

**CHARAKTERISIERUNG NEGATIV INOTROPER SUBSTANZEN NACH
MYOKARDISCHÄMIE**

HABILITATIONSSCHRIFT
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Innere Medizin

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med./Frankreich Verena Stangl, geb. Tiessen
geboren am 15.04.1960 in Essen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek
Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Tag des öffentlichen Vortrags: 23. April 2002

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Trappe
2. Univ.-Prof. Dr. med. K. Werdan

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung und Problemstellung	5
3. Postischämisch freigesetzte negativ inotrope Substanzen (NIS): Untersuchungen am Doppelherzmodell	
3.1. Entwicklung des Doppelherzmodells	10
3.2. Charakterisierung der Effekte von NIS: pharmakologische und biochemische Untersuchungen	12
3.3. Freisetzung von NIS: Bedeutung des Koronarendothels	13
3.4. Interaktion von NIS mit postischämisch freigesetzten Katecholaminen und Adenosin	15
3.5. Interaktion von Adenosin und Prostazyklin bei der Regulation des Koronarflusses nach Myokardischämie	16
4. Effekte von NIS: Untersuchungen an isolierten adulten Kardiomyozyten	
4.1. Laserscan Online Messung: Methodik	17
4.2. Validierung des Meß- und Erfassungssystems: Untersuchungen zu kontraktile Effekten von Endothelin und Adrenomedullin	18
4.3. Effekte von NIS auf Ca^{2+} -Transient, L-Typ Ca^{2+} -Kanal und Signaltransduktion	19
5. Stellenwert der Untersuchungsergebnisse im Gesamtkonzept	
5.1. Kardiodepressorische Mediatoren nach Myokardischämie	21
5.2. Teleologische Bedeutung von NIS	22
5.3. Ausblick	25
6. Danksagung	26
7. Erklärung	27
8. Lebenslauf	28
9. Publikationen	29

1. Zusammenfassung

Kardialen Strukturen, wie dem koronaren oder endokardialen Endothel, dem Myokard und auch dem Perikard werden unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zunehmend autokrine oder parakrine Funktionen zugesprochen. Es ist gut belegt, dass das Herz durch Freisetzung von löslichen Mediatoren nach Myokardischämie einen entscheidenden Anteil an der postischämischen Regulation der Vasomotion hat. Allerdings weniger bekannt ist die Bedeutung einer Mediatorvermittelten kardialen Autoregulation bei postischämischen Veränderungen der Myokardkontraktilität.

In dieser Arbeit wird eine neue negativ inotrope Substanz(en) (NIS) beschrieben, die nach myokardialer Ischämie aus isolierten Herzen freigesetzt wird und die an sequentiell perfundierten Herzen, die als Bioassay eingesetzt werden, einen deutlichen kardiodepressiven Effekt hervorruft. In isolierten Feld-stimulierten Rattenkardiomyozyten reduziert NIS dosisabhängig die systolische Zellverkürzung und den Ca^{2+} -Transienten (Konfokale Laser Scan Mikroskopie). Der negativ inotrope Effekt setzt sowohl in isolierten Herzen als auch Kardiomyozyten schnell ein und ist reversibel. Katecholamine maskieren und überspielen den negativ inotropen Effekt in Abhängigkeit von der Ischämiedauer. Voltage clamp Untersuchungen auf Einzelzellebene zeigten, dass NIS den Ca^{2+} -Einstrom I_{ca} über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle reduziert. Somit scheint NIS die Myokardkontraktilität und Zellverkürzung über eine Verminderung der intrazellulären systolischen Ca^{2+} -Konzentrationen durch Blockade der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zu reduzieren und nicht etwa über eine Ca^{2+} -Desensitivierung. Derzeit ist noch nicht geklärt, über welchen Mechanismus NIS den Ca^{2+} -Einstrom blockiert. Da weder die Gewebsspiegel von cGMP und cAMP noch die PKA Aktivität durch NIS moduliert werden, ist es unwahrscheinlich, dass eine Dephosphorylierung von Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals der Funktionsweise von NIS zu Grunde liegt. Die Ergebnisse legen nahe, dass NIS direkt mit dem Ca^{2+} -Kanal interagiert, z.B. durch Bindung an ein Kanalprotein.

Die chemische Struktur von NIS ist derzeit noch ungeklärt, allerdings gibt es Hinweise, dass es sich nicht um ein Protein handelt. Die Substanz(en) ist stabil, Hitze-resistent (56°) und ein dialysierbares Molekül mit einem geringen Molekulargewicht (< 0.5

kDa). Die kardiodepressorische Substanz(en) wird nicht vom Koronarendothel freigesetzt.

Eine abschließende Bewertung, ob NIS durch Aggravation der kontraktilen Dysfunktion myokardschädigend oder durch Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauches kardioprotektiv wirkt, ist derzeit noch nicht möglich.

2. Einleitung und Problemstellung

Das schlagende Herz adaptiert sich an Veränderungen der Lastbedingungen, von Hormonwirkungen und der Koronarperfusion durch eine Reihe gewebsspezifischer Reaktionsformen, die letztlich alle darauf abzielen, das Gleichgewicht zwischen Energieangebot und -bedarf des Herzens selbst, als auch des gesamten Organismus aufrechtzuerhalten. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass das Herz nicht nur als mechanische Pumpe anzusehen ist, sondern dass es darüberhinaus über autokrine und parakrine Mechanismen verfügt, über die es unter physiologischen aber auch pathophysiologischen Bedingungen in die Herzkreislaufregulation eingreift. Vor allem das vaskuläre Endothel, zuvor als mechanische Barriere angesehen, wurde als eigenständiges Organ - präziser - als ein endokrines System neu definiert. Die Endothelzellen sind in Lage, rezeptorabhängig oder -unabhängig eine Reihe von Mediatoren freizusetzen, die Gefäßtonus und Kontraktilität, ja die gesamte Gefäßwandhomöostase modulieren. Diese Beobachtungen bilden den Kontext dafür, dass die Bedeutung einer (patho)physiologisch relevanten Interaktion zwischen kontrahierendem Myokard und den benachbarten Endothelzellen bei der Regulation der Myokardkontraktilität in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses gerückt ist (Shah et al., 1996; Brutsaert et al., 1998). Offenbar setzt aber nicht nur das Koronarendothel, sondern auch das Endokard neben bekannten Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) zum Teil noch nicht identifizierte Substanzen frei, die abhängig vom Gewebsmilieu positiv oder negativ inotrop wirken können (Shah et al., 1996; Brutsaert et al., 1998). Auch für das Myokard selbst konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, biologisch aktive Substanzen wie NO und Zytokine zu produzieren, die im Sinne einer autokrinen Regulation wiederum die eigene Kontraktilität modulieren können.

Für die pathologische Situation einer Ischämie und Reperfusion ist es inzwischen gut belegt, dass das Herz - insbesondere das Koronarendothel - durch Freisetzung von Mediatoren wie NO, Adenosin und Prostazyklin einen entscheidenden Anteil an der postischämischen Regulation der Vasomotion hat (Node et al., 1996; Park et al., 1992; Ely et al., 1992). Weniger klar ist die Bedeutung einer Mediator-vermittelten kardialen Autoregulation bei postischämischen Kontraktionsstörungen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Myokard selbst verschiedene negativ inotrope Substanzen nach

Ischämie und Reperfusion freisetzt, die über autokrine oder parakrine Mechanismen die Kontraktilität modulieren (Dietze et al., 1997). In diesem Kontext sind vor allem Zytokine, Plättchen aktivierender Faktor (PAF), freie Radikale, Arachidonsäure und/oder deren Metabolite sowie NO zu nennen (Meldrum 1998; Guillen et al., 1995; Montrucchio et al., 2000; Zweier et al., 1987, Van der Vusse et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass diese lokal im ischämischen (und/oder reperfundierten) Gebiet gebildeten kardiodepressiven Mediatoren nicht nur die Ischämie-vermittelte Kontraktionsstörung verstärken, sondern auch in intakte, nicht ischämische Areale des Myokards diffundieren und so eine globale myokardiale Dysfunktion hervorrufen können. Es ist derzeit nicht geklärt, ob diesen Mediatoren eine Bedeutung beim Phänomen des Reperfusionsschadens zukommt.

Neben bekannten (post)ischämisch freigesetzten, negativ inotrop wirksamen Mediatoren wurden in experimentellen Untersuchungen einige noch nicht identifizierte kardiodepressive Substanzen beschrieben, die bisher nur in Bioassays charakterisiert wurden. So konnte Ramaciotti nachweisen, dass die Myokardkontraktilität durch einen stabilen endothelialen negativ inotropen Faktor (sog. „downregulating factor“) moduliert wird, der nach Abfall des Koronarflusses verstärkt synthetisiert wird (Ramaciotti et al., 1993). Auch Shah beschrieb einen endothelialen Faktor, der bei einer Gewebhypoxie gebildet wird und unabhängig vom Kalziumstoffwechsel direkt die Brückenbildung der Aktin-Myosinfilamente hemmt. Wahrscheinlich werden diese Reaktionen über Gefäßwandfaktoren reguliert, die den lokalen Sauerstoffpartialdruck registrieren (Shah et al., 1997). Die Bedeutung dieser endothelialen, negativ inotrop wirksamen Mediatoren für Ischämie-bedingte Kontraktionsstörungen und für den Reperfusionsschaden ist derzeit nicht geklärt.

Unklar ist auch, ob das Herz - insbesondere das Myokard - während oder nach Ischämie noch weitere negativ inotrope Substanzen bildet. Im allgemeinen sind Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung putativer kardiodepressorischer Mediatoren, die nach einer Myokardischämie freigesetzt werden, methodisch sehr schwierig, da Mediator-induzierte Veränderungen nicht genau von Ischämie-bedingten Störungen differenziert werden können. Insbesondere metabolische Faktoren, wie Sauerstoffpartialdruck, CO₂, und Gewebs-pH, aber auch neurogene und myogene Mechanismen beeinflussen Vasomotion und Kontraktilität nach myokardialer Ischämie.

Aufgrund dieser methodischen Probleme ist die Bedeutung einer Mediator-vermittelten (post)ischämischen Kontraktionsstörung bisher nicht eindeutig geklärt. Es ist ein großes wissenschaftliches Anliegen, Ansätze zu entwickeln, die eine Differenzierung zwischen Mediator-bedingten inotropen Effekten und rein Ischämie-bedingten Kontraktionsstörungen erlauben und die es ermöglichen, beide Formen, sowie deren Interaktionen weiter funktionell zu beschreiben. Diesem Anliegen sowie der Identifizierung bzw. genaueren Charakterisierung von postischämisch freigesetzten Mediatoren dient die vorliegende Schrift.

Literaturangaben zu 2.

Shah AM, Grocott-Mason RM, Pepper CB, Mebazaa A, Henderson AH, Lewis MJ, Paulus WJ. The cardiac endothelium: Cardioactive Mediators. *Progr Cardiovasc Dis* 1996;39:263-284.

Brutsaert DL, Franssen P, Andries JL, De Keulenaer GW, Sys SU. Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc Res* 1998;38:281-290.

Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Tada M, Hori M, Kamada T. Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation* 1996;93:356-364.

Park KH, Rubin LE, Gross SS, Levi R. Nitric oxide as a mediator of hypoxic coronary vasodilation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circ Res* 1992;71:992-1001.

Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992;85:893-904.

Dietze GJ, Taegtmeyer H. Autocrine and paracrine signaling between contracting myocardium and coronary endothelium during myocardial ischemia: effects of insulin resistance. *Am J Cardiol* 1997;80:1A-2A.

Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998;274:R577-R595.

- Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 β and IL-6. *Am J Physiol* 1995;269:R229-R235.
- Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80:1669-1699.
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1404-1407.
- Van der Vusse GJ, Reneman RS, van Bilsen M. Accumulation of arachidonic acid in ischemic/reperfused cardiac tissue: possible causes and consequences. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:85-93.
- Ramacioti C, McClellan G, Sharkey A, Rose D, Weisberg A, Winegrad S. Cardiac endothelial cells modulate contractility of rat heart in response to oxygen tension and coronary flow. *Circ Res* 1993;72:1044-1064.
- Shah AM, Mebazaa A, Yang ZK, Cuda G, Lankford EB, Pepper CB, Sollott SJ, Sellers JR, Robotham JL, Lakatta EG. Inhibition of myocardial crossbridge cycling by hypoxic endothelial cells: a potential mechanism for matching oxygen supply and demand? *Circ Res* 1997;80:688-698.

Die vorliegende Habilitationsschrift befaßt sich mit folgenden Problemstellungen:

1. Entwicklung eines physiologischen in vitro-Modells der sequentiellen Perfusion zweier Herzen (Doppelherzmodell) zur Erfassung der Effekte von Mediatoren, die unter pathophysiologischen Bedingungen, vor allem nach Myokardischämie aus isolierten Herzen freigesetzt werden;
2. Hämodynamische Untersuchungen der Effekte postischämisch freigesetzter kardiodepressiver (und vasodilatierender) Mediatoren an diesem Modell;
3. Biochemische und pharmakologische Charakterisierung der negativ inotropen Substanz(en) (NIS);
4. Aufbau und Validierung einer Meßmethode zur Computer-gesteuerten Online-Registrierung von Zellverkürzung und Calcium-Transient isolierter adulter Kardiomyozyten am konfokalen Laserscan Mikroskop;
5. Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen und der Signaltransduktion, die für den negativ inotropen Effekt von NIS verantwortlich sind.

Die Forschungsergebnisse zu diesen Teilthemen stelle ich in Form einer Monographie mit Originalarbeiten vor. Die Bedeutung der Arbeiten diskutiere ich am Schluß in einer Übersichtsarbeit, die ich zu diesem Thema verfaßt habe. Der deutschsprachige Text ist auf der Grundlage der neuen amtlichen Rechtschreibregeln geschrieben.

3. Postischämisch freigesetzte negativ inotrope Substanz(en) (NIS): Untersuchungen am Doppelherzmodell

3.1. Entwicklung des Doppelherzmodells

Um die Effekte putativer kardioaktiver Substanzen, die aus isoliert perfundierten Herzen nach einer Myokardischämie während der Reperfusion freigesetzt werden, auf Koronarzirkulation und Kontraktilität eines nachgeschalteten, in Serie perfundierten nicht - ischämischen Herzen zu untersuchen, wurde ein spezielles Doppelherzmodell entwickelt. Das Wirkprinzip beruht darauf, dass einem nach der Langendorff-Technik perfundierten isolierten Herzen das reoxygenierte Koronareffluat eines anderen isolierten Herzen zugeleitet wird.

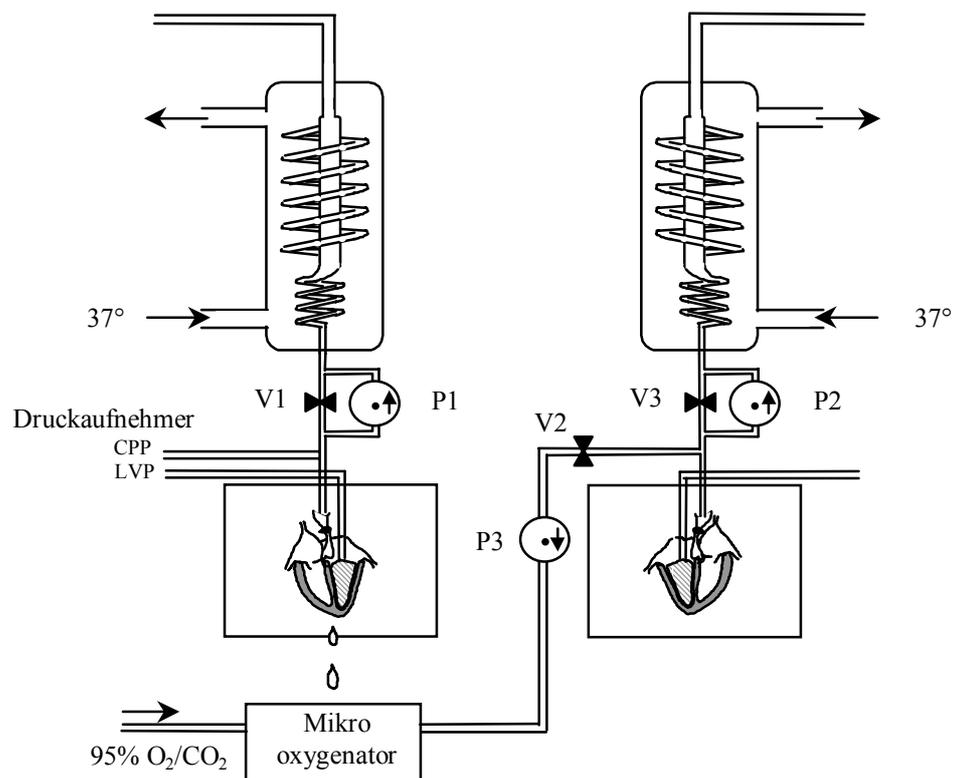


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Doppelherzmodells

(V1-3: Ventile; P1-3: Pumpen; CPP: koronarer Perfusionsdruck, LVP: linksventrikulärer Druck)

Einige Voraussetzungen zur Durchführung dieses „Doppelherzmodells“ mußten erfüllt werden: So ist eine kurze Transitzeit des Koronareffluats vom ersten zum zweiten Herzen notwendig, um auch die Wirkung kurzlebiger Metabolite beurteilen zu können; deshalb muß in möglichst kurzer Zeit eine adäquate Oxygenierung des Koronareffluats gewährleistet sein und das Volumen des Oxygenators gering gehalten werden, um eine Konzentrationsabnahme oder einen Wirkverlust möglicher kardioaktiver Metabolite zu vermeiden. Darüberhinaus ist die exakte Synchronisation der Flußraten beider Herzen eine unabdingbare Voraussetzung für die einwandfreie Arbeitsweise einer seriellen Perfusion zweier isolierter Langendorffherzen. Mit dem entwickelten Modell können diese Vorgaben umgesetzt werden. Das Koronareffluat des ersten Herzens wird von einem Mikrooxygenator (Volumen 500 µl) reoxygeniert und mittels einer Pumpe zum zweiten Herzen gefördert. Durch ein speziell entwickeltes Pumpen- und Antriebsystem sowie Reduktion von Länge und Diameter der Schläuche konnte gewährleistet werden, dass die Transferzeit des Koronareffluats vom ersten zum zweiten Herzen unter 3 Sekunden liegt. Die Flußraten des zweiten Herzens werden über einen Mikroprozessor exakt an die Flußraten des ersten Herzens adaptiert. Mit Hilfe von Durchfluß-Sonden („flow-thru“) erfolgt eine kontinuierliche Messung von Temperatur, Sauerstoffpartialdruck und pH. Dieses Modell ermöglicht es somit erstmals, kardiale Wirkungen auch kurzlebiger Metabolite, die im ersten Herzen gebildet werden, funktionell am zweiten Herzen zu testen.

Das Modell wurde patentiert (Deutsche Patentanmeldung P4407337.2 und P4407331.3).

3.2. Charakterisierung der Effekte von NIS: pharmakologische und biochemische Untersuchungen

In Validierungsuntersuchungen wurde gezeigt, dass unter Kontrollbedingungen eine sequentielle Perfusion zweier Herzen am Doppelherzmodell möglich ist und zu keinen relevanten Veränderungen der kontraktile Parameter führt. Erfolgte die sequentielle Perfusion nach einer 10-minütigen globalen Ischämie des ersten Herzens, kam es zu einem deutlichen negativ inotropen (LVP -22% , LVdP/dt_{max} -43%) und lusitropen (LVdP/dt_{min} -41%) Effekt am zweiten Herzen. Die Herzfrequenz veränderte sich nicht signifikant. Der kardiodepressive Effekt setzte schnell ein und war innerhalb von 5 Minuten reversibel.

Um die modulatorische Rolle bekannter, während und nach einer Ischämie freigesetzter Mediatoren auf diesen negativ inotropen Effekt zu charakterisieren, wurden verschiedene biochemische bzw. pharmakologische Interventionen durchgeführt. Durch Verabreichung von Rezeptorblockern, Syntheseinhibitoren und Sauerstoffradikalfängern konnte durch das Doppelherzmodell nachgewiesen werden, dass dieser kardiodepressorische Effekt weder durch Adenosin, Stickstoffmonoxid (NO), Arachidonsäure oder Arachidonsäuremetaboliten noch durch freie Sauerstoffradikale verursacht wird.

Untersuchungen zu Stabilität und chemischer Struktur der negativ inotropen Substanzen (NIS) ergaben:

1. **NIS ist stabil:** Lagerung des Koronareffluats bei Raumtemperatur bis 24 h hebt den Effekt nicht auf,
2. **NIS ist hitzeresistent** (gegenüber Erhitzen auf 56° über 30 min),
3. **NIS ist wahrscheinlich kein Protein:** Erhitzen oder Inkubation mit unterschiedlichen Proteasen hebt den Effekt nicht auf,
4. **NIS ist ein kleines Molekül** (<0.5 kD),
5. **NIS ist löslich.**

Anlage zu 3.2:

Felix SB, Stangl V, Frank TM, Harms C, Berndt T, Kästner R, Baumann G. Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischaemia during reperfusion. Cardiovasc Res 1997;35:68-79.

3.3. Freisetzung von NIS: Bedeutung des Koronarendothels

In diesem Teilthema wurde untersucht, ob die koronaren Endothelzellen möglicher Synthese- und/oder Freisetzungsort von NIS sind. Dies ist insofern von besonderem Interesse, da zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die Myokardkontraktilität entscheidend durch koronare und endokardiale Endothelzellen moduliert wird. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt. Neben bekannten Mediatoren, die aus dem Endothel freigesetzt werden, wie Endothelin, NO und Prostazyklin werden andere noch nicht identifizierte kardioaktive Substanzen diskutiert, welche die Myokardkontraktilität reduzieren oder steigern.

Um die funktionelle Bedeutung des koronaren Endothels bei dem beobachteten kardiodepressorischen Effekt zu klären, wurde das Koronarendothel des ersten Herzens vor Einleitung der Ischämie und Reperfusion sowie der sequentiellen Perfusion selektiv geschädigt. Hierfür wurde zwei verschiedene Methoden angewendet. Im ersten Verfahren wurden die Endothelzellen durch eine intrakoronare Triton X-100 Infusion geschädigt. Die exakte Dosis von Triton X-100, die selektiv das Koronarendothel zerstört, die glatten Muskelzellen und Myozyten aber noch nicht beeinflusst, wurde in vorangehenden Dosisfindungsstudien ermittelt. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde nach histologischen Kriterien eine schwere Endothelzellschädigung festgemacht. Myozyten und glatte Muskelzellen wurden durch die Behandlung jedoch nicht geschädigt. Neben der histologischen Validierung erfolgten funktionelle Untersuchungen an isolierten Herzen mittels Endothel-abhängiger und -unabhängiger Vasodilatoren vor und nach Schädigung des Endothels. Durch diese Untersuchungen wurde die funktionelle Schädigung des Endothels sowie die Integrität der glatten Muskelzelle nachgewiesen. Untersuchungen der Ansprechbarkeit der isolierten Herzen auf eine β -adrenerge Stimulation vor und nach Triton X-100 Behandlung zeigten nach „Deendothelialisierung“ keine Abschwächung der positiv inotropen Wirkung von Isoproterenol. Somit ist sowohl der kontraktile Apparat als auch die β -Rezeptor vermittelte Signaltransduktion nicht von der Triton X-100 Behandlung kompromittiert.

Das zweite Verfahren zur Endothelzellschädigung wurde im Detail von Griffith et al. (1984) und Ramaciotti et al. (1993) beschrieben. Die isolierten Herzen wurden über die

Dauer von 10 Minuten mit einer hyperkaliämischen Krebs-Henseleit-Lösung (40 mM) perfundiert.

Unabhängig von der verwendeten Methode der Endothelschädigung zeigte sich nach 10-minütiger Ischämie des ersten Herzens am zweiten Herzen mit Beginn der sequentiellen Perfusion ein deutlicher kardiodepressorischer Effekt. Dies kann als Hinweis gelten, dass das Koronarendothel nicht der Syntheseort dieser negativ inotropen Substanzen ist. Möglicherweise wird NIS direkt während der Reperfusionphase aus den Kardiomyozyten freigesetzt.

Anlage zu 3.3.:

Stangl V, Felix SB, Meyer R, Berndt T, Kästner R, Wernecke KD, Baumann G. Cardiodepressive mediators are released after ischemia from an isolated heart: role of coronary endothelial cells. JACC 1997;29:1390-1396.

3.4. Interaktion von NIS mit postischämisch freigesetzten Katecholaminen und Adenosin

Katecholamine werden in Abhängigkeit von der Ischämiedauer über verschiedene Mechanismen freigesetzt. Ischämien kürzer als 10 Minuten sind nur mit einer exozytotischen lokalen Katecholaminfreisetzung assoziiert. Ischämien von mehr als 10 Minuten Dauer führen über einen nicht-exozytotischen Mechanismus zu einer Noradrenalinfreisetzung, die im Extrazellulärraum des ischämischen Myokards und im Koronareffluat gemessen werden kann. Diese Noradrenalinfreisetzung steigt mit der Dauer der Ischämie an. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, bei der die sequentielle Perfusion zweier Herzen nach unterschiedlichen Ischämiezeiten (10, 20 und 30 Minuten) eingeleitet wurde. Die Ergebnisse dieser biochemisch-analytischen und pharmakologischen Untersuchungen ergaben, dass aus dem ersten Herzen bei längeren Ischämiezeiten (Ischämiedauer >10 Minuten) zeitabhängig vermehrt Katecholamine freigesetzt werden, die im zweiten Herzen die negativ inotropen Effekte von NIS überspielen bzw. antagonisieren. Andererseits wird nach einer Myokardischämie vom Myokard vermehrt Adenosin freigesetzt, das durch seine antiadrenerge Wirkung die Katecholamineffekte im zweiten Herzen abschwächt. Die Interaktion von NIS und Adenosin könnte durch die Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauches einen protektiven kompensatorischen Mechanismus nach Myokardischämie darstellen.

Anlage zu 3.4.:

Stangl V, Harms C, Frank T, Stangl K, Muß J, Buttke K, Baumann G, Felix SB. Cardiodepressant mediators are released after myocardial ischaemia: modulation by catecholamines and adenosine. *Acta Physiol Scand* 1999;165:387-393.

3.5. Interaktion von Adenosin und Prostazyklin bei der Regulation des Koronarflusses nach Myokardischämie

Mit Hilfe des Doppelherzmodells können neben den kontraktile Effekten auch die Wirkungen vasoaktiver Mediatoren, die aus dem ersten Herzen nach Ischämie freigesetzt werden, am zweiten Herzen, das als bioassay eingesetzt wird, untersucht werden. Da das zweite Herz nicht einer Ischämie ausgesetzt wird, sind die unter sequentieller Perfusion beobachteten Veränderungen der Vasoreaktivität allein Mediator-vermittelt und nicht auf metabolische, myogene oder neurogene Mechanismen zurückzuführen.

Durch Einsatz von spezifischen Rezeptorantagonisten und Syntheseinhibitoren wurde die Bedeutung und Interaktion von Adenosin und Prostazyklin, der zwei wichtigsten Mediatoren der postischämischen Vasodilatation, geprüft. Die Untersuchungen bestätigen erstens das Konzept, dass Adenosin der bedeutendste Mediator der postischämischen Vasodilatation ist; sie zeigen zweitens, dass Prostazyklin zum Teil die Adenosinfreisetzung inhibiert und sie geben drittens Hinweise darauf, dass Prostazyklin als vasodilatatorisch wirksamer Mediator kompensatorisch an Bedeutung gewinnt, wenn die Wirkung von Adenosin wegfällt. Darüberhinaus ergaben sie Versuche, dass selbst unter vollständiger Hemmung der postischämischen Vasodilatation an diesem Modell der negativ inotrope Effekt unverändert vorlag. Aus diesen Versuchen ist ferner zu folgern, dass NIS die Vasoreaktivität des postischämischen Herzen offenbar nicht beeinflusst. Die kardialen Effekte von NIS betreffen in erster Linie den Ca^{2+} -Stoffwechsel des Kardiomyozyten und nicht der glatten Gefäßmuskulatur.

Anlage zu 3.5.:

Stangl V, Frank TM, Schrör K, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Interaction of adenosine and prostacyclin in coronary flow regulation after myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 1999;377:43-50.

4. Effekte von NIS: Untersuchungen an isolierten adulten Kardiomyozyten

4.1. Laserscan Online Messung: Methodik

Ziel weitergehender Untersuchungen war es abzuklären, über welche Mechanismen NIS negativ inotrop wirkt. Die myokardiale Kontraktilität wird entweder über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen reguliert oder über Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität. Aus diesem Grunde wurde an den isolierten ventrikulären Rattenkardiomyozyten die intrazelluläre Ca^{2+} -Messung bei simultaner Erfassung der Zelllänge etabliert. Die Isolation adulter Kardiomyozyten erfolgte enzymatisch in einem nach Langendorff perfundierten isolierten Rattenherzen. Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und der Zelllänge von isolierten mit dem Ca^{2+} -Chelator Fluo-3 beladenen, feldstimulierten Kardiomyozyten erfolgte mittels der konfokalen Lasermikroskopie. Um eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung der Veränderungen von Ca^{2+} und Zelllänge zu erreichen, entwickelten wir in Kooperation mit Gregg Joss, Macquarie University, North Ryde NSW, Australien, ein Computerprogramm, mit dem es möglich ist, zweidimensionale Bilder in sehr schneller Abfolge (480 frames per second) zu erfassen und analysieren.

Anlage zu 4.1.:

Bramlage P, Joss G, Staudt A, Jarrin A, Podlowski S, Baumann G, Stangl K, Felix SB, Stangl V. Computer-aided measurement of cell shortening and calcium transients in adult cardiac myocytes. Biotech Progress 2001, in press.

4.2. Validierung des Meß- und Erfassungssystems: Untersuchungen zu kontraktile Effekten von Adrenomedullin und Endothelin

Zur Validierung der Laserscan-Mikroskopie Online Messung wurden verschiedene Substanzen mit bewiesenen (Endothelin-1, Isoproterenol) und noch ungeklärten (Adrenomedullin) Effekten auf die Myokardkontraktilität eingesetzt und mit anderen etablierten Meßsystemen (isolierter Ratten-Papillarmuskel, isoliertes retrograd, nach Langendorff perfundiertes Herz) verglichen. Es zeigte sich, dass es mit der Laserscan Online Meßmethode (inklusive speziell entwickelter Software, siehe 4.1.) möglich ist, über einen Zeitraum von 20 Minuten mit hoher räumlicher Auflösung an Einzelzellen simultan den Ca^{2+} -Transienten und die Zelllänge zu erfassen. Die erhobenen Daten korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der anderen Meßsysteme. Wir konnten zeigen, dass Adrenomedullin, ein kürzlich entdecktes natriuretisches Peptid, für das sehr widersprüchliche Literatur bezüglich gleichzeitig bestehender kontraktile Effekte vorliegt, in adulten Ratten die Myokardkontraktilität nicht moduliert.

Anlage zu 4.2.:

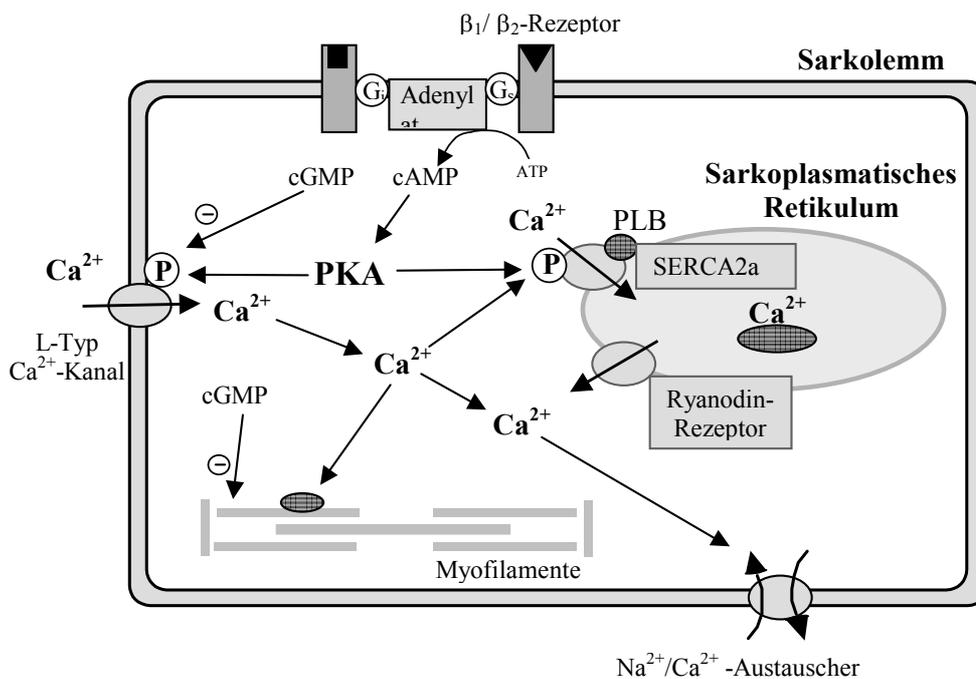
Stangl V, Dschietzig T, Bramlage P, Boyé P, Kinkel HAT, Staudt A, Baumann G, Felix SB, Stangl K. Adrenomedullin and myocardial contractility in the rat. Eur J Pharmacol 2000;408:83-89.

4.3. Effekte von NIS auf Ca^{2+} -Transient, L-Typ Ca^{2+} -Kanal und Signaltransduktion

Untersuchungen an isolierten adulten Feld-stimulierten Kardiomyozyten ergaben, dass das postischämische Koronareffluat, das NIS enthält, zu einer dosisabhängigen Reduktion des Ca^{2+} -Transienten, der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Zellverkürzung führt. Die negativ inotrope Wirkung des ischämischen Effluats setzte bei einer Verdünnung von 1:16 und führt bei einer Verdünnung von 1:2 zu einer 75%igen Reduktion der Zellverkürzung und 58%igen Verminderung des Ca^{2+} -Transienten. Da die Konzentrations-Wirkungskurven für die Inhibition der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Inhibition der Zellverkürzung nahezu deckungsgleich verlaufen, muß postuliert werden, dass der negativ inotrope Effekt nicht auf eine Desensitivierung der Myofilamente zurückzuführen ist, sondern direkt durch eine Abnahme des Ca^{2+} -Transienten verursacht wird.

Die Ca^{2+} -Konzentration im Myozyten ist ein entscheidender Faktor bei der Regulation der Myokardkontraktilität. Ca^{2+} -Ionen gelangen vom Extrazellarraum in die Zelle hauptsächlich durch in der Plasmamembran lokalisierte spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle.

Ca²⁺-Regulation im Kardiomyozyt



In Herzzellen ist vor allem der L-Typ (long-lasting) Ca^{2+} -Kanal, der durch die Membrandepolarisation und über Phosphorylierung aktiviert wird, für den langsamen Einwärtsstrom („slow inward current“) verantwortlich, der dann als primärer Effektor die schnelle phasische Kontraktion triggert. Dieser Kalziuminflux führt zu einer Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum („Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung“) und damit zu einer Kontraktion der Myozyten.

Es wurde in einem weiteren Schritt geprüft, über welchen Mechanismus NIS zu einer Reduktion des Kalziumtransienten führt. In Kooperation mit dem Institut für Physiologie, Universität Halle (Prof. G. Isenberg) erfolgten voltage clamp-Untersuchungen, die zeigten, dass NIS den Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) über die eine Blockade der L-typ Ca^{2+} -Kanäle reduziert. Es ist noch nicht geklärt, über welchen Mechanismus NIS I_{Ca} genau blockiert. Durch weitere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass weder die Gewebsspiegel von cGMP und cAMP noch die Proteinkinase A Aktivität durch NIS moduliert wird. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Dephosphorylierung von Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals ursächlich zu Grunde liegt. Wir vermuten, dass NIS direkt mit dem Ca^{2+} -Kanal interagiert, z.B. durch Bindung an ein Kanalprotein oder durch Verstopfung des Kanals (oder der Kanal-Pore).

Anlage zu 4.3.:

Felix SB, Stangl V, Pietsch P, Bramlage P, Staudt A, Bartel S, Krause EG, Borschke JU, Wernecke KD, Isenberg G, Baumann G. Soluble substances released from postischemic reperfused rat hearts reduce calcium transients and contractility by blocking the L-Type Calcium Channel. *JACC* 2001;37:668-675.

5. Stellenwert der Untersuchungsergebnisse im Gesamtkonzept

5.1. Kardiodepressorische Mediatoren nach Myokardischämie

Während myokardialer Ischämie und nachfolgender Reperfusion werden vom Herz selbst eine Reihe von negativ inotropen Substanzen freigesetzt, die über auto- und parakrine Mechanismen die eigene Myokardkontraktilität modulieren können. Diese Mediatoren sind vor allem Zytokine, PAF, freie Sauerstoffradikale, Arachidonsäure und deren Metaboliten, Adenosin und Stickstoffmonoxid. Die Bedeutung dieser negativ inotropen Mediatoren wurde in einem Review herausgearbeitet und zusammengefaßt.

Anlage zu 5.1.:

Stangl V, Baumann G, Stangl K, Felix SB. Negative inotropic mediators released from the heart after myocardial ischaemia-reperfusion. Cardiovasc Res 2001, in press.

5.2. Teleologische Bedeutung von NIS

Die zentrale Frage, ob NIS eine pathogenetische Bedeutung bei Ischämie- und/oder Reperfusionen bedingten Schäden im Sinne einer weiteren Aggravation der kontraktile Dysfunktion zukommt oder, ob - im Gegensatz dazu - NIS vielleicht sogar protektiv in Bezug auf das Überleben der Kardiomyozyten durch Verminderung des Energiebedarfs wirkt, ist unklar und kann durchaus kontrovers diskutiert werden.

Für eine pathogenetische, schädigende Wirkung von NIS spricht die Hypothese, dass negativ inotrope Mediatoren - wie NIS - die bereits kompromittierte Myokardfunktion während Ischämie zusätzlich verschlechtern können. Auch nach der myokardialer Ischämie kann NIS die Myokardkontraktilität während der Reperfusion weiter aggravieren. Somit stellte sich die Frage, welche Bedeutung NIS oder anderen kardiodepressiven Mediatoren bei der Ausbildung des Reperfusionsschadens zukommt. Unter diesem Begriff werden Ereignisse wie die reversible kontraktile Dysfunktion („myocardial stunning“), Reperfusionarrhythmien, mikrovaskuläre Schäden, Apoptose und nekrotischer Zelltod (lethaler Reperfusionsschaden) zusammengefasst, die trotz adäquater Myokardperfusion nach Ischämie auftreten (Bolli et al., 1999). Zwei Pathomechanismen werden heute hauptsächlich für der Entstehung des Reperfusionsschadens verantwortlich gemacht, nämlich oxidativer Stress und Ca^{2+} -Überladung der Zelle. Mit Beginn der Reperfusion werden große Mengen freier Sauerstoffradikale sowohl vom Myokard als auch von aktivierten infiltrierenden neutrophilen Granulozyten generiert und führen zum oxidativen Schaden mit entsprechenden biochemischen, metabolischen und funktionellen Auswirkungen. Durch Freisetzung von lytischen Enzymen aus aktivierten Neutrophilen wird diese Schädigung weiter verstärkt (Ambrosio et al., 1999). Mediatoren wie NIS, die in der postischämischen Reperusionsphase liberiert werden und die über autokrine und parakrine Mechanismen negativ inotrop wirken, können bei der Entstehung des Reperfusionsschadens von Bedeutung sein. Insbesondere gilt dies für das „myocardial stunning“, definiert als eine prolongierte und reversible Beeinträchtigung der kontraktile Funktion des ischämischen, jedoch noch vitalen Myokardgewebes (Opie, 1991).

Andererseits könnte sich NIS bei der Ischämie/Reperfusion auch günstig im Sinne der Zellprotektion auswirken. Für diese Hypothese spricht der Befund, dass NIS - vergleichbar den Effekten der Beta-Blocker – die myokardiale Kontraktilität während und nach Ischämie verringert und somit zu einer Reduktion des myokardialen Sauerstoffverbrauchs führt. Eine Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs ist energetisch günstig und erhöht die Überlebenswahrscheinlichkeit von Kardiomyozyten in gefährdeten Myokardbezirken wie der ischämischen Randzone. Darüber hinaus könnte die Freisetzung von NIS ein kompensatorischer Mechanismus des Myokards sein durch Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms die Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyten während Ischämie und Reperfusionsphase zu reduzieren und damit den Zellschaden zu verringern (Opie, 1991; Bolli et al., 1999).

In Analogie zu NIS wurden für $\text{TNF-}\alpha$, einem weiteren Mediator, der nach Myokardischämie freigesetzt wird, sowohl positive als auch negative Effekte auf die Myokardkontraktilität beschrieben. So zeigen sich zum einem negativ inotrope Effekte mit Ausbildung einer linksventrikulären Dysfunktion, wenn bei normaler myokardialer Pumpfunktion $\text{TNF-}\alpha$ exogen verabreicht wird (Bozkurt et al., 1998). Im Gegensatz dazu finden sich aber auch Hinweise auf eine protektive $\text{TNF-}\alpha$ Wirkung in der Ischämie/Reperfusion: So entwickeln genetisch modifizierte Mäuse mit TNF- Rezeptor Knockouts größere Myokardinfarkte als die Wildtyp Kontrollen (Kurrelmeyer et al., 2000). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass ein Mediator mit unter Normalbedingungen potentiell schädigenden Effekten in einem bestimmten pathophysiologischen Kontext wie der akuten Myokardischämie sich durchaus vorteilhaft auswirken kann. Der aktuelle Stand der Forschungsarbeiten erlaubt derzeit keine abschliessende Beurteilung der oben aufgeworfenen Frage, ob NIS nun günstig im Sinne einer Kardioprotektion oder ungünstig im Sinne einer eigenständigen pathogenetischen Bedeutung beim Reperfusionsschaden zu klassifizieren ist.

Literaturangaben zu 5.2.:

Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:S69-S75.

Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-634.

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;97:1382-1391.

Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5456-5461.

Opie LH. Postischemic stunning – the case for calcium as the ultimate culprit. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:895-899.

5.3. Ausblick

Ziel weitergehender Untersuchungen ist es, die Wirkungen von NIS noch genauer zu charakterisieren und mittels weiterer biochemischer Methoden wie HPLC (high pressure liquid chromatography) und Massenspektrometrie detailliertere Kenntnisse über die chemische Struktur zu gewinnen.

Darüberhinaus ist es von besonderem Interesse, ob diese endogen gebildete negativ inotrope Substanz(en) neben den gezeigten Akuteffekten auch zelluläre Veränderungen über längere Zeiträume induzieren kann, die möglicherweise für andauernde Kontraktionsstörungen verantwortlich sind. Dazu ist es geplant, die Effekte von NIS auf die Genexpression zu analysieren: auf RNA-Ebene seriell mittels cDNA Arrays und differential display Methoden und auf Proteinebene mittels diagnostischer und analytischer 2D Gel Elektrophoresetechniken.

Wenn der Autorin am Ende dieser Arbeit die Formulierung einer Vision erlaubt ist, so ermöglichen diese weiterführenden Forschungen die Isolierung und Identifizierung des endogen gebildeten negativ inotropen Faktors NIS. Seine Identifizierung hätte große wissenschaftliche Bedeutung im Sinne der Aufklärung von Mechanismen, die für postischämische Kontraktionsstörungen verantwortlich zeichnen. Zum anderen könnte aber aus der genaueren Kenntnis der Wirkungsweise dieses Faktors auch ein ganz praktischer klinischer Nutzen im Sinne einer Minimierung des Reperfusionsschadens in klinischen Situationen wie akuter Myokardinfarkt oder bei herzchirurgischen Eingriffen resultieren.

6. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die meinen wissenschaftlichen Werdegang gefördert und mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan B. Felix für die Hinführung zur wissenschaftlichen Thematik, für die langjährige enge wissenschaftliche Zusammenarbeit und die freundschaftliche, aber auch kritisch konstruktive Begleitung dieser Forschungsarbeiten.

Herr Prof. Dr. Gert Baumann hat durch seine große Unterstützung die Voraussetzungen für meine breite klinische Ausbildung geschaffen und die Rahmenbedingungen ermöglicht, ohne die meine Forschungstätigkeit nicht möglich gewesen wäre. Darüberhinaus hat er meine Arbeiten mit inhaltlichen Impulsen und konstruktiver Kritik über die Jahre begleitet, dafür gilt ihm mein besonderer Dank.

Diese Arbeit wäre ohne das Team des kardiologischen Forschungslabors unserer Klinik nicht möglich gewesen. Für das großes Engagement, die fachliche Unterstützung und die Flexibilität über den langen Zeitraum unserer Zusammenarbeit möchte ich allen Mitarbeitern herzlich danken.

Teile der Forschungsarbeiten wären ohne die hilfreiche Kooperation mit externen Wissenschaftlern nicht möglich gewesen. Herrn Prof. Dr. E.-G. Krause vom MDC Berlin-Buch danke ich für konstruktive Diskussionen und Anregungen sowie für die Unterstützung bei der Abklärung möglicher Signaltransduktionswege. Herrn Prof. Dr. G. Isenberg danke ich für die voltage clamp Untersuchungen am L-Typ Ca^{2+} -Kanal.

Meiner Familie, insbesondere meinen Mann, gilt mein Dank für die Unterstützung und für das aufgebrachte Verständnis.

7. Erklärung

Ich versichere hiermit, dass

1. keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
2. ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren angemeldet oder durchgeführt habe,
3. ich die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen habe, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
4. mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den

Dr. med Verena Stangl

8. Lebenslauf

Dr. med. Verena Stangl, geb. Tiessen

Charité der Humboldt-Universität, Campus Mitte

Med. Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie, Pneumologie

Schumannstr. 20/21

10117 Berlin

Tel: 030/5131535, Fax: 030/513932, Email: verena.stangl@charite.de

Persönliche Daten:

Geburtsdatum:	15.4.1960
Geburtsort:	Essen/Westfalen
Eltern:	Dr. med. Otto Tiessen, Allgemeinmediziner Ingrid Tiessen, geb. Capelle
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	verheiratet mit Prof. Dr. Karl Stangl
Schulbildung:	1965 Einschulung in die Grundschule Leoschule Lünen 1969 -1978 Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums Altlnünen mit Abschluß Abitur
Studium:	1979-1988 Studium der Humanmedizin an der Universität Droit et Santé, Lille, Frankreich
Approbation:	am 2.11.1988
Promotion:	am 2.11.1988, Thema: „Les endocardites Tricuspidiennes à Streptocoques bovis“
Weiterbildung:	vom 15.02.1989-30.09.1992 wissenschaftlicher/klinischer Assistent am der 1. Med. Klinik des Klinikum rechts der Isar/München vom 01.10.1992-dato wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Med. Klinik I der Charité, HU zu Berlin
Facharzt:	für Innere Medizin: April 1996
Oberarzt:	seit 1997

9. Publikationen:

R. Blasini, **V. Tiessen**, A. Schömig. Functional changes in left ventricular hypertrophy: diagnosis of impaired diastolic function in patients with hypertension. *Clin Invest* 1993;71(5 suppl):S46-50.

S.B. Felix, **V. Stangl**, Th. M. Frank, C. Harms, Th. Berndt, R. Kästner, G. Baumann. Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischaemia during reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997; 35:68-79.

V. Stangl, S.B. Felix, R. Meyer, Th. Berndt, R. Kästner, K.D. Wernecke, G. Baumann. Cardiodepressive mediators are released after myocardial ischemia from an isolated heart. Role of coronary endothelial cells. *JACC* 1997; 29:1390-1396.

K. Stangl, M. Laule, B. Tenckhoff, **V. Stangl**, V. Gliach, P. Dübel, A. Grohmann, C. Melzer, J. Langel, K.D. Wernecke, G. Baumann, S. Ziemer. Fibrinogen breakdown, long-lasting systemic fibrinolysis, and procoagulant activation during alteplase double-bolus regimen in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998;81:841-7.

M. Laule, I. Cascorbi, **V. Stangl**, S. Rost, C. Bielecke, K.D. Wernecke, S.B. Felix, I. Roots, G. Baumann, K. Stangl. Glycoprotein III (PIA1/PIA2) polymorphism: association with coronary artery disease and adverse events after coronary interventions. *Lancet* 1999;353:708-712.

V. Stangl, C. Harms, T.M. Frank, K. Stangl, J. Muß, K. Buttke, G. Baumann, S.B. Felix. Cardiodepressant mediators are released after myocardial ischaemia: modulation by catecholamines and adenosine. *Acta Physiol Scand* 1999, 165:387-93.

V. Stangl, O. Rödiger, T.M. Frank, M. Böhm, K. Stangl, G. Baumann, S.B. Felix. Influence of polymorphonuclear leukocytes and plasma on regulation of coronary vasomotion after myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg* 1999;68:442-446.

V. Stangl, T.M. Frank, K. Schrör, K. Stangl, G. Baumann, S.B. Felix. Interaction of adenosine and prostacyclin in coronary flow regulation after myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 1999, 377:43-50.

K. Stangl, I. Cascorbi, M. Laule, T. Klein, **V. Stangl**, S. Rost, K.D. Wernecke, S.B. Felix, A. Bindereif, G. Baumann, and I. Roots. High CA repeat number in intron 13 of the endothelial nitric synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 2000;10:133-140.

S.B. Felix, A. Staudt, W.V. Dörffel, **V. Stangl**, K. Merkel, M. Pohl, W.D. Döcke, S. Morgera, H.H. Neumayer, K.D. Wernecke, G. Wallukat, K. Stangl, G. Baumann. Hemodynamic effects of immunadsorption in patients with dilated cardiomyopathy: Three-month results from a controlled randomized study. *JACC* 2000;35(6):1590-8.

- V. Stangl**, A. Staudt, W.V. Dörffel, G. Wallukat, K. Stangl, G. Baumann, und S.B. Felix. Immunadsorption: Eine neue intensivmedizinische Methode zur Rekompensation von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz. *Intensivmed* 2000, 37:137-145.
- K. Stangl, I. Cascorbi, M. Laule, **V. Stangl**, M. Vogt, S. Ziemer, I. Roots, K. Wernecke, G. Baumann, H. Hauner. Elevated serum leptin in patients with coronary artery disease: no association with the Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor. *Int J Obes* 2000, 24:369-375.
- V. Stangl**, K. Stangl, J. Bohm, S.B. Felix. Thrombus formation after catheter closure of an atrial septal defect with a clamshell device. *Ann Thorac Surg* 2000; 69(6):1956-7.
- V. Stangl**, T. Dschietzig, P. Bramlage, A. Staudt, P. Boyé, H.-T. Kinkel, G. Baumann, S.B. Felix, and K. Stangl. Adrenomedullin and myocardial contractility in the rat. *Eur J Pharmacol*, 2000; 408:83-89.
- K. Stangl, I. Cascorbi, **V. Stangl**, M. Laule, P.M. Mrozikiewicz, M. Schwarz, S.B. Felix, H. Theres, G. Baumann, I. Roots. A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and risk of adverse events following coronary catheter interventions. *Am Heart J* 2000;140(1):170-175.
- K. Stangl, T. Dschietzig, C. Richter, M. Laule, **V. Stangl**, E. Tanis, G. Baumann, S.B. Felix. Pulmonary release, coronary and peripheral consumption of big endothelin and endothelin-1 in severe heart failure. Effects of acute after load reduction by vasodilator therapy. *Circulation* 2000, 102:1132-1138.
- C. Meisel, I. Cascorbi, I. Roots, M. Laule, **V. Stangl**, and K. Stangl. The platelet glycoprotein Ia C807T polymorphism as risk factor for coronary catheter interventions. *Blood* 2000; 96:2002-2003.
- P.M. Mrozikiewicz, I. Cascorbi, S. Ziemer, M. Laule, C. Meisel, **V. Stangl**, W. Rutsch, K. Wernecke, G. Baumann, I. Roots, K. Stangl. Reduced procedural risk for coronary catheter interventions in carriers of the coagulation factor VII-Gln³⁵³ Gene. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1520-1525.
- K. Stangl, I. Cascorbi, **V. Stangl**, M. Laule, T. Dschietzig, C. Richter, S.B. Felix, I. Roots, G. Baumann. Hyperhomocysteinaemia and adverse events complicating coronary catheter interventions. *Int J Cardiol* 2000; 76:211-217.
- V. Stangl**, C. Günther, A. Jarrin, P. Bramlage, M. Moobed, A. Staudt, G. Baumann, K. Stangl, and S.B. Felix. Homocysteine inhibits TNF- α -induced endothelial adhesion molecule expression and monocyte adhesion via nuclear factor- κ B dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1093-1100.
- V. Stangl**, G. Baumann, K. Stangl. Erworbene Herzerkrankungen und Schwangerschaft. *Z. Kardiologie* 2001;90:16-27.

- S.B. Felix, **V. Stangl**, P. Pietsch, P. Bramlage, A. Staudt, S. Bartel, E.-G. Krause, J.-U. Borschke, G. Isenberg, G. Baumann. Soluble Mediators Released from Postischemic Reperfused Rat Hearts Reduce Calcium Transient and Contractility by Blocking the L-type Ca^{2+} Channel. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:668-75.
- C. Meisel, M. Laule, I. Cascorbi, **V. Stangl**, I. Roots, K. Stangl. The G protein subunit β_3 and early complications after coronary catheter interventions. *Atherosclerosis* 2000;153:523-524.
- K. Stangl, I. Cascorbi, M. Laule, **V. Stangl**, C. Meisel, K.-D. Wernecke, S. Ziemer, G. Baumann, I. Roots, H. Hauner. The β_3 -adrenergic receptor Trp64Arg mutation is not associated with coronary artery disease. *Metabolism* 2001;50:184-8.
- C. Meisel, I. Cascorbi, T. Gerloff, **V. Stangl**, M. Laule, J.M. Müller, K.D. Wernecke, G. Baumann, I. Roots, K. Stangl. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001;154:651-658.
- K. Stangl, M. Laule, C. Richter, **V. Stangl**, J. Koch, Ö. Göktas, G. Baumann, T. Dschietzig. Pulmonary adrenomedullin counteracts deterioration of coronary flow and myocardial performance evoked by pulmonary endothelins in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001;29:1027-1032.
- A. Staudt, F. Schäper, **V. Stangl**, A. Plagemann, M. Böhm, K. Merkel, G. Wallukat, K. Stangl, G. Baumann, S.B. Felix. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by Immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 2001, 103:2681-2686.
- A. Staudt, R. Mobini, M. Fu, Y. Große, **V. Stangl**, K. Stangl, A. Thiele, G. Baumann, S.B. Felix. β_1 -Adrenoceptor antibodies induce positive inotropic response in isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2001; 423:115-119.
- S.B. Felix, **V. Stangl**, A. Kieback, W. Doerffel, A. Staudt, K.D. Wernecke, G. Baumann, K. Stangl. Acute hemodynamic effects of β -blockers in patients with severe congestive heart failure: comparison of celiprolol and esmolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:666-671.
- C. Meisel, V. Afshar-Kharghan, I. Cascorbi, M. Laule, **V. Stangl**, S.B. Felix, G. Baumann, J.A. Lopez, I. Roots, and K. Stangl. Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein $Ib\alpha$ as a risk factor for coronary artery disease and catheter interventions. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1023-1027.
- S.B. Felix, A. Staudt, M. Landsberger, Y. Grosse, **V. Stangl**, T. Spielhagen, G. Wallukat, K.D. Wernecke, G. Baumann, K. Stangl. Removal of cardiodepressant factor(s) in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 2001; 39:646-645.

P. Bramlage, G. Joss, A. Staudt, G. Baumann, and S.B. Felix, and **V. Stangl**. Computer aided measurement of cellular calcium transients and myocyte shortening by means of confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Progress* 2001; 17:929-934.

V. Stangl, K. Stangl, S.B. Felix. Myocardial release of cardiodepressant mediators after ischemia. *Cardiovasc Res* 2001; 53:12-30.