

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Die Bedeutung von Endocannabinoiden im kardiogenen Schock
und bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan Christoph Karcher

aus Heidelberg

Würzburg, Januar 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. O. Elert

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Stand der Forschung	3
Pharmakologische Grundlagen der Endocannabinoid-Wirkung	3
Kardiovaskuläre Wirkung von Cannabinoiden	4
Einheiten, Abkürzungen	8
Berechnungen abgeleiteter Größen	9

Teil I

Freisetzung von Endocannabinoiden im kardiogenen Schock, ihr Einfluss auf kardiovaskuläre Funktionsparameter und auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion.	10
I.1 Material und Methoden	11
Versuchstiere	11
Operationsbeschreibung	11
Hämodynamische Messungen	12
Fixierung und Planimetrie	13
Zellisolierung	14
Biochemische Analyse von Anandamid und 2-AG	15
Endotheliale Funktion	16
Verabreichte Substanzen	17
Statistische Auswertungen	17
I.2 Ergebnisse	18
Durch Gabe des CB ₁ -Rezeptor-Antagonisten wird der Blutdruckabfall im kardiogenen Schock antagonisiert.	18
SR 141716A verstärkt die Frühmortalität nach Myokardinfarkt	20
Durch Myokardinfarkt (MI) wird die Cannabinoidsynthese in zirkulierenden Makrophagen und Thrombozyten erhöht	21
Verstärkung der endothelialen Dysfunktion nach Gabe von SR 141716A	22
I.3 Diskussion	24
Tachykardie nach Gabe von SR	24
Hat die Endocannabinoid-induzierte Dilatation der Koronar- und Zerebralarterien Auswirkung auf die Mortalität?	24
Einfluss der CB ₁ -Rezeptor-Blockade auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion nach Myokardinfarkt	25
Mechanismen der Schockentstehung	26
Endocannabinoide und das zytokine System im kardiogenen Schock	27

Teil II

Einfluss der Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung und -Inhibierung auf die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz und auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion	29
II.1 Material und Methoden	31
Versuchstiere	31
Verabreichte Substanzen, Dosisfindung	31
Einteilung in Behandlungsgruppen	32
Operation, Hämodynamische Messungen	33
Linksventrikuläres Volumen	34
Fixierung und Planimetrie	36
Vaskuläre Reaktivitätsstudien	36
CB ₁ -Rezeptor-Expression	36
Statistische Auswertung	37
II.2 Ergebnisse	38
Mortalität	38
Erkennbare Nebenwirkungen, Verhalten	39
Linksventrikuläre Infarktgröße der drei Gruppen	40
Ausgangswerte	41
Hämodynamische Variablen vor Thorakotomie (Tabelle 4)	43
Hämodynamische Variablen nach Thorakotomie (Tabelle 5)	45
Steifigkeitskonstanten	47
Passive Druck-Volumen-Beziehung des linken Ventrikels, Arbeitsvolumen und linksventrikuläres Volumen/Gewichtsverhältnis	49
Expression und Funktion der CB ₁ -Rezeptoren	52
II.3 Diskussion	54
Zusammenfassung	60
Literaturverzeichnis	61

Einleitung

Seit Entdeckung spezifischer Cannabinoid-Rezeptoren im Jahre 1988 (1,2) sind die biochemischen Eigenschaften des Endocannabinoidsystems in einer Vielzahl von Studien untersucht worden. Seither wurden gute Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der Biosynthese, Aktivierung und Deaktivierung dieser Membranlipide gewonnen (3). Auch weiß man heute, dass endogen gebildete Cannabinoide, neben ihrer in der vorliegenden Arbeit behandelten kardiovaskulären Funktion, Teile unseres Nerven- und Immunsystems regulieren und dass sie unter anderem Einfluss auf grundlegende Zellfunktionen wie den Energiemetabolismus (4) und die Zellproliferation (4), sowie auf die Embryonalentwicklung (5) und auf die Appetitregulation (6) haben. Die Anwesenheit dieser Substanzen in Neuronen und ihre stimulations-induzierte Ausschüttung deuten darauf hin, dass es sich hierbei um eine neue Klasse von Lipidmediatoren handelt (7). Die Einführung von Cannabinoid-Rezeptor-Knockout-Mäusen (8), die Synthese von Inhibitoren des Endocannabinoid-Abbaus und die Synthese von spezifischen Cannabinoidrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (9) stellen der Forschung nun gute Mittel zur Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von Endocannabinoiden zur Verfügung, über die noch vergleichsweise wenig bekannt ist. Ziel experimenteller Studien ist es, zu erforschen, in welchen pathophysiologischen Situationen das Endocannabinoid-System beteiligt ist und ob die entwickelten Substanzen, ob kurativ oder palliativ wirksam, therapeutische Verwendung finden könnten. Hierzu sollen vorliegende experimentelle Studien beitragen, in denen wir den Einfluss von endogenen und exogenen Cannabinoiden auf kardiovaskuläre Funktionsparameter unter den Bedingungen des akuten und chronischen Myokardinfarktes untersucht haben.

Anlass für unsere Projekte waren vorangegangene Versuche zum hämorrhagischen und zum septischen Schock der Ratte, die ergeben hatten, dass endogene Liganden des CB₁-Cannabinoid-Rezeptors Blutdruckabfall erzeugen. Hierbei schienen sie eine protektive Wirkung zu entfalten. Bisher war unbekannt, ob ähnliche Mechanismen auch im kardiogenen Schock der Ratte nach Koronararterienligatur zu finden sind und ob Blockierung oder Aktivierung des CB₁-Cannabinoid-Rezeptors Auswirkung auf das

Auftreten einer endothelialen Dysfunktion haben. Im Teil II dieser Promotionsarbeit wurde der Einfluss einer Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung und -Inhibierung auf die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz und auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion nach Myokardinfarkt untersucht.

Konkret wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

Teil I: Modell des kardiogenen Schocks nach Koronararterienligatur

- Werden endogene Cannabinoide auch im kardiogenen Schock freigesetzt, wie es bereits für den septischen und den hämorrhagischen Schock erwiesen ist, und welche hämodynamischen Größen werden in diesem Fall durch sie verändert?
- Ist der Blutdruckabfall durch Vorbehandlung mit dem CB₁-Rezeptorantagonisten SR 141716 A inhibierbar und welche Auswirkungen hat die Rezeptorblockade auf die Mortalität?
- Welche Zellen sind für die Endocannabinoid-Synthese im kardiogenen Schock verantwortlich?
- Entsteht eine endotheliale Dysfunktion bereits im Akutstadium nach Myokardinfarkt und welchen Einfluss hat hierauf die Verabreichung des Rezeptorantagonisten?

Teil II: Herzinsuffizienzmodell des chronisch infarzierten Rattenherzens

- Welchen Einfluss hat die CB₁-Rezeptor-Modulation während der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz auf kardiovaskuläre Funktionsparameter und auf die myokardiale Morphologie bei Ratten mit verschiedener Infarktgröße?
- Welche Mechanismen liegen etwaigen Effekten zugrunde?
- Welche Rolle spielen Endocannabinoide bei der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion im Herzinsuffizienzmodell?
- Wird der kardiale CB₁-Rezeptor der Ratte heraufreguliert?

Stand der Forschung

Pharmakologische Grundlagen der Endocannabinoid-Wirkung

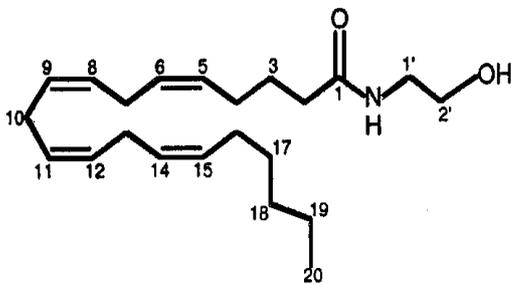
Sowohl psychoaktive als auch medizinische Wirkungen der Marihuana-Pflanze sind der Menschheit seit Jahrtausenden bekannt. In der arabischen Medizin des Mittelalters sind viele der heute bekannten Indikationen von Cannabinoiden bereits beschrieben (10), gesicherte Kenntnisse zur Wirkung dieser Substanzen konnten jedoch erst nach Identifizierung der chemischen Struktur von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), dem Hauptwirkstoff der Marihuana-Pflanze, im Jahre 1964 gewonnen werden (11).

1988 wurden zwei Cannabinoid-Rezeptor-Typen identifiziert (1) und anschließend kloniert (12,13): CB₁-Rezeptoren (mit dem CB_A-Subtyp) sind sowohl zentral als auch peripher in verschiedenen Geweben lokalisiert, CB₂-Rezeptoren (14), die nur zu 44% homolog mit CB₁-Rezeptoren sind, werden fast ausschließlich auf Immunzellen exprimiert. Die hydrophoben Eigenschaften von Δ^9 -THC ließen vermuten, dass es sich bei dem endogenen Liganden um ein Lipid handelt und tatsächlich konnte 1992 das Arachidonsäure-Derivat Arachidonylethanolamid (Anandamid) (2) aus Schweinehirnen isoliert werden. Wenig später wurde ein zweites Endocannabinoid, 2-Arachidonylglycerid (2-AG) (15) entdeckt. In ihrer biologischen Wirkung stimmen Endocannabinoide mit THC fast vollständig überein. Die Potenz ihrer hypotensiven Wirkung, die gut mit der Affinität am Rezeptor korreliert (16), ist jedoch deutlich geringer als die von Δ^9 -THC (17).

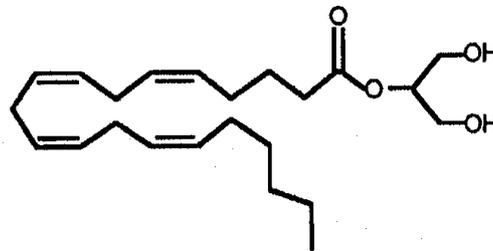
Anandamid (Sanskrit, ananda = Glückseligkeit) ist ein CB₁-Rezeptor-Agonist, entsteht aus N-Arachidonyl-Phosphatidyl-Ethanolamid unter Abspaltung von phosphoriger Säure und wird durch das Enzym Anandamid-Amidohydrolase zu Arachidonsäure und Ethanolamid abgebaut (7,18). Die physiologische Wirkung kann zudem durch einen in Neuronen (19) und in Makrophagen (20,21) lokalisierten selektiven Wiederaufnahmemechanismus beendet werden.

2-AG ist ein Arachidonsäureester (22), der CB₁- und CB₂- Rezeptoren aktiviert und aus anderen Vorstufen entsteht als Anandamid. Abgebaut wird 2-AG durch zelluläre Esterasen (23), wobei Phospholipide, Diacylglycerole und Triglyceride entstehen. Es kann auch durch dieselbe Fettsäuren-Amidohydrolase (FAAH), die auch Anandamid abbaut, zu Arachidonsäure und Glycerol hydrolysiert werden (24), wobei hypotensiv

wirkende Cyclooxygenasemetabolite entstehen können (25). 2-AG hat eine geringere Stabilität als Anandamid in vivo und in vitro, weshalb Ligandenbindungsversuche erschwert sind und weshalb es in seiner Wirkungsweise bislang weniger intensiv beforscht wurde. Die Aktivierung des CB₁-Rezeptors, der sieben transmembranäre Domänen aufweist, löst durch die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen verschiedene Signaltransduktionskaskaden aus (9). Unter anderem wird der Kalzium-Einstrom durch N- und P/Q- spannungsabhängige Kalziumkanäle inhibiert, die Öffnungswahrscheinlichkeit von verschiedenen Kaliumkanälen erhöht und die Aktivität der Adenylatzyklase inhibiert. Folge der Aktivierung sind funktionelle Veränderungen insbesondere in erregbaren Zellen wie Neuronen.



Anandamid



2-AG

Kardiovaskuläre Wirkung von Cannabinoiden

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass Cannabinoide erheblichen Einfluss auf die kardiovaskuläre Aktivität haben können, der sich nicht über einen einzelnen Wirkmechanismus erklärt lässt. In diesem recht komplexen System ergaben sich Unterschiede in der Wirkung von endogenen, pflanzlichen und synthetischen Cannabinoiden, die sowohl endothelabhängig als auch endothelunabhängig eine Vasorelaxation induzieren können. Diese wird im wesentlichen aber nicht ausschließlich über CB₁-Cannabinoid-Rezeptoren vermittelt. Zudem gibt es deutliche Unterschiede der Cannabinoid-Wirkung auf einzelne vaskuläre Stromgebiete. Der Abfall des systemischen Blutdrucks erfordert zwar eindeutig das Vorhandensein von intakten CB₁-Rezeptoren (26), die Regulation der lokalen Mikrozirkulation durch Endocannabinoide in verschiedenen vaskulären Stromgebieten erfolgt jedoch durch

zusätzliche Mechanismen. Die folgende Zusammenfassung gibt einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand der kardiovaskulären Wirkung von Cannabinoiden.

Nach Identifizierung der chemischen Struktur von Δ^9 -THC (11), wurde mit synthetischen Cannabinoidrezeptor-Agonisten auch deren kardiovaskuläre Wirkung untersucht. Die akute Verabreichung von Δ^9 -THC beim Menschen induziert eine Tachykardie ohne signifikante Änderung des Blutdrucks (27). Chronischer Konsum beim Menschen ebenso wie akute und chronische Verabreichung bei Versuchstieren führt zu einem lang anhaltenden Blutdruckabfall und zu Bradykardie (28) (s. auch Disk. Teil II).

Bei intravenöser Verabreichung von Anandamid kann man bei Ratten und Mäusen eine triphasische Reaktion beobachten (29): Zunächst erfolgt eine kurze, vagal vermittelte Bradykardie, die mit einem Blutdruckabfall einhergeht, gefolgt von einem wenige Sekunden andauernden Blutdruckanstieg, der nach chirurgischer oder pharmakologischer Sympathektomie unbeeinflusst bleibt. Die aus therapeutischer Sicht interessante Phase der Hypotonie schließt sich direkt an, ist länger andauernd und durch den CB₁-Rezeptorantagonisten SR 141716A inhibierbar (16,29). Die Hypotonie nach intravenöser Gabe von Anandamid wird sowohl durch Blockade von α -Rezeptoren, als auch durch Rückenmarksdurchtrennung (in Höhe HWK 2) verhindert (29). Der Wirkmechanismus der therapeutisch unerwünschten zweiten Phase des Blutdruckanstiegs ist unbekannt. Das sympathische Nervensystem und bekannte Cannabinoid-Rezeptoren sind hierbei nicht beteiligt (30), interessanterweise zeigen synthetische Cannabinoide keinen Phase-2-Blutdruckanstieg.

Eine Blutdruckerniedrigung kann durch Verminderung des vaskulären Widerstandes, durch Verminderung des Herzzeitvolumens oder aus einer Kombination der beiden induziert werden. Experimente mit radioaktiv markierten Mikrosphären zeigten, dass die Wirkung von Anandamid hauptsächlich auf einer Abnahme des peripheren Widerstandes beruht, das Herzzeitvolumen hingegen war nicht signifikant verändert. Die gleiche Wirkung hatte das metabolisch stabile R-Methanandandamid, woraus hervorgeht, dass die blutdrucksenkende Wirkung von Anandamid nicht durch metabolische Abbauprodukte induziert wird, sondern auf direkter Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren beruht (31). Der vaskuläre Widerstand wurde vor allem in Niere, Gehirn und Herz vermindert (31). Die kardiovaskuläre Anandamid-Wirkung

wird peripher und nicht durch zentral-gelegene CB₁-Rezeptoren vermittelt (29,32). Durch die Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren auf präsynaptischen, postganglionären Nervenendigungen wird die Ausschüttung von Noradrenalin inhibiert (33). Dies hemmt in den Gefäßen den Vasokonstriktortonus. Cannabinoid-Rezeptoren sind auf sympathischen Nervenendigung, die Widerstandgefäße innervieren, nachgewiesen. Unklar ist allerdings, ob sie dort als Heterorezeptoren für zirkulierende Zytokine fungieren oder zusätzlich als Autorezeptoren auf Cannabinoide reagieren, die direkt vom sympathischen Nerven gebildet und ausgeschüttet werden. Die durch die synthetischen Cannabinoide WIN 55,212-2 und HU-210 ausgelöste maximale Hypotonie (34) übersteigt allerdings deutlich den durch β -adrenerge Blockade oder Sympathektomie auslösbaren Blutdruckabfall, was gegen rein-neuronale Mechanismen der Cannabinoid-Wirkung spricht. Durch Aktivierung zerebrovaskulärer CB₁-Rezeptoren wird der Kalzium-Einstrom vermindert, woraus Vasodilatation resultiert (35). Auch auf Gefäßendothelzellen kann die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren zu Ausschüttung verschiedener endothelialer Faktoren führen, die eine Vasodilatation bewirken. So kommt es beispielsweise in Endothelzellen der A. renalis nach Anandamid-Exposition zu einer vermehrten Produktion von NO und durch die Inhibierung der endothelialen NO-Synthetase wird die Dilatation der A. renalis nach Anandamid-Gabe inhibiert (36). Es bleibt jedoch die systemische Anandamid-induzierte Blutdrucksenkung durch die Gabe von L-NAME unbeeinflusst (37). Zudem gibt es eine Beteiligung von Cannabinoiden in der Kontrolle der lokalen Mikrozirkulation über CB₁-Rezeptor-unabhängige Mechanismen. Bekannt ist, dass Anandamid über einen SR-insensitiven, endothel-unabhängigen Mechanismus auch den Capsaizin-sensitiven Vanilloid-Rezeptor auf perivaskulären sensorischen Nervendigungen aktiviert. Dies führt zur Ausschüttung eines CGRP (calcitonin gene-related peptide), welches durch Bindung an seinen Rezeptor auf vaskulären Muskelzellen eine Vasodilatation induziert (38). An der molekularen Identifizierung eines bislang nicht identifizierten, endothelständigen dritten Cannabinoid-Rezeptors in der Mesenterialarterie wird zur Zeit gearbeitet. Wichtig ist, darauf hinzuweisen, dass Endocannabinoide unter normalen physiologischen Bedingungen wenig zum Gefäßtonus beitragen, da die Verabreichung von CB₁- und CB₂-Rezeptor-Antagonisten bei normotensiven Tieren zu keiner Veränderung des Blutdrucks führt (16,25). Ebenso wenig kann bei CB₁- und CB₂- Rezeptor-Knockout-

Mäusen (26) ein höherer Blutdruck gegenüber Kontrollmäusen festgestellt werden. Diese Tiere haben eine erhöhte intrauterine Mortalität, erreichen aber post partum das gleiche Lebensalter wie Mäuse, die den CB₁-Rezeptor exprimieren.

Einheiten, Abkürzungen

<u>Abkürzung</u>	<u>Bezeichnung/ Größe</u>	<u>Einheit</u>
2-AG	2-Arachidonylglycerid	-
AM-251	CB ₁ -Rezeptor-Antagonist	-
Anandamid	Arachidonylethanolamid	-
CI	Herzindex	ml/min/kg
CO	Herzminutenvolumen	ml/min
DAP	diastolischer Aortendruck	mmHg
DEVP _{max}	maximale linksventrikuläre Druckentwicklung	mmHg
dP/dt _{max}	Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit	mmHg/s
dP/dt _{min}	Maximale Druckabfallgeschwindigkeit	mmHg/s
HF	Herzfrequenz	1/min
HU-210	CB ₁ -Rezeptor-Agonist	-
Indices	Werte/kg Körpergewicht	kg ⁻¹
K ₀ -K ₄	Kammersteifigkeitskonstante	mmHg
KG	Körpergewicht	g
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie	-
LG	Lungengewicht	g
LPS	Lipopolysaccharide	-
LVG	linksventrikuläres Gewicht	g
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck	mmHg
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck	mmHg
MAP	mittlerer Aortendruck	mmHg
MI	Myokardinfarkt	-
Q _{peak}	maximale aortale Flussgeschwindigkeit	ml/min
RAP	mittlerer rechtsatrialer Druck	mmHg
RVG	rechtsventrikuläres Gewicht	g
SAP	systolischer Aortendruck	mmHg
SEM	Standardfehler des Mittelwertes	-
SR	SR141716 A (CB ₁ -Rezeptor-Antagonist)	-
SV	Schlagvolumen	ml
TPR	totaler peripherer Widerstand	mmHg·min/ml

Berechnungen abgeleiteter Größen

<u>Abkürzung</u>		<u>Berechnung</u>	<u>Einheit</u>
MAP	=	$1/3 \cdot (\text{SAP} - \text{DAP}) + \text{DAP}$	mmHg
TPR	=	$\text{MAP} - \text{RAP} / \text{CO}$	mmHg min/ml
SV	=	CO / HF	ml
DEVP_{max}	=	$\text{LVSP}_{\text{max}} - \text{LVEDP}$	mmHg

Teil I

Freisetzung von Endocannabinoiden im kardiogenen Schock, ihr Einfluss auf kardiovaskuläre Funktionsparameter und auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion.

Der kardiogene Schock ist durch einen systolischen Blutdruck $< 80-90$ mmHg, einen erniedrigten Herzindex $< 1,8$ L/min/m² und einen meist erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck (> 20 mmHg) gekennzeichnet (39). Er ist eine häufige Todesursache von Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Die Inzidenz des kardiogenen Schocks liegt bei 7%, die Mortalität ohne Revaskularisierung beträgt 70-85% (39). Die Ergebnisse der SMASH (40) und SHOCK (41) Studien zeigen, dass auch nach Revaskularisierung die Prognose des kardiogenen Schocks erschreckend schlecht ist. Selbst bei überstandenen kardiogenen Schock ist die 5-Jahres-Überlebensrate immer noch $< 40\%$. Es scheint sinnvoll, die dem Schockgeschehen zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, zumal eine spezifische pharmakologische Prophylaxe oder Therapie bislang nicht existiert.

Erste Nachweise eines aktivierten Endocannabinoid-Systems in pathophysiologischen Situationen wurden 1997/98 erbracht. Im hämorrhagischen und im septischen Schock werden Cannabinoide von zirkulierenden Monozyten und Thrombozyten gebildet und führen durch Aktivierung peripherer CB₁-Rezeptoren zur schockassoziierten Hypotonie (42,43). Als Mediator dieses Effektes konnten Anandamid und 2-AG identifiziert werden.

I.1 Material und Methoden

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden adulte, weibliche Wistar-Ratten (Charles River GmbH Deutschland) verwendet, deren Gewicht vor Koronarligatur 275-300 Gramm betrug. Wie bei den anderen Versuchen auch, wurden die Tiere in Kunststoffkäfigen mit höchstens fünf Ratten bei konstanter Raumtemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten und waren einem zwölfstündigem Tag-Nacht-Zyklus unterworfen. Sie erhielten normales Rattenfutter und Wasser ad libitum. Vor Beginn der Experimente hatten die Tiere eine einwöchige Eingewöhnungszeit.

Operationsbeschreibung

Es wurde ein experimenteller Myokardinfarkt durch Koronarligatur oder eine Scheinoperation durchgeführt. Hierzu wurde die Methode von Pfeffer et al. verwendet (44). Nach Narkoseeinleitung im Äthertopf wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte (Thermorex, Beurer) gelagert und fixiert, anschließend wurden die Femoralgefäße freipräpariert. Nach distaler Ligatur mit 4-0 Permasidefäden (Ethicon, Deutschland) und Eröffnung des Gefäßes wurde eine Plastikkanüle (PE 50, Portex, England) in die rechte Vena femoralis gelegt, durch die anschließend Urethan zur Aufrechterhaltung der Anästhesie verabreicht wurde. Urethan (0,7 g/kg i.v. + 0,3g/kg i.p.) wurde verwendet, da es die kardiovaskulären Parameter unbeeinflusst lässt (45) und intravenös gut zu applizieren ist.

Zur Messung der hämodynamischen Basiswerte (Blutdruck, Herzfrequenz) wurde die rechte Arteria femoralis ebenfalls kanüliert.

Um die Sauerstoffversorgung nach Infarkt sicherzustellen und um die atemdepressive Wirkung der Anästhesie aufzufangen, wurden die Tiere tracheotomiert und mit 90 Atemzügen pro Minute und einem Atemhubvolumen von 2,8 ml beatmet (Rodent Ventilator 7025, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland).

Der Myokardinfarkt wurde durch Ligatur des Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie erzeugt. Zum Freilegen des Herzens wurde die Ratte zunächst über der Einschnittstelle rasiert und anschließend die Haut mit einer Schere durchtrennt.

Darauf erfolgte die stumpfe Durchtrennung der Mm. pectorales. Nach interkostalem Zugang in die Thoraxhöhle und Eröffnung des Perikardbeutels wurde durch äußerlichen Druck auf die Brustwand und Spreizung der Rippen das Herz aus Thorax und Perikard luxiert, so dass der Ramus interventrikularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie umstochen und ligiert (Prolene Monofil 5-0-Faden) werden konnte. Bei der Schein-Operation wurde keine Ligatur durchgeführt. Innerhalb von 15-20 Sekunden erfolgte die Rückverlagerung des Herzens in den Thorax. Danach wurde die Operationswunde mit einer fortlaufenden Naht und die Haut durch Klammern verschlossen.

Der Infarzierung folgte eine zweistündige Aufzeichnung der hämodynamischen Basiswerte, bei Auftreten von Kammerflimmern wurden die Tiere durch seitliche Kompression des Thorax reanimiert. Um Blutkoagulationen im Katheter zu vermeiden, wurden die Tiere nach Myokardinfarkt heparinisiert (500 I.U./kg).

Alle Vorgehensweisen waren vom Tierschutzbeauftragten der Universität und von der Regierung von Unterfranken genehmigt und entsprachen den Empfehlungen der "American Heart Association on Research Animal Use".

Hämodynamische Messungen

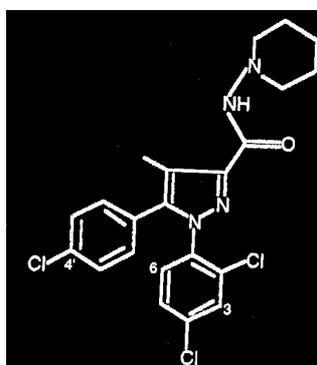
Die in der rechten Arteria femoralis liegende Kanüle war über einen Dreiwegehahn mit einem Drucksensor verbunden (Millar Tip-Catheter Pressure transducer SPC-350, Millar Instruments Inc., USA). Zur Signalverarbeitung diente ein modulares Biosystem (Firma ZAK, Simbach), zur Registrierung ein Mehrfachkanal-Thermoschreiber (Graphtec Linearcorder Mark VII WR 3101, Firma ZAK, Deutschland).

Es wurden systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck, sowie die Herzfrequenz in den ersten zwei Stunden nach Myokardinfarkt bestimmt.

Folgende Gruppen wurden zunächst verglichen:

- Ratten, die nur mit der Trägerlösung vorbehandelt wurden (1:1:8, Ethanol: Emulphor: Kochsalzlösung; 0,2 ml).
- Ratten, die 15 Minuten vor Koronarligatur mit dem selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten SR141716 A (N-[Piperidin-1-yl]-5-[4-Chlorphenyl]-1-[2,4-Dichlorphenyl]-4-Methyl-1H-Pyrazol-3-Carboxamid-HCl) vorbehandelt wurden (6,45 µmol/kg = 3 mg/kg i.v. in 1:1: 8, Ethanol: Emulphor: Kochsalzlösung; 0,2 ml).

SR141716 A



Zur Bestimmung der Mortalität in der jeweiligen Gruppe wurden zusätzlich Tiere infarziert, denen ebenfalls 15 min vor Infarkt entweder SR141716A oder Trägerlösung verabreicht wurde. Die Zahl der überlebenden Ratten wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden beobachtet, bei Kammerflimmern wurde diesmal keine Reanimation durchgeführt.

Um die Endocannabinoid-produzierenden Zellen im kardiogenen Schock zu identifizieren, wurden zirkulierende Monozyten und Thrombozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Koronarligatur aus dem Blut von infarzierten Ratten isoliert und anschließend unbehandelten Kontrollgruppen oder Tieren, die mit dem CB₁-Rezeptorantagonisten vorbehandelt wurden, intravenös injiziert.

Die Dosis des CB₁-Rezeptorantagonisten wurde so gewählt, dass gerade eine maximale Inhibierung der hypotensiven Wirkung von Anandamid erzielt wurde.

Fixierung und Planimetrie

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen wurden die Herzen entnommen, gewogen und bei -20°C tiefgefroren. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden mit dem

Schlittenmikrotom (Leica CM 1850, Bensheim) angefertigte Transversalschnitte der Herzen (etwa 15 Schnitte, entsprechend einem Schnittabstand von 1mm) 5 min lang bei einer Temperatur von 37°C in einer Lösung aus 3g Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in 260 ml Phosphat-Puffer angefärbt. Fixiert wurden die Schnitte durch Eintauchen in 10% Formalin-Lösung. Mittels TTC-Färbung ist eine akkurate Bestimmung der Infarktgröße bereits ab einer Stunde nach Myokardinfarkt möglich (46). Hierbei wird nicht-infarziertes Myokard ziegelrot gefärbt, infarziertes Myokard bleibt ungefärbt.

Es gingen nur die hämodynamischen Messungen von Ratten mit Myokardinfarkten >35% des linksventrikulären Gesamtmyokards in die Ergebnisse ein.

Zur planimetrischen Analyse wurden die Präparate in 16 facher Vergrößerung in einem Mikroskop (Laborlux S, Leitz, Deutschland) dargestellt und durch eine Scannerkamera (3CCD-IRIS, Sony) über eine Videoschnittstelle in einen Computer eingescannt. Mit dem Cursor wurden die infarzierten Areale der verschiedenen Schnitte eines Ventrikels sowie der gesamte Ventrikel epi- und endokardial umfahren und aus den ermittelten Werten mit Hilfe eines speziellen Computer-Programms zum Bearbeiten gescannter Daten (Sigma Scan Pro, Jandel Scientific, USA) die relativen infarzierten Anteile der einzelnen Querschnitte errechnet. Hieraus ging wiederum durch statistische Mittelung die prozentuale Infarktgröße in Relation zum linksventrikulären Gesamtmyokard hervor.

Zellisolierung

Zur Durchführung der Transfusionsversuche und zur Quantifizierung der Endocannabinoide wurde 30, 60 oder 120 Minuten nach Koronarligatur Blut von Infarkt- und von Kontrolltieren über die arterielle Kanüle abgenommen und die darin enthaltenen Monozyten und Thrombozyten durch die folgenden Verfahren isoliert. Die Blutentnahme erfolgte bei narkotisierten Ratten, die nicht für hämodynamische Messungen verwendet wurden. Zunächst wurde, um den enzymatischen Abbau der Endocannabinoide zu verhindern, dem Blut soviel Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) hinzugefügt, dass vor Weiterverarbeitung eine Konzentration von 200 µM PMSF in der Blutprobe vorhanden war. Durch Zentrifugation (100g, 15min) wurde anschließend das thrombozytenreiche Plasma gewonnen, welches erst abpipetiert, dann zentrifugiert (800g, 15min) wurde. Das am Boden des Zentrifugenröhrchens entstandene "Pellet"

(Thrombozyten) wurde anschließend zur Weiterverarbeitung in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS: phosphate-buffered-saline, 0,2 ml) suspendiert.

Die mononukleäre Zellfraktion wurde aus dem übrigen Blut (ohne thrombozytenreiches Plasma) nach der Methode von Böyum isoliert (47). Hierbei wurden 5 ml heparinisiertes Blut vorsichtig auf eine Phase aus Histopaque-1077 (Sigma) pipetiert und zentrifugiert (400g, 20 min). Die Fraktion aus mononukleären Zellen bildete eine weiße Schicht in der Interphase, die abpipetiert werden konnte, Erythrozyten und Granulozyten bildeten am Boden des Röhrchens die untere Phase. Die mononukleäre Zellfraktion wurde ebenfalls in phosphatgepufferte Kochsalzlösung suspendiert und die Lösung zentrifugiert (800g, 20 min). Das entstandene Pellet wurde in 0,2 ml PBS gegeben, die gewonnene Lösung (pro Tier $\sim 2 \times 10^6$ Makrophagen und $2 - 4 \times 10^7$ Lymphozyten enthaltend) wurde, wie auch die Thrombozyten, entweder für Transfusionsversuche oder für biochemische Analysen verwendet.

Biochemische Analyse von Anandamid und 2-AG

Aus 25-30 ml gepooltem Blut von Ratten mit Myokardinfarkt oder von gesunden Kontrolltieren wurden die Thrombozyten und Makrophagen wie oben beschrieben isoliert. Nach Suspendierung in 1ml Kochsalzlösung wurden die Proben mit 1 nmol d8-Anandamid und mit 10 nmol d8-2-AG als internen Standard versehen. Durch die exakte Bestimmung des internen Standards kann ein zwischen Probennahme und Probenanalyse entstandener Schwund (z.B. durch Abbau) erkannt werden. Die Lipidfraktion wurde aus den Zellen durch Zufügen des doppelten Volumens eines Chloroform-Methanolgemisches (2:1, v/v) extrahiert und konnte durch Zentrifugation und anschließendes Abpipetieren der unteren, organischen Phase von den Zellen und der Kochsalzlösung getrennt werden. Dieser Vorgang wurde dreimal unter alleinigem Zufügen von Chloroform wiederholt. Die organische Phase mit den darin gelösten Endocannabinoiden wurde durch Stickstoffbegasung vollständig evaporiert und anschließend durch Hinzufügen einer eiskalten Chloroform-Aceton-Mischung wieder in Lösung gebracht. Die hierdurch präzipitierten Proteine, konnten nun nach Zentrifugation abpipetiert werden. Die verbleibende Lösung wurde evaporiert, der Rückstand schließlich in 0,1 ml Methanol gelöst und bis zur Analyse bei -70°C tiefgefroren. Die Detektion der Endocannabinoide erfolgte durch

Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie (LC /MS) im Labor von Prof. Kunos, NIAAA, Bethesda, Maryland, USA. Hierzu wurden die Zellextrakte durch Flüssigkeitschromatographie ("reverse-phase high-performance liquid chromatographie") an einer ODS-Säule (Supelcosil, 5 µm, 4,6 mm x 15 cm) fraktioniert. Es wurde eine mobile Phase aus Methanol/ Wasser/ Essigsäure (85:15:0,03 v/v/v) verwendet, mit einer Fließgeschwindigkeit von 1ml/min (Waters 2690 system). Danach folgte die Analyse mit dem Massenspektrometer (Micromass Quattro II Massenspektrometer), das mit einer unter Atmosphärendruck arbeitenden chemischen Ionisierungsquelle ausgestattet war. Zwei ausgewählte Ionen konnten nun gleichzeitig detektiert werden: m/z 387,2 für d8-2-AG-Ionen als internen Standard, m/z 379,2 für 2-AG-Ionen, m/z 356,2 für d8-Anandamid-Ionen als internen Standard und m/z 348,2 für Anandamid-Ionen. Die Ergebnisse der Cannabinoid-Konzentrationen konnten nun in pmol pro ml Blut angegeben werden, das Detektionsminimum lag bei 0,01 pmol/ml.

Endotheliale Funktion

Nach Abschluss der hämodynamischen Untersuchungen wurde die Aorta descendens aus Thorax und Abdomen herauspräpariert, nach Befreiung von umgebendem Bindegewebe in 3 Millimeter breite Ringen zerteilt und zur isometrischen Kraftmessung in Myographen (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) aufgespannt. Im Organbad wurden die Gefäßringe mit oxygeniertem (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Henseleit-Puffer (NaCl 118 mmol/l, KCL 4,7 mmol/l, MgSO₄ 1,2 mmol/l, CaCl₂ 1,6 mmol/l , K₂HPO₄ 1,2 mmol/l , NaHCO₃ 25 mmol/l, Glukose 25 mmol/l; pH 7,4, 37°C) umspült, dem Diclofenac (1 µmol/l) als Cyclooxygenaseinhibitor beigefügt wurde. Unter konstantem Zug von 2g wurden die Ringe über einen Zeitraum von 30 min äquilibriert und danach mehrfach mit KCL (100 mmol/l) kontrahiert, bis reproduzierbare Antworten erzielt wurden. Anschließend wurden die Ringe mit Phenylephrin (0,3-1µmol/l) bis zu 80% der maximalen Kontraktionsstärke vorkontrahiert und schließlich die relaxierende Wirkung der kumulativen Gabe von Acetylcholin oder Nitroprussidnatrium ermittelt.

Verabreichte Substanzen

SR141716A war ein Geschenk von Sanofi Recherche (Montpellier, Frankreich).

Anandamid, 2-AG, d8-Anandamid und d8-2AG wurden von Deva Biotech (Hatboro, PA), Acetylcholin, NO, Phenylephrin, TTC und Histopaque-1077 von Sigma bezogen.

Statistische Auswertungen

Die zeitabhängige Wirkung des Herzinfarktes und der verabreichten Substanzen auf Blutdruck und Herzfrequenz wurde mit ANOVA, gefolgt von Bonferroni's Post-Hoc Test ermittelt. Die Unterschiede zwischen den mit dem Rezeptorantagonisten vorbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Blutproben der Gruppen mit und ohne Myokardinfarkt wurden mit dem Student's impaired T-Test analysiert. Überlebensraten wurden durch Fisher's Exact Test analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,05 wurden als signifikant für die Nullhypothese bewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

I.2 Ergebnisse

Zwischen den 12 mit dem Rezeptorantagonisten vorbehandelten Ratten und den 16 Tieren der Kontrollgruppe gab es vor Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede bezüglich des arteriellen Mitteldruckes, der Herzfrequenz, des Körpergewichts, des Herzgewichts und der Infarktgröße.

Tabelle 1.1 Ausgangswerte vor Infarkt

	n	MAP	Herz- frequenz	Körper- gewicht	Herzgewicht	Infarktgröße
Co	16	126 +/- 2	392 +/- 11	284 +/- 9	1.20 +/- 0.04	38.3 +/- 3,7
SR	12	121 +/- 3	380 +/- 10	277 +/- 3	1.11 +/- 0.04	39.9 +/- 3,6

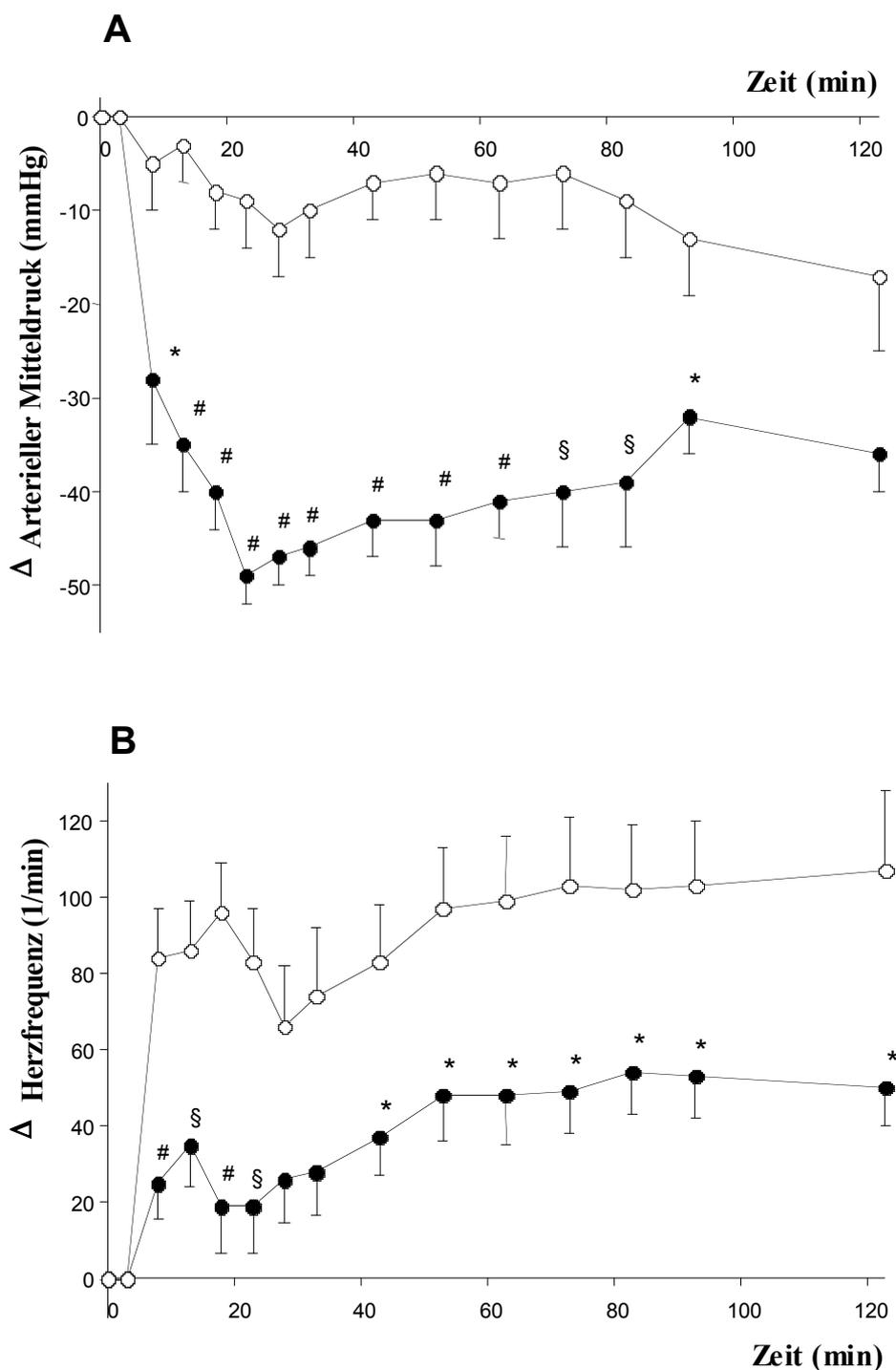
Ausgangswerte von MAP (mmHg), Herzfrequenz (Schläge/min), Körpergewicht (g), Herzgewicht (g) und Infarktgröße (%) von entweder mit Trägersubstanz (Co) oder mit 6.45 $\mu\text{mol/kg}$ SR141716A (SR) 15 min vor experimentellen Myokardinfarkt vorbehandelten Ratten.

Durch Gabe des CB₁-Rezeptor-Antagonisten wird der Blutdruckabfall im kardiogenen Schock antagonisiert.

Unmittelbar nach Ligatur der Koronararterie konnte eine lang-anhaltende Hypotonie gemeinsam mit einer moderaten Tachykardie beobachtet werden. Durch Gabe von SR konnte der Abfall des arteriellen Mitteldruckes nahezu vollständig verhindert werden, die Tachykardie wurde signifikant verstärkt. Wie vorangegangene Experimente gezeigt hatten, blieb die Verabreichung von SR bei gesunden, unauffälligen Tieren ohne signifikante Veränderungen des arteriellen Mitteldruckes und der Herzfrequenz.

Abbildung I/1

Entwicklung von arteriellem Mitteldruck und Herzfrequenz nach Infarkt

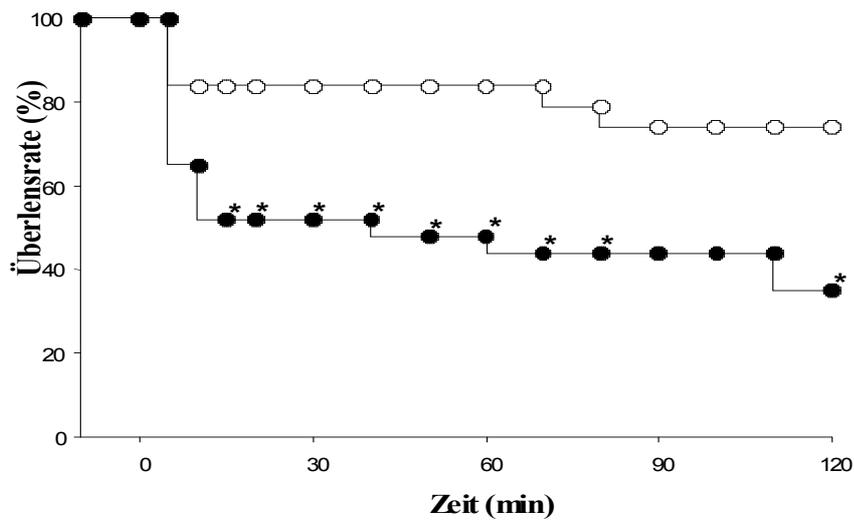


Arterieller Mitteldruck (A) und Herzfrequenz (B) nach Infarzierung von Kontrolltieren (dunkle Kreise; n=16) und von mit SR 141716 A (helle Kreise; n=12) vorbehandelten Tieren (6,45 μ mol/kg i.v.). Infarzierung zum Zeitpunkt 0, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar. Signifikante Unterschiede (* p < 0,05; § p < 0,01; # p < 0,001) gegenüber korrespondierenden Werten in Abwesenheit von SR.

SR 141716A verstärkt die Frühmortalität nach Myokardinfarkt

Die nachfolgenden Untersuchungen zur Mortalität infarzierter Tiere nach SR-Gabe zeigen jedoch, dass die Überlebensrate trotz vermindertem Blutdruckabfall in dieser Gruppe nur 40% betrug, während sie in der Kontrollgruppe bei 76% lag.

Abbildung I/2 Mortalität



Überlebensrate nach CB₁-Rezeptor-Antagonisierung (dunkle Kreise) im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Infarzierung zum Zeitpunkt 0. * Signifikante Unterschiede (p<0,05) gegenüber den korrespondierenden Werten in Abwesenheit von SR141716A.

Durch Myokardinfarkt (MI) wird die Cannabinoidsynthese in zirkulierenden Makrophagen und Thrombozyten erhöht

Isolierte Monozyten und Thrombozyten aus Kontroll-Ratten hatten nach Transfusion in unbehandelte Empfängerratten keinen Einfluss auf den arteriellen Mitteldruck oder auf die Herzfrequenz. Die Transfusion von Monozyten und Thrombozyten von Tieren mit MI führte in unbehandelten Tieren zu einem sich langsam entwickelnden, lang anhaltenden Blutdruckabfall. Bei mit SR vorbehandelten Tieren wurde der arterielle Mitteldruck eher verstärkt, während die Herzfrequenz unverändert blieb.

Sowohl Anandamid als auch 2-AG konnten in Proben von Monozyten und Thrombozyten aus den Blut von infarzierten Tieren nachgewiesen werden, während in Proben von unbehandelten Kontrollen oder schein-operierten Tieren keine Cannabinoide messbar waren. Das Detektionsminimum lag bei ~ 0,01 pmol/ ml.

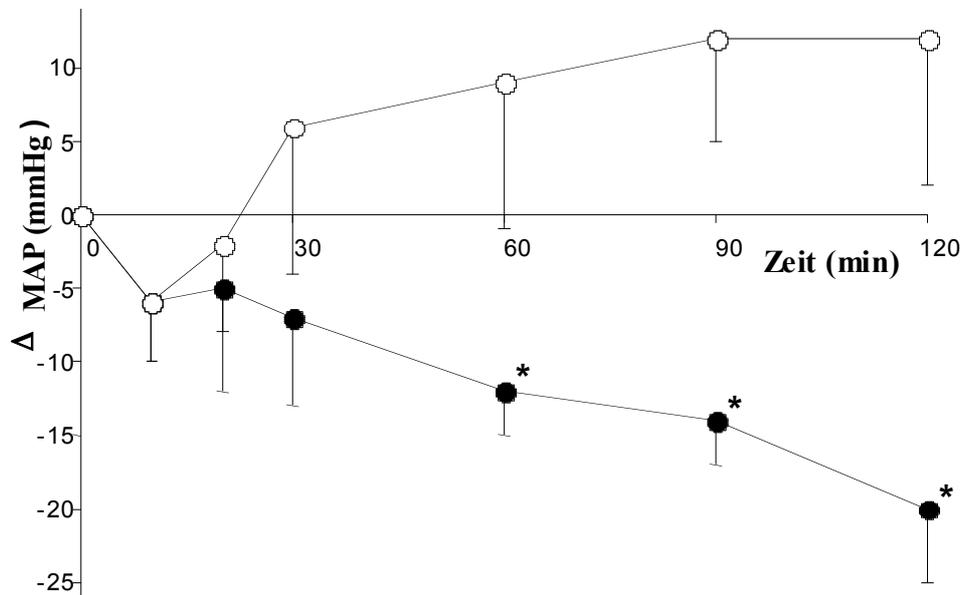
Tabelle I/2 Produktion von Anandamid und 2-AG in Thrombozyten und Monozyten von Kontrolltieren, von Tieren mit Myokardinfarkt und von sham-operierten Tieren

	Kontr.	30	60	120	Sham
Anandamid, Thrombozyten	n.m.	0.48	n.m.	0.08	n.m.
Anandamid, Makrophagen	n.m.	1.55	0.15	0.38	n.m.
2-AG, Thrombozyten	n.m.	3.6	13.1	7.1	n.m.
2-AG, Makrophagen	n.m.	8.7	1.1	9.8	n.m.

n.m. = nicht meßbar

Die Werte entsprechen pmol Anandamid oder 2-AG pro ml Blut. In jeder Gruppe wurde das Blut von je 3-4 Ratten gepoolt und anschließend die Cannabinoid-produzierenden Zellen isoliert. Zellen von Ratten mit MI wurden 30, 60 oder 120 Minuten nach MI entnommen, die von von sham-operierten Tieren 120 Minuten nach Operation.

Abbildung I/3 Änderung des arteriellen Mitteldruckes von Empfängerratten nach Transfusion von zirkulierenden Monozyten und Thrombozyten aus dem Blut von infarzierten Tieren.

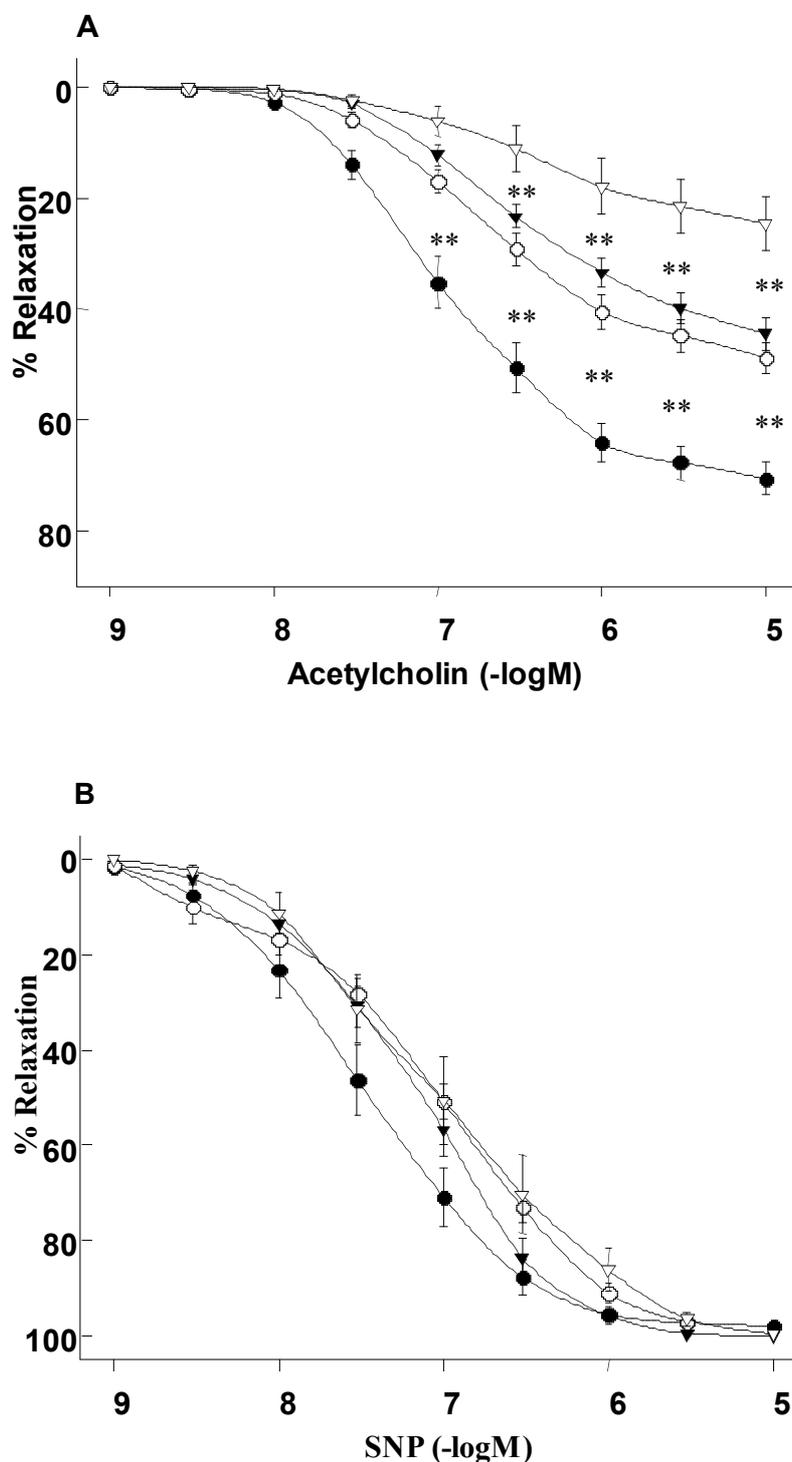


Die Zellen wurden Kontrolltieren (dunkle Kreise; n=5) und Tieren die, mit SR 141716A (helle Kreise; n= 4) vorbehandelten waren, zum Zeitpunkt 0 injiziert. Die Verabreichung von SR allein hatte keine signifikante Auswirkung auf den arteriellen Mitteldruck und die Herzfrequenz. *Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber korrespondierenden Werten.

Verstärkung der endothelialen Dysfunktion nach Gabe von SR 141716A

Im Vergleich zu sham-operierten Ratten war die Acetylcholin-induzierte und damit die endothelabhängige Dilatation von Aortenringen bei Tieren mit Myokardinfarkt vermindert (Abb.1.4.A). Hingegen blieb die Relaxation von Aortenringen nach Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Nitroprussidnatrium unverändert. Die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation war nach Vorbehandlung von sham-operierten Tieren mit SR bereits reduziert und bei Ratten mit Myokardinfarkt darüber hinaus verschlechtert. Die Wirkung von Nitroprussidnatrium hingegen war in allen Gruppen identisch.

Abbildung I/4 Auswirkung der CB₁-Rezeptor-Antagonisierung auf die endotheliale Funktion



Relaxation induziert durch Acetylcholin und Natrium-Nitroprussid (SNP) bei vorkontrahierten Aortenringen von Ratten 2 Stunden nach Infarzierung (helle und dunkle Dreiecke) verglichen mit Sham-operierten Tieren (helle und dunkle Kreise). Die Ratten waren entweder unvorbehandelt (dunkle Kreise und Dreiecke) oder mit SR 141716A vorbehandelt (6,45 μ mol/kg i.v. 15 min vor Infarzierung) (helle Kreise und Dreiecke). N=8 bis 12, * * p<0,01 für unbehandelte Ratten mit MI gegenüber sham-operierten Ratten gegenüber mit SR141716A behandelten Tieren mit Myokardinfarkt.

I.3 Diskussion

Zusammenfassend kann anhand der durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass aktivierte CB₁-Rezeptoren zur Blutdrucksenkung nach experimentellem Myokardinfarkt bei der Ratte beitragen und dass die Endocannabinoide Anandamid und 2-AG, welche den CB₁-Rezeptor aktivieren, von zirkulierenden Monozyten und Thrombozyten gebildet werden. Durch Gabe des spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten SR141716A kann der Blutdruckabfall nach Koronarligatur weitgehend verhindert werden, jedoch wird hierdurch die endotheliale Dysfunktion verstärkt und die Mortalität erhöht.

Somit kann die Hypothese bestätigt werden, dass Endocannabinoide, ähnlich den eingangs für den septischen (43) und den hämorrhagischen (42) Schock beschriebenen Vorgängen, auch im kardiogenen Schock durch CB₁-Rezeptor-Aktivierung eine wesentliche Rolle in der Vermittlung der Blutdrucksenkung während des Schockgeschehens innehaben.

Tachykardie nach Gabe von SR

Der von uns aufgezeichnete Blutdruckabfall von ~ 50 mmHg nach Koronarligatur ist in Übereinstimmung mit den wenigen veröffentlichten Daten zum kardiogenen Schock der Ratte (48), jedoch konnten wir anstatt einer Bradykardie (49) eher eine Tachykardie beobachten, die nach Gabe von SR weiter verstärkt wurde. Der durch das medulläre Kreislaufzentrum zur Schockkompensation induzierten Tachykardie könnte die bradykarde Wirkung der Endocannabinoide (29) teilweise entgegenwirken. Durch Verabreichung des Rezeptorantagonisten wäre dieser Effekt wieder aufgehoben, wodurch die verstärkte Tachykardie nach Gabe von SR erklärt werden könnte.

Hat die Endocannabinoid-induzierte Dilatation der Koronar-und Zerebralarterien Auswirkung auf die Mortalität?

Zwar konnte die Entstehung des kardiogenen Schocks durch Vorbehandlung der Tiere mit dem CB₁-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden, jedoch war die Mortalitätsrate dabei nahezu verdoppelt. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde zuvor bei Experimenten mit Ratten im hämorrhagischen Schock gefunden (42), zudem konnte hier, ebenso wie im septischen Schock, die Überlebensrate durch Vorbehandlung der Tiere mit Δ^9 -

Tetrahydrocannabinol verbessert werden (42,43). Wie die unverändert hohe Mortalitätsrate bei Patienten nach hochdosierter Verabreichung von Katecholaminen zeigt, führt die alleinige Aufrechterhaltung des Blutdrucks auch mit anderen Mitteln zu keiner signifikanten Besserung. Frühere Experimente der Arbeitsgruppe mit radioaktiven Mikrosphären hatten gezeigt, dass die Verabreichung von Anandamid insbesondere in den Koronar (50) - und Zerebralarterien (35) eine Reduzierung des vaskulären Widerstandes bewirkt und dass diese Vasodilatation auch bei Aufrechterhaltung des systemischen Blutdruckes durch Volumensubstitution unverändert bleibt (31). Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass die Dilatation in diesen Gefäßen nur auf eine autoregulative Antwort bei systemischer Hypotonie zurückzuführen ist. Die durch erhöhten Sympathikotonus und verstärkter Ausschüttung von Katecholaminen resultierende Vasokonstriktion ist eine Anpassungsreaktion, die zwar dem systemischen Blutdruckabfall entgegenwirkt, die sich jedoch durch die resultierende Verminderung des Blutflusses und der damit verbundenen Ischämie in den besonders empfindlichen Organen Herz und Gehirn fatal auswirken könnte. Im Schock kommt es zum *circulus vitiosus* aus systemischer arterieller Hypoperfusion, verminderter koronarer Perfusion, vermindertem Herzzeitvolumen und daraus resultierender verstärkter Hypotonie (51). Endocannabinoide könnten die Funktion haben, die Gewebsperfusion in den kritischen Organen aufrechtzuerhalten – eine Wirkung, die durch Vorbehandlung der Tiere mit dem CB₁-Rezeptorantagonisten verhindert werden würde.

Einfluss der CB₁-Rezeptor-Blockade auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion nach Myokardinfarkt

Bei chronischer Herzinsuffizienz ist das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion und der damit einhergehende Anstieg des peripheren Widerstandes ein bekanntes Problem (52). In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass bereits bei Ratten unmittelbar nach MI die endothelabhängige arterielle Gefäßerweiterung, nicht aber die direkte Vasorelaxation durch Nitroprussid-Natrium, beeinträchtigt ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bereits beim hämorrhagischen Schock und beim Endotoxinschock gemacht (53). Im septischen Schock wird durch SR eine endothelabhängige Vasokonstriktion induziert, deren Ursache wahrscheinlich in der Antagonisierung der

vasodilatatorischen Wirkung eines lokal produzierten Cannabinoids liegt (54). Wir konnten keinen Endocannabinoid-Gehalt in Monozyten und Thrombozyten von shamoperierten Tieren feststellen. 2-AG wird jedoch in vaskulären Endothelzellen synthetisiert und seine Produktion wird durch Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren erhöht (55). Ferner wurde publiziert, dass durch SR die vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin partiell inhibiert wird. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass 2-AG neben NO ein weiterer endothelialer Mediator der Acetylcholinwirkung sein könnte (56). Dies würde plausibel erklären, weshalb die nach Myokardinfarkt entstandene endotheliale Dysfunktion durch SR-Behandlung weiter verschlechtert wurde. Dies könnte auch zur erhöhten Mortalität der mit SR-vorbehandelten, infarzierten Tieren beigetragen haben. Somit gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten für die verminderte Überlebensrate der mit dem CB₁-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tiere:

- 1) Antagonisierung der bei erniedrigten MAP und erhöhtem Sympathikotonus durch Endocannabinoide induzierten blutflusserhöhenden Dilatation in den Koronar- und Zerebralarterien.
- 2) Verstärkung der endothelialen Dysfunktion, wahrscheinlich durch Antagonisierung einer endothelialen Mediatorfunktion von Endocannabinoiden in der Acetylcholinwirkung.

Mechanismen der Schockentstehung

Isolierte Monozyten und Thrombozyten aus dem Blut von Ratten im kardiogenen Schock induzieren nach Transfusion in unbehandelten Empfängerratten eine Hypotonie. Nach Transfusion von Zellen aus nicht- infarzierten Kontrolltieren ist hingegen kein Blutdruckabfall erkennbar. Hieraus wird deutlich, dass auch im kardiogenen Schock die Endocannabinoide Anandamid und 2-AG von zirkulierenden Monozyten und Thrombozyten gebildet werden, wie dies bereits für den hämorrhagischen und den septischen Schock gezeigt wurde (42,43).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) als auslösendes Agens zur Produktion von Endocannabinoiden in Makrophagen und Thrombozyten identifiziert werden (31,57). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bakterielle LPS auch bei der leberzirrhoseassoziierten Hypotonie vermehrt im Blut zu

finden sind (58). Es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass auch im kardiogenen Schock bakterielle Lipopolysaccharide infolge von Darmwandischämien aus dem Darm ins Blut diffundieren (59) und dort zu einer Immunaktivierung mit gesteigerter Zytokinausschüttung, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), führen (60). Somit könnten auch im kardiogenen Schock bakterielle Lipopolysaccharide auslösendes Agens einer Endocannabinoid-Ausschüttung und der dadurch ausgelösten Hypotonie sein.

Im Endotoxinschock kommt es in Reaktion auf die Endotoxämie zu einer Aktivierung des Endothels, woraus eine verstärkte Adhäsion von Monozyten und Thrombozyten folgt (61). Die aus diesen Zellen ausgeschütteten Cannabinoide könnten durch einen parakrinen Mechanismus direkt an vaskulären CB₁-Rezeptoren binden, wodurch die lokalen Konzentrationen der Substanzen am Wirkort deutlich erhöht wären. Durch diesen Mechanismus könnte die zellulär-vermittelte blutdrucksenkende Wirkung von Anandamid und 2-AG bei geringer Plasmakonzentration erklärt werden. Zudem reduzieren hoch-affine Wiederaufnahmemechanismen, wie sie für Anandamid in Neuronen und Makrophagen bekannt sind (18,20) zusätzlich die Konzentrationen der Endocannabinoide im Plasma. Endocannabinoide entfalten ihre Wirkung über CB₁-Rezeptoren auf vaskulären Gefäßmuskelnzellen, auf postganglionären sympathischen Nervenendigungen, oder auch direkt auf dem Endothel (33,35,36).

Endocannabinoide und das zytokine System im kardiogenen Schock

Die komplexen Störungen des Zellstoffwechsels im Schock lassen sich somit nicht allein durch O₂-Mangel, Ischämie und Energieverarmung erklären. Toxine, Mediatoren und die neurohumoralen Adaptations- und Dysregulationsmechanismen sind daran ebenfalls entscheidend beteiligt. Endocannabinoide zeigen viele Eigenschaften von neurohumoralen Mediatoren (62). Für den septischen Schock ist eine Dysbalance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen beschrieben, die eigentlich eine körpereigene Abwehrreaktion zur Bekämpfung von Sepsis und Schock darstellt, schließlich aber selber zu Multiorganversagen führt (63). Durch inflammatorische Reaktionen und durch systemische Hypoxie kommt es im kardiogenen Schock, wie auch im septischen Schock, zur Freisetzung von monozytenaktivierenden Zytokinen, wie dem TNF- α (60) und monozyteninhibierenden

Zytokinen, wie Interleukin-10 (64). Cannabinoide sind selbst in der Lage über einen CB₁-Rezeptor-vermittelten Mechanismus die Zytokinkonzentrationen nach Lipopolysaccharid-Gabe bei Mäusen zu modulieren (65). Die TNF- α -Konzentration nach Gabe von CB₁-Rezeptoragonisten wird vermindert und die IL-10-Konzentration erhöht. Dass diese Wirkung CB₁-Rezeptor-vermittelt ist, wird dadurch deutlich, dass sie durch Gabe von SR141716A blockiert werden kann, nicht aber durch einen selektiven CB₂-Rezeptorantagonisten (66). Ein Beispiel für die Bedeutung von Monozyten und ihre Interaktion mit Zytokinen im Frühstadium nach MI ist die Entdeckung des „monocytes chemotactic and activating factor“ (MCAF) und des „monocyte chemoattractant protein-1“(MCP-1) (67) als inflammatorische Mediatoren bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Diese Zytokine werden von Mononukleären Zellen, Endothel und Gefäßmuskelzellen als Antwort auf LPS oder TNF- α gebildet (67). Inwiefern das Endocannabinoidsystem eine regulatorische Funktion innerhalb dieses komplexen Systems innehat, muss in künftigen Studien weiter untersucht werden.

Teil II

Einfluss der Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung und -Inhibierung auf die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz und auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion

Die bradykardisierende und vasodilatatorische Potenz von Cannabinoiden und ihre offenbar protektive Wirkung im kardiogenen Schock war Grund, den Einfluss von chronischer Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung und -Inhibierung auf die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz zu untersuchen. Auf den Ergebnissen von Teil I aufbauend wurden zusätzlich Versuche zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion durchgeführt, diesmal zusätzlich unter CB₁-Rezeptor-Agonisierung.

Pathophysiologische Mechanismen bei der Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist klinisch durch eine verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung gekennzeichnet. Eine Vielzahl kardialer und extrakardialer Störungen kann das Entstehen einer chronischen Linksherzinsuffizienz verursachen oder begünstigen, ihre häufigste Ursache ist heute jedoch eine Störung der Koronardurchblutung (68). Im experimentellen Modell dieser Erkrankung werden durch Koronararterienligatur am Rattenherzen größere Teile des linken Ventrikels ischämisch und verlieren damit ihre Kontraktionsfähigkeit. In Abhängigkeit von der Größe des infarzierten Areals kommt es zu einer Abnahme der myokardialen Leistung, was sich in einer Studie von Pfeffer und Fishbein bei großen Infarkten insbesondere in einer reduzierten isometrischen Druckentwicklung, erhöhtem Füllungsdruck und reduziertem Herzzeitvolumen manifestiert hat (69). Die verminderte Auswurfraction des Herzens nach MI führt zur Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens und Druckes, wodurch es zur kompensatorischen Aktivierung des Frank-Starling-Mechanismus kommt (Zunahme der Kontraktionskraft durch Dehnung der Herzmuskelfaser). Die linksventrikuläre Volumenzunahme kann initial zu einer Normalisierung des Schlagvolumens führen, da zur Förderung des gleichen Schlagvolumens bei einem größerem Füllungsvolumen eine deutlich geringere

Faserverkürzung notwendig ist, als bei einem kleinerem Volumen (70). Der mit der Druckerhöhung verbundene erhöhte Wandstress kann bis zu einem gewissen Grad durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten ausgeglichen werden (71), denn nach dem Laplace'schen Gesetz ist der Wandstress definiert als das Produkt aus dem ventrikulären Druck und dem Ventrikelradius, dividiert durch die doppelte Wanddicke. Im Tiermodell kommt es ab einem linksventrikulären Infarktanteil von etwa 40% jedoch zu einer progredienten linksventrikulären Dilatation mit verstärkter Gefügedilatation und Rarifizierung der Mikrozirkulation, wodurch die energetische Situation des Herzens weiter verschlechtert wird. Nach Überschreiten einer kritischen Vordehnung nimmt auch die durch den Frank-Starling-Mechanismus initiierte verstärkte Kontraktion wieder ab. Zudem steigt proportional mit dem Radius der Dilatation auch die Wandspannung, wodurch u.a. der myokardiale Blutfluss und konsekutiv die Kontraktilität und damit auch das Schlagvolumen abnehmen. Die progrediente linksventrikuläre Dilatation ist somit ein *Circulus vitiosus* bestehend aus der Zunahme des Wandstress, Abnahme der Ejektionfraktion, Abnahme des Schlagvolumens, Zunahme des enddiastolischen Volumens und damit weiterer Zunahme des Wandstresses (68) - sie führt schließlich zur Dekompensation der Herzleistung (72). Zudem kommt es durch den systemischen Blutdruckabfall zur Aktivierung von neurohumoralen Kompensationsmechanismen wie einem aktivierten Renin-Angiotensin-System (73) und sympathiko-adrenergen System (74). Diese bewirken zwar kurzfristig eine Erhöhung der Vorlast und durch systemische Vasokonstriktion die Aufrechterhaltung eines ausreichenden arteriellen Mitteldruckes, längerfristig wird aber die Progression der Herzinsuffizienz begünstigt und dadurch die Mortalität erhöht (75).

II.1 Material und Methoden

Versuchstiere

Es wurden erwachsene, weibliche Wistar Ratten als Versuchstiere verwendet, deren Gewicht vor Koronarligatur bei etwa 245 Gramm lag. Die Tiere waren innerhalb eines klimatisierten Tierstalls in Kunststoffkäfigen untergebracht und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus unterworfen. Sie erhielten normales Rattenfutter und Wasser ad libitum. Vor Beginn der Experimente wurde den Tieren eine einwöchige Eingewöhnungszeit zugestanden.

Die Technik der Infarzierung entsprach der im Teil I bereits detailliert für das Akutschockmodell beschriebenen Vorgehensweise (44,76). Im Unterschied zum beschriebenen Verfahren wurde die Anästhesie während der Infarzierung diesmal anstelle von Äther mit Isofluran im Inhalationstopf eingeleitet und anstelle von Urethan auch mit Isofluran aufrechterhalten. Hierzu wurden die Tiere nach Lagerung auf der Fixationsplatte intubiert und volumenkontrolliert beatmet.

Auch für dieses Projekt waren alle Vorgehensweisen vom Tierschutzbeauftragten der Universität und von der Regierung von Unterfranken genehmigt und entsprachen den Empfehlungen der "American Heart Association on Research Animal Use".

Verabreichte Substanzen, Dosisfindung

Zur Dosisfindung wurde der Blutdruck von Tieren unter Äther-Anästhesie über einen in die rechte A. Karotis gelegten Polyethylen-Katheter, der mit dem Microtip-Katheter (Millar) verbunden war, gemessen. Durch Verabreichung des CB₁-Rezeptorantagonisten AM-251 (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid) in der Dosierung von 0,5 mg/kg/Tag i.p. (aber nicht in der Dosierung von 0,25 mg/kg/Tag) wurde die blutdrucksenkende Wirkung von Anandamid (4 mg/kg i.v.) fast vollständig aufgehoben (-5±10 mm Hg vs. -45±1 mm Hg, n=3, p<0.01).

Der verwendete CB₁-Rezeptor-Agonist HU-210 ({}-11-OH- Δ ₉-Tetrahydrocannabinol-Dimethylheptyl), gehört zu den biologisch wirksamsten blutdrucksenkenden Substanzen und kann, intravenös verabreicht, in der Ratte den systolischen Blutdruck über mehrere

Stunden von 120 mm Hg auf 30-40 mm Hg absenken, ohne dass das Tier dauerhaften Schaden nimmt. Die Dosierung (50 µg/kg/d i.p) von HU-210 entsprach 10× der ED₅₀ der blutdrucksenkenden Wirkung nach intravenöser Gabe (16). Bisher gibt es keine andere Veröffentlichung zur Veränderung kardiovaskulärer Parameter unter chronischer CB₁-Rezeptor-Stimulation.

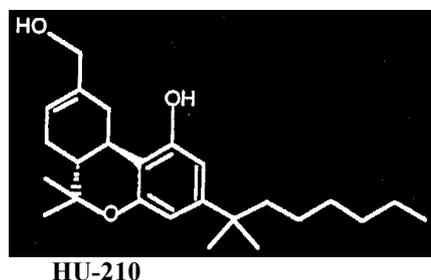
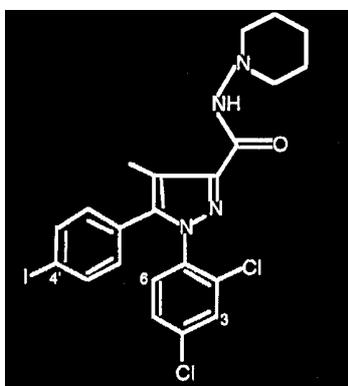
Einteilung in Behandlungsgruppen

Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere vor der Operation einer der drei Behandlungsgruppen zugeteilt. Über einen Zeitraum von zwölf Wochen hinweg erfolgte die Verabreichung der Substanzen täglich über eine intraperitoneale Injektion. Die erste Applikation erfolgte 24 Stunden nach Infarzierung, 24 Stunden vor den hämodynamischen Messungen wurden die Substanzen zum letzten Mal verabreicht. Um eine differenzierte Analyse der erhobenen Daten zu ermöglichen wurden die drei Behandlungsgruppen anhand der Infarktgröße in vergleichbare Untergruppen unterteilt (kein Infarkt, Infarktgröße < 40%, Infarktgröße > 40%). Insgesamt wurden also 9 Gruppen untereinander verglichen.

Die drei Behandlungsgruppen erhielten folgende Substanzen:

- Gruppe 1 (Kontrollgruppe) : Kochsalzlösung (0,5 ml/Tag)
- Gruppe 2 (CB₁-Rezeptor-Antagonist) : AM 251 (0,5 mg/kg/Tag)
- Gruppe 3 (CB₁-Rezeptor-Agonist) : HU- 210 (0,05 mg/kg/Tag)

AM-251



HU-210

Operation, Hämodynamische Messungen

Zwölf Wochen nach Infarkt wurden die hämodynamischen Werte der infarzierten Tiere ermittelt, die isovolumetrischen Maximaldrücke bestimmt, die passive Druck-Volumen-Kurve aufgezeichnet, die linksventrikulären Umbauprozesse vermessen und die vaskuläre Funktion der Aorta untersucht. Der narbige Umbau des infarzierten Gewebes ist zu diesem Zeitraum vollständig abgeschlossen (69). Der apparative Versuchsaufbau zur Durchführung der hämodynamischen Messungen war in diesem Projekt mit dem zuvor für den kardiogenen Schock beschriebenen Versuchsaufbau identisch, zusätzlich wurde ein zweiter Katheter über die rechte Vena jugularis interna in den rechten Vorhof geschoben. Dieser Katheter war mit einem Statham-Druckaufnehmer (Spektramed Statham p 50 Gould Inc., USA) verbunden. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte wieder in Anlehnung an die von Pfeffer und Fishbein entwickelte Methodik (44).

Die Narkoseeinleitung erfolgte im Äthertopf, nach Fixation auf der Wärmeplatte, Tracheotomie und Beatmung wurden zunächst die rechte A. carotis communis und die rechte V. jugularis operativ dargestellt, ligiert und kanüliert. Die Katheter wurden anschließend in den rechten Vorhof, bzw. in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Narkosetiefe wurde minimiert, es folgte die Bestimmung des rechtsatrialen Drucks (RAP), des linksventrikulären systolischen und enddiastolischen Blutdrucks (LVSP, LVEDP), der maximalen linksventrikulären Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt , $-dP/dt$), und der Herzfrequenz (HF). Der arterielle Katheter wurde unmittelbar danach in den Aortenbogen zurückgezogen und diesmal der systolische und der diastolische aortale Druck (SAP, DAP) und die Herzfrequenz registriert.

Nach Vertiefung der Narkose erfolgte die Eröffnung des Thorax durch einen mediosternalen Längsschnitt mit Hilfe eines Thermokauters (Erbotom Multiplex, Erbe Medizintechnik, Deutschland) und einer Schere. Der Brustkorb wurde mit einem Wundspreizer offengehalten, die Aorta ascendens wurde freipräpariert und mit einem 2-0 Permaseidefaden (Ethicon, Deutschland) umschlungen. Eine kalibrierte elektromagnetische Flowsonde (Gould Statham Blood Flow Transducer 2,5 mm, Gould Inc., USA) wurde an der Aorta platziert, um kontinuierlich die phasischen Werte der aortalen Flussgeschwindigkeit zu ermitteln, die als Herzindex (ml/min/kg

Körpergewicht) angegeben werden konnte. Hieraus konnte wiederum der totale periphere Widerstand ermittelt werden (MAP-RAP/CI).

Ebenfalls registriert wurde der systolische und der diastolische arterielle Druck, der rechtsventrikuläre Druck, sowie die Herzfrequenz. Um die Exaktheit der Daten zu gewährleisten, erfolgte die Registrierung über einen Zeitraum von zehn Minuten hinweg in regelmäßigen Abständen, die gemittelten Ergebnisse bildeten die hämodynamischen Basiswerte nach Thorakotomie.

Zur Bestimmung der isovolumetrischen Druckmaxima des linken Ventrikels wurde nach Entfernung der Flowsonde der Aortenkatheter in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Aorta ascendens wurde durch den zuvor gelegten Faden kurzzeitig (ca. 1-2 sek.) okkludiert, um eine maximale Druckentwicklung durch nahezu vollständige isovolumetrische Kontraktion zu erzielen. Die koronare Perfusion kann methodisch bedingt nicht unterbrochen werden. Gemessen wurden der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und der maximale linksventrikuläre systolische Druck ($LVSP_{max}$) und aus denen die maximale linksventrikuläre Druckentwicklung berechnet wurde ($DEVP_{max} = LVSP_{max} - LVEDP$). Unter mehreren Registrierungen wurde der Wert in die Ergebnisse aufgenommen, der eine maximale Druckentwicklung gefolgt von 4-5 gleichartigen Herzzyklen erkennen ließ. Durch die Messung wurde die maximale Druckentwicklungskapazität des linken Ventrikels bestimmt (76).

Da Isofluran in hohen Dosen blutdrucksenkend wirkt, wurden die hämodynamischen Messungen unter leichter Narkose durchgeführt (Dosierstufe 2), während die Eröffnung des Thorax unter tiefer Narkose (Dosierstufe 5) erfolgte.

Linksventrikuläres Volumen

Zur Bestimmung der passiven, mechanischen Parameter des linken Ventrikels (Druck-Volumen-Beziehung, Kammerelastizität) und des linksventrikulären Arbeitsvolumens (linksventrikuläres enddiastolisches Füllungsvolumen) wurde im Anschluss an die hämodynamischen Messungen eine Druck-Volumen-Kurve nach der Methodik von Fletcher (76) aufgezeichnet. Hierzu wurde zunächst der thorakale Zugang zum Herzen erweitert, das Perikard entfernt und 500 I.E Heparin zur postmortalen Gerinnungshemmung injiziert: Dann wurde das Herz durch Verabreichung von 1ml kardiopleger Kaliumchloridlösung arretiert. Nach Eröffnung der Aorta ascendens wurde

ein doppellumiger Katheter (PE 50 in PE 200) im linken Ventrikel platziert, dessen inneres Lumen mit dem Millar-Transducer und dessen äußeres Lumen mit einem Perfusor (Infusion Withdrawal Pump, Harvard Apparatus, USA) verbunden war. Durch eine Ligatur in der atrioventrikulären Ebene wurden Vorhöfe und Kammern voneinander getrennt und gleichzeitig der Katheter im Ventrikel fixiert. Um Flüssigkeitsakkumulation zu vermeiden wurde der rechte Ventrikel inzidiert. Nach erneutem Nullabgleich und Entleerung des linken Ventrikels durch manuelle Kompression konnte nun die Infusion von physiologischer Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,76 ml/min beginnen. Gleichzeitig wurde die Druckentwicklung unter konstantem Papiervorschub aufgezeichnet, so dass anhand der entstehenden Druck-Volumen-Kurve später das Füllungsvolumen zu einem spezifischen Druck berechnet werden konnte. Das linksventrikuläre Arbeitsvolumen war definiert als das Volumen im linken Ventrikel bei linksventrikulärem enddiastolischen Druck, der zuvor *in vivo* bestimmt worden war. Die Aufzeichnungen wurden stets bei einem negativen Ausgangsdruck von minus 5 mmHg begonnen, bei dem das Nullvolumen definiert war, und bei Erreichen des *in vivo* gemessenen linksventrikulären enddiastolischen Druckes beendet (mindestens bis 30 mm Hg). Die Registrierung wurde ein zweites Mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Kurve sicherzustellen. Zudem wurden die Steifigkeitskonstanten (K_0 , K_1 , K_2 , K_3 , und K_4) nach dem von Fletcher entwickelten Verfahren ermittelt (76). Hierzu wurde das linksventrikuläre Füllungsvolumen bei den Drücken von 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, und 30 mmHg anhand der Druck-Volumen-Kurve berechnet. Bis zum Eintreten des Rigor mortis etwa zehn Minuten nach Herzstillstand musste die Datenerhebung abgeschlossen sein.

Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurden die Herzen 24 Stunden lang in 10% Formalinlösung fixiert und bezüglich ihrer morphologischen Veränderungen untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe einer Schieblehre der intraventrikuläre Katheteranteil ermittelt (dessen Volumen zu dem ermittelten linksventrikulären Arbeitsvolumen hinzuaddiert wurde), ebenso wurden der Apex-Basis-Abstand, der maximale Durchmesser und die maximale Zirkumferenz des Herzens vermessen. Anschließend wurden zunächst Vorhöfe und Kammern, dann der rechte und der linke Ventrikel, dem das Septum interventrikuläre zugerechnet wurde, voneinander getrennt

und separat auf einer Analysewaage gewogen (Waage A120S, Fa. Satorius, D). Bis zur histologischen Aufarbeitung wurde das Herz nun wieder in Formalinlösung gelegt.

Fixierung und Planimetrie

Die isolierten linken Ventrikel wurden jeweils in die drei transversale Abschnitte Apex, mittlerer Ring und Basis aufgeteilt. Der ca. drei mm dicke mittlere Ring wurde tiefgefroren und anschließend mit einem Mikrotom (Leica CM 1850, Bensheim) in etwa zehn jeweils 5 µm dicke Schnitte geteilt. Diese wurden nach von Gieson gefärbt, mit einer auf ein Mikroskop aufmontierten Scannerkamera (3CCD-IRIS, Sony) eingescannt und mit Hilfe eines digitalisierten Computerprogramms (Sigma Scan pro, Jandel Software) vermessen. Hieraus konnte anschließend der relative Anteils des infarzierten Myokards am Gesamtmyokard errechnet werden.

Vaskuläre Reaktivitätsstudien

Die Durchführung der Experimente zur Untersuchungen der vaskulären endothelialen Funktion erfolgte nach derselben Methodik, die bereits auf Seite 16 für das Akutschockmodell beschrieben ist.

CB₁-Rezeptor-Expression

Für Western-Blot-Analysen der myokardialen CB₁-Rezeptoren wurden 100 mg direkt nach Entnahme eingefrorenes Herzgewebe (viales links - oder rechtsventrikuläres Myokard ohne Narbengewebe) von fünf unbehandelten Ratten mit großem Myokardinfarkt zwölf Wochen nach Infarzierung in 2 ml eiskalter RIPA-Lösung (Radioimmunopräzipitation Assay + Puffer) homogenisiert. Neben 20 mM MOPS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Natriumdeoxychololat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA (pH 7,0) enthielt der Puffer 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µM E-64 (Trans-Epoxy succinyl-L-Leukylamide-(4-Guanidino)Butan) und 200 µg/ml p-Aminobenzamid (Materialien von Sigma bzw. Roche, Schweiz). Das Homogenat wurde zentrifugiert und das Pellet verworfen. Nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Bio-Rad Laboratories, München) wurde nach

Zentrifugation (14000 x g, 15 Minuten) aus einem Teil der verbleibenden Flüssigkeit die Proteinkonzentration mit einem Bio-Rad Proteinassay (Bradford) gemessen. Der Rest wurde mit Lämmli SDS-Proben-Puffer versetzt, bei 95°C zehn Minuten lang gekocht und für Western-Blot-Analysen verwendet (77). Um die spezifische Bindung von polyklonalen CB₁-Rezeptor-Antikörpern (N-15, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), zu testen, wurde in zusätzlichen Experimenten ein blockierendes Peptid für CB₁-Antikörper in zehnfachem Überschuss zugefügt und bei Zimmertemperatur eine Stunde lang vor Immunoblotting mit dem CB₁-Antikörper inkubiert.

Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Infarkt- und Behandlungsgruppen herauszufinden wurde, ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc Test verwendet. Die Mortalitätsstatistik wurde mittels Chi-Quadrat- und Fisher's Exact Test erhoben.

II.2 Ergebnisse

Mortalität

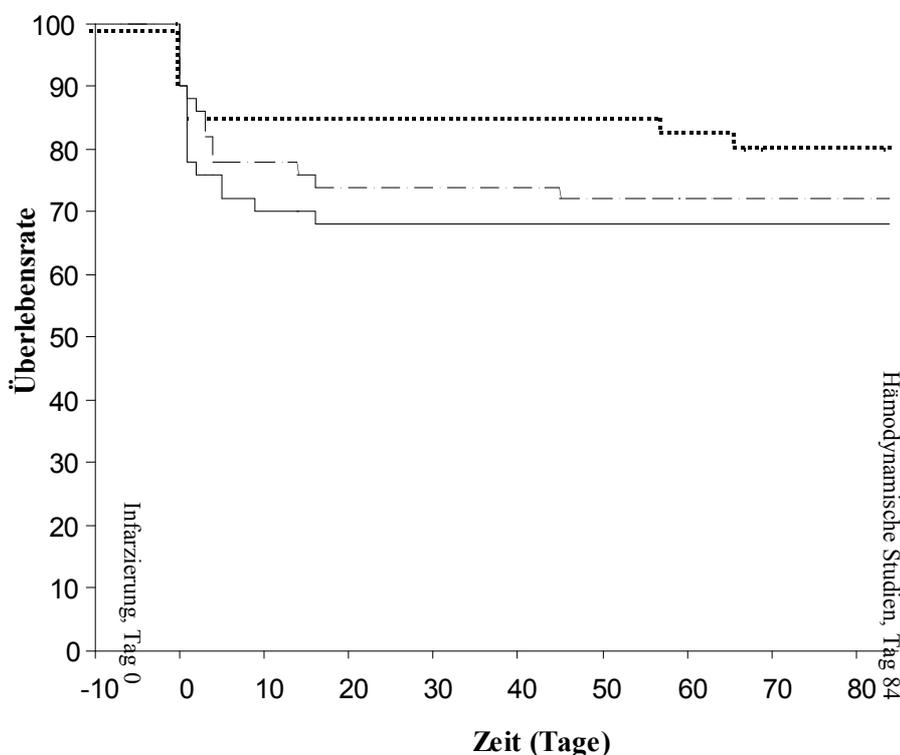
Im Verlauf der Studie wurden die Todesfälle jeder Behandlungsgruppe verzeichnet und hieraus die Mortalitätsrate errechnet. Insgesamt wurden 140 Tiere koronarligiert, zusätzlich gingen die Tiere in die Studie ein, die für quantitative Bestimmungen des Endocannabinoid-Gehaltes im Blut herangezogen wurden.

Die Tiere, die während der Operation oder innerhalb von 24 Stunden nach Infarzierung verstarben, wurden der Gruppe der Frühletalität zugeordnet (22,1%). Von den übrigen Tieren, die die Gruppe der Spätletalität bildeten, starben 12,5% der Kontrollgruppe, 2,9% der mit AM-251 behandelten Tiere und 25,7% der mit HU-210 behandelten Ratten. In der Kaplan-Meier Kurve ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Gesamt-Mortalität zwischen den drei Behandlungsgruppen.

Tab. II/1 Spätletalität
(Tod zwischen dem 2. und dem 84. Tag nach Infarzierung)

Behandlungsgruppen	Insgesamt infarzierte Tiere	Todesfälle	Mortalitätsrate
Unbehandelt	40	5	12,5%
AM-251	34	1	2,9%
HU-210	35	9	25,7%

Abbildung II/1 Mortalität



Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrollen (durchgezogene Linie), AM-251 (gepunktete Linie) und HU-210 (gestrichelte Linie).

Erkennbare Nebenwirkungen, Verhalten

Es gab keine erkennbaren äußerlichen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit AM-251 behandelten Ratten. Tiere, die mit HU-210 behandelt wurden, zeigten insbesondere nach Behandlungsbeginn eine deutliche Hypomotilität und Katalapsie, zudem war in dieser Gruppe eine erhöhte Ängstlichkeit und Aggressivität im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtbar. Bei vermehrtem Kratzverhalten war bei einigen Tieren ein temporärer Haarausfall zu sehen, vereinzelt konnten Krampfanfälle in dieser Gruppe beobachtet werden.

Im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen war das Gewicht der mit HU-210 behandelten Tieren deutlich geringer (Tabelle 3).

Alle physischen Werte wurden bei der Auswertung durch arithmetische Mittelung von je zehn Herzzyklen ermittelt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Linksventrikuläre Infarktgröße der drei Gruppen

Um die Wirkung der verabreichten Substanzen differenziert anhand vergleichbarer Infarktgrößen beurteilen zu können, wurden die Messergebnisse jeder Behandlungsgruppe nach Abschluss der Infarktgrößenbestimmung einer von drei Gruppen zugeordnet. Tiere, die nach Operation einen Infarkt von maximal acht Prozent des linksventrikulären Gesamtmyokards hatten, wurden als Kontrolltiere behandelt und gingen in die Gruppe der scheinoperierten Tiere (sham) ein (44). Eine Infarktgröße von $< 40\%$ des linksventrikulären Myokards wurde als kleiner Infarkt, von $> 40\%$ als großer Infarkt gewertet (Tabelle 2).

Tabelle II/2 Infarktgröße

Behandlungsgruppe	Sham-Operation ($< 8\%$)	Kleine Infarkte ($< 40\%$)	Große Infarkte ($> 40\%$)
Unbehandelt			
MI (%)	1 \pm 1	28 \pm 3	47 \pm 1
Anzahl der Tiere	10	12	13
AM-251			
MI (%)	3 \pm 2	31 \pm 2	48 \pm 1
Anzahl der Tiere	4	12	15
HU-210			
MI (%)	4 \pm 1	26 \pm 5	49 \pm 2
Anzahl der Tiere	5	7	10

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung

Ausgangswerte

Das Gewicht des isolierten linken und rechten Ventrikels wurde zur differenzierten Analyse in g/kg Körpergewicht umgerechnet. In allen drei Gruppen war eine tendenzielle Zunahme des rechtsventrikulären Gewichts sowie des Lungengewichts proportional zur Infarktgröße feststellbar, die sich bei den großen Infarkten als signifikant erwies. Hingegen waren beim linksventrikulären Gewicht weder unter den Infarktgruppen noch unter den Behandlungsgruppen wesentliche Unterschiede ersichtlich. Wie der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt, hatte die Behandlung mit HU-210 oder AM-251 keine Auswirkung auf die durchschnittliche Infarktgröße aller Ratten ($30,1 \pm 4,3$ (HU-210), $36,4 \pm 3,1\%$ (AM-251), $29,5 \pm 3,4\%$ (Kontrollen) $p= 0,31$). Es gab zwischen den Behandlungsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße (Tabelle 2). Weder bei den sham-operierten Tieren, noch den Tieren mit kleinen und großen Infarkten gab es im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den mit AM-251-behandelten Ratten signifikante Unterschiede im Körpergewicht. Auffallend war, dass im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen das Gewicht der mit HU-210 behandelten Tiere geringer ausfiel, mit Signifikanz für die kleinen und großen Infarkte (Tabelle 3).

Tabelle II/3 Körper-, Herz- und Lungengewichte

	Vor Operation	Sham- Operation ($< 8\%$)	Kleine Infarkte ($< 40\%$)	Große Infarkte ($> 40\%$)
KG (g)				
Unbehandelt	244±3	304±13	295±6	303±6
AM-251	245±3	292±6	300±5	307±10
HU-210	242±2	270±17	266±9 ^{†,##}	271±3 [#]
LVG (g)				
Unbehandelt		0,75±0,03	0,73±0,02	0,77±0,04
AM-251		0,76±0,08	0,76±0,03	0,79±0,02
HU-210		0,73±0,05	0,72±0,02	0,72±0,04
LVG/KG(g)				
Unbehandelt		2,49±0,14	2,48±0,05	2,56±0,13
AM-251		2,58±0,21	2,53±0,08	2,60±0,05
HU-210		2,72±0,12	2,73±0,11	2,68±0,18
RVG (g)				
Unbehandelt		0,15±0,02	0,23±0,02	0,33±0,03 ^{***}
AM-251		0,19±0,02	0,24±0,04	0,37±0,04
HU-210		0,15±0,01	0,18±0,02	0,33±0,03 ^{**}
RVG/KG(g)				
Unbehandelt		0,50±0,06	0,80±0,07	1,11±0,11 ^{***}
AM-251		0,63±0,06	0,80±0,11	1,20±0,10 [*]
HU-210		0,54±0,05	0,67±0,05	1,23±0,11 ^{***}
LungenG. (g)-				
Unbehandelt		1,28±0,08	1,92±0,21	2,57±0,28 ^{**}
AM-251		1,47±0,14	2,19±0,29	3,02±0,20 ^{**}
HU-210		1,29±0,06	1,61±0,24	2,89±0,38 [*]

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs. sham-operierte Ratten derselben Behandlungsgruppen. † p<0,05 vs. unbeh. Ratten mit gleicher Infarktgröße. # p<0,05, ## p<0,01 HU-210 vs. AM-251 behandelte Ratten mit gleicher Infarktgröße. KG = Körpergewicht; LVG = Linksventr. Gewicht, RVG = Rechtsventr. Gewicht.

Hämodynamische Variablen vor Thorakotomie (Tabelle 4)

Tiere mit großem Infarkt, die mit AM-251 behandelt worden waren und unbehandelte Tiere mit großem Infarkt zeigten verglichen mit sham-operierten Tieren erniedrigte Werte für den linksventrikulären systolischen Druck und den arteriellen Mitteldruck. Bemerkenswert ist, dass bei Verabreichung von HU-210 diese Verminderung des LVSP und des MAP im Vergleich zu den AM-251-Tieren bei gleicher Infarktgröße nicht auftrat. Die linksventrikuläre Kontraktionsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) war bei Tieren mit großem Infarkt durch Behandlung mit HU-210 signifikant weniger vermindert als bei Tieren, die AM-251 injiziert bekamen.

Der LVEDP stieg in allen drei Behandlungsgruppen proportional zur Infarktgröße an, im Vergleich zu unbehandelten Tieren war in der HU-210- Gruppe mit großen Infarkten ein signifikant höherer Anstieg erkennbar.

Der rechtsatriale Druck nahm außer bei den kleinen Infarkten der Kontrollgruppe mit zunehmender Infarktgröße tendenziell in allen Gruppen ebenfalls zu. Signifikanz erreichte die Zunahme bei den kleinen Infarkten der AM-251-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Ratten mit der gleichen Infarktgröße.

Die Herzfrequenz zeigte in keiner der drei Behandlungsgruppen signifikant veränderte Messergebnisse.

Tabelle II/4 Hämodynamische Variablen vor Thorakotomie

	Sham- Operation (<8 %)	Kleine Infarkte (<40%)	Große Infarkte (>40%)
LVSP (mm Hg)			
Unbehandelt	148±3	135±4	124±3 ^{***}
AM-251	146±19	133±6	114±3 [*]
HU-210	148±9	151±9	142±5 ^{†,###}
MAP (mm Hg)			
Unbehandelt	122±6	113±4	108±4
AM-251	119±9	112±5	97±3
HU-210	124±10	125±7	118±5 ^{##}
dP/dt_{max} (x 1,000 mm Hg/s)			
Unbehandelt	9,3±1,1	6,9±0,6	6,8±0,6 [*]
AM-251	9,2±2,0	6,8±0,4	5,5±0,4
HU-210	8,1±1,1	8,1±1,1	7,2±0,4 [#]
LVEDP (mm Hg)			
Unbehandelt	7,9±2,0	17,0±4,5	30,7±3,0 ^{**}
AM-251	8,3±1,0	22,7±5,1	31,9±2,6 [*]
HU-210	8,2±1,9	18,1±3,4	42,4±5,5 ^{**,†}
RAP (mm Hg)			
Unbehandelt	0,5±0,3	0,2±0,2	1,6±0,2 [*]
AM-251	0,6±0,7	1,4±0,4 [†]	2,1±0,4
HU-210	0,6±0,3	0,9±0,4	2,5±0,5 [*]
HR (Schläge/min)			
Unbehandelt	367±13	341±10	350±17
AM-251	344±19	351±9	316±8
HU-210	342±15	350±17	360±13

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs.sham-operierte Ratten derselben Behandlungsgruppen. † p<0,05 vs. unbehandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße. # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 HU-210 vs. AM-251 behandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße.

Hämodynamische Variablen nach Thorakotomie (Tabelle 5)

Der arterielle Mitteldruck war auch nach Thorakotomie bei Kontrolltieren und bei mit AM-251 behandelten Ratten proportional zur Infarktgröße deutlich vermindert, durch Gabe von HU-210 konnte auch nach Thorakotomie das Abfallen des MAP bei großen Infarkten signifikant reduziert werden.

Die Herzfrequenz nahm mit steigender Infarktgröße geringfügig ab, jedoch erreichten diese Unterschiede kein Signifikanzniveau.

Der Herzindex nahm ebenfalls in allen drei Gruppen mit steigender Infarktgröße ab. Auffallend ist, dass trotz der unveränderten Herzfrequenz der mit HU-210 behandelten Tiere mit kleinen Infarkten der CI signifikant gegenüber den beiden anderen Gruppen erhöht war, woraus sich ein erhöhtes Schlagvolumen und ein verminderter TPRI ableiten lässt.

Die maximale linksventrikuläre Druckentwicklung ($DevP_{max}$) wurde durch Druckmessung während Aortenocclusion bestimmt. Mit steigender Infarktgröße war wie erwartet ein deutliches Absinken der Druckentwicklung erkennbar, wobei durch Behandlung mit dem CB_1 -Rezeptorantagonisten bei Ratten mit großem Infarkt eine weitere signifikante Verminderung der Druckentwicklung im Vergleich zu unbehandelten Ratten mit der gleichen Infarktgröße erkennbar war.

Tabelle II/5 Hämodynamische Variablen nach Thorakotomie

	Sham (< 8 %)	Kleine Infarkte (< 40%)	Große Infarkte (> 40%)
Baseline:			
MAP (mm Hg)			
Unbehandelt	103±12	95±3	85±3*
AM-251	109±22	97±5	79±3
Hu-210	110±6	108±4	104±9 ^{†,##}
HR (Schläge/min)			
Unbehandelt	353±18	334±11	334±18
AM-251	328±23	354±18	323±9
Hu-210	357±14	370±15	354±21
CI (ml/min pro kg KG)			
Unbehandelt	218±16	185±18	176±13*
AM-251	303±59	182±14*	181±12**
Hu-210	325±28	293±17 ^{††,##}	203±19**
SVI (ml/kg)			
Unbehandelt	0,62±0,02	0,56±0,06	0,54±0,04
AM-251	0,93±0,20	0,53±0,06*	0,57±0,04*
Hu-210	0,91±0,07	0,80±0,05 [#]	0,57±0,04**
TPRI (mm Hg/ml pro min pro kg KG)			
Unbehandelt	0,47±0,01	0,56±0,07	0,50±0,03
AM-251	0,42±0,16	0,55±0,04	0,46±0,04
Hu-210	0,36±0,05	0,37±0,03 ^{†,#}	0,52±0,05*
<u>Aorten-Occlusion/ Dev P</u> max (mm Hg)			
Unbehandelt	215±4	177±12	143±8***
AM-251	236±13	159±12**	115±7***,†
Hu-210	218±15	183±9	146±9**,#

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs. sham-operierte Ratten derselben Behandlungsgruppen. † p<0,05^{††}, p<0,01 vs. unbehandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße. # p<0,05, ## p<0,01 HU-210 vs. AM-251 behandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße.

Steifigkeitskonstanten

Die Steifigkeitskonstante k wurde für verschiedene linksventrikuläre Druckbereiche ermittelt, um Hinweise auf die Elastizität des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt unter Einfluss der verabreichten pharmakologischen Substanzen zu bekommen.

Die Gesamtkonstante k_0 (2,5-30 mmHg) zeigte in der Kontrollgruppe bei kleinen und großen Infarkten signifikant erniedrigte Werte gegenüber den sham-operierten Tieren. Die Steifigkeitskonstante nahm tendenziell in allen Behandlungsgruppen mit zunehmender Infarktgröße ab.

Durch die Gabe von HU-210 wurde bei sham-operierten Ratten mit kleinen Infarkten die Steifigkeit tendenziell gesenkt, ohne für jeden einzelnen Wert Signifikanz zu erreichen.

Tabelle II/6 Steifigkeitskonstanten

	Sham- Operation ($< 8\%$)	Kleine Infarkte ($< 40\%$)	Grosse Infarkte ($> 40\%$)
K₀ (2.5-30 mm Hg)			
Unbehandelt	10,4±0,6	7,0±0,4 ^{***}	6,1±0,4 ^{***}
AM-251	7,8±0,4	7,4±0,7	5,6±0,2
HU-210	6,7±0,5 ^{††}	6,8±0,5	6,4±0,6
K₁ (0-3 mm Hg)			
Unbehandelt	25,9±4,3	21,2±2,2	14,3±1,9 [*]
AM-251	27,5±9,2	18,7±1,9	11,4±1,1 ^{**}
HU-210	22,7±3,7	15,8±3,0	11,4±1,9 [*]
K₂ (3-10 mm Hg)			
Unbehandelt	10,9±1,1	6,9±0,5 ^{**}	5,7±0,4 ^{***}
AM-251	9,0±1,7	7,9±1,1	5,0±0,3 [*]
HU-210	6,4±0,5 [†]	6,2±0,7	5,6±0,6
K₃ (10-20 mm Hg)			
Unbehandelt	10,8±0,8	7,2±0,4 ^{***}	6,8±0,4 ^{***}
AM-251	7,8±0,6	7,4±0,6	6,2±0,2
HU-210	6,8±0,6 ^{††}	7,6±0,3	7,0±0,8
K₄ (20-30 mm Hg)			
Unbehandelt	10,5±1,0	7,7±0,4 ^{**}	7,5±0,4 [*]
AM-251	8,6±1,6	7,5±0,5	6,7±0,3
HU-210	8,2±0,8	8,3±0,4	7,3±0,8

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. sham-operierte Ratten derselben Behandlungsgruppen.

† p<0,05, †† p<0,01 vs. unbehandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße.

Passive Druck-Volumen-Beziehung des linken Ventrikels, Arbeitsvolumen und linksventrikuläres Volumen/ Gewichtverhältnis

Das für definierte Drücke im linken Ventrikel ermittelte Flüssigkeitsvolumen stieg in klarer Relation zur Infarktgröße. Die Druck-Volumen-Kurve war mit steigender Infarktgröße also zunehmend nach rechts verschoben. Morphologisch war dieser Zusammenhang durch eine Erhöhung der medianen Zirkumferenz und des Apex-Basis-Abstandes der Herzen bei großen Infarkten erkennbar und auch planimetrisch durch eine Vergrößerung der Ventrikelhöhle ermittelbar. Bei Ratten mit großen Infarkten wurde durch Behandlung mit AM-251 das linksventrikuläre Volumen im Vergleich zu den anderen Gruppen weiter erhöht (Abbildung 2).

Das linksventrikuläre Arbeitsvolumen, definiert als Flüssigkeitsmenge im linken Ventrikel bei LVEDP stieg in allen Behandlungsgruppen proportional zur Infarktgröße an und war signifikant höher bei den mit AM-251 behandelten Ratten (Tabelle 4).

Für den Volumen-Gewichts-Index, bei dem das linksventrikuläre Volumen in Bezug zum linksventrikulären Gewicht angegeben wird, finden sich ähnliche Verhältnisse.

Tabelle II/7 Druck-Volumen- und Volumen/Gewichtsverhältnisse des linken Ventrikels

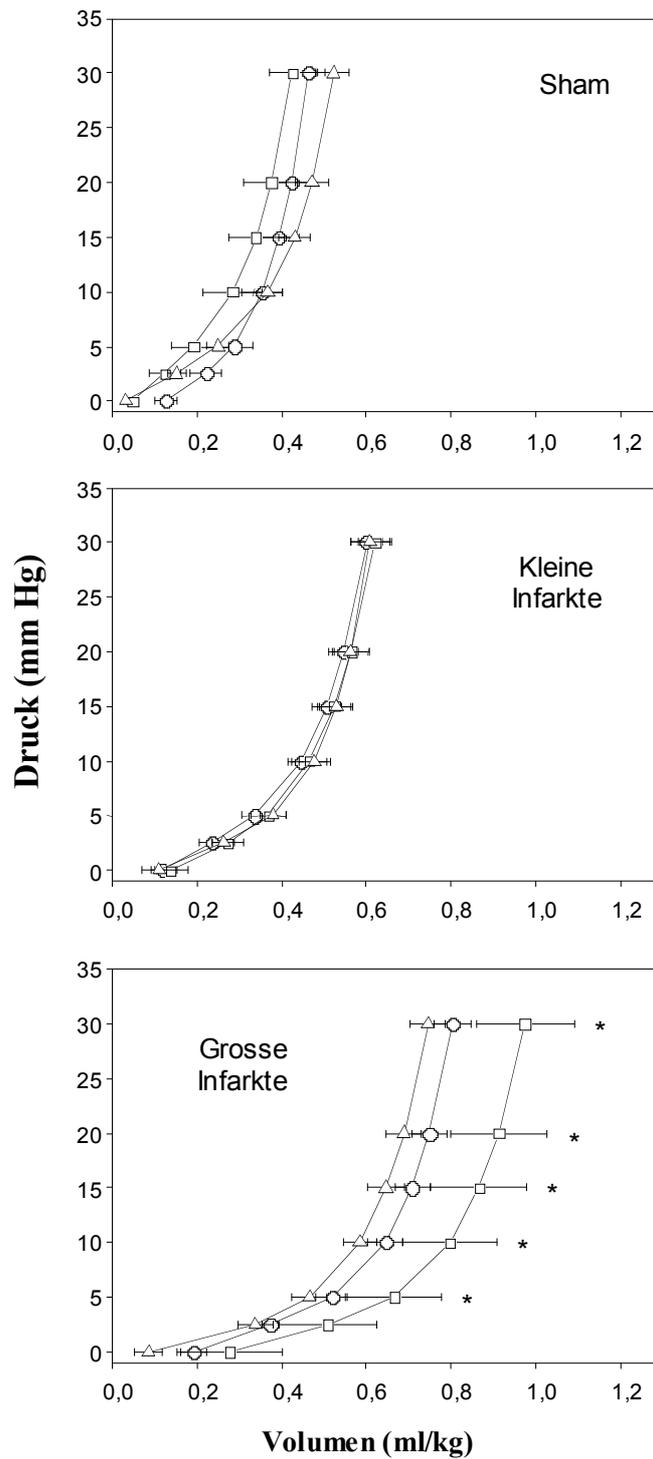
	Sham- Operation ($< 8\%$)	Kleine Infarkte ($< 40\%$)	Große Infarkte ($> 40\%$)
Vol (ml)			
Unbehandelt	0,30±0,02	0,47±0,05	0,82±0,04 ^{***}
AM-251	0,23±0,06	0,52±0,07	0,93±0,04 ^{**,†}
HU-210	0,32±0,07	0,55±0,06	0,79±0,05 ^{***}
Vol/LVG (ml/g)			
Unbehandelt	0,41±0,04	0,64±0,07	1,10±0,07 ^{***}
AM-251	0,34±0,08	0,68±0,09	1,15±0,04 ^{**}
HU-210	0,46±0,11	0,76±0,08	1,11±0,06 ^{***}

Vol = Volumen, Vol/LVg =Volumen/ linksventrikuläres Gewicht.

** p<0,01, *** p<0,001 vs. sham-operierte Ratten derselben Behandlungsgruppen.

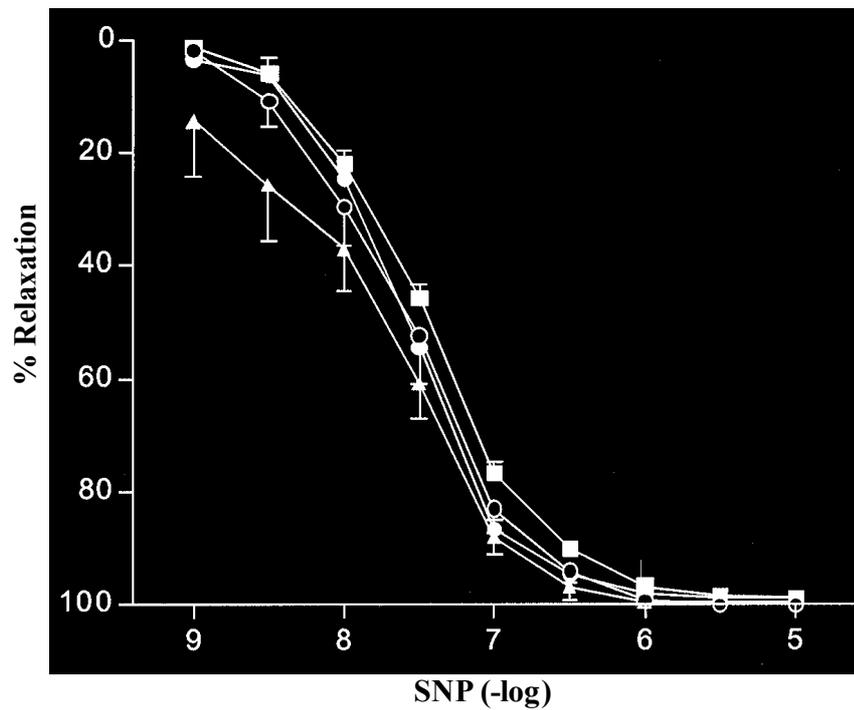
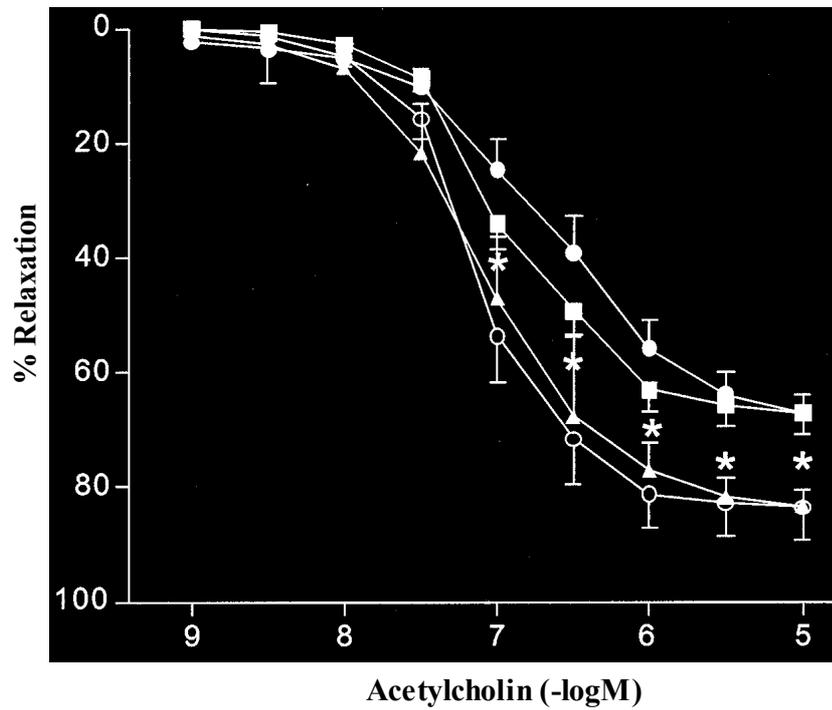
† p<0,05, vs. unbehandelte Ratten mit vergleichbarer Infarktgröße.

Abbildung II/2 Passive Druck-Volumen-Beziehung des linken Ventrikels



Passive Druck-Volumen-Kurve von Herzen sham-operierter Tiere (oberes Schaubild), von Ratten mit kleinen (mittleres Schaubild) und großen Infarkten (unteres Schaubild) bei unbehandelten (○), mit AM-251-behandelten (□) oder mit HU-210-behandelten (Δ) Ratten. Standardabweichung des Mittelwertes *P < 0.05 AM-251 gegenüber den anderen Gruppen.

Abbildung II/3 Endotheliale Dysfunktion



Vaskuläre Relaxation induziert durch Acetylcholin (oberes Schaubild) und Natrium-Nitroprussid (SNP, unteres Schaubild). Es wurden Aortenringe von Ratten mit großem MI (schwarz markiert) verglichen mit sham-operierten Ratten (hell markiert). Die infarzierten Tiere waren entweder mit der Trägerlösung (●), AM-251 (■) oder mit HU-210 (▲) behandelt. Es gab keinen Unterschied zwischen sham-operierten Tieren, die mit AM-251, HU-210 (beide nicht gezeigt), oder Trägersubstanz vorbehandelt waren (○). Standardabweichung des Mittelwertes von 6-10 Tieren *p < 0.05 von mit HU-210-behandelten Tieren im Vergleich zu Tieren, die mit der Trägersubstanz behandelten waren.

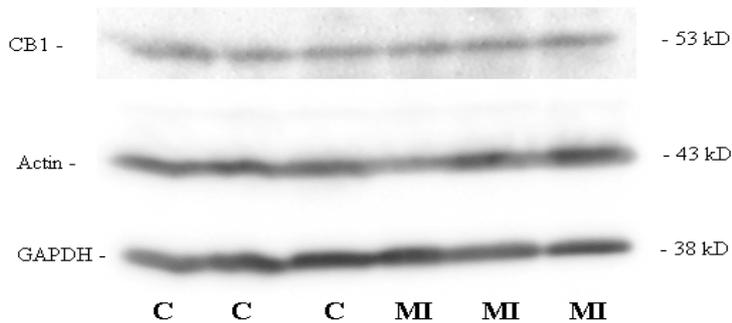
Die endothelabhängige vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin war in Aortenringen von Kontrolltieren oder mit AM-251 vorbehandelten Tieren mit großem Infarkt im Vergleich zu sham-operierten Tieren reduziert, somit also eine endotheliale Dysfunktion vorhanden. Im Gegensatz dazu war bei Ratten, die mit HU-210 behandelt wurden, die vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin unverändert. Nach Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Natrium-Nitroprussid war die Relaxation der Aortenringe hingegen in allen Gruppen gleich (Abbildung 3).

Expression und Funktion der CB₁-Rezeptoren

Die linksventrikuläre CB₁-Rezeptor-Immunaktivität von Ratten mit großen Infarkten war im Vergleich zu nicht infarzierten Tieren unverändert (Abbildungen 4 und 5).

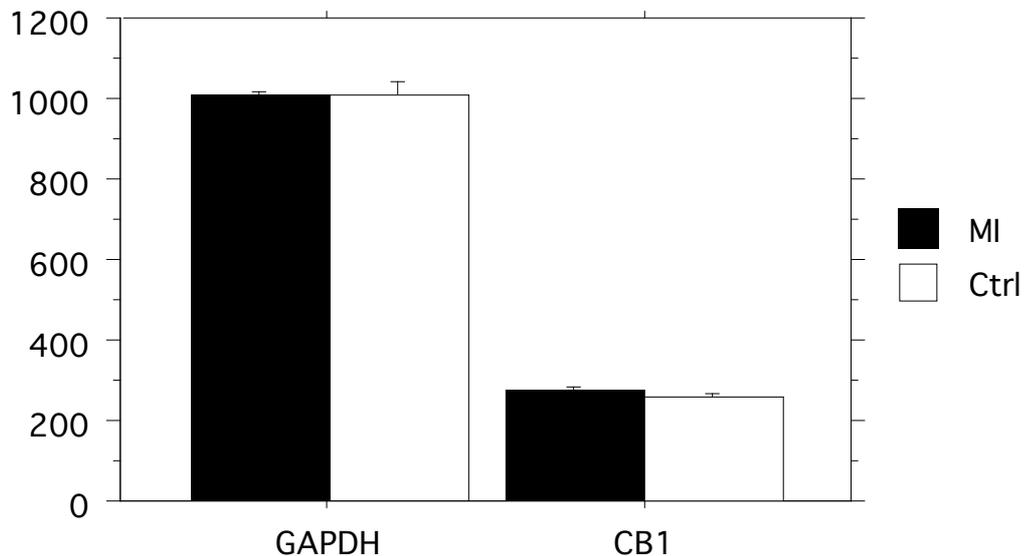
Die chronische Stimulierung der CB₁-Rezeptoren durch tägliche intraperitoneale Verabreichung von HU-210 hatte keine Toleranzentwicklung zur Folge, da die hypotensive und bradykarde Wirkung von intravenös verabreichtem HU-210 (10 µg/kg) bei diesen Tieren nicht herabgesetzt wurde, wie der Vergleich mit zuvor unbehandelten Kontrolltieren nach intravenöser Gabe von HU-210 zeigt. (-46 ± 5 und -49 ± 4 mmHg, -108 ± 25 und -85 ± 19 Herzschläge/min). Die Werte wurden 30 Minuten nach Verabreichung von HU-210 gemessen.

Abbildung II/4 Western-Blot-Analyse



Western-Blot-Analyse mit CB₁-Rezeptor-spezifischen Antikörpern (CB₁), Aktin und Glyceraldehyd-3 Phosphodehydrogenase (GAPDH). Für jede Reihe wurden 18 µg Protein aus vitalem linksventrikulärem Myokard nach sham-Operation (Kontrollen, Reihe 1-3) oder 12 Wochen nach Myokardinfarkt (MI, Reihe 4-6) aufgetragen. Zur zusätzlichen Kontrolle wurden aus denselben Proben auch die nicht regulierten Proteine Aktin und GAPDH analysiert. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kilo Dalton (kD) rechts neben der Darstellung angegeben.

Abbildung II/5 Signalintensität



Durchschnittliche Signalintensität von CB₁ und GAPDH im Western Blot von 5 Kontrolltieren (CTRL) und von 5 infarzierten Tieren (MI). Der statistische Vergleich mit dem Student-Test (Mittelwerte +/- Standardabweichung) zeigt keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und infarzierten Tieren für CB₁ (259 ± 8 und 274 ± 11) und GAPDH (1009 ± 32 und 1005 ± 11) oder für Aktin (nicht gezeigt).

II.3 Diskussion

Nebenwirkungen nach Behandlung mit HU-210

Die vorliegende Arbeit ist zugleich die erste Studie, die sich mit der Wirkung von HU-210, welches über einen längeren Zeitraum und in hoher Dosierung verabreicht wurde, beschäftigt. Bislang war die Substanz in vergleichbarer Dosis maximal über den Zeitraum von einer Woche verabreicht worden (78). Die Dosierung wurde gezielt hoch gewählt, um die Wirkung von chronischer CB₁-Rezeptor-Aktivierung auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz deutlich erfassen zu können. Trotz der bekannten Appetit-stimulierenden Wirkung von Cannabinoiden bei geringeren Dosierungen (6,79) konnten wir in Übereinstimmung mit der Literatur in der mit HU-210 behandelten Gruppe ein vermindertes Körpergewicht feststellen (78). Zusätzlich zeigten Tiere, die mit HU-210 behandelt wurden, insbesondere nach Behandlungsbeginn eine deutliche Hypomotilität und Katalepsie, aber auch eine vermehrte Ängstlichkeit und Aggressivität(80) während der Injektionen, einige Male waren Krampfanfälle zu beobachten. Es ist naheliegend, dass infolge der Hypomotilität und Katalepsie durch hochdosierte CB₁-Rezeptor-Aktivierung bei Nagetieren auch eine verminderte Nahrungsaufnahme auftreten kann. Ratten, die mit dem Rezeptor-Antagonisten AM-251 behandelt worden waren, zeigten keine sichtbaren Nebenwirkungen, was mit den zuvor bei CB₁-Rezeptor-Knockout-Mäusen gemachten Beobachtungen übereinstimmt (30).

Wie zuvor erwähnt, wurde bei Ratten im hämorrhagischen Schock die Überlebensrate durch Verabreichung des CB₁-Rezeptor-Antagonisten vermindert, während die Gabe des Rezeptoragonisten im septischen Schock eine positive Wirkung auf die Überlebensrate hatte (42,43). Bei weitgehend verbesserten hämodynamischen Werten in der mit dem CB₁-Rezeptor-Agonisten behandelten Gruppe war die Mortalität nun bei chronischer Verabreichung in allen drei Gruppen statistisch nicht signifikant verschieden.

Einfluss der verabreichten Substanzen auf das linksventrikuläre Remodeling

Bei der planimetrischen Vermessung der histologischen Schnitte nahmen der linksventrikuläre Durchmesser und die Ventrikelhöhle mit zunehmender Infarktgröße zu. Ebenso konnte dieser Zusammenhang bei der Bestimmung des linksventrikulären

Arbeitsvolumens und bei der Vermessung der Ventrikelmorphologie ermittelt werden. Zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede der morphologischen Verhältnisse. Hervorzuheben ist jedoch, dass die Antagonisierung des CB₁-Rezeptors in der passiven Druck-Volumen-Kurve bei Ratten mit großen Infarkten eine Rechtsverschiebung zur Folge hatte, was für eine positive Wirkung von Endocannabinoiden auf die linksventrikulären Umbauprozesse spricht. Da der LVEDP im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert und im Vergleich zu HU-210-Tieren signifikant niedriger war, ist eher eine strukturelle als eine druckbedingte Dilatation als Ursache für die Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurve anzunehmen, die deutlich über die übliche Wirkung eines großen Infarktes hinausgeht.

Hämodynamische und vaskuläre Funktion

Eine interessantes Ergebnis der Studie ist, dass die chronische Aktivierung von CB₁-Rezeptoren bei Ratten mit großen Infarkten den Abfall des linksventrikulären systolischen Druckes und des arteriellen Mitteldruckes im Vergleich zu den anderen Gruppen verhindert. Zudem war der arterielle Mitteldruck bei Ratten, die mit dem CB₁-Rezeptor-Antagonisten behandelt worden waren, tendenziell geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe und auch die maximale Druckentwicklungskapazität nach Aortenokklusion war vermindert. Dies deutet darauf hin, dass in unbehandelten Tieren die Ausschüttung von Endocannabinoiden dem Blutdruckabfall entgegenwirkt und steht den Ergebnissen des Akutschockmodells (Teil I) entgegen.

Der erhöhte linksventrikuläre systolische Druck bei Tieren der HU-210-Gruppe ist bei unverändertem TPRI nicht auf eine systemische Vasokonstriktion als Ursache zurückzuführen. Jedoch war der LVEDP bei den Tieren dieser Gruppe erhöht, was den Schluss zulässt, dass der verminderte Abfall des LVSP durch den Frank-Starling-Mechanismus bedingt war.

Die Daten deuten darauf hin, dass endogene Cannabinoide das linksventrikuläre Remodeling nach MI positiv beeinflussen und protektiven Einfluss auf die systolische Funktion von Ratten mit großen Infarkten haben. Es stellt sich die Frage, weshalb bei aufrechterhaltenem Schlagvolumen und unveränderter systolischer Leistung der LVEDP in dieser Gruppe erhöht war, zumal es keine Unterschiede in der passiven linksventrikulären Steifigkeit im Vergleich zu unbehandelten Ratten gab. Zudem

zeigten die mit HU-210 behandelten Ratten im Vergleich zu den anderen Gruppen keine Zeichen eines stärker ausgeprägten Lungenödems post mortem, auch war das Körpergewicht erniedrigt. Durch die klinisch gängige Therapie mit Beta-Blockern und ACE-Hemmern wird bei der chronischen Herzinsuffizienz der linksventrikuläre enddiastolische Druck gesenkt und die Überlebensrate verbessert (81,82). Dies lässt vermuten, dass sich eine Blutdruckerhöhung auf Kosten eines erhöhten LVEDP eher nachteilig auswirken dürfte.

Zwar ist erwiesen, dass Cannabinoide über einen CB₁-Rezeptor-vermittelten Mechanismus eine Hypotonie induzieren, wie die Verwendung von CB₁-Rezeptor-Antagonisten (16,25) und CB₁-Rezeptor-Knockout-Mäusen (26) experimentell gezeigt hat, jedoch kann es bei der Blutdruckregulation Unterschiede zwischen akuter und chronischer Wirkung einer Substanz geben. Bei der psychoaktiven Wirkung von Cannabinoiden ist Toleranzentwicklung seit langem bekannt (83) und auch kardiovaskuläre Studien, die Mitte der siebziger Jahre mit dem aktiven Bestandteil der Marihuana-Pflanze, dem Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) durchgeführt wurden, konnten Toleranzentwicklung zeigen(84). Neuere Studien beschreiben, dass chronische Gabe von HU-210 eine irreversible Internalisierung des CB₁-Rezeptors bewirkt, jedoch ist bislang ungeklärt, welche Rolle dieser Rezeptor-Abbau bei einer eventuellen Toleranzentstehung spielt (85). Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass die nach Myokardinfarkt ausgeschütteten endogenen Cannabinoide durch Toleranzentwicklung bei hochdosierter Verabreichung des CB₁-Rezeptor-Agonisten nicht hypotensiv wirken können, wodurch der nur geringe Blutdruckabfall der HU-210-Ratten zu erklären wäre. Bei dieser Interpretation wäre jedoch auch in der AM-251-Gruppe ein gleichsinniger Anstieg des LVSP und des MAP zu erwarten, was jedoch nicht der Fall ist. Zudem zeigte die nach Beendigung der chronischen Verabreichung von HU-210 bei einigen Tieren durchgeführte intravenöse Verabreichung von HU-210 (10 μ g/kg) keine signifikante Verminderung der hypotensiven und bradykarden Wirkung im Vergleich zu Kontrolltieren. Demnach ist Toleranzentwicklung z.B. durch Rezeptordownregulierung oder Enzyminduktion nach chronischer Verabreichung von Cannabinoiden in hoher Dosis in der vorliegenden Studie ein unzureichendes Argument, um die signifikanten Unterschiede des LVSP und des MAP bei Tieren der verschiedenen Gruppen mit großen Infarkten zu erklären.

Bei Ratten mit großen Infarkten, die mit dem CB₁-Rezeptor-Agonisten HU-210 behandelt wurden, konnten trotz erhöhtem LVEDP generell verbesserte hämodynamische Werte beobachtet werden. Neben der Aufrechterhaltung des Blutdruckes zeigten sie im Vergleich zu Ratten, die mit AM-251 behandelt worden waren, während der Aortenokklusion eine verbesserte maximale linksventrikuläre Druckentwicklung (DevP_{max}). Der Index des Herzminutenvolumens, der Schlagvolumenindex und der Index des totalen peripheren Widerstandes wurden nur bei Tieren mit kleinem Myokardinfarkt durch Verabreichung von HU-210 verbessert. Das könnte bedeuten, dass die vorteilhafte Wirkung der CB₁-Rezeptor-Aktivierung durch die Infarktgröße limitiert sein könnte. Zuvor hatte sich bei ACE-Hemmern (81) und bei Beta-Blockern (82) gezeigt, dass unterschiedliche Wirkungen der pharmakologischen Behandlung auch in Abhängigkeit vom Verabreichungszeitpunkt auftreten können.

Der verminderte TPRI in der HU-210-Gruppe mit kleinen Infarkten spricht für eine verminderte Nachlast. Bei nicht-infarzierten Ratten führt die intravenöse Gabe von 10 µg/kg zu einem verminderten Herzindex ohne signifikant den TPRI zu beeinflussen (31). Auch hierin zeigt sich ein Unterschied in der hämodynamischen Wirkung zwischen der akuten und der chronischen Verabreichung von HU-210. Der potente CB₁-Rezeptor-Agonist bewirkte in vorangegangenen Studien den Blutdruckabfall hauptsächlich durch eine Reduktion des Herzzeitvolumens, bei signifikanter Erhöhung der Koronar- und Zerebraldurchblutung. Anandamid hingegen verminderte den totalen peripheren Widerstand. Die genaue Lokalisation der durch HU-210 aktivierten CB₁-Rezeptoren ist jedoch nicht vollständig geklärt, wenngleich ein zentral-vermittelter Mechanismus wohl auszuschließen ist (86). Die durch Anandamid und durch HU-210 induzierte differierende Vasodilatation könnte auf eine unterschiedliche Verteilung vaskulärer und auf sympathischen Nervenendigungen lokalisierter CB₁-Rezeptoren zurückzuführen sein. Falls letztere in geringerer Dichte vorkämen, wäre es möglich, dass erst HU-210 als vollständiger Agonist zu ihrer Aktivierung in der Lage wäre (31).

HU-210-Gabe verhindert die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion

Die Gabe von HU-210 verhindert die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei infarzierten Tieren (s. Abbildung II/3). Das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion ist ein gut bekanntes Phänomen bei der chronischen Herzinsuffizienz (52). Im

kardiogenen Schock (Teil I dieser Arbeit) hatte sich gezeigt, dass im Akutstadium nach Myokardinfarkt die frühe endotheliale Dysfunktion durch Gabe des CB₁-Rezeptor-Antagonisten weiter verstärkt wurde (87). In der vorliegenden Studie wurde durch CB₁-Rezeptor-Antagonismus die entstandene endotheliale Dysfunktion zwar nicht weiter verstärkt, aber ihr Auftreten konnte durch Verabreichung von HU-210 verhindert werden. Diese Beobachtung ergänzt frühere Ergebnisse, die einen aktiven Aufnahmemechanismus für Endocannabinoide in Endothelzellen und den Einfluss von Cannabinoiden auf die vaskuläre Funktion beschreiben (88). Die endotheliale Dysfunktion in unserer Studie war durch eine verminderte Dilatation von isolierten Aortenringen nach Gabe von Acetylcholin gekennzeichnet. Vorangegangene Studien beschreiben, dass diese Art der endothelialen Dysfunktion hauptsächlich durch die systolische Leistung und damit durch die Strömungsmuster und den Wandstress in der Aorta ascendens hervorgerufen wird (52).

CB₁-Rezeptor-Expression

Chronische CB₁-Rezeptor-Aktivierung führt zu einer verbesserten hämodynamischen Funktion, ohne die CB₁-Rezeptor-Expression im vitalen Myokard von Ratten mit großen Infarkten zu verändern. Dies ist zugleich die erste Studie, die sich mit der Expression von CB₁-Rezeptoren nach MI beschäftigt. Falls Endocannabinoide durch ihre Wirkung an CB₁-Rezeptoren deutlich die kardiale Leistung verbessern sollten, wäre eine Heraufregulierung von CB₁-Rezeptoren sinnvoll, wie es am Beispiel der Leberzirrhose auf humanen hepatischen Endothelzellen bereits gezeigt werden konnte (58). Die Aktivierung von neurohumoralen Systemen spielt eine wichtige Rolle bei den myokardialen Umbauprozessen nach Infarkt (89), wie in Teil I dieser Arbeit bereits beschrieben wurde, zeigen Endocannabinoide Eigenschaften von neurohumoralen Mediatoren (62). Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zur Aktivierung mehrerer neurohumoraler Systeme, so ist z.B. das Renin-Angiotensin-System aktiviert und durch den erhöhten Sympatikotonus werden beta-adrenerge Rezeptoren aktiviert. Zudem sind die Serumspiegel des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und des brain natriuretischen Peptids (BNP) erhöht.

Die Möglichkeit einer vorübergehenden Heraufregulierung der Rezeptoren bleibt jedoch offen, da wir die Rezeptorexpression erst 12 Wochen nach Infarkt gemessen haben, zu

einem Zeitpunkt, zu dem die Herzinsuffizienz bereits vollständig ausgebildet ist. Die exakten Mechanismen im Zusammenspiel zwischen Cannabinoiden und anderen neurohumeralen Mediatoren in Schockzuständen und bei der Ausbildung einer Herzinsuffizienz bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen, eine umfassende Abschätzung der hier wirksamen regulatorischen Mechanismen ist allein auf Basis unserer Studien nicht möglich.

Einschränkungen der Studie

Obwohl die Ergebnisse der Studie erstmalig nahelegen, dass die chronische Aktivierung von CB₁-Rezeptoren eine protektive Wirkung auf die ventrikuläre Funktion nach MI hat, gibt es einige Einschränkungen. Zum einen war die verwendete Dosis von HU-210 so hoch, so dass es zu ernsthaften Nebenwirkungen kam. Bislang wurde HU-210 in einer ähnlichen Dosis nur über den Zeitraum von einer Woche verwendet (80). Zum anderen würde man bei einer protektiven Wirkung von Endocannabinoiden in diesem Modell eine deutliche gegenteilige Wirkung von AM-251 auf die hämodynamischen Werte erwarten. Verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren hatte die Antagonisierung der CB₁-Rezeptoren einen signifikant niedrigeren entwickelten Druck nach Aortenokklusion und eine Dilatation des linken Ventrikels zur Folge. Jedoch hatte die Verabreichung von AM-251 keinen signifikant gegenteiligen Einfluss auf die anderen hämodynamischen Parameter, die durch HU-210 verbessert wurden, wie den LVSP, den MAP, die dp/dt_{max} , den CI und den TPRI, was gegen einen förderlichen Cannabinoid-Tonus in diesem chronischen Modell spricht. Zudem werden durch CB₁-Rezeptoren zwar die meisten der kardiovaskulären Wirkungen von Endocannabinoiden vermittelt, aber nicht alle. So werden z.B. einige der Wirkungen durch CB₂-Rezeptoren vermittelt (90), oder durch einen bislang noch nicht identifizierten Anandamid-Rezeptor (30,54). Die Verwendung von CB₁- und CB₁/CB₂-Knockout-Mäusen könnte hilfreich sein, die Rolle der Aktivierung von CB₁ und CB₂-Rezeptoren bei den hämodynamischen Veränderungen nach Myokardinfarkt zu verstehen.

Zusammenfassung

Teil I:

Der Blutdruckabfall nach Koronararterienligatur war bei Tieren, die mit dem CB₁-Rezeptorantagonisten SR141716A vorbehandelt waren, bei gleicher Infarktgröße signifikant geringer als bei Kontrolltieren. Isolierte Monozyten und Thrombozyten aus dem Blut von infarzierten Tieren führten nach Transfusion in unbehandelten Empfängerratten zu einer Erniedrigung des MAP, jedoch in Tieren, die mit SR vorbehandelt waren, zu einer Zunahme des MAP ($p < 0.05$). Anandamid und 2-Arachidonylglycerid konnten in Monozyten und Thrombozyten nach MI nachgewiesen werden, nicht aber in Zellen von Kontrolltieren. Durch SR wurde die Überlebensrate zum Zeitpunkt 2 Stunden nach MI vermindert ($p < 0.05$) und die frühe endotheliale Dysfunktion nach MI verstärkt.

Schlussfolgerung: Die in Monozyten und in Thrombozyten produzierten Cannabinoide tragen zur Blutdruckerniedrigung nach akutem Myokardinfarkt bei. Durch CB₁-Rezeptor-Blockade wird der Abfall des arteriellen Mitteldruckes verhindert, aber die Mortalität 2 Stunden nach MI erhöht. Dies geschieht möglicherweise durch Beeinträchtigung der endothelialen Funktion.

Teil II:

Durch chronische CB₁-Rezeptorstimulation konnte bei Ratten mit großen Infarkten trotz erhöhtem LVEDP der Abfall des linksventrikulären systolischen Drucks und des arteriellen Mitteldrucks vermindert und das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion verhindert werden. Bei Ratten mit kleinen Infarkten wurde durch HU-210 der Herzindex verbessert und der totale periphere Widerstand vermindert. Die linksventrikuläre CB₁-Rezeptorexpression war bei Ratten mit großen Infarkten im Vergleich zu nicht-infarzierten Tieren unverändert. Durch CB₁-Rezeptor-Antagonisierung wurde die maximale Druckentwicklungskapazität weiter vermindert, die Druck-Volumen-Kurve weiter nach rechts verschoben und das Arbeitsvolumen von Ratten mit großen Infarkten vermindert.

Literaturverzeichnis

1. Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988;34:605-13.
2. Devane WA, Hanus L, Breuer A, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-9.
3. Hillard CJ. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;61:3-18.
4. De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8375-80.
5. Paria BC, Ma W, Andrenyak DM, et al. Effects of cannabinoids on preimplantation mouse embryo development and implantation are mediated by brain-type cannabinoid receptors. *Biol Reprod* 1998;58:1490-5.
6. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;410:822-5.
7. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994;372:686-91.
8. Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5780-5.
9. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;6:635-64.
10. Lozano I. The therapeutic use of *Cannabis sativa* in Arabic Medicin. *Journal of Cannabis Therapeutics* 2001;Vol 1, No 1:64-70.
11. Gaoni Y MR. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964;86, 1646-1647.

12. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4.
13. Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991;279:129-34.
14. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-5.
15. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90.
16. Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1- like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:1030-7.
17. Wagner JA, Varga K, Kunos G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J Mol Med* 1998;76:824-36.
18. Hillard CJ, Campbell WB. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Lipid Res* 1997;38:2383-98.
19. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997;277:1094-7.
20. Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 1997;272:3315-23.
21. Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:7-14.
22. Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 1999;274:2794-801.

23. Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J* 1997;322:671-7.
24. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83-7.
25. Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, et al. Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension* 2000;35:679-84.
26. Ledent C, Valverde O, Cossu G, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999;283:401-4.
27. Kanakis C, Jr., Pouget JM, Rosen KM. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (cannabis) on cardiac performance with and without beta blockade. *Circulation* 1976;53:703-7.
28. Benowitz NL, Jones RT. Cardiovascular effects of prolonged delta-9-tetrahydrocannabinol ingestion. *Clin Pharmacol Ther* 1975;18:287-97.
29. Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* 1995;278:279-83.
30. Jarai Z, Wagner JA, Varga K, et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14136-41.
31. Wagner JA, Jarai Z, Batkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 2001;423:203-10.
32. Niederhoffer N, Szabo B. Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *Br J Pharmacol* 1999;126:457-66.
33. Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 1996;118:2023-8.

34. Vidrio H, Sanchez-Salvatori MA, Medina M. Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol- dimethylheptyl in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:332-6.
35. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 1999;276:H2085-93.
36. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, et al. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 1997;100:1538-46.
37. Kunos G, Jarai Z, Varga K, Liu J, Wang L, Wagner JA. Cardiovascular effects of endocannabinoids--the plot thickens. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;61:71-84.
38. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400:452-7.
39. DHZB. Daten aus: "Themenserie Kardiogener Schock", MILIS-Studie, ISIS-3-Studie, TIMI-2-Studie. , 1999.
40. Urban P, Stauffer JC, Bleed D, et al. A randomized evaluation of early revascularization to treat shock complicating acute myocardial infarction. The (Swiss) Multicenter Trial of Angioplasty for Shock-(S)MASH. *Eur Heart J* 1999;20:1030-8.
41. Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, et al. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N Engl J Med* 1999;341:625-34.
42. Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997;390:518-21.
43. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *Faseb J* 1998;12:1035-44.
44. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503-12.

45. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia* 1986;42:109-14.
46. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985;121:522-30.
47. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
48. Ohnishi H, Yamaguchi K, Sato M, Uemura A, Funato H, Dabasaki T. Effects of 2-[(5-chloro-2-methoxyphenyl)azo]-1H-imidazole (M6434) on hemorrhagic, cardiogenic, and endotoxin shock in rats and rabbits. *Circ Shock* 1984;13:261-70.
49. Wu JP, Chen YT, Lee AY. Opioids in myocardial ischaemia: potentiating effects of dynorphin on ischaemic arrhythmia, bradycardia and cardiogenic shock following coronary artery occlusion in the rat. *Eur Heart J* 1993;14:1273-7.
50. Pratt PF, Hillard CJ, Edgemond WS, Campbell WB. N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am J Physiol* 1998;274:H375-81.
51. Williams SG, Wright DJ, Tan LB. Management of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: towards evidence based medical practice. *Heart* 2000;83:621-6.
52. Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 1999;100:292-8.
53. Parker JL, Adams HR. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ Res* 1993;72:539-51.
54. Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999;33:429-34.

55. Mechoulam R, Fride E, Ben-Shabat S, Meiri U, Horowitz M. Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur J Pharmacol* 1998;362:R1-3.
56. Kagota S, Yamaguchi Y, Nakamura K, Sugiura T, Waku K, Kunitomo M. 2-Arachidonoylglycerol, a candidate of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur J Pharmacol* 2001;415:233-8.
57. Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci* 1999;65:645-55.
58. Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001;7:827-32.
59. Brunkhorst FM, Clark AL, Forycki ZF, Anker SD. Pyrexia, procalcitonin, immune activation and survival in cardiogenic shock: the potential importance of bacterial translocation. *Int J Cardiol* 1999;72:3-10.
60. Hirschl MM, Gwechenberger M, Binder T, et al. Assessment of myocardial injury by serum tumour necrosis factor alpha measurements in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1996;17:1852-9.
61. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996;32:752-63.
62. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;225:1-8.
63. Werdan K. Schock und Mikrozirkulationsstörungen. Fölsch, Kochsiek, Schmidt, "Pathophysiologie", Springer-Verlag 2000;ISBN 3-540-65782-7.
64. Marchant A, Alegre ML, Hakim A, et al. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol* 1995;15:266-73.
65. Newton C, Klein T, Friedman H. The role of macrophages in THC-induced alteration of the cytokine network. *Adv Exp Med Biol* 1998;437:207-14.
66. Smith SR, Terminelli C, Denhardt G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-

- inflammatory interleukin- 10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:136-50.
67. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, et al. Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:419-23.
68. Ertl G. Störungen der Koronardurchblutung. Fölsch, Kochsiek, Schmidt, "Pathophysiologie", Springer-Verlag 2000;ISBN 3-540-65782-7.
69. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978;90:57-70.
70. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993;87:755-63.
71. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
72. Gaudron P, Eilles C, Ertl G, Kochsiek K. Compensatory and noncompensatory left ventricular dilatation after myocardial infarction: time course and hemodynamic consequences at rest and during exercise. *Am Heart J* 1992;123:377-85.
73. McAlpine HM, Morton JJ, Leckie B, Rumley A, Gillen G, Dargie HJ. Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1988;60:117-24.
74. Levine TB. Neuroendocrine activation in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;65:32I-34I.
75. Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 1993;87:VI40-8.

76. Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res* 1981;49:618-26.
77. Laser M, Willey CD, Jiang W, et al. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2000;275:35624-30.
78. Giuliani D, Ottani A, Ferrari F. Effects of the cannabinoid receptor agonist, HU 210, on ingestive behaviour and body weight of rats. *Eur J Pharmacol* 2000;391:275-9.
79. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;143:315-7.
80. Giuliani D, Ferrari F, Ottani A. The cannabinoid agonist HU 210 modifies rat behavioural responses to novelty and stress. *Pharmacol Res* 2000;41:47-53.
81. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;57:84-95.
82. Hu K, Gaudron P, Ertl G. Long-term effects of beta-adrenergic blocking agent treatment on hemodynamic function and left ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction: importance of timing of treatment and infarct size. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:692-700.
83. Nowlan R, Cohen S. Tolerance to marijuana: heart rate and subjective "high". *Clin Pharmacol Ther* 1977;22:550-6.
84. Adams MD, Chait LD, Earnhardt JT. Tolerance to the cardiovascular effects of delta9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Br J Pharmacol* 1976;56:43-8.
85. Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K. Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 1999;73:493-501.
86. Malinowska B, Godlewski G, Bucher B, Schlicker E. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;356:197-202.
87. Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, et al. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:2048-54.

88. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agro A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000;275:13484-92.
89. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1228-33.
90. Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2001;132:793-6.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Jens Wagner für die Überlassung des Themas, für seine stetige Unterstützung und seine ansteckende Begeisterung für die Sache. Durch Gespräche, e-mails und die Möglichkeit, ihm „über die Schulter zu gucken“ wurde bei mir Interesse für wissenschaftliches Arbeiten geweckt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Kai Hu und Martina Wiesler für die engagierte Zusammenarbeit, ohne die ein Zustandekommen der beiden Studien nicht möglich gewesen wäre.

Zudem gilt mein Dank Priv.-Doz. Dr. Johann Bauersachs und Dr. Andreas Schäfer für ihre Beiträge zu den vaskulären Reaktivitätsstudien, sowie Dr. Martin Laser und Frau Dr. Hong Han für die Beiträge zur CB₁-Rezeptor-Expression.

Bei Prof. Dr. Ertl bedanke ich mich für die Überlassung seines Labors zur Durchführung der beiden Studien und für seine Beiträge zur Diskussion, bei Prof. Dr. Elert für das Korrekturlesen dieser Arbeit in seiner Funktion als Koreferent.

Anschließend an die Arbeit zu den vorliegenden Studien hatte ich die Gelegenheit, in Bethesda ein halbes Jahr ausschließlich an der kardiovaskulären Wirkung von Cannabinoiden zu forschen. Bei meinem dortigen Laborleiter Prof. Dr. George Kunos möchte ich mich für diese Möglichkeit und, wie auch bei meinen dortigen Kollegen Dr. Sandor Batkai und Dr. Laszlo Offertaler, für die erfahrungsreiche und unterhaltsame Zusammenarbeit bedanken.

Verzeichnis bisher veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten

Veröffentlichungen

- 1.) Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J et al.: Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2001;38:2048-54.
- 2.) Wagner JA, Hu K, Karcher J et al.: Antagonism of CB1 Cannabinoid Receptors Promotes Remodeling and Cannabinoid Treatment Prevents Hypotension and Endothelial Dysfunction in Rats with Myocardial Infarction. Br J Pharmacol. 2003 Apr;138(7):1251-8.
- 3.) Kunos G, Batkai S, Offertaler L, Mo F, Liu J, Karcher J, Harvey-White J.: The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. Chem Phys Lipids. 2002 Dec 31;121(1-2):45-56.

Vorträge

- 20.1.2001: Promomed-Kongress Würzburg: „Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung im kardiogenen Schock nach experimentellem Myokardinfarkt bei der Ratte“ (Preis für einen „herausragenden Vortrag“).
- 16.2.2001: 2. Bad Brückenaue Wintertagung der Medizinischen Klinik: „Endogene Cannabinoide tragen zur Blutdruckerniedrigung nach experimentellem Myokardinfarkt bei der Ratte bei.“
- 20.8.2001: NIAAA, Bethesda, Maryland: “Effect of cannabinoids on the coronary system.”

L e b e n s l a u f

Persönliche Daten

Name Jan Christoph Karcher
Geburtsdatum 16.11.1974
Geburtsort Sargodha/ Pakistan
Vater Dr.jur. Henning Karcher
Mutter Dipl.psych. Gerlinde Karcher
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981-1985 Tiefburg-Grundschule Heidelberg
1985 -1994 Bunsengymnasium Heidelberg

1994 - 1996 Zivildienst in Versailles und in Nîmes /Frankreich

Studium

4/ 96 - 11/ 03 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
3/ 01 - 9/ 01 Kardiovaskuläre Forschung am NIH, Bethesda, MD/ USA
11/ 03 Abschluss mit dem 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

10/02- 1/03 Innere Medizin: Université de Lausanne/ Schweiz
2/03 - 5/03 Chirurgie: Conradie Hospital, Cape Town/ Südafrika
6/03 - 9/03 Pädiatrie: Red Cross Childrens Hospital, Cape Town/ Südafrika

Sprachen Deutsch, Englisch, Französisch fließend in Wort und Schrift.