiedliche Effekte in den Vordergrund treten (Kojda et al., 1996; Hare, 2003). Untersuchungen mit NO-Donatoren (Kojda et al., 1996; Hu et al., 1997; Sandrasegane und Diamond, 1999) geben Hinweise hierfür: An transfizierten Zellen, die zwar kardiale Calciumkanäle, aber keine lösliche Guanylylcyclase exprimieren, wird eine Hemmung dieser Kanäle erst ab einer Konzentration der NO-Donatoren von  $100 \mu\text{mol/l}$  beschrieben (Hu et al., 1997). Kojda et al. (1996) beschreiben infolge hoher Konzentrationen von NO-Donatoren ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) eine Steigerung des cGMP-Gehaltes der Myozyten, was zu einer Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase und Reduktion der Myozyten-Kontraktilität führt. Niedrige Konzentrationen von NO-Donatoren ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) rufen eine geringere Erhöhung der cGMP hervor. Dies führt laut Kojda et al. (1996) zu einer Vermehrung des cAMP-Gehaltes der Zelle und letztendlich über die Aktivierung einer abhängigen Proteinkinase zu einer Steigerung der Kontraktilität der Kardiomyozyten. Es gibt unter anderem Hinweise dafür, dass die Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase sehr niedrige NO-Konzentrationen benötigt ( $EC_{50}$  von  $100 \text{ nmol/l}$ ) (Wink und Mitchel, 1998). Welcher Mechanismus nun in den Signaltransduktionsweg des  $\kappa$ -Opioidrezeptors involviert ist, müsste insbesondere vor dem Hintergrund des komplexen Geschehens, auf das schon die Konzentrationswirkungskurve von U-50,488 bezüglich der Signalvermittlung hindeutet, noch weiter untersucht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Opioide und Opioidpeptide spielen eine große Rolle im kardiovaskulären System. Sowohl systemisch als auch lokal können sie die Arbeit des Herzens beeinflussen. Die Stimulation des  $\kappa$ -Opioidrezeptors, einer der drei am Herzen nachgewiesenen Opioidrezeptoren, induziert kardiogene Arrhythmien und führt zu einer Abnahme der Kontraktilität der Herzzelle. Dieses Wissen ist möglicherweise für die weitere Forschung im Bereich der Herzinfarktprophylaxe interessant. Bislang war bekannt, dass in den Signaltransduktionsweg des  $\kappa$ -Opioidrezeptors ein Pertussis-Toxin (PTX) sensitives G-Protein, Phospholipase C (PLC), Proteinkinase C (PKC) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) involviert sind. Auch Veränderungen von cAMP-Konzentrationen und der Calcium-Hämöostase spielen eine Rolle. Da nachgewiesen worden war, dass PKC in einigen Fällen das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aktiviert und dass NO-Donatoren ähnlich wie  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten eine negative Inotropie des Herzens hervorrufen, lag es nahe zu prüfen, ob Stickstoffmonoxid (NO) in den Bereich des Signalnetzwerkes unterhalb des  $\kappa$ -Opioidrezeptors involviert ist.

Isolierte Herzmuskelzellen von Wistarratten wurden hinsichtlich der Änderung ihres Kontraktionsverhaltens während  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation durch (-)-U50,488 mit und ohne Zusatz des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME getestet. Daneben wurden Kontrolluntersuchungen ohne  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass L-NAME die Wirkung des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten vollständig aufhob. Durch Verwendung des inaktiven Enantiomers des NO-Synthase-Hemmers D-NAME wurden unspezifische Effekte ausgeschlossen. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass NO innerhalb der Signalkaskade des  $\kappa$ -Opioidrezeptors eine Rolle spielt. Um zu untersuchen, wie die Wirkung von Stickstoffmonoxid vermittelt wird, wurde nach dem klassischen Mediator von NO, der löslichen Guanylylcyclase, geforscht. ODQ, ein Guanylylcyclasen-Inhibitor, fand daraufhin Anwendung. Es stellte sich heraus, dass ODQ keinen Einfluss auf die Wirkung von (-)-U-50,488 hat. Die lösliche Guanylylcyclase spielt somit keine Rolle innerhalb des Signaltransduktionsweges des  $\kappa$ -Opioidrezeptors. Als Alternative kommen cGMP-unabhängige Effekte in Frage, z. B. die Bildung von Peroxynitrit, das in hohen Konzentrationen bis zum Zelltod führen kann

oder die Bildung von  $H_2O_2$ , das ähnliche Zelleffekte wie die  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation hervorruft. Ein direkter Einfluss von NO, vermittelt durch  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation, auf die Hemmung der Atmungskette und auf die Veränderung der Calciumkanäle müssten in gesonderten Arbeiten genauer untersucht werden.

## 6 SUMMARY

Opioids and opioid peptides play a big role in the cardiovascular system. Stimulation of the one of the three opioid receptors in the heart induces cardiac arrhythmias and decreases cardiomyocytes contraction.

These facts seem to be interesting for further investigation in cardioprotection. The signal transduction pathway includes a pertussis toxin-sensitive G protein, phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Besides, changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and cAMP concentration are described. It has been shown that PKC activates the enzyme nitric oxide Synthase (NOS). Nitric oxide (NO) donors display similar time dependent effects on contractile response in isolated rat ventricular cardiomyocytes compared to that exerted by κ-opioid receptor agonists.

It is evident that nitric oxide may be involved in the signal transduction pathway of the κ-opioid receptor. Therefore the influence of the NOS inhibitor L-NAME was investigated concerning the effects of the κ-opioid receptor agonist (-)-U-50,488 on contractile response at first in the absence of isoprenaline. While pretreatment of cardiac myocytes with the NOS inhibitor L-NAME did not affect basal contractile response, the effect of (-)-U-50,488 contraction amplitude was reduced completely. To exclude unspecifically effects D-NAME, an inactive enantiomer of the NOS inhibitor was tested in isolated cardiomyocytes. This substance had no significant influence on the effect (-)-U-50,488. Therefore, these results indicate that the diminution of contractile response by (-)-U-50,488 is mediated via a NOS.

The mechanism, by which NO could produce this effect, had to be researched. The classic mediator of NO is the soluble guanylyl cyclase (sGC) increasing cGMP levels. The effects of the potent and highly selective inhibitor of sGC ODQ in the presence of (-)-U-50,488 were studied. Pretreatment of cardiomyocytes with ODQ had no significant influence on contractile response. These results lead us to the conclusion that soluble guanylyl cyclase is not involved in the signal pathway of the κ-opioid receptor.

cGMP independent effects could be an alternative; for example: the production of peroxynitrite which can - when produced in a high amount - destroy the cells; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which causes similar cell effects like the κ-opioid receptor-stimulation.

A direct effect of NO through the inhibition of mitochondrial respiration and the change of calcium channels have to be researched in further investigations.

## 7 LITERATUR

- ◆ AHLNER, J.; ANDERSSON, R. G. G.; TORFGARD, K.; AXELSSON, K. L. (1991) Organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol. Rev.* 43: 351-423
- ◆ ALDERTON, W. K.; COOPER, K. E.; KNOWLES, R. G. (2001) Nitric oxide Synthetases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615
- ◆ BALLIGAND, J. L.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; SIMMONS, W. W.; PIMENTAL, D.; MALINSKI, T. A.; KAPTURCZAK, M.; TAHA, Z.; LOWENSTEIN, C. J.; DAVIDOFF, A. J.; KELLY, R. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. (1994) Cytokine-inducible nitric oxide Synthetase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 269: 27580-27588
- ◆ BALLIGAND, J. L.; KOBZIK, L.; HAN, X.; KAYE, D. M.; BELHASSEN, L.; O'HARA, D. S.; KELLY, R. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. (1995) Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide Synthetase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 14582-14586
- ◆ BALLIGAND, J. L. (2000) Regulation of cardiac function by nitric oxide. Mayer, B (ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 143: 207-234
- ◆ BIAN, J. S.; ZHANG, W. M.; XIA, Q.; WONG, T. M. (1998a) Phospholipase C inhibitors attenuate arrhythmias induced by  $\kappa$ -receptor stimulation in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 2103-2110
- ◆ BIAN, J. S.; WANG, H. X.; ZHANG, W. M.; WONG, T. M. (1998b) Effects of  $\kappa$ -opioid receptor stimulation in the heart and the involvement of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 124: 600-606
- ◆ BIAN, J. S.; ZHANG, W. M.; PEI, J. M.; WONG, T. M. (2000) The role of phosphodiesterase in mediating the effect of protein kinase C on cyclic AMP

accumulation upon  $\kappa$ -opioid receptor stimulation in the rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 1065-1070

- ◆ BRODDE, O. E.; HILLEMANN, S.; KUNDE, K.; VOGELSANG, M.; ZEKOWSKI, H.-R. (1992) Receptor systems affecting force of contraction in the human heart and their alterations in chronic heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* 11: 164-174
- ◆ BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C.; ZERKOWSKI, H.-R. (1995) Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 30: 570-584
- ◆ CAPOGROSSI, M. C.; KORT, A. A.; SPURGEON, H. A.; LAKATTA, E. G. (1986) Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the  $\text{Ca}^{2+}$ - and species dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle. *J. Gen. Physiol.* 88: 589-613
- ◆ CAPOGROSSI, M. C.; KAKU, T.; FILBURN, C. R.; PELTO, D. J.; HANSFORD, R. G.; SPURGEON, H. A.; LAKATTA, E. G. (1990) Phorbol ester and dioctanoylglycerol stimulate membrane association of protein kinase C and have a negative inotropic effect mediated by changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in adult rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 66: 1143-1155
- ◆ DAY, R.; TRUJILLO, K. A.; AKIL, A. (1993) Prodynorphin biosynthesis and posttranslational processing. Herz, A. (ed.), *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 104/1: 449-463
- ◆ FADEN, A. I. (1993) Role of endogenous opioids in central cardiovascular regulation and dysregulation. Herz, A. (ed.), *Opioids II, Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 104: 191-204
- ◆ FEUERSTEIN, G.; SIREN A.-L. (1987) The opioid system in cardiac and vascular regulation of normal and hypertensive states. *Circulation* 75 (Suppl. I): 125-129
- ◆ FIELDS, H. L. (1993) Brainstem mechanisms of pain modulation: anatomy and physiology. Herz, A. (ed.), *Opioids II, Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 104/II: 3-15

- ◆ GAN, T.; PEI, J.; CHAN, I.; WONG, T. M. (2000)  $\kappa$ -opioid receptor stimulation increase the expression of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange gene in the heart. *Life Sci.*, Vol. 66/4: 355-361
- ◆ GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 48: 184-188
- ◆ GAUTRET, B.; SCHMITT, H. (1985) Central and peripheral sites for cardiovascular actions of dynorphin-(1-13) in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 111: 263-266
- ◆ GOLDSTEIN, A.; NAIDU, A. (1989) Multiple opioid receptors: Ligand selectivity profiles and binding signatures. *Mol. Pharmacol.* 36: 265-272
- ◆ GOPALAKRISHNA, R.; CHEN, Z. H.; GUNDIMEDA, U. (1993) Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.* 268: 27180-27185
- ◆ HARE, J. M. (2003) Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 719-729
- ◆ HOLADAY, J. W. (1983) Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 541-594
- ◆ HU, H.; CHIAMVIMONVAT, N.; YAMAGISHI, T.; MARBAN, E. (1997) Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by S-nitrosithol nitric oxide donors. *Circ. Res.* 81: 745-752
- ◆ HUGHES, J.; SMITH, T. W.; KOSTERLITZ, H. W.; FOTHERGIL, L. A.; MORGAN, B. A.; MORRIS, H. R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579
- ◆ ISENBERG, G.; KLOCKNER, U. (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch.* 395: 6-18

- ◆ JIN, W.-Q.; TAI, K. K.; CHAN, T. K. Y.; WONG, T. M. (1995) Further characterization of [H]U69593 binding sites in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: 1507–1511
- ◆ JI, G. J.; FLEISCHMANN, B. K.; BLOCH, W.; FEELISCH, M.; ANDRESSEN, C.; ADDICKS, K.; HESCHELER, J. (1999) Regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.* 13: 313-324
- ◆ KELLY, R. A.; BALLIGAND, J. L.; SMITH, T. (1996) Nitric oxide and cardiac funktion. *Circ. Res.* 79: 363-380
- ◆ KIEFFER, B. L. (1995) Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptor for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 615-635
- ◆ KOESLING, D.; FRIEBE, A. (2000) Enzymology of Soluble Guanylyl Cyclase. Mayer, B. (ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 143: 93-109
- ◆ KOJDA, G.; KOTTENBERG, K.; NIX, P.; SCHLÜTER, K. D.; PIPER, H. M.; NOACK, E. (1996) Low increase of cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78: 91-101
- ◆ KOJDA, G.; KOTTENBERG, K.; NOACK, E. (1997) Inhibition of nitric oxide Synthetase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 334: 181-190
- ◆ KRUMINS, S. A.; FADEN, A. I.; FEUERSTEIN, G. (1985) Opiate binding in rat hearts: Modulating of binding after hemorrhagic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 120-128
- ◆ KRUMINS, S. A. (1987) Characterization of dermorphin binding to membranes of rat brain and heart. *Neuropeptides* 9: 93-102

- ◆ LAHTI, R. A.; VONVOIGTLANDER, P. F.; BARSUHN, C. (1982) Properties of a selective kappa agonist, U-50,488H. *Life Sci.* 31: 2257-2260
- ◆ MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. (1997) Inhibition of nitric oxide Synthetase enhances antinociception mediated by mu, delta, and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 977-984
- ◆ MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M. E.; AKIL, H.; WATSON, S. J. (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7: 2445-2464
- ◆ MCKENNA, T. M.; LI, S.; TAO, S. (1995) PKC mediates LPS- and phorbol-induced cardiac cell nitric oxide Synthetase activity and hypocontractility. *Am. J. Physiol.* 269: H1891-1898
- ◆ MCINTOSH, M.; KANE, K.; PARRATT, J., (1992) Effects of selective opioid receptor agonists and antagonists during myocardial ischaemia. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 37-44
- ◆ MIKI, T.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. (1998) Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol. Cell. Biochem.* 186: 3-12
- ◆ MINAMI, M.; SATOH, M. (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 23: 121-145
- ◆ NATHAN, C.; XIE, Q. (1994) Nitric oxide Synthetases: Roles, tolls, and controls. *Cell.* 78: 915-918
- ◆ NIROOMAND, F.; MURA, R. A.; PIACENTI, L.; KÜBLER, W. (1996) Opioid receptor agonists activate pertussis toxin-sensitive G proteins and inhibit adenylyl cyclase in canine cardiac sarcolemma. *Naunyn Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol.* 354: 643-649
- ◆ OLSON, G. A.; OLSON, R. D.; KASTIN, A. I. (1994) Endogenous opiates: 1993. *Peptides* 15: 1513-1556

- ◆ PAOLOCCI, N.; EKELUND, U. E. G.; ISODA, T.; OZAKI, M.; VANDEGAER, K.; GEORGAKOPOULOS, D. (2000) cGMP-independent inotropic effect of nitric oxide and peroxyxynitrite donors: potential role for S-nitrosylation. *Am. J. Physiol.* 279: H1982-1988
- ◆ PEPE, S.; XIAO, R. P.; HOHL, C.; ALTSCHULD, R.; LAKATTA, E. G. (1997) `Cross talk´ between opioid peptide and adrenergic receptor signalling in isolated rat heart. *Circulation* 95: 2122-2129
- ◆ PRZEWLOCKI, R.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKA, B. (1993) Inhibition of nitric oxide Synthetase enhances morphine antinoception in the rat spinal cord. *Life Sci.* 53: PL 1-5
- ◆ REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.; MONCADA, S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide Synthetase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101: 746-752
- ◆ RICHARD, V.; BLANC, T.; KAEFFER, N.; TRON, C.; THUILLEZ, C. (1995) Myocardial and coronary endothelial protective effects of acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in rat: Role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 115: 1532-1538
- ◆ ROSSIER, J. (1993). Biosynthesis of enkephalin-derived peptides. Herz, A. (ed.), *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 104/1: 423-441
- ◆ ROTHMAN, R. B.; FRANCE, C. P.; BYKOV, V.; DE COSTA, B. R.; JACOBSON, A. E.; WOODS, J. H.; RICE, K. C. (1989) Pharmacological activities of optically pure enantiomers of the  $\kappa$  opioid agonist, U-50,488, and its cis diastereomer: evidence for three  $\kappa$  receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 167: 345-353
- ◆ SANDIRASEGARANE, L.; DIAMOND, J. (1999) The nitric oxide donors, SNAP and DEA/NO, exert a negative inotropic effect in rat cardiomyocytes which is independent of cyclic GMP elevation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 799-808

- ◆ SCHULZ, R.; NAVA, E.; MONCADA, S. (1992) Induction and potential biological relevance of Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthetase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 105: 575-580
- ◆ SHENG, J.-Z.; WONG, N. S.; WANG, H.-X.; WONG, T. M. (1997) Pertussis toxin, but not tyrosine kinase inhibitors, abolishes effects of U50488 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in myocytes. *Am. J. Physiol.* 272: C560-564
- ◆ SHENG, J.-Z.; WONG, T. M. (1996) Chronic U-50,488H abolishes inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular Ca<sup>2+</sup> elevations evoked by k-opioid receptor in rat myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 307: 323-329
- ◆ SIEGFRIED, M. R.; ERHARDT, J.; RIDER, T.; XIN-LIANG, M. A.; LEFER, A. M. (1992) Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischaemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 668-675
- ◆ SUMERAY, M. S.; REES, D. D.; YELLON, D. M. (2000) Infarct size and nitric oxide Synthetase in murine myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 35-42
- ◆ TAI, K. K.; JIN, W. Q.; CHAN, T. K. Y.; WONG, T. M. (1991) Characterization of [H]U69593 binding sites in the heart by receptor binding assays. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23: 1297-1302
- ◆ TAUB, D. D.; EISENSTEIN, T. K.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W.; ROGERS, T. J. (1990) Immunomodulatory activity of μ- and κ-selective opioid agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 360-364
- ◆ UTZ, J.; ECKERT, R.; TRAUTWEIN, W. (1995) Inhibition of L-Type calcium currents in guinea pig ventricular myocytes by the κ-opioid agonist U-50,488H does not involve binding to opiate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 627-633
- ◆ VENTURA, C.; BASTAGLI, L.; BERNARDI, P.; CALDARERA, C. M.; GUANIERI, C. (1989) Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effects of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim. Biophys. Acta* 987: 69-74

- ◆ VENTURA, C.; CAPOGROSSI, M. C.; SPURGEON, H. A.; LAKATTA, E. G. (1991)  $\kappa$ -opioid peptide receptor stimulation increases cytosolic pH and myofilament responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 261: H1671-1674
- ◆ VENTURA, C.; SPURGEON, H.; LAKATTA, E. G.; GUANIERI, C.; CAPOGROSSI, M. C. (1992)  $\kappa$ - and  $\delta$ -opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and  $\text{Ca}^{2+}$  release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ. Res.* 70: 66-81
- ◆ VONVOIGTLANDER, P. F.; LAHTI, R. A.; LUDENS, J. H. (1983) U-50,488H, a selective and structurally novel non- $\mu$  ( $\kappa$ ) opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 7-12
- ◆ WALDMANN, S. A.; MURAD, F. (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39: 163-196
- ◆ WANG, G. Y.; WU, S.; PEI, J.-M.; YU, X.-C.; WONG, T. M. (2001)  $\kappa$ - but not  $\delta$ -opioid receptors mediate effect of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am. J. Physiol.* 280: H384-391
- ◆ WEI, S.; ROTHSTEIN, E. C.; FLIEGEL, L.; DELL'ITALIA, L. J.; LUCCHESI, P. A. (2001) Differential MAP kinase activation and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger phosphorylation by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 281: C1542-1550
- ◆ WENZLAFF, H.; STEIN, B.; TESCHEMACHER, H. (1998a) Diminution of contractile response by  $\kappa$ -opioid receptor agonists in isolated rat ventricular cardiomyocytes is mediated via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: 360-366
- ◆ WENZLAFF, H.; WEIL, G.; STEIN, B.; TESCHEMACHER, H. (1998b) Negative inotropic effects of  $\kappa$ -opioid receptor agonists in isolated rat ventricular cardiomyocytes are mediated via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358, Suppl. 2: R642
- ◆ WENZLAFF, H.; KUBE, B.; WEIL, G. (1999) The negative inotropic effects of U50488 in isolated rat ventricular cardiomyocytes are not mediated via adenylylcyclase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, Suppl. 1: R107.

- ◆ WEYRICH, A. S.; MA, X. L.; BUERKE, M.; MUROHARA, T.; ARMSTEAD, V. E.; LEFER, A. M.; NICOLAS, J. M.; THOMAS, A. P.; LEFER, D. J.; VINTEN-JOHANSEN, J. (1994) Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle. *Circ. Res.* 75: 692-700
- ◆ WINK, D. A.; MITCHEL, J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 434-456
- ◆ WONG, T. M.; LEE, A. Y. S.; TAI, K. K. (1990) Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart- an attempt to identify cardiac opioid receptors subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 1167-1175
- ◆ XIAO, R. P.; PEPE, S.; SPURGEON, H. A.; CAPOGROSSI, M. C.; LAKATTA, E. G. (1997) Opioid peptide receptor stimulation reverses  $\beta$ -adrenergic effects in rat heart cells. *Am. J. Physiol.* 272: H797-H805
- ◆ YOUNG, E.; BRONSTEIN, D.; AKIL, H. (1993) Proopiomelanocortin biosynthesis, processing and secretion: functional implications. Herz, A. (ed.), *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer, Berlin, Vol. 104/1: 393-413
- ◆ YU, X. C.; LI, H. Y.; WANG, H. X.; WONG, T. M. (1998) U50488H inhibits effects of norepinephrine in rat cardiomyocytes—cross-talk between  $\kappa$ -opioid and  $\beta$ -adrenergic receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 405-413.
- ◆ ZHANG, W. M.; WONG, T. M. (1998) Suppression of cAMP by phosphoinositol/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway in the cardiac  $\kappa$ -opioid receptor. *Am. J. Physiol.* 274: C82-87
- ◆ ZHANG, W. M.; WU, S.; YU, X. C.; WANG, H. X.; BIAN, J. S.; WONG, T. M. (1999) Effects of U-50,488 and bremazocine on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and cAMP in naive and tolerant rat ventricular myocytes: Evidence of kappa opioid receptor multiplicity in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 355-362
- ◆ ZIMLICHMANN, R.; GEFEL, D.; ELIAHOU, H.; MATAS, Z.; ROSEN, B.; GASS, S.; ELA, C.; EILAM, Y.; VOGEL, Z.; BARG, J. (1996) Expression of opioid

receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93: 1020-1025

- ◆ ZUKIN, R. S.; EGHBALI, M.; OLIVE, D.; UNTERWALD, E. M.; TEMPEL, A. (1988) Characterization and visualization of rat and guinea pig brain  $\kappa$ -opioid receptors: evidence for  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4061-4065

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 Auskünften 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.“

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name	Rita Wilkens
Geburtsdatum	geboren am 09.08.1976 in Papenburg, Niedersachsen
Eltern	Johann und Thekla Wilkens
Familienstand	ledig

### **Schulausbildung**

1983-1987	Grundschule Heede
1987-1989	Orientierungsstufe Dörpen
1989-1996	Gymnasium Papenburg, Abschluss Abitur

### **Freiwilliges Soziales Jahr**

1996-1997	Pflegebereich Marienhospital Papenburg
-----------	--

### **Hochschulausbildung**

1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Frühjahr 1999	Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 2000	Aufnahme einer Promotionsarbeit am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der JLU
Herbst 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2002-2003                      Praktisches Jahr an der Asklepiosklinik Lich und am  
Slotervaartziekenhuis Amsterdam

Herbst 2003                      Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Weiterbildung**

Ab Dezember 2003              Tätigkeit als Ärztin im Praktikum bzw. Assistenzärztin in  
der gynäkologischen Abteilung des Pius-Hospitals  
Oldenburg

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. H. Teschemacher möchte ich danken für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Dreyer und Dr. H. Wenzlaff für die kritische Durchsicht des Manuskripts

Für die engagierte Betreuung während der Durchführung der Versuchsreihen und die Anregungen und Hilfestellungen bedanke ich mich bei Dr. H. Wenzlaff.

Ein großes Dankeschön gilt B. Dickopf für die Einarbeitung im Labor.