

**Untersuchung der vasorelaxierenden Wirkung von Terbutalin
auf das pulmonalarterielle Gefäßsystem im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vanessa Stolle
aus Leverkusen

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Johannes Breuer
2. Gutachter: Professor Dr. med. Bernd Fleischmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 30.08.2011

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Bonn, Abteilung für
Kinderkardiologie
Direktor: Professor Dr. med. Johannes Breuer

Für meine Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1. Pulmonale Hypertonie im Kindesalter	10
1.1.1. Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	10
1.1.1.1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)	11
1.1.1.2. Pulmonale Hypertonie bei kongenitalen Herzfehlern.....	12
1.1.2. Histopathologische Veränderungen	13
1.1.3. Pathogenese	15
1.1.4. Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie	17
1.2. Vasoregulation in Pulmonalarterie und Aorta	20
1.2.1. Pulmonalarterie	20
1.2.2. Aorta	22
1.3. β_2 -Rezeptor-Agonisten und ihr therapeutischer Einsatz	23
1.3.1. Der β_2 -Rezeptor-Agonist Terbutalin	24
1.4. Ziele der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Chemikalien.....	27
2.2. Lösungen für isometrische Kraftmessung	27
2.3. Versuchstiere	29
2.4. Isometrische Kraftmessung am Myographen	29
2.4.1. Präparation	29
2.4.1.1. Endothelfreie Präparation.....	30
2.4.1.2. Inkubation über Nacht mit Pertussis-Toxin	31

2.4.2. Einspannen der Gefäßringe	31
2.4.3. Normalisierungsprozess	33
2.4.4. Versuchsablauf	35
2.4.5. Antagonisten zur Untersuchung des Terbutalin-Signalweges	37
2.5. Statistische Auswertung	39
2.5.1. Schild-Plot	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Standard Dosis-Wirkungskurven	41
3.1.1. Phenylephrin Dosis-Wirkungskurve	41
3.1.2. Serotonin Dosis-Wirkungskurve	42
3.1.3. Endothelin Dosis-Wirkungskurve	43
3.1.4. U 46619 Dosis-Wirkungskurve	44
3.2. Terbutalin Dosis-Wirkungskurve	45
3.2.1. Einfluss von endothelialen Mediatoren	46
3.2.2. Einfluss des G _i -Proteins	48
3.2.3. Einfluss des cAMP-Signalweges	49
3.2.4. Einfluss der β-Adrenozeptoren	50
3.2.5. Einfluss der Kalium-Kanäle	54
3.2.6. Einfluss der Vorkontraktion durch verschiedene Vasokonstriktoren	56
3.2.7. Einfluss von Phentolamin auf die Terbutalin Dosis-Wirkungskurve	58
3.3. Ermittlung der Wirkpotenz verschiedener Antagonisten mittels Schild-Plot	63
3.3.1. Schild-Plot Phenylephrin - Phentolamin	63
3.3.2. Schild-Plot Serotonin - Phentolamin	66
3.3.3. Schild-Plot Endothelin - Phentolamin	67
3.3.4. Schild-Plot U 46619 - Phentolamin	69
3.3.5. Schild-Plot Phenylephrin - Terbutalin	71

3.3.6. Schild-Plot Phenylephrin - U 46619	73
3.3.7. Schild-Plot Terbutalin - ICI 118,551	74
3.3.8. Schild-Plot Terbutalin - Phentolamin	76
4. Diskussion.....	79
4.1. Allgemeines zur Therapie der pulmonalen Hypertonie.....	79
4.2. Terbutalin Dosis-Wirkungskurve.....	80
4.2.1. Einfluss der β -Adrenozeptoren im Terbutalin-Signalweg	82
4.2.1.1. Der β_3 -Rezeptor-Antagonist SR 59230A	82
4.2.1.2. Der β_3 -Rezeptor-Antagonist Cyanopindolol.....	83
4.2.2. Einfluss der Kalium-Kanäle im Terbutalin-Signalweg.....	84
4.3. Wirkung von Terbutalin auf den α -Adrenozeptor	85
4.3.1. Änderung der Vorkontraktion in der Terbutalin Dosis-Wirkungskurve..	86
4.3.2. Einfluss von Phentolamin auf Vorkontraktion und Relaxation	87
4.4. Quantifizierung von antagonistischen Potenzen mittels Schild-Plot	88
4.5. Terbutalin als neuer Therapieansatz der PAH	91
5. Zusammenfassung	93
6. Anhang	95
6.1. Abbildungsverzeichnis.....	95
6.2. Tabellenverzeichnis.....	96
7. Literaturverzeichnis.....	98
8. Danksagung	108

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
APAH	„Pulmonary arterial hypertension related to risk factors or associated conditions“ - pulmonalarterielle Hypertonie assoziiert mit anderen Erkrankungen
AO	Aorta
ASD	„Atrial septal defect“ - Vorhofseptumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl ₂	Bariumchlorid
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CTx	Charybdotoxin
DWK	Dosis-Wirkungskurve
EC	Effektive Konzentration
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin-Rezeptor
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
i.v.	Intravenös
IC	Innerer Gefäßumfang
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
K _{ATP} -Kanal	ATP sensitiver Kalium-Kanal
K _{Ca} -Kanal	Kalzium sensitiver Kalium-Kanal
KCl	Kaliumchlorid
K _{ir} -Kanal	Einwärtsgerichteter Kalium-Kanal
K _v -Kanal	Spannungsabhängiger Kalium-Kanal
M	Molar

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PA	Pulmonalarterie
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PBS	Physiologisch gepufferte Salzlösung
pEC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
PDE	Phosphodiesterase
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PH	Pulmonale Hypertonie
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PSS	Physiologische Salzlösung
PTX	Pertussis-Toxin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TEA	Tetraethylammonium
vs	Versus
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Pulmonale Hypertonie im Kindesalter

1.1.1. Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine seltene, jedoch schwer verlaufende Erkrankung, die sowohl im Erwachsenen-, als auch im Kindesalter auftritt (Widlitz und Barst, 2003). Hierbei handelt es sich um eine fortschreitende Erkrankung mit erhöhten Druck- und Widerstandsverhältnissen in den Pulmonalarterien, die unbehandelt über ein Rechtsherzversagen innerhalb von wenigen Jahren zum Tode führen kann (Cacoub et al., 1997). Eine Vielzahl von Ursachen kann zum Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie führen. Während des dritten Kongresses der World Health Organisation (WHO) zur pulmonalen Hypertonie 2003 wurde eine neue Fassung zur Klassifikation der PH verabschiedet. Ziel dieser überarbeiteten Klassifikation war es, einzelne Gruppen mit Gemeinsamkeiten im pathophysiologischen Mechanismus, Klinik und therapeutischen Möglichkeiten zusammenzufassen (Simonneau et al., 2004). Eine Übersicht über die WHO-Klassifikation gibt *Tabelle 1* wieder.

Die beiden Haupttypen der PH im Kindesalter sind die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie und die PH assoziiert mit kongenitalen Herzfehlern, die einen links-rechts Shunt verursachen. Diese beiden Formen sind die Ursache in fast 90 % der Fälle. In beiden Gruppen überwiegt das weibliche Geschlecht. In einigen Fällen kann eine genetische Prädisposition gefunden werden (De Wolf, 2009).

Die Definition der PH im Kindesalter entspricht der Erwachsener (Widlitz und Barst, 2003). Historisch wurde die pulmonalarterielle Hypertonie hämodynamisch durch eine anhaltende Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes ≥ 25 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) in Ruhe oder ≥ 30 mmHg unter Belastung definiert (Chin und Rubin, 2008). Auf dem 4. Welt-Symposium zur PH in Dana Point 2008 wurde diese historische Einteilung überarbeitet und die Belastungswerte aus der Definition der PH ausgeschlossen. Demnach gilt ein pulmonaler Mitteldruck < 21 mmHg als normal, > 25 mmHg wird als manifeste PH gewertet und der Bereich von 21-25 mmHg wurde als Grenzwertbereich definiert (Olschewski, 2008).

- 1. pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)**
 - idiopathische PAH (IPAH)
 - familiär (FPAH)
 - PAH assoziiert mit anderen Krankheiten (APAH):
 - Kollagenosen,
 - kongenitale systemisch-pulmonale-Shunts
 - portale Hypertonie
 - HIV
 - Medikamente/Drogen
 - andere Erkrankungen (Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherstörungen, M.Gaucher, myeloproliferative Erkrankungen u.a.)
 - PAH in Verbindung mit signifikanter venöser oder kapillärer Gefäßpathologie
 - pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
 - pulmonal-kapilläre Hämangiomatose (PCH)
 - persistierende PH des Neugeborenen (PPHN)
- 2. PH bei Linksherzerkrankungen**
 - atriale oder ventrikuläre Linksherzerkrankung
 - Linksherzerkrankung mit Klappenbeteiligung
- 3. PH bei Lungenerkrankungen mit/ohne Hypoxämie**
 - chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
 - interstitielle Lungenerkrankungen
 - Schlaf-Apnoe-Syndrom
 - zentrale alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - chronischer Höhenexposition
 - entwicklungsbedingte Erkrankungen
- 4. PH aufgrund chronisch thrombotischer und/oder embolischer Prozesse**
 - Obstruktion der proximalen Pulmonalarterien
 - Obstruktion der distalen Pulmonalarterien
 - Pulmonalembolien durch Tumor/Parasiten/Fremdkörper
- 5. Verschiedenes: Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangiomatosis, Kompression der Lungengefäße (Adenopathie oder Tumor, fibrosierende Mediastinitis)**

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der PH von 2003

1.1.1.1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)

Für die IPAH gilt zusätzlich zu der obengenannten Definition der PH, dass der pulmonalarterielle Wedge-Druck oder linksventrikuläre enddiastolische Druck < 15mmHg liegen muss und dass eine gleichzeitige signifikante Linksherz- oder Lungenerkrankung, sowie chronisch thromboembolische Erkrankungen auszuschließen sind (Chin und Rubin, 2008).

Die Symptome bei Kindern mit IPAH variieren je nach Alter. Kleinere Kinder zeigen eine erhöhte Irritabilität, Wachstumsstörungen, Tachyarrythmien und respiratorische Symptome wie Kurzatmigkeit; ältere Kinder hingegen weisen oft Belastungsprobleme auf. Synkopen als Erstsymptom kommen häufig vor und sind Zeichen eines bereits stark

erhöhten pulmonalarteriellen Druckes. In der klinischen Untersuchung ist ein lauter zweiter Herzton auskultierbar (De Wolf, 2009; Haworth, 2008).

Bis vor einigen Jahren, vor Einführung der unterschiedlichen medikamentösen Therapien mit pulmonalarteriellen Vasodilatoren, war die Diagnose der IPAH mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden (Rosenzweig und Barst, 2005); die mittlere Überlebenszeit betrug für Kinder und Erwachsene zusammen 2,8 Jahre, für Kinder nur 10 Monate (D'Alonzo et al., 1991).

1998 waren die einzig verfügbaren Medikamente für die Behandlung der PH Kalzium-Kanal-Antagonisten und Epoprostenol (Haworth, 2008). In den letzten Jahren wurden Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren und Prostazyklin-Analoga für die Therapie der PH eingeführt (Haworth, 2008). Durch diese Substanzklassen und ihre Kombinationstherapie konnte ein signifikanter Fortschritt in der Therapie der PH erreicht werden. Hierzu zählen eine Verbesserung der Lebensqualität, erhöhte Belastbarkeit sowie bessere Überlebenschancen (Rosenzweig und Barst, 2005; Yung et al., 2004).

1.1.1.2. Pulmonale Hypertonie bei kongenitalen Herzfehlern

Das Auftreten der PAH bei Kindern mit kongenitalen Herzfehlern hängt von der Lokalisation und der Größe des Septumdefektes ab. Es werden Läsionen proximal und distal der Trikuspidalklappe unterschieden. Zu den Läsionen proximal zählt der Vorhofseptumdefekt (ASD). Dieser verursacht in erster Linie einen erhöhten Zufluss in den pulmonalen Kreislauf und zeigt ein geringeres und verzögertes Auftreten von PAH und Eisenmenger Reaktionen im Vergleich zu den Läsionen distal der Trikuspidalebene. Zu diesen zählen der Ventrikelseptumdefekt (VSD) und der persistierende Ductus arteriosus, die zu einer gleichzeitigen Druck- und Volumenüberladung führen (De Wolf, 2009). Patienten mit größeren Defekten neigen eher zur Entwicklung einer PAH als Patienten mit kleineren Defekten. Als kleinere Defekte gelten ein VSD < 1 Zentimeter (cm) und ein ASD < 2cm (Galie et al., 2008). Neben dem Versuch der Korrekturoperation entspricht die Therapie für Patienten mit kongenitalen Herzfehlern und PAH denen der IPAH (De Wolf, 2009).

1.1.2. Histopathologische Veränderungen

Die PH ist gekennzeichnet durch eine Obstruktion der kleinen Pulmonalarterien (Runo und Loyd, 2003). Ursache dieser Obstruktion ist ein Umbau der Pulmonalgefäße. Dabei treten Intimaläsionen, eine Mediahypertrophie, sowie eine Verdickung der Adventitia in der präkapillären Region, als auch eine rechtsventrikulären Hypertrophie des Herzens auf (Schermyly et al., 2004). Im weiteren Verlauf bilden sich ungeordnete Endothelzellproliferationen gemischt mit Myofibroblasten, welche zur Entstehung sogenannter plexiformer Läsionen und nekrotisierender Arteriitiden führen. Diese sind im Gegensatz zu Intimaprolieration und Mediahypertrophie irreversibel (De Wolf, 2009) und Ausdruck von schweren Formen der PH (Galie et al., 1998).

Ein weiteres Kennzeichen schwerer Formen der PH ist die Ausbildung einer Schicht aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix zwischen Endothel und der Lamina elastica interna, die auch als Neointima bezeichnet wird. Diese Veränderungen können zum Verlust der Elastizität der Gefäßwand und so zu einer Erhöhung des Widerstandes beitragen. Bei vielen Formen der PH kommt es mit der Verdickung der Gefäßwände zu einer begleitenden Zunahme der Vasa vasorum. Die Neovaskularisation beginnt in der Adventitia, kann sich aber bis auf die Media ausbreiten (Humbert et al., 2004a).

Im Gegensatz zu Erwachsenen ist bei Kindern mit PH die Mediahypertrophie stärker ausgeprägt, dafür treten eine geringere Intimafibrose und weniger plexiforme Läsionen auf (Widlitz und Barst, 2003).

Eine histopathologische Klassifikation der PH erfolgte von Heath und Edwards 1958 (Heath und Edwards, 1958). Sie teilten die als Folge eines angeborenen Herzfehlers nachweisbaren histopathologischen Veränderungen der PH in sechs verschiedene Schweregrade ein (*Tabelle 2*). In Grad I werden Veränderungen bei Patienten mit VSD und ASD unterschieden, alle weiteren Veränderungen sind für beide Herzfehler identisch.

Grad	Definition
I	Hypertrophie und Hyperplasie der Media in Arterien und Arteriolen; keine Veränderungen der Intima (bei Patienten mit großem VSD und persistierendem Ductus arteriosus) Intimahyperplasie in den kleinsten muskulären Arterien und Arteriolen; Intimafibrose in den pulmonalen Venen (bei Patienten mit ASD)
II	Mediahypertrophie und Intimahyperplasie
III	Mediahypertrophie; Intimafibrose mit beginnender Einengung des Gefäßlumens; frühe generalisierte Gefäßdilatation in schweren Fällen
IV	Plexiforme Läsionen mit dünnwandigen Gefäßdilatationen
V	Angiomatöse Läsionen
VI	Fibrinoide Nekrose; nekrotisierende Arteriitis

Tabelle 2: Histopathologische Klassifikation der PH nach Heath und Edwards 1958

Die Klassifikation von Heath und Edwards beruht auf strukturellen Veränderungen in den Pulmonalarterien. Diese Art der Klassifikation weist jedoch Probleme auf, denn die Veränderungen, vor allem in Grad IV und höher, sind auch bei schweren Formen der PH in den ersten zwei Lebensjahren ungewöhnlich. Auch sind die fortgeschrittenen Veränderungen meist nur punktuell oder irregulär in der Lunge verteilt, sodass diese in einem kleinen Stück der Lungenbiopsie möglicherweise nicht präsent sind. Eine Modifikation der Klassifikation wurde von Rabinovitch et al. 1978 vorgenommen (*Tabelle 3*). Hierfür wurden ebenfalls Untersuchungen bei Patienten mit kongenitalen Herzfehlern durchgeführt. Es werden drei Grade A, B und C unterschieden, bei denen strukturelle Veränderungen in Zusammenhang mit hämodynamischen Veränderungen gebracht werden. Grad A und B stellen eine Weiterentwicklung des Heath-Edwards Grad I dar (Rabinovitch et al., 1978).

Grad	Definition
A	Extension glatter Muskelzellen in kleineren und peripheren Arterien; gesteigerter pulmonaler Blutfluss ohne Nachweis für einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck
B	Abnorme Extension der Muskelzellen; Hypertrophie der Muskelzellen der Media; bei leichteren Formen ist die Media < 2-fache Wandstärke (pulmonaler Blutfluss erhöht, pulmonalarterieller Druck normal), bei schwereren Formen ist die Media mehr als doppelt so dick (pulmonaler Blutfluss erhöht, pulmonalarterieller Druck erhöht)
C	Abnorme Extension der Muskelzellen; Hypertrophie der Media; Abnahme der Anzahl der kleinen Arterien (erhöhter pulmonaler Widerstand)

Tabelle 3: Histopathologische Klassifikation der PH nach Rabinovitch 1978

1.1.3. Pathogenese

Die wesentlichen Aspekte, die zu dem Krankheitsbild der PH führen, sind neben dem Remodelling der Gefäße die Vasokonstriktion und Thrombosen in situ (Rubin, 1997).

Verletzungen und Veränderungen des Endothels führen nicht nur zu Proliferationen und Hypertrophie der Gefäßwand, wie oben beschrieben, sondern beeinflussen auch die Synthese von vasodilatierenden Substanzen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklinen bei einer gleichzeitigen Überexpression von vasokonstriktorisches Stoffen, wie z.B. Endothelin oder Thromboxan. So kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion durch eine verminderte Synthese von NO und Prostazyklinen und einem Überwiegen der Vasokonstriktoren (Humbert et al., 2004a; Rubin, 1997).

Bei Patienten mit PH konnten erhöhte Endothelin-Spiegel nachgewiesen werden. Endothelin ist ein Peptid, das von den Endothelzellen sezerniert wird. Es hat die höchste vasokonstriktorische Potenz, wirkt unter anderem mitogen auf glatte Muskelzellen und fördert somit das Remodelling der Gefäße. Daher spielt Endothelin im Rahmen der PH eine bedeutende Rolle bei der Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes und der Mediahypertrophie (Cacoub et al., 1997). Es existieren zwei verschiedene, G-Protein gekoppelte, Endothelin-Rezeptoren (ET), ET_A und ET_B. Diese zeigen eine unterschiedliche Verteilung; ET_A-Rezeptoren sind auf den pulmonalen glatten Muskelzellen exprimiert, ET_B-Rezeptoren hingegen sind ebenfalls in glatten Muskelzellen jedoch überwiegend in pulmonalen Endothelzellen lokalisiert. Über die ET_A-Rezeptoren der glatten Muskelzellen wird eine Vasokonstriktion ausgelöst, die Aktivierung der endothelialen ET_B-Rezeptoren führt zu einer Vasodilatation und induziert die Freisetzung von NO und Prostazyklinen. Die mitotischen Effekte werden über beide Rezeptortypen vermittelt (Raja und Dreyfus, 2008).

Bei den Prostazyklinen handelt es sich um wichtige endogene pulmonale Vasodilatoren (Humbert et al., 2004a); sie sind die Hauptmetaboliten der Arachidonsäure von Endothel- und vaskulären glatten Muskelzellen (Tuder et al., 1999). Ihren vasodilatatorischen Effekt erzielen sie über einen zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Signalweg. Gleichzeitig inhibieren Prostazykline auch die Proliferation glatter Muskelzellen in den Gefäßen und senken die Thrombozytenaggregation. Die Synthese in den Endothelzellen ist, ebenso wie die

Ausscheidung des Prostazyklinmetaboliten im Urin bei Patienten mit PAH vermindert (Humbert et al., 2004a).

NO ist ein von den Endothelzellen gebildeter Vasodilatator und inhibiert gleichzeitig die Proliferation von glatten Muskelzellen. NO wird u.a. durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet. Bei Patienten mit PH konnte neben der verminderten Prostazyklin Bildung ebenso eine verminderte Expression der eNOS und somit eine verminderte NO Synthese nachgewiesen werden (Giaid und Saleh, 1995).

Die Thrombosen können durch eine Verletzung des Endothels entstehen, durch veränderte Fibrinolyse oder aber auch durch erhöhte prokoagulatorische Aktivität, Störungen in der Gerinnungskaskade oder abnorme Thrombozyten (Humbert et al., 2004a; Rubin, 1997). Die Veränderungen des Gefäßbettes im Rahmen der PH führen zu einer Freisetzung von in Thrombozyten gespeicherten Substanzen. Diese Stoffe begünstigen den Gefäßumbau und wirken prokoagulatorisch. Dazu zählen u.a. Thromboxan A₂, Serotonin, platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β) und vascular endothelial growth factor (VEGF). Es bleibt jedoch in den meisten Fällen unklar, ob die Thrombozytendysfunktion und die Thrombosen Ursache oder Konsequenz der PAH sind (Humbert et al., 2004a).

Auch erhöhte Konzentrationen von Serotonin konnten im Zusammenhang mit der PAH beschrieben werden. Serotonin wird von Zellen des gastrointestinalen Traktes und pulmonal, endokrinen Zellen sezerniert und in Thrombozyten gespeichert (Humbert et al., 2004a). Im Rahmen der PH können die pulmonal, endokrinen Zellen proliferieren (Breuer et al., 1996) und so größere Mengen an Serotonin produzieren. Ebenso können die erhöhten Serotonin-Spiegel durch eine Freisetzung von Serotonin aus den Thrombozyten zustande kommen (Egermayer et al., 1999). Serotonin führt nicht nur zu einer vermehrten Vasokonstriktion, sondern auch zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen und somit zum Remodelling der pulmonalen Gefäße im Rahmen der PH (Fanburg und Lee, 1997).

Es besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PAH bei Patienten, die appetithemmende Medikamente, wie Aminorex, Dexfenfluramin oder Fenfluramin, eingenommen haben (Abenhaim et al., 1996; Rich et al., 2000). Der genaue Mechanismus ist unklar, kann aber möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass diese Substanzen sowohl mit dem Serotonin-System im zentralen Nervensystem als

auch in den pulmonalen Blutgefäßen interagieren (Rothman et al., 1999). Die Appetitzügler führen zu einem lokalen Anstieg von Serotonin, das, wie oben genannt, zur Proliferation von pulmonalen glatten Muskelzellen führen kann.

Die vermehrte Vasokonstriktion der Pulmonalarterie (PA) im Rahmen der PAH wird auch einer verminderten Expression oder Aktivität der spannungsabhängigen Kalium-Kanäle zugeschrieben (Humbert et al., 2004a).

Die Ursachen der PH sind vielfältig und die Pathogenese ist komplex. Jedoch stellen die einzelnen oben genannten pathogenetischen Faktoren diverse Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie der PH dar.

1.1.4. Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie

Die medikamentöse Therapie der PAH hat sich in den letzten Jahren rapide entwickelt; von unspezifischen Vasodilatoren hin zu Medikamenten, die spezifisch auf die pulmonale Strombahn, die Endothelfunktion oder auch auf das vaskuläre Remodelling wirken (Barnett und Machado, 2006). Zum Einsatz kommen Kalzium (Ca^{2+})-Kanal-Antagonisten, NO, Prostaglandine, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase-Inhibitoren.

Die orale Langzeittherapie mit hochdosierten Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten kann bei einem Teil der Patienten durch Vasodilatation zu einer Verbesserung der Überlebensrate führen. Da nicht alle Patienten von dieser Therapie profitieren, muss zunächst in einem Rechtsherzkatheter untersucht werden, ob die Patienten eine Lungengefäßreagibilität besitzen und somit von der Therapie profitieren können (Humbert et al., 2004b).

NO ist ein inhalativer Vasodilatator und führt über einen Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in den glatten Muskelzellen der PA zu einer Relaxation (Widlitz und Barst, 2003). Wird NO inhalativ appliziert, führt der Kontakt von NO mit Hämoglobin durch die Bildung von Methämoglobin zu einer Inaktivierung von NO. Durch diesen Mechanismus kann eine systemische Vasodilatation verhindert werden, NO kann daher als potenter und spezifischer pulmonaler Vasodilatator angesehen werden (Breuer et al., 1995; Rosenzweig und Barst, 2005).

Da bei Patienten mit PH zu niedrige Prostazyklin-Spiegel eine Rolle in der Pathogenese spielen, kommen heutzutage verschiedene Prostazyklin-Analoga in der Therapie der PH

zum Einsatz. Epoprostenol findet seit den 80er Jahren Anwendung in der Therapie der PH. Das Analogon ist sehr instabil mit einer kurzen HWZ von ca. 3-5 Minuten. Die Verabreichung erfolgt unter kontinuierlicher zentralvenöser Infusion (Haworth, 2008; Humbert et al., 2004b). Iloprost ist ein inhalierbares Prostazyklin-Analogon. Auch bei diesem Wirkstoff ist die Wirkungszeit < 2 Stunden (Haworth, 2008), sodass es zwischen 6-12 mal täglich inhaliert werden muss (Humbert et al., 2004b). 2006 erfolgte die Zulassung für subkutanes Treprostinil. Die Halbwertszeit beträgt drei Stunden, jedoch ist auch hier die Gabe über eine subkutane Infusionspumpe erforderlich (Widlitz und Barst, 2003).

Auch erhöhte Endothelin-Spiegel spielen bei der Pathogenese der PH eine Rolle (Giaid et al., 1993), daher kommen in der Therapie Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zum Einsatz. Bosentan ist ein oral verfügbarer ET_A- und ET_B-Rezeptor-Antagonist. (Rosenzweig et al., 2005). Da Bosentan über die Leber metabolisiert wird, kann es unter der Therapie zu einer Erhöhung der Leberenzyme kommen. Regelmäßige Kontrollen zur Überwachung der Leberfunktion sind während der Therapie notwendig, ebenso ist eine Interaktion mit Medikamenten, die über die Leber verstoffwechselt werden, zu bedenken (Humbert et al., 2004b). Der ET_B-Rezeptor ist unter anderem endothelial lokalisiert und vermittelt vasodilatorische Effekte über eine Freisetzung von NO und Prostazyklinen (Raja und Dreyfus, 2008). Um diese Effekte zu nutzen, wurden weitere, selektive und oral verfügbare ET_A-Rezeptor-Antagonisten wie Sitaxsentan und Ambrisentan entwickelt (Chin und Rubin, 2008).

Sildenafil ist ein neueres Medikament in der Therapie der PH und gehört zur Gruppe der Phosphodiesterase (PDE)-Hemmer, welche den Abbau des gefäßrelaxierenden second messengers cGMP hinauszögern und so zu einer Vasodilatation und verminderten Proliferation der glatten Muskelzellen führen (Barnett und Machado, 2006). Sildenafil ist ein selektiver und potenter Inhibitor des PDE-Isoenzym Typ V; welches in hoher Konzentration vor allem in der PA und in den Corpora cavernosa vorkommt. Es wurde zunächst zur Therapie der erektilen Dysfunktion zugelassen (Chin und Rubin, 2008); heute kommt es jedoch zur oralen oder intravenösen (i.v.) Therapie der PAH zum Einsatz (Galie et al., 2005). Problematisch unter der Therapie mit Sildenafil sind auftretende systemische Hypotensionen (Haworth, 2008; Stocker et al., 2003).

Neuere vielversprechende Wirkstoffe aus verschiedenen Substanzklassen befinden sich zurzeit in der klinischen Erprobung. Hierzu zählen u.a. Aktivatoren/Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase, Tyrosinkinase-Inhibitoren und Serotonin-Rezeptor-Antagonisten (Hoepfer et al., 2008).

Eine nicht medikamentöse Therapiemöglichkeit zur Verbesserung des Herzminutenvolumens bei Patienten mit fortgeschrittener PAH ist die operative Atrioseptostomie. Hierbei wird eine künstliche Öffnung zwischen den Herzvorhöfen angelegt bzw. eine bereits vorhandene Öffnung erweitert. Durch diesen Eingriff wird als Überdruckventil eine Verbindung zwischen dem rechten und linken Vorhof des Herzens geschaffen. Folge davon ist, dass die rechte Herzhälfte entlastet wird, sich der Druck in den Pulmonalarterien verringert und die linke Herzhälfte besser gefüllt wird. Nachteilig ist die dadurch reduzierte arterielle Sauerstoffsättigung. Die Atrioseptostomie ist vor allem bei Kindern mit IPAH und postoperativer PH angezeigt, die unter Synkopen oder schwerem Rechtsherzversagen leiden (Haworth, 2008). Als Ultima ratio bleibt die Möglichkeit der Lungen- bzw. der kombinierten Herz-/Lungentransplantation. Die Überlebenszeit für lungentransplantierte Kinder beträgt 4,3 Jahre mit einer Überlebensrate von 75 % im ersten Jahr (Boucek et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es vielfältige Ansatzpunkte in der medikamentösen Therapie gibt; die Medikamente haben jedoch teilweise beachtliche Nebenwirkungen oder Einschränkungen. Zusätzlich ist der Langzeiterfolg z.B. von Sildenafil und wahrscheinlich auch Bosentan limitiert. Die Belastbarkeit kehrt unter diesen Therapien im Rahmen des normalen Fortschreitens der Erkrankung häufig auf Ausgangsniveau zurück, sodass es in 40 % der Fälle eine zusätzliche Therapiemaßnahme durchgeführt werden muss (Maiya et al., 2006). Viele neue therapeutische Versuche haben aufgrund mangelnder Spezifität für den pulmonalen Kreislauf wenig Aufmerksamkeit bekommen und sind gescheitert. Daher ist es wichtig, weitere neue und vor allem pulmonalselektive Angriffspunkte für die Therapie der PH zu finden (Rhodes et al., 2009).

1.2. Vasoregulation in Pulmonalarterie und Aorta

1.2.1. Pulmonalarterie

Der pulmonale Kreislauf ist ein Niederdruck-Gefäßsystem mit geringem Widerstand. Daher ist es möglich, ein großes Blutvolumen bei einem geringen Druck zu befördern (Merkus et al., 2008). Die Gefäßwand der pulmonalen Gefäße ist im Vergleich zum systemischen Kreislauf relativ dünn; die wenigen Schichten von glatten Muskelzellen führen zu einer beträchtlichen Compliance der Gefäße, sodass sich die pulmonalen Gefäße schon bei einem mäßigen Anstieg des pulmonalen Druckes adäquat ausdehnen können (Dawson, 1984). Der pulmonale Gefäßtonus kommt durch ein Zusammenspiel verschiedener vasodilatatorischer und -konstriktorischer Faktoren zu Stande. Eine wichtige Rolle spielen dabei vasoaktive Substanzen, wie NO, Prostazykline, Endothelin (*siehe Kapitel 1.1.3. Pathogenese*). Diese werden von den Zellen der Gefäßwand und den peripheren Blutzellen produziert und tragen, ebenso wie neurohumorale Stoffe, z.B. Katecholamine, zu einer Aufrechterhaltung des Gefäßtonus bei.

Katecholamine üben ihre vasoaktiven Effekte über eine Aktivierung von α - und β -Adrenozeptoren aus (Merkus et al., 2008). Eine Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren, die auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert sind, führt zu einer Vasokonstriktion. Wohingegen die Aktivierung der endothelialen α_2 -Adrenozeptoren eine Vasodilatation hervorruft (Pepke-Zaba et al., 1993). In pulmonalen Venen werden α_2 -Adrenozeptoren beschrieben, die eine vasokonstriktorische Wirkung haben, diese sind jedoch auf den glatten Muskelzellen lokalisiert (Barnes und Liu, 1995).

Eine Aktivierung von pulmonalen β -Adrenozeptoren führt zu einer Vasodilatation. Sowohl β_1 - als auch β_2 -Adrenozeptoren konnten auf glatten Muskelzellen identifiziert werden, wobei der β_2 -Adrenozeptor der vorherrschende Subtyp im pulmonalen Gefäßbett ist (O'Donnell und Wanstall, 1981); die relative Dichte der einzelnen Subtypen kann zwischen den einzelnen Spezies variieren kann (Barnes und Liu, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die über β -Adrenozeptoren vermittelte Vasorelaxation in den großen Pulmonalarterien in hohem Maße NO-abhängig ist, in den kleinen Pulmonalarterien jedoch nur zu einem geringen Teil (Priest et al., 1997). Das Vorkommen von vasodilatatorisch wirkenden β_3 -Adrenozeptoren oder atypischen

β -Rezeptoren in der PA wird ebenfalls diskutiert (Dumas et al., 1998; Kozłowska et al., 2006; Tamaoki et al., 1998).

Eine untergeordnete Rolle bei der pulmonalen Gefäßtonusregulation spielt die cholinerge Innervation, wobei sich das genaue Ausmaß zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden kann (Barnes und Liu, 1995). Cholinerge Rezeptoren mit Lokalisation auf glatten Muskelzellen führen zu einer Vasokonstriktion, wohingegen die endothelial lokalisierten Rezeptoren eine Vasodilatation durch Aktivierung von NO- oder Prostazyklin-Bildung auslösen (Furchgott und Zawadzki, 1980; Norel et al., 1996).

Vasokonstriktorische Reaktionen auf 5-Hydroxytryptamin (5-HT) werden in den Pulmonalgefäßen durch 5-HT_{1B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen vermittelt. Die Aktivierung von endothelialen 5-HT_{2C}-Rezeptoren führt zu einer Vasodilatation (MacLean, 2007; Merkus et al., 2008).

Kalium-Kanäle sind ebenfalls Schlüssel-Regulatoren des Gefäßtonus. Der Aktivierungszustand dieser Kanäle in den glatten Muskelzellen der Gefäße beeinflusst direkt das Membranpotenzial und führt so zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen, einem Ca²⁺-Einstrom und einer Veränderung der Kontraktion von glatten Muskelzellen. Da viele vasoaktive Substanzen Kalium-Kanäle aktivieren oder inhibieren, werden diese als End-Punkte in der Kontrolle des Gefäßtonus und des vaskulären Remodellings angesehen (Bonnet und Archer, 2007; Mandegar und Yuan, 2002). Vier Gruppen von Kalium-Kanälen können bis jetzt unterschieden werden. Die einwärtsgerichteten (inward-rectifier) Kalium-Kanäle (K_{ir}-Kanäle) mit dem Adenosintriphosphat (ATP) sensitiven Kalium-Kanal (K_{ATP}-Kanal), die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (K_V-Kanäle), die Ca²⁺-sensitiven Kalium-Kanäle (K_{Ca}-Kanäle) und die zwei Poren Kanäle (TASK). K_V- und K_{Ca}-Kanäle sind die dominierenden Subtypen in den pulmonalen Gefäßen und spielen eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Gefäßtonusregulation. K_V-Kanäle sind vorwiegend in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Widerstandgefäße lokalisiert (Bonnet und Archer, 2007).

Weitere Regulationsfaktoren sind das Angiotensin II, ein Vasokonstriktor des Renin-Angiotensin-Systems, die natriuretischen Peptide, wie z.B. ANP und BNP, sowie viele andere vasoaktiven Substanzen wie Adenosin, Bradykinin, Calcitonin gene related peptide, Histamin, Neuropeptide Y, Substanz P, Vasopressin und das vasoaktive intestinale Peptid (Barnes und Liu, 1995).

1.2.2. Aorta

In der Aorta (AO), als Beispiel für ein Gefäß des systemischen Kreislaufes, koexistieren wie in der PA β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass neben diesen beiden Subtypen β_3 -Adrenozeptoren und atypische β -Adrenozeptoren, zumindest in der AO der Ratte, vorkommen (Brawley et al., 2000; Matsushita et al., 2003). Die über β -Adrenozeptoren vermittelte Vasorelaxation ist im Wesentlichen cAMP-unabhängig. Der β_1 - und β_2 -Adrenozeptor vermittelte Weg wird teilweise K_{Ca} -Kanälen zugeschrieben (Matsushita et al., 2006). Die β_3 -Adrenozeptoren sind vorwiegend auf den Endothelzellen der AO exprimiert und vermitteln die Relaxation über einen $G_{i/o}$ -unabhängigen Weg (Rautureau et al., 2002). Die Aktivierung von verschiedenen Kalium-Kanälen wird hier diskutiert, z.B. K_V -Kanäle und K_{Ca} - sowie K_{ATP} -Kanäle (Matsushita et al., 2006; Rautureau et al., 2002). Die Aktivierung der eNOS und der folgende Anstieg von cGMP wird ebenfalls im Zusammenhang mit β_3 -Adrenozeptoren beschrieben (Trochu et al., 1999). In anderen Studien z. B. von Brahmadevara et al. 2003 wurde die Existenz von β_3 -Adrenozeptoren in der Ratten AO widerlegt (Brahmadevara et al., 2003). α -Adrenozeptoren tragen auch in der AO zur Aufrechterhaltung des Ruhetonus des Gefäßes und zur Regulierung des Gefäßwiderstandes bei (Rudner et al., 1999). In der AO spielen genauso wie in der PA neben diesen neurohumoralen Stoffen auch weitere Regulationsfaktoren eine Rolle.

1.3. β_2 -Rezeptor-Agonisten und ihr therapeutischer Einsatz

β -Adrenozeptoren werden in verschiedene Subtypen unterteilt und gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In der Lunge sind sie weit verbreitet, der dominierende Subtyp ist hier der β_2 -Adrenozeptor. Dieser ist vorwiegend in den glatten Muskelzellen der Atemwege, Epithelzellen, Mastzellen und Pneumozyten Typ II lokalisiert (Johnson, 1998). Durch Aktivierung mit einem β_2 -Rezeptor-Agonisten kommt es zu einer intrazellulären Aktivierung des G_s -Proteins (Daaka et al., 1997). Diese führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase gefolgt von einem Anstieg von cAMP. Durch eine Phosphorylierung der regulatorischen Muskelproteine und einer Abnahme des zellulären Ca^{2+} -Gehaltes erfolgt die Bronchodilatation (Johnson, 1998).

β_2 -Rezeptor-Agonisten werden regelmäßig zur Therapie von Exazerbationen bei Atemwegsobstruktion durch Asthma bronchiale oder COPD verwendet (Jones et al., 1982). Sie gehören dabei zur Therapie der ersten Wahl. Kurzwirksame β_2 -Agonisten, wie Terbutalin, werden als Reliever, bei Bedarf, zur Bronchodilatation eingesetzt. Langwirksame β_2 -Agonisten können bei schwereren Formen des Asthma bronchiale oder der COPD zusätzlich zu einem inhalativen Steroid gegeben werden (Broadley, 2006). Zu den kurzwirksamen β_2 -Rezeptor-Agonisten gehören z.B. Terbutalin oder Salbutamol, zu den langwirksamen Formoterol und Salmeterol (Broadley, 2006). Für die Wirkungsdauer der β_2 -Agonisten zur Senkung von erhöhtem bronchialem Tonus gilt: Salmeterol >> Formoterol > Terbutalin > Fenoterol (Johnson, 1998). Die Wirkung der langwirksamen β_2 -Agonisten tritt später ein, dafür hält die bronchodilatatorische Wirkung länger an (Johnson et al., 1993).

Die bedeutendste Reaktion durch Inhalation der β_2 -Rezeptor-Agonisten ist die Bronchodilatation durch die Relaxation der glatten Muskelzellen der Bronchien. Gleichzeitig wirken β_2 -Rezeptor-Agonisten anti-inflammatorisch über eine Inhibition der Mastzell-Degranulation und Hemmung der Freisetzung von Stoffen wie Tryptase, Zytokinen oder Histamin. Ebenso wird die Chemotaxis, sowie die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten verringert. Durch eine Aktivierung der β_2 -Adrenozeptoren wird die Schlagfrequenz der Zilien und so die mukoziliäre Clearance in den Bronchien verstärkt. Zusätzlich dazu wird die durch Allergene und Histamin induzierte Extravasation von Plasmaproteinen und die Entstehung von Ödemen verhindert. So

wird die Ausprägung eines Lungenödems abgeschwächt, das ebenfalls zur weiteren Obstruktion der Luftwege beitragen würde (Broadley, 2006).

Unerwünschte Wirkungen der β_2 -Agonisten sind Tachykardien und Arrhythmien, feiner Tremor v.a. in den Händen. In der längeren Anwendung von β_2 -Agonisten kommt es zur Tachyphylaxie. Eine bedeutende Nebenwirkung ist die Hypokaliämie. Diese entsteht durch die β -adrenerge Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase in den Skelettmuskelzellen. Natrium strömt aus den Zellen heraus, Kalium wird in der Zelle akkumuliert, mit der Folge einer intrazellulären Kalium Ansammlung und einer extrazellulären Verminderung der Kalium-Konzentration (Broadley, 2006).

1.3.1. Der β_2 -Rezeptor-Agonist Terbutalin

Terbutalin war mit Salbutamol zusammen der erste selektive β_2 -Rezeptor-Agonist, der in den 70er Jahren in den klinischen Gebrauch kam. Beide zeigten starke Effekte auf die Relaxation der glatten Muskelzellen in den Atemwegen in Konzentrationen bei denen Effekte auf den Herzmuskel gering waren (Waldeck, 2002). Da Terbutalin kein Katechol-Derivat ist, wird es nicht durch die Catechol-O-Methyltransferase abgebaut. Dies führt zu einer verlängerten Wirkung und ermöglicht sogar eine orale Applikation (Waldeck, 2002). Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind die inhalative, i.v. oder subkutane Applikation.

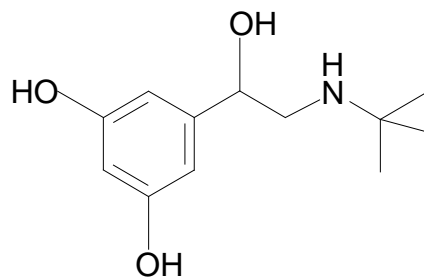


Abbildung 1: Strukturformel Terbutalin

Terbutalin gehört zu den selektiven β_2 -Sympathomimetika mit der Summenformel $C_{12}H_{19}NO_3$. Es findet Anwendung in der Therapie des Asthma bronchiale und der COPD, sowie in der Gynäkologie zur Tokolyse.

Eine Hypokaliämie durch Terbutalin kann innerhalb von Minuten besonders nach i.v. oder subkutaner Applikation durch die intrazelluläre Aufnahme von Kalium ausgelöst werden. Die Veränderungen der Kalium-Spiegel sind nur transient und erreichen nach zwei Stunden wieder ihr Ausgangsniveau. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg von Glukose- und Insulin-Spiegeln durch β -adrenerg vermittelte Glykogenolyse oder direkte Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren und Insulinsekretion in dem Pankreas (Braden et al., 1998). Eine fragliche Kardio-Toxizität für die i.v. Gabe von Terbutalin wird kontrovers diskutiert, kann jedoch nicht belegt bzw. widerlegt werden (Chiang et al., 2000).

Die Wirkung von Terbutalin in der Therapie des Asthmas und der COPD ist bereits gut verstanden und untersucht. Über mögliche Einflüsse auf die pulmonale Zirkulation, besonders im Hinblick auf die PH, liegen bisher nur wenige Studien vor.

1.4. Ziele der Arbeit

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungsprojektes zur Gewinnung eines besseren pathophysiologischen und pharmakologischen Verständnisses der PAH und Entwicklung neuer Ansatzpunkte in der Therapie. Das Projekt wurde gemeinsam von der Abteilung für Kinderkardiologie und dem Institut für Physiologie I der Universität Bonn durchgeführt.

Die Behandlungsmöglichkeiten der PH haben sich in der letzten Dekade durch Einführung neuer Medikamente verbessert. Trotzdem sind wir von einer Heilung der Erkrankung noch weit entfernt. Neben dem zum Teil nicht unerheblichen Nebenwirkungsprofil einzelner Medikamente führt die häufig auftretende gleichzeitige Reduktion des systemarteriellen Gefäßwiderstands trotz erfolgreicher Vasodilatation im pulmonalarteriellen System zu einer Verschlechterung des Cardiac Index. Ein Schwerpunkt bei der Entwicklung neuer Substanzen liegt auf der pulmonalselektiven Vasodilatation ohne gleichzeitige Verschlechterung des Cardiac output.

Hierzu wurde der β_2 -Agonist Terbutalin in Hinblick auf die Wirkung im pulmonalarteriellen und systemarteriellen Gefäßsystem untersucht. Die bronchodilatorische Wirkung von Terbutalin ist bislang gut untersucht und verstanden, jedoch ist nur relativ wenig über die Wirkung auf den pulmonalen Kreislauf bekannt.

Daher wurden folgende Fragestellungen in dieser Arbeit genauer untersucht:

- I. Gibt es im Mausmodell unterschiedliche Wirkungen von vasoaktiven Substanzen wie z. B. Phenylephrin, Endothelin und Serotonin im pulmonalarteriellen und systemarteriellen Gefäßsystem?
- II. Wie wirkt Terbutalin auf AO und PA? Gibt es Unterschiede in der durch Terbutalin ausgelösten Vasodilatation von PA und AO, als Vertreter der beiden Kreislaufsysteme von vergleichbarer anatomischer Größe?
- III. Wie wirkt Terbutalin pharmakologisch in der PA? Die Aktivierung welcher Rezeptoren oder intrazellulären Signalwege liegen der Vasorelaxation im pulmonalarteriellen Gefäßsystem zugrunde?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Apamin	Firma Calbiochem, San Diego, Kalifornien, USA
Charybdotoxin	Firma AnaSpec, San Jose, Kalifornien, USA
Rp-8-CPT-cAMPS	Firma Biolog Life Science Institut, Bremen, Deutschland
SQ 22,536	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
U 46619	Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland erworben.

Alle Substanzen, mit Ausnahme von U 46619 und Indomethazin, wurden in physiologischer Salzlösung gelöst. Indomethazin war in Ethanol zu lösen. U 46619 musste zunächst für 5 Minuten lyophilisiert werden, da die Probe in Methylacetat vorgelöst war. Hierbei wurde das Methylacetat entfernt und der Überstand konnte schließlich in physiologisch gepufferter Salzlösung gelöst werden.

2.2. Lösungen für isometrische Kraftmessung

Für die Versuche zur isometrischen Kraftmessung und zur Verdünnung der Chemikalien wurden verschiedene Lösungen benötigt.

Die physiologische Salzlösung mit normalem Kalzium-Gehalt (PSS) wurde vorwiegend für die Ansätze der Chemikalien und während des Versuchsablaufes zum Auswaschen der Gefäße benötigt. Hierfür wurden die Chemikalien, wie in *Tabelle 4* angegeben, abgewogen und in gereinigtem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von 37°C erwärmt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Während der Präparation der Gefäße war es notwendig die entnommenen Segmente in einer Salzlösung mit niedrigerem Kalzium-Gehalt zu lagern. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Gefäße während der gesamten Zeit der Präparation relaxiert bleiben. Die physiologische Salzlösung mit geringem Kalzium-Gehalt (low-Ca²⁺ PSS)

setzt sich wie in *Tabelle 5* beschrieben zusammen. Hier wurde jedoch der pH-Wert bei einer Temperatur von 21°C eingestellt.

Für das Ansetzen der Substanz U 46619 wurde physiologisch gepufferte Salzlösung (PBS) benötigt. Diese setzte sich wie in *Tabelle 6* dargestellt zusammen.

NaCl	118 mM
Na ₂ HPO ₄	1,2 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,6 mM
Hepes	24 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei 37°C	

Tabelle 4: Zusammensetzung PSS

NaCl	118 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	1,2 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	0,16 mM
Hepes	24 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 bei 21°C	

Tabelle 5: Zusammensetzung low-Ca²⁺ PSS

NaCl	8,00 g/L
KCl	0,20 g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L
K ₂ HPO ₄	0,24 g/L

Tabelle 6: Zusammensetzung PBS

2.3. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 6-12 Wochen alte, weibliche CD1 Wildtyp Mäuse der Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland mit einem durchschnittlichen Gewicht von 26,74 Gramm verwendet. Die Tierhaltung und die Experimente wurden entsprechend den Leitlinien für artgerechte Tierhaltung der Universität Bonn durchgeführt.

2.4. Isometrische Kraftmessung am Myographen

2.4.1. Präparation

Die Mäuse wurden unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen durch zervikale Dislokation getötet. Dabei wurden Schädel und Halswirbelsäule gegeneinander verschoben und somit das Rückenmark durchtrennt. Nach der Tötung wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und mit 70 %-igem Ethanol abgesprüht, um Verunreinigungen durch Haare und Kontaminationen vorzubeugen. Mit Hilfe von Schere und Pinzette wurde durch einen paramedianen Schnitt vom Abdomen bis zum Hals der Maus das Fell von der Thoraxwand abgelöst und zur Seite geklappt. Im Anschluss erfolgte eine mediane Thorakotomie. Vor Entfernung des Herz-Lungen-Paketes wurde zunächst die thorakale AO präpariert und entnommen. Dazu wurden die ventral liegenden Strukturen, wie die Vena cava inferior und der Ösophagus, durchtrennt und die AO samt umgebendem Bindegewebe mit Hilfe eines Skalpell über die gesamte Länge von der Wirbelsäule abgelöst. Für die Entfernung des Herz-Lungen-Paketes wurden zuerst die Muskeln ventral der Trachea durchtrennt. Unter kontinuierlichem Zug an der Trachea wurde das Herz-Lungen-Paket von der dorsalen Thoraxwand gelöst und explantiert.

Im Anschluss an die Entnahme wurden sowohl die AO als auch das Herz-Lungen-Paket für die nun folgende Präparation in 4°C kalter physiologischer Salzlösung mit geringem Kalziumgehalt gelagert, um die Relaxation der Gefäße während der weiteren Präparation sicherzustellen.

Die Feinpräparation sowie auch das spätere Einspannen der Gefäßsegmente in den Myographen wurden unter einer Wild M3 Stereolupe (Wild Heerbrugg Ltd, Heerbrugg, Schweiz) mit 6,4-facher Vergrößerung durchgeführt. Dazu wurde die AO durch Nadeln der Länge nach, jedoch ohne starken Zug, auf dem Agarose-Boden einer Petri-Schale aufgespannt, vom umliegenden Bindegewebe und Fett befreit und in zwei jeweils

2 Millimeter (mm) lange Segmente zugeschnitten. Für die genaue Abmessung der Gefäße wurde ein in das Okular eingearbeitetes Zentimetermaß verwendet. Im Anschluss daran wurde das Herz-Lungen-Paket aufgespannt und zunächst der Thymus sowie das darunterliegende Binde- und Fettgewebe entfernt (*Abbildung 2*). Der rechte und linke Hauptstamm der Pulmonalarterien wurde ebenfalls in jeweils 2 mm lange Segmente geschnitten.

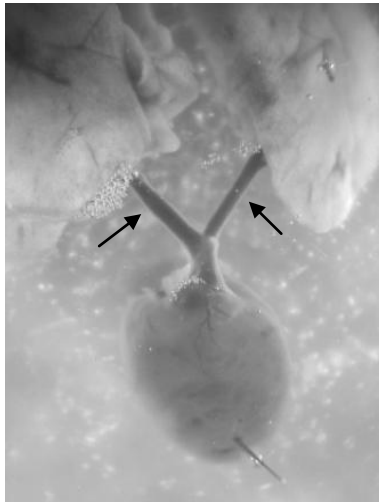


Abbildung 2: Präparation der Pulmonalarterien

Blick auf das Herz mit Pulmonalis-Hauptstamm sowie rechter und linker PA (Pfeile). Der Thymus, die Herzohren und das umliegende Binde- und Fettgewebe sind entfernt worden.

2.4.1.1. Endothelfreie Präparation

Für einige Versuche war es erforderlich, das Endothel der Gefäßringe zu entfernen. Dazu wurde mit Hilfe eines Maus-Schnurrhaares die Oberfläche des Lumens vorsichtig in kreisenden Bewegungen abgerieben.

Um die Abwesenheit des Endothels zu beweisen, wurden die Gefäße nach Abschluss des Versuches submaximal mit Phenylephrin kontrahiert und anschließend Azetylcholin und Bradykinin hinzugegeben. Die Endothelentfernung konnte als erfolgreich angesehen werden, wenn Azetylcholin eine Relaxation $< 15\%$ der maximal ausgelösten Kontraktion verursachte (*Abbildung 3*).

Bradykinin wird in anderen Geweben alleine zum Nachweis der Endothelentfernung verwendet (McKenzie et al., 2009), führte jedoch in der Mäuse PA mit intaktem Endothel zu keinerlei Relaxation. Eine Kombination aus Bradykinin und Azetylcholin hat sich nach

einigen Versuchen und Vergleichen mit immunhistochemischer Färbung als geeignet für den Nachweis der erfolgreichen Endothelentfernung erwiesen.

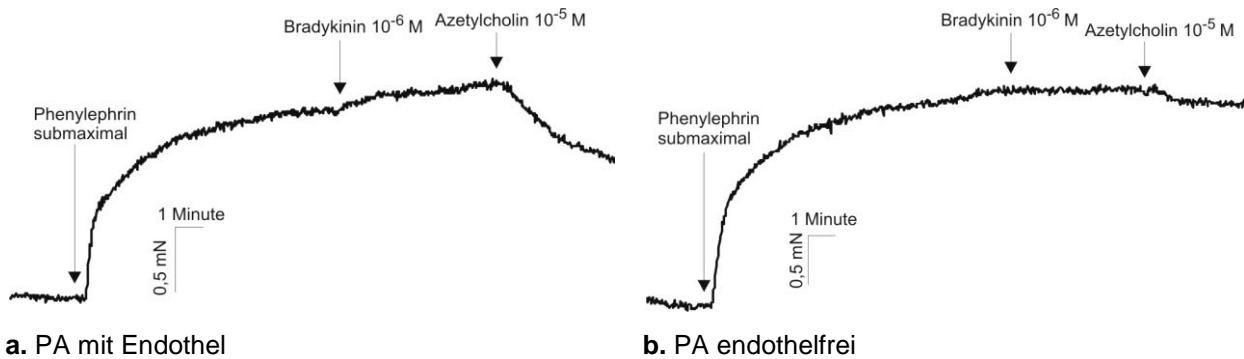


Abbildung 3: Nachweis der Endothelentfernung

a. PA mit intaktem Endothel nach submaximaler Kontraktion mit Phenylephrin und Zugabe von Bradykinin und Azetylcholin. Die Zugabe von Azetylcholin nach Bradykinin führte bei Vorhandensein des Endothels zu einer Relaxation der PA. b. PA nach erfolgreicher Endothelentfernung. Nach Zugabe von Bradykinin und Azetylcholin blieb die Relaxation der PA aus. Die Endothelentfernung konnte als erfolgreich angesehen werden.

2.4.1.2. Inkubation über Nacht mit Pertussis-Toxin

β -Adrenozeptoren vermitteln einen Großteil ihrer Wirkung über eine Aktivierung des G_s -Proteins, jedoch können β_2 -Rezeptoren auch zwischen anderen G-Proteinen wechseln und z.B. das G_i -Protein aktivieren (Daaka et al., 1997).

Daher war es für die Untersuchung des Signalweges von Terbutalin notwendig, das G_i -Protein zu inhibieren. Hierzu wurden die Gefäße wie oben beschrieben präpariert, in 2 mm lange Segmente geschnitten und für 12 Stunden bei 4°C in einer Lösung aus low- Ca^{2+} PSS und 1 Mikrogramm (μ g) / Milliliter (ml) Pertussis-Toxin (PTX), einem Inhibitor des G_i -Proteins, inkubiert (Wenzel et al., 2006). Im Anschluss erfolgte der Versuchsablauf nach dem folgenden Standard.

Bei PTX handelt es sich um ein Exotoxin, das von dem Bakterium *Bordetella pertussis* gebildet wird und zur Inaktivierung des G_i -Proteins führt.

2.4.2. Einspannen der Gefäßringe

Für die Experimente zur isometrischen Kraftmessung wurde das Multi Myograph System 610M (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dänemark) verwendet (Abbildung 4). Aus einem rostfreien Draht mit einem Durchmesser von 40 Mikrometern (μ m) wurden 2,2 cm lange Stücke zugeschnitten. Der Draht wurde zunächst zwischen die beiden Trägerbacken,

die mit dem Kraftumwandler verbunden sind, eingespannt. Mit Hilfe dieses Umwandlers ist es möglich, Kraftveränderungen von 0,01 Millinewton (mN) zu messen. Der Draht wurde wie in *Abbildung 5* zwischen den Trägerbacken fixiert und mit Hilfe eines Schraubenziehers im Uhrzeigersinn festgezogen.

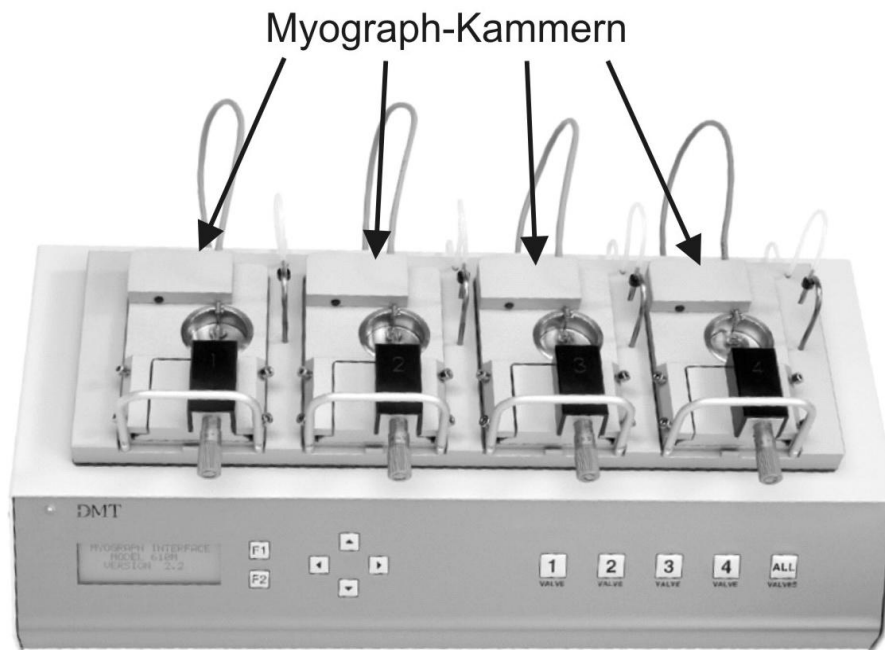


Abbildung 4: Myograph DMT 610M der Firma Danish Myo Technologies
(Quelle: <http://www.dmt.dk>)

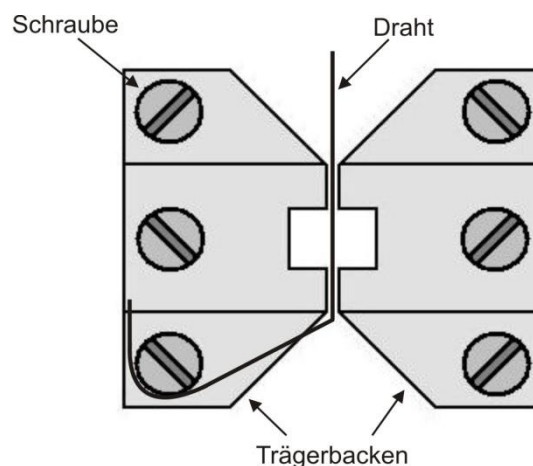


Abbildung 5: Einspannen des Drahtes in den Myographen
Aufsicht von oben auf die Trägerbacken in der Versuchskammer des Myographen. Der Draht wurde zwischen den Trägerbacken mit Hilfe der Fixierungsschrauben befestigt. Über das freie Drahtende konnte im Anschluss das Gefäßsegment aufgezogen werden.

Die Kammer des Myographen wurde mit low-Ca²⁺ PSS gefüllt. Die Gefäßsegmente von AO oder PA wurden aus der Petri-Schale entnommen und mit Hilfe von Pinzetten auf den Draht aufgezogen, bis sie zwischen den Trägerbacken zu liegen kamen. Das freie Ende des Drahtes wurde durch die Schraube befestigt und zur Fixierung des Gefäßstückes an der zweiten Trägerbacke wurde ein weiterer Draht eingespannt. Die Trägerbacken wurden vorsichtig geschlossen, ohne dass es zu einer Einklemmung von Gefäßanteilen zwischen den Trägerbacken kam (*Abbildung 6*).

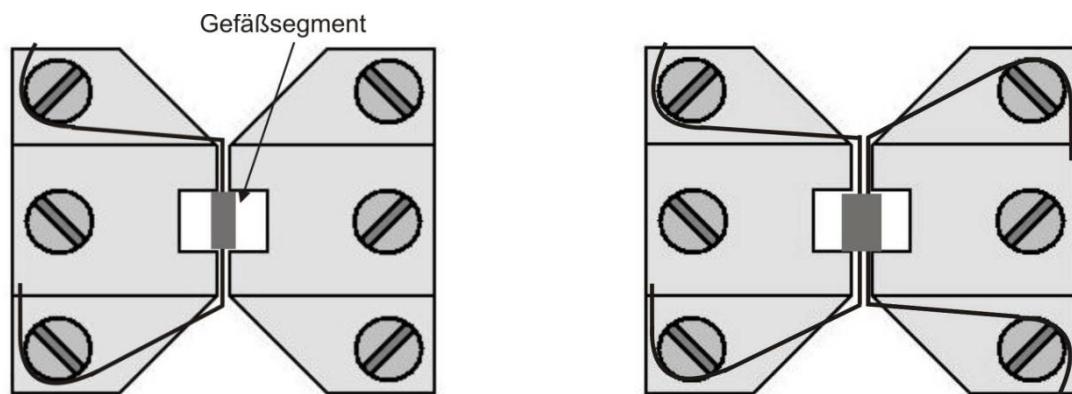


Abbildung 6: Einspannen des Gefäßes in den Myographen

Das Gefäßsegment wurde über das noch freie Ende des Drahtes aufgezogen; dieses Drahtende wurde im Anschluss ebenfalls fixiert. Ein weiterer Draht wurde zur Verbindung des Gefäßstückes mit der zweiten Trägerbacke eingespannt. Die rechte Abbildung zeigt die endgültige Anordnung des Gefäßstückes zwischen den Trägerbacken, die das Gefäß leicht dehnen.

2.4.3. Normalisierungsprozess

Die vier einzelnen Myograph-Kammern wurden mit dem Myograph Multi System verbunden. Für die Experimente wurden 2 ml PSS Lösung mit normalem Kalzium Gehalt in die Myograph-Kammern pipettiert, das Wasserbad auf 37°C geheizt und die Gaszufuhr angeschlossen, um eine regelmäßige Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Um vergleichende Messungen durchzuführen, war es wichtig, einen definierten Lumendurchmesser für die Gefäße festzulegen. Sowohl die Kraftentwicklung der Gefäße als auch ihre Reaktivität gegenüber Agonisten und Antagonisten ist abhängig von dem Ausmaß der Vorspannung. Daher war es notwendig, dass die Gefäße zu Beginn jedes Experimentes kalibriert wurden. Ziel war es den inneren Gefäßumfang (Internal Circumference=IC₁₀₀) zu ermitteln, der bei vollständig relaxiertem Gefäß und einem transmuralen Druck von 100 mmHg vorliegt (Mulvany und Halpern, 1976). Die

Normalisierung der Gefäße fand mit Hilfe von Powerlab und der Software Chart 5 for Windows (AD Instruments) statt.

Für die Normalisierung wurden die beiden Trägerbacken, zwischen die das Gefäß eingespannt wurde, alle zwei Minuten schrittweise voneinander entfernt. So kam es zu einer Erhöhung der Wandspannung (*Abbildung 7*). Der Myograph hat sowohl die Mikrometerveränderungen, als auch die durch die einzelnen Entfernungsschritte resultierende Kraft ermittelt. Der transmurale Druck P_i konnte durch die Gleichung nach Laplace bestimmt werden.

Es gilt:

$$P_i = \frac{\text{Wandspannung}}{\left(\frac{\text{Innerer Gefäßumfang}}{2 \times \pi}\right)} \text{ [mmHg]}$$

Innerer Gefäßumfang (IC) = Abstand zwischen den Drähten + 2 x Drahtdurchmesser
 Wandspannung = gemessene Kraft / Gefäßlänge

Sobald ein transmuraler Druck von 100 mmHg erreicht oder überschritten wurde, wurde die Gefäßextension abgeschlossen. Mit den so ermittelten Daten konnte eine exponentielle Kurve bestimmt werden; dabei wurde die entstehende Wandspannung gegen den inneren Gefäßumfang aufgetragen. Mit Hilfe der entsprechenden Kurve war es möglich, den Gefäßinnendurchmesser, bei dem eine Wandspannung von 100 mmHg vorlag (IC_{100}), zu bestimmen (*Abbildung 8*).

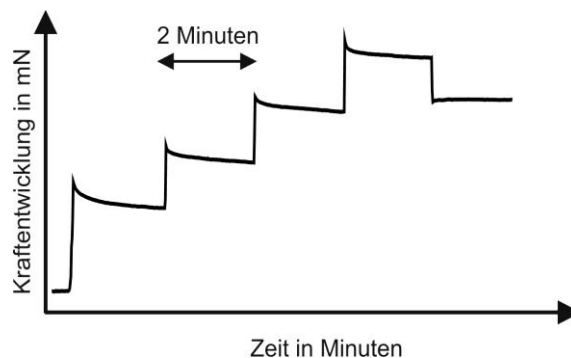


Abbildung 7: Vorspannen des Gefäßes

Schrittweises Vorspannen des Gefäßes alle zwei Minuten mit der daraus resultierenden Kraftentwicklung. Die Gefäßextension wurde bei Erreichen des effektiven Druckes von 100 mmHg abgeschlossen.

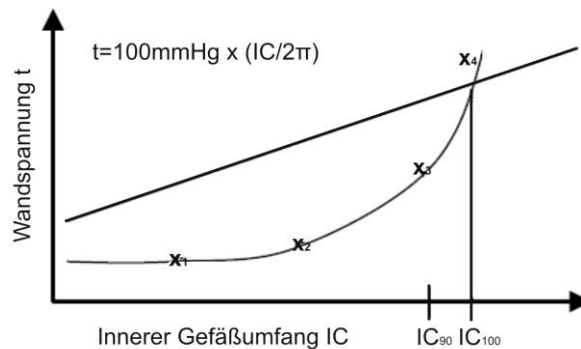


Abbildung 8: Bestimmung des IC_{90}

Exponentielle Kurve ermittelt aus dem IC und der gemessenen Kraftentwicklung (x_i) und Laplace Gleichung, $IC_{90} = 0,9 \times IC_{100}$.

Experimente haben ergeben, dass bei einem Gefäßinnendurchmesser, der 90 % des IC_{100} beträgt, die aktive Kraftproduktion des Gefäßes am größten ist. Daher wurden die Experimente am Myographen für die Aorten mit einem Gefäßinnendurchmesser von $IC_{90} = 0,9 \times IC_{100}$ durchgeführt. Dies entsprach einer Kraftentwicklung von 8-12 mN.

Da der physiologische Blutdruck im pulmonalen Kreislauf deutlich niedriger ist als in systemischen Gefäßen, wurden die Pulmonalarterien geringer vorgespannt als die Gefäßringe aus der Aorta. Eine optimale Kraftentwicklung wurde nach eigenen Vorexperimenten und Literaturangaben bei einer Vorspannung von 5 mN erreicht (Knapp et al., 2006). Die Trägerbacken wurden solange schrittweise voneinander entfernt bis eine Kraftentwicklung von 5 mN erreicht werden konnte.

2.4.4. Versuchsablauf

Nach dem Normalisierungsprozess fand eine 20-minütige Äquilibrationsphase statt. Im Anschluss daran wurden alle Gefäße zur Aktivierung zunächst mit Phenylephrin 10 Mikromolar (μM) maximal kontrahiert.

Für die Bestimmung dieser maximalen Konzentration wurden vor Beginn der Versuchsreihe Dosis-Wirkungskurven (DWK) mit Phenylephrin 10^{-9} - 10^{-5} Molar (M) durchgeführt. Für diese DWK wurden alle zwei Minuten steigende Dosen des Agonisten zu den Gefäßen hinzugegeben. In diesen Experimenten zeigte sich, dass $10 \mu\text{M}$ als optimale Konzentration für die maximale Kontraktion anzusehen ist.

Sobald nach Zugabe des Phenylephrins ein Plateau der Kontraktion erreicht wurde (ca. fünf Minuten), wurden die Gefäße mit jeweils 2 ml einer auf 37°C erwärmten PSS solange alle zwei Minuten ausgewaschen, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht war. Im Anschluss daran wurden verschiedene pharmakologische Testreihen durchgeführt. Für DWK mit kontrahierenden Substanzen, z.B. Phenylephrin, wurden alle zwei Minuten ansteigende Dosen des jeweiligen Agonisten appliziert (*Abbildung 9*).

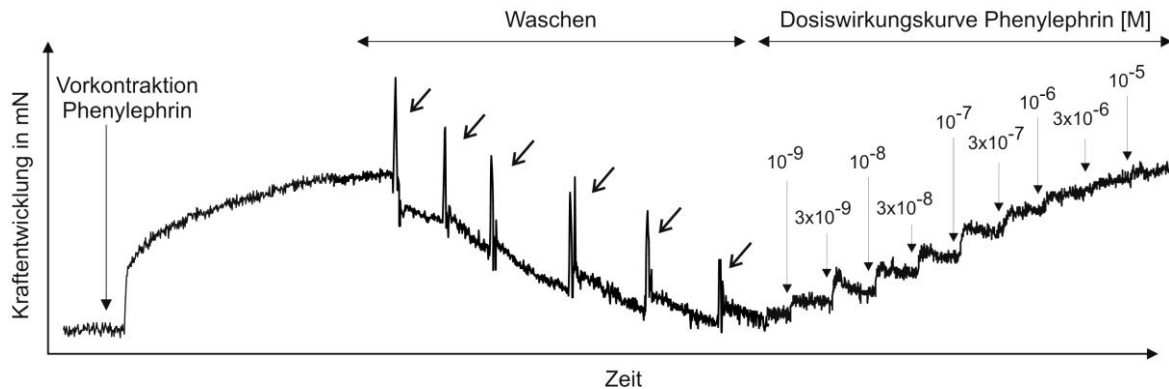


Abbildung 9: Versuchsaufbau Phenylephrin DWK

Begonnen wurde mit der Vorkontraktion des Gefäßes mit Phenylephrin. Nach Erreichen eines Steady states in der Kraftentwicklung wurden die Gefäße mit PSS ausgewaschen. Die Spikes während der Auswaschphase sind Artefakte, die durch das Absaugen der Lösung aus den Myograph-Kammern entstanden sind (Pfeile ↙). Bei Erreichen des Ausgangsniveaus wurde mit der DWK begonnen. Alle zwei Minuten wurde eine steigende Dosis Phenylephrin ins Wasserbad gegeben. Dargestellt ist die dosisabhängige Kraftentwicklung des Gefäßes.

Für Versuche mit dem β_2 -Rezeptor-Agonisten Terbutalin (*Abbildung 10*) oder anderen relaxierenden Substanzen mussten die Gefäße vor Beginn der DWK erneut, dieses Mal jedoch submaximal, kontrahiert werden. Als submaximale Dosis gilt die jeweilige effektive Konzentration (EC), bei der die Gefäße 75 % der maximal ausgelösten Kontraktion erreichen (EC_{75}). Diese wurde aus der entsprechenden Standard-DWK des Agonisten graphisch ermittelt. Soweit nicht anders vermerkt, wurde als Standard für die submaximale Kontraktion Phenylephrin verwendet. Die verwendeten submaximalen Konzentrationen für Phenylephrin betragen 5×10^{-6} M für die AO und 10^{-7} M für die PA.

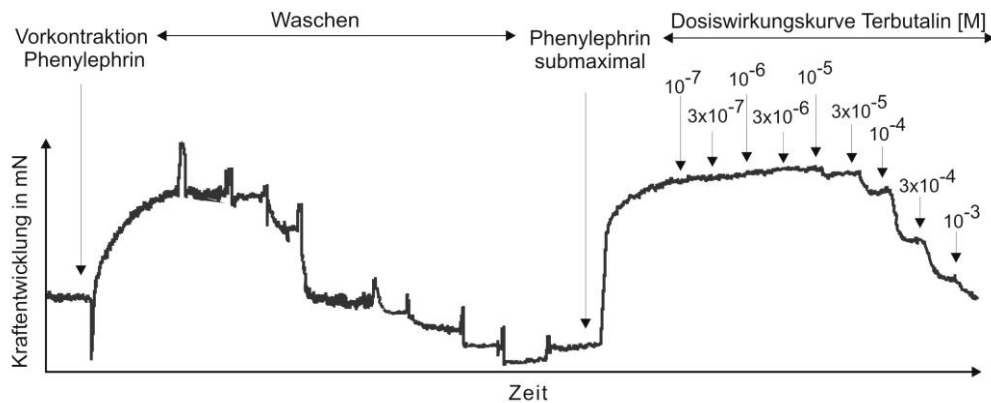


Abbildung 10: Versuchsablauf Terbutalin DWK

Nach Vorkontraktion des Gefäßes und im Anschluss an die Auswaschphase wurde das Gefäß mit Phenylephrin submaximal kontrahiert. Erreicht die Kontraktion ein Plateau wurde mit der DWK Terbutalin begonnen. Das Gefäß zeigte eine starke dosisabhängige Relaxation unter Terbutalin.

2.4.5. Antagonisten zur Untersuchung des Terbutalin-Signalweges

Zur genaueren Analyse des Signalweges von Terbutalin in der PA wurden nacheinander verschiedene Signalwege/Mediatoren und Rezeptoren blockiert und so der Einfluss auf die Relaxation durch Terbutalin untersucht.

Die Vasodilatation wird in Gefäßen häufig über endotheliale Enzyme vermittelt, daher wurden zur Untersuchung des Terbutalin-Signalweges zunächst die Cyclooxygenase (COX) und die eNOS inhibiert. Als Inhibitor der COX wurde Indomethazin [10^{-5} M] verwendet. Dieses Enzym wird in Endothelzellen der Gefäße exprimiert und katalysiert die Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandinen, die wiederum zur Relaxation der Gefäße führen können. Indomethazin ist ein COX-Inhibitor, der relativ spezifisch auf das Isoenzym COX-1 wirkt (Mitchell et al., 1993). Desweiteren wurde die eNOS mit L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester) [10^{-5} M] inhibiert, um die Bildung von NO herabzusetzen. Die Gefäße wurden vor der submaximalen Phenylephrin Kontraktion, soweit nicht anders beschrieben, mit dem Inhibitor/Antagonisten für jeweils 5 Minuten inkubiert. Zur gleichzeitigen Inhibition der COX und eNOS wurde eine Kombination aus Indomethazin und L-NAME verwendet.

β-Adrenozeptoren sind an G-Proteine gekoppelt und da einige G-Proteine den cAMP-Signalweg aktivieren, wurde dieser in der Terbutalin DWK ebenfalls genauer untersucht. Für die Blockade des cAMP-Signalweges wurde zum einen die Substanz Rp-8-CPT-cAMPS [100 μM] verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Analogon des second-messengers cAMP. Es ist membranpermeabel und führt zu einer Inhibition der

Proteinkinase A Typ I und II. Rp-8-CPT-cAMPS blockiert die cAMP Bindungsstelle an der regulären Untereinheit der Proteinkinase A und verhindert so deren Aktivierung. Durch dieses Wirkungsprinzip waren für diesen Inhibitor längere Vorinkubationen von 20 Minuten für optimale Versuchsergebnisse nötig. Eine mögliche Fehlerquelle kann bei der Verwendung von Rp-8-CPT-cAMPS sein, dass die Substanz trotz verlängerter Inkubationszeit nicht vollständig membranpermeabel war. Um die Bedeutung des cAMP-Signalweges trotzdem genauer zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit SQ 22,536 [100 μ M], einem Inhibitor der Adenylatzyklase, durchgeführt. Durch diese zellpermeable Substanz wurde die Produktion von cAMP verhindert. Auch hier ist die Inkubationszeit auf 10 Minuten verlängert worden, um eine ausreichende Wirkung zu erreichen.

Da es sich bei Terbutalin um einen β_2 -Rezeptor-Agonisten handelt, wurde der Einfluss von β -Adrenozeptoren auf die Vasorelaxation durch Terbutalin genauer untersucht. Terbutalin wirkt nicht zu 100 % spezifisch auf β_2 -Adrenozeptoren, sondern kann auch andere β -Adrenozeptor-Subtypen aktivieren (Baker, 2005; Hoffmann et al., 2004), daher wurden die unterschiedlichen β -Adrenozeptoren selektiv blockiert. Für die Blockade der einzelnen β -Adrenozeptor-Subtypen wurden möglichst spezifische Antagonisten verwendet; als β_1 -Adrenozeptor-Antagonist wurde CGP 20712A [300 nM] verwendet, zur Blockade der β_2 -Adrenozeptoren ICI 118,551 [10^{-6} M].

Für die Blockade der β_3 -Adrenozeptoren wurde zunächst der β_3 -Rezeptor-Antagonist SR 59230A in einer Konzentration von 10^{-5} M verwendet. Jedoch war es bei Verwendung dieser Konzentration nicht möglich eine ausreichende Kontraktion der Gefäße, besonders der PA, durch Phenylephrin für die Durchführung der Terbutalin DWK zu erreichen. Dieses Problem wurde bereits zuvor von Brahmadevara et al., 2003 beschrieben, auch hier führte eine Konzentration $> 1 \mu$ M SR 59230A zu einer Verringerung der Phenylephrin induzierten Kontraktion (Brahmadevara et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde die für die submaximale Kontraktion verwendete Phenylephrin Konzentration in der PA für diese Versuche auf 2×10^{-7} M verdoppelt, sodass die Gefäße auch nach Inkubation mit SR 59230A noch eine ausreichende Kontraktion erreichen konnten. Um Effekte durch die höhere Phenylephrindosis auszuschließen wurde der Versuch erneut mit einer niedrigeren Konzentration des β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten [10^{-6} M] durchgeführt. Hierbei wurde die Konzentration SR 59230A ausgewählt, bei der

die Gefäße gerade noch mit der standardmäßigen submaximalen Phenylephrindosis eine ausreichende Kontraktion erreichen konnten.

Da SR 59230A neben der antagonistischen Wirkung am β_3 -Adrenozeptor auch die Kontraktion mit Phenylephrin verringerte, also möglicherweise die α -Adrenozeptoren beeinflusste, wurde ein weiterer β_3 -Rezeptor-Antagonist verwendet, um die mögliche Beteiligung der β_3 -Adrenozeptoren an der Relaxation durch Terbutalin weiter zu untersuchen. Hierzu wurde Cyanopindolol in einer Konzentration von 10^{-5} M verwendet. Jedoch ist auch hierbei zu berücksichtigen, dass Cyanopindolol nicht nur die β_3 -Adrenozeptoren blockiert (Khan et al., 2005), sondern ebenfalls ein 5-HT_{1A/1B}-Serotonin-Rezeptor-Antagonist ist (Grignaschi et al., 1995) und diese Effekte das Ergebnis möglicherweise beeinflussen könnten. Auch hier wurde aufgrund der unspezifischen Effekte, wie bei SR 59230A, der Antagonist in noch einer weiteren, niedrigeren Konzentration [10^{-6} M] verwendet.

Für die Untersuchung der Beteiligung von Kalium-Kanälen am Terbutalin-Signalweg wurden für die einzelnen Subtypen verschiedene Antagonisten verwendet. Zur Blockade der K_v -Kanäle wurde 4-Aminopyridin (4-AP) [1 mM] verwendet; für die K_{ir} -Kanäle Bariumchlorid ($BaCl_2$) [30 μ M]. Zur Blockade der K_{Ca} -Kanäle wurde eine Kombination aus Charybdotoxin (CTX) und Apamin, beide jeweils in einer Konzentration von 10^{-7} M, verwendet. Desweiteren wurde der unspezifische Kalium-Kanal-Blocker Tetraethylammonium (TEA) in einer Konzentration von 1 mM verwendet.

2.5. Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten und die graphische Darstellung erfolgte mit Sigma Plot 9.0 (Jandel Scientific) und GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, bezogen auf die maximal ausgelöste Kontraktion/submaximale Vorkontraktion. Die Dosis-Wirkungskurven wurden als sigmoidale Kurve mit variabler Steigung gefittet und hieraus die Konzentrationen ermittelt, bei denen der Agonist einen halbmaximalen Effekt aufweist (EC_{50} -Wert). Mit Hilfe des Student's t-Tests für verbundene und unverbundene Stichproben wurden die logarithmierten EC_{50} -Werte (pEC_{50}) der PA und Aorta miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft (GraphPad InStat 3.01, GraphPad Software). Bei der Untersuchung des Terbutalin-Signalweges in der PA wurden nur die

pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK mit und ohne Antagonist in der PA miteinander verglichen. Wurden, wie bei den Schild-Plot Analysen, mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde der ANOVA-Test mit Bonferroni Post-Hoc Test angewendet. Die Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Der Term „n“ steht für die Zahl der untersuchten Gefäßringe.

2.5.1. Schild-Plot

Für einige Versuche wurde ein Schild-Plot durchgeführt, um die antagonistische Potenz einer Substanz zu bestimmen. Der Schild-Plot beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Antagonisten-Konzentration ($\log[\text{Antagonist}]$) und der Hemmwirkung des Antagonisten ($\log(r-1)$). Hieraus lässt sich der pA₂-Wert aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse bestimmen.

Für die rechnerische Bestimmung des pA₂-Wertes gilt:

$$pA_2 = -\log[\text{Antagonist}] + \log(r-1)$$

$$r = \frac{EC_{50}(+\text{Antagonist})}{EC_{50}(-\text{Antagonist})}$$

Dabei ist der pA₂-Wert als der negative dekadische Logarithmus der Konzentration einer antagonistischen Substanz definiert, bei der die Konzentration eines Agonisten verdoppelt werden müsste, um den gleichen Effekt wie bei Abwesenheit eines Antagonisten zu erreichen (Schild, 1997).

Zur Anfertigung eines Schild-Plots und der anschließenden Berechnung des pA₂-Wertes wurden bei mehreren Experimenten die Gefäße mit unterschiedlicher Antagonisten-Konzentration inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten Dosis-Wirkungskurven mit steigender Agonisten-Konzentration; hieraus wurden die pEC₅₀-Werte bestimmt. Diese sind von der Konzentration des Antagonisten abhängig und nehmen mit steigender Antagonisten-Konzentration zu.

3. Ergebnisse

3.1. Standard Dosis-Wirkungskurven

Zu Beginn wurden pharmakologische Testreihen mit unterschiedlichen vaso-konstriktorischen Agonisten durchgeführt, um im Mausmodell Unterschiede des kontraktiven Verhaltens von AO und PA zu bestimmen. Die Standard-Dosis-Wirkungskurven dienen als Grundlage für die graphische Ermittlung der EC_{75} -Werte der jeweiligen Substanz. Diese Konzentrationen wurden für die submaximale Vorkontraktion der Gefäße in den folgenden Versuchen verwendet.

3.1.1. Phenylephrin Dosis-Wirkungskurve

Für die Phenylephrin DWK wurde im Anschluss an die maximale Kontraktion mit Phenylephrin und die Auswaschphase der α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin alle zwei Minuten in steigenden Dosen von 10^{-9} M bis 10^{-5} M in das Wasserbad der Myograph-Kammer hinzugegeben. *Abbildung 11* zeigt die graphische Auswertung der DWK.

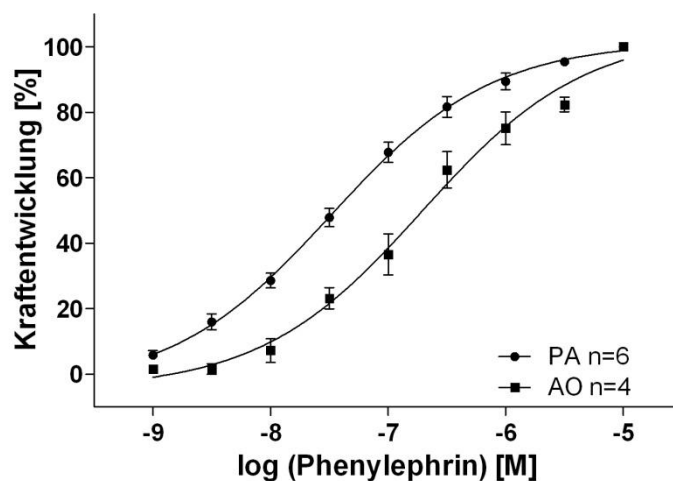


Abbildung 11: Phenylephrin DWK

Für die Phenylephrin DWK wurden Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-5} M verwendet. Dargestellt ist die resultierende Kraftentwicklung der Gefäße bezogen auf die maximal ausgelöste Kontraktion in Abhängigkeit von dem Logarithmus der Phenylephrin-Konzentration. Sowohl PA als auch AO zeigen eine konzentrationsabhängige Kontraktion. Die PA kontrahiert bereits bei geringeren Phenylephrin-Konzentrationen als die AO.

Die kumulative Applikation von Phenylephrin führte zu einer konzentrationsabhängigen Kontraktion der Gefäße, wobei die PA sensitiver auf Phenylephrin reagierte als die AO; d.h. die PA zeigte bereits bei einer geringen Phenylephrindosis eine stark ausgeprägte Kontraktion. Die höhere Sensitivität der PA zeigte sich in der graphischen Auswertung in einer Linksverschiebung der DWK. Bei einem Vergleich der pEC_{50} -Werte erkennt man, dass die PA nahezu eine zehnfach höhere Sensitivität gegenüber Phenylephrin besitzt (PA pEC_{50} : $7,43 \pm 0,03537$ (n=6) versus (vs) AO pEC_{50} : $6,706 \pm 0,05052$ (n=4); $p < 0,0001$).

Die Konzentration von 10^{-5} M konnte als optimale Konzentration für eine maximale Kontraktion der Gefäße angesehen werden und wurde im Weiteren als Standard für die Vorkontraktion zur Aktivierung aller Gefäße verwendet. Die aus der graphischen Auswertung ermittelten pEC_{75} -Werte für Phenylephrin betragen für die PA 10^{-7} M und für die AO 5×10^{-6} M. Diese Konzentrationen wurden als Standard für die submaximale Kontraktion der Gefäße in der Terbutalin DWK verwendet.

3.1.2. Serotonin Dosis-Wirkungskurve

Für die Durchführung der Serotonin DWK wurden Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-5} M Serotonin verwendet. In der graphischen Auswertung der Serotonin DWK zeigte sich, dass auch hier die PA bei niedrigen Serotonin Konzentrationen sensitiver reagierte als die AO (*Abbildung 12*). Die pEC_{50} -Werte unterschieden sich signifikant zwischen der PA und AO (PA pEC_{50} : $7,258 \pm 0,03607$ (n=4) vs AO pEC_{50} : $6,715 \pm 0,01481$ (n=4); $p < 0,0001$).

Da sich die Kurven bei höheren Konzentrationen näherten, beträgt der pEC_{75} -Wert für Serotonin in der PA und AO 5×10^{-7} M. Diese Konzentrationen wurden für die submaximale Vorkontraktion der Gefäße in einigen Terbutalin DWK verwendet.

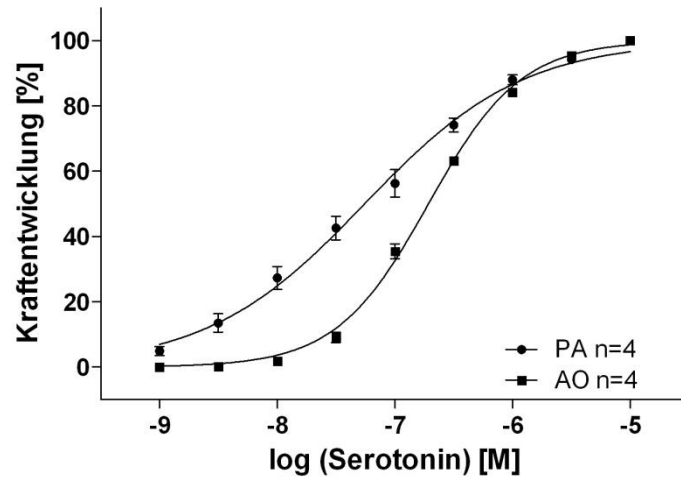


Abbildung 12: Serotonin DWK

Unter kumulativer Zugabe von Serotonin reagierte die PA sensitiver als die AO und kontrahierte bereits bei geringen Serotonin-Konzentrationen.

3.1.3. Endothelin Dosis-Wirkungskurve

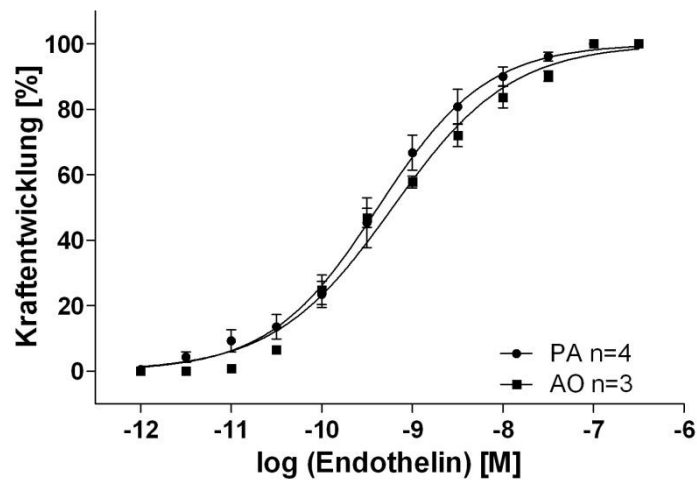


Abbildung 13: Endothelin DWK

Für die DWK Endothelin wurden Konzentrationen von 10^{-12} M bis 3×10^{-7} M verwendet. In der graphischen Auswertung der DWK war kein Unterschied im kontraktilem Verhalten zwischen PA und AO erkennbar.

Bei Durchführung der Endothelin DWK [10^{-12} M bis 3×10^{-7} M] zeigten PA und AO ein ähnliches kontraktiles Verhalten. Dieses bestätigte sich auch bei der statistischen Auswertung, hierbei haben sich die pEC_{50} -Werte nicht signifikant unterschieden (Abbildung 13, PA pEC_{50} : $9,381 \pm 0,04566$ (n=4) vs AO pEC_{50} : $9,219 \pm 0,04073$ (n=3); $p=0,0521$). Die pEC_{75} -Werte für die submaximale Vorkontraktion der Gefäße wurden

aus der Endothelin DWK ermittelt, bei der die Gefäße vor Versuchsbeginn maximal mit Noradrenalin vorkontrahiert wurden (Daten nicht gezeigt). Hier waren die Werte 3×10^{-9} M für die PA und 3×10^{-8} M für die AO.

3.1.4. U 46619 Dosis-Wirkungskurve

Bei der Substanz U 46619 handelt es sich um einen Thromboxan A₂ Rezeptor-Agonisten. Für die DWK wurden Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M verwendet. Es zeigte sich in der graphischen Auswertung der DWK, ebenso wie in der Endothelin DWK, kein signifikanter Unterschied der pEC₅₀-Werte in PA und AO (Abbildung 14, PA pEC₅₀: $7,439 \pm 0,04229$ (n=4) vs AO pEC₅₀: $7,247 \pm 0,03644$ (n=4); p=0,8361). Der pEC₇₅-Wert für die submaximale Vorkontraktion betrug in der PA und AO 10^{-7} M.

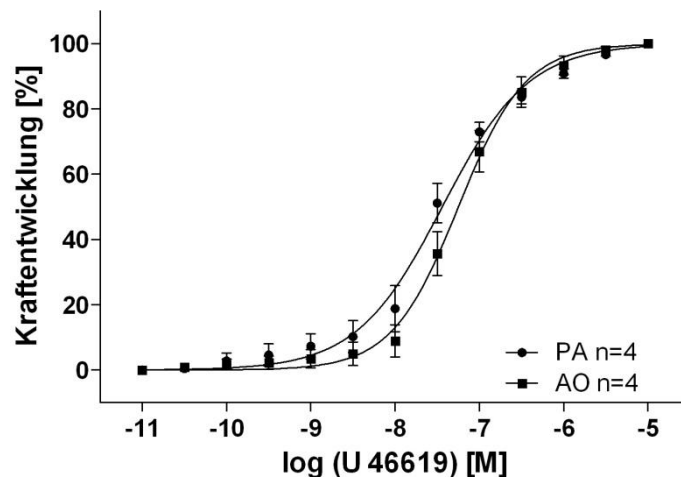


Abbildung 14: U 46619 DWK

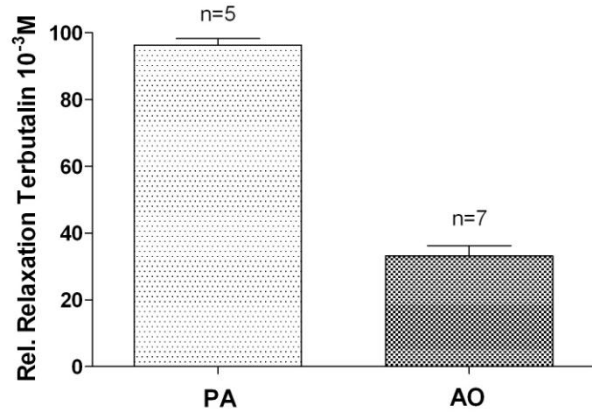
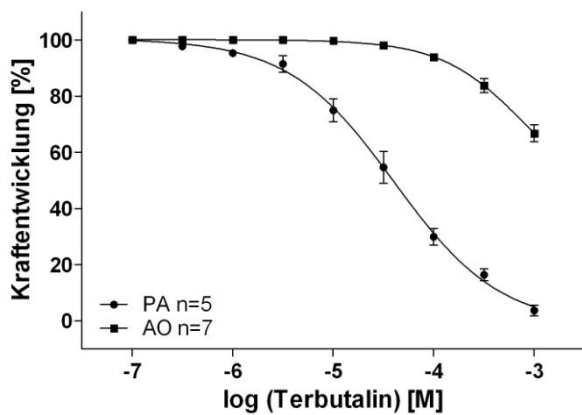
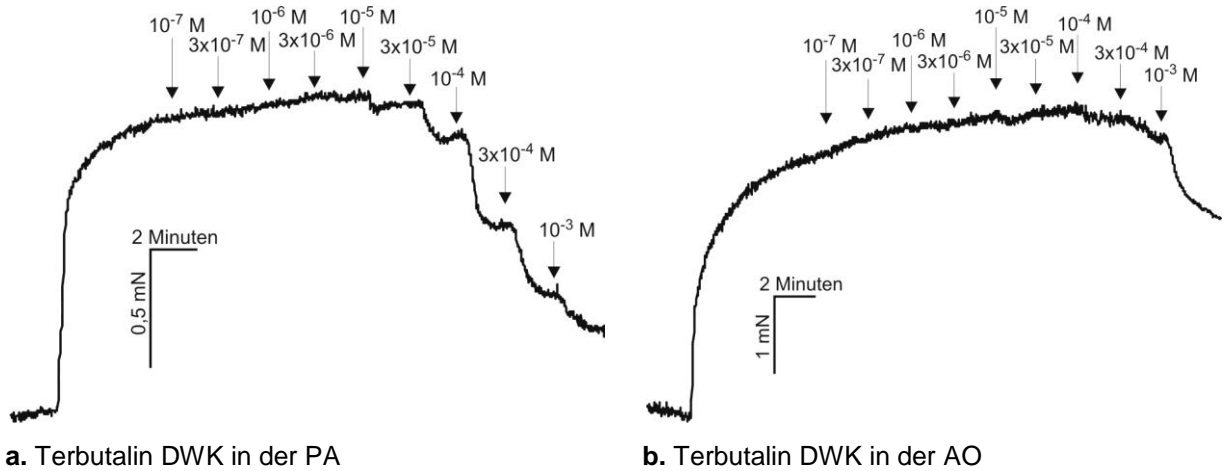
Dargestellt ist die DWK mit U 46619, einem Thromboxan A₂ Rezeptor-Agonisten. U 46619 führte in PA und AO zu keinem Unterschied im kontraktile Verhalten.

DWK	PA			AO			p
	pEC ₅₀	SEM	n	pEC ₅₀	SEM	n	
Phenylephrin	7,430	0,03537	6	6,706	0,05052	4	<0,0001 *
Serotonin	7,258	0,03607	4	6,715	0,01481	4	<0,0001 *
Endothelin	9,381	0,04566	4	9,219	0,04073	3	0,0521
U 46619	7,439	0,04229	4	7,247	0,03644	4	0,8361

Tabelle 7: pEC₅₀-Werte der Standard DWK in PA und AO

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der PA mit den pEC₅₀-Werten der AO. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen PA und AO (p<0,05).

3.2. Terbutalin Dosis-Wirkungskurve



c. Graphische Auswertung Terbutalin DWK

d. Relative Relaxation unter Terbutalin 10^{-3} M

Abbildung 15: Terbutalin DWK

Abbildung a. zeigt die kumulative Zugabe von Terbutalin nach submaximaler Kontraktion mit Phenylephrin in der PA. Ab einer Konzentration von 10^{-5} M kam es zu einer Relaxation der PA. Das Gefäß relaxierte unter Terbutalin 10^{-3} M fast bis auf Ausgangsniveau. b. zeigt die Reaktion der AO. Hier erfolgte ebenfalls alle zwei Minuten die Zugabe einer steigenden Dosis Terbutalin. Im direkten Vergleich ist erkennbar, dass die AO unter Terbutalin erst in hohen Konzentrationen und auch nur in geringem Ausmaß relaxierte. c. zeigt die graphische Auswertung der DWK Terbutalin. Die PA reagierte sensitiver auf Terbutalin als die AO und relaxierte fast bis auf Ausgangsniveau. d. zeigt die relative Relaxation von PA und AO unter der höchsten Terbutalin Konzentration [10^{-3} M].

In der PA und in der AO wurden nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin Terbutalin DWK mit Konzentrationen von 10^{-7} M bis 10^{-3} M durchgeführt. Bereits in der Originalkurve war zu erkennen, dass die PA eine höhere Sensitivität gegenüber Terbutalin aufwies als die AO (Abbildung 15). Auch hier benötigte man in der PA weniger als ein Zehntel der Dosis von Terbutalin um die halbmaximale Wirkung zu erreichen (PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs AO pEC_{50} : $3,087 \pm 0,4326$ (n=7);

$p=0,0248$). Unter der höchsten Terbutalin Konzentration [10^{-3} M] kam es in der PA zu einer fast 100 %-igen Relaxation, die AO relaxierte jedoch nur um ~ 35 %.

Im Weiteren folgen die Ergebnisse der Versuche zur genaueren Analyse des Signalweges von Terbutalin in der PA.

3.2.1. Einfluss von endothelialen Mediatoren

Die Relaxation durch Terbutalin wurde in den Pulmonalarterien weder durch die Inkubation mit Indomethazin [10^{-5} M], zur Inhibition der COX-1, noch durch L-NAME [10^{-5} M], zur Inhibition der eNOS, signifikant beeinflusst (Abbildung 16, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ ($n=5$) vs PA + Indomethazin pEC_{50} : $4,227 \pm 0,06275$ ($n=4$); $p=0,1436$; PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ ($n=5$) vs PA + L-NAME pEC_{50} : $4,215 \pm 0,05808$ ($n=4$); $p=0,1138$).

Auch eine Kombination aus Indomethazin und L-NAME konnte zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Standard-DWK der PA führen (Abbildung 17, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ ($n=5$) vs PA + Indomethazin + L-NAME pEC_{50} : $4,213 \pm 0,04648$ ($n=3$); $p=0,1362$).

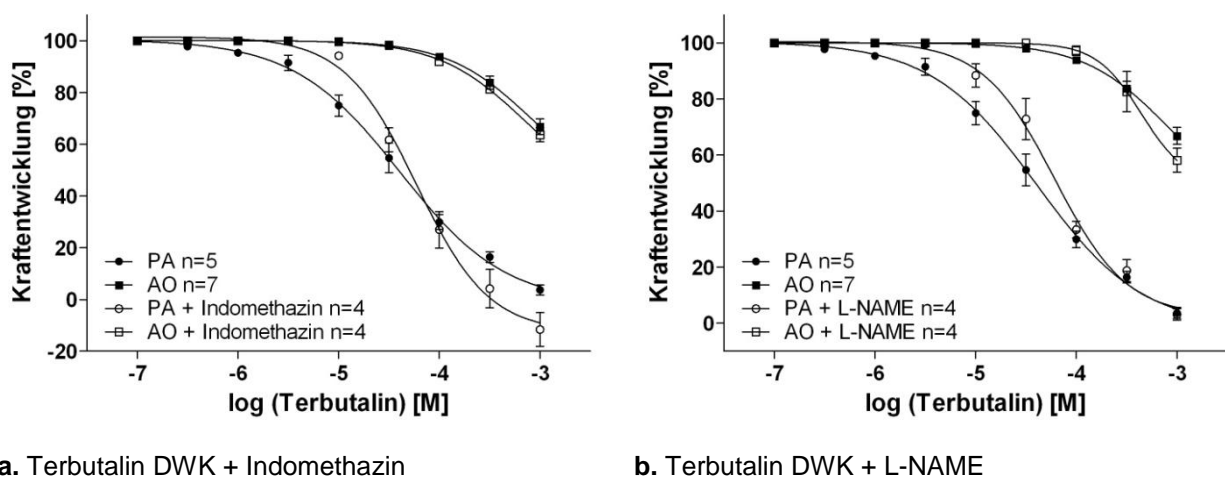


Abbildung 16: Einfluss der endothelialen Mediatoren im Terbutalin-Signalweg

a. DWK Terbutalin + Indomethazin [10^{-5} M]. Durch Inkubation der Gefäße mit Indomethazin wurde die COX-1 inhibiert. Dies führt in der PA zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Terbutalin DWK. b. DWK Terbutalin + L-NAME [10^{-5} M]. Zur Inhibition der eNOS wurde L-NAME verwendet. Die Inkubation hatte jedoch keinen Effekt auf die Terbutalin DWK in der PA.

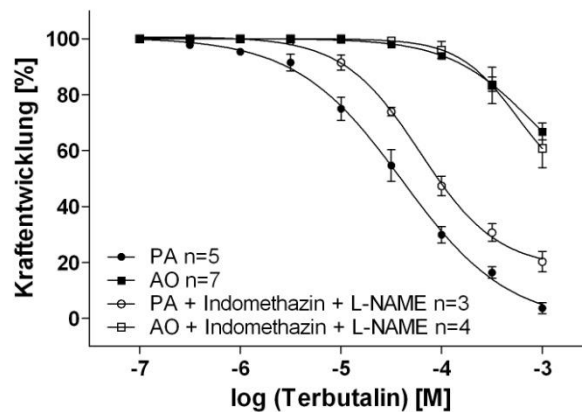


Abbildung 17: Terbutalin DWK + Indomethazin + L-NAME

Zur gleichzeitigen Inhibition der COX und der eNOS wurden die GefäÙe mit Indomethazin [10^{-5} M] und L-NAME [10^{-5} M] inkubiert. Vergleicht man die pEC_{50} -Werte der DWK in der PA so ist der Unterschied nicht signifikant ($p=0,1362$).

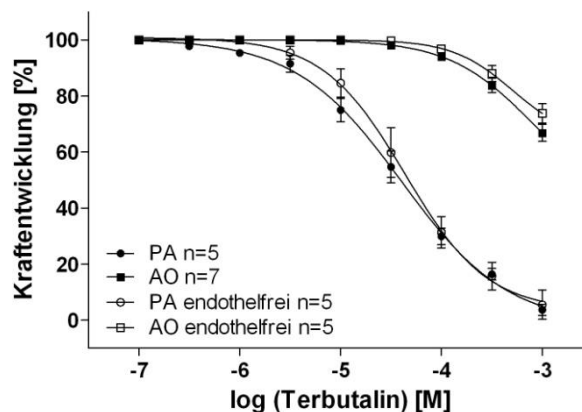


Abbildung 18: Terbutalin DWK endothelfrei

Zur Entfernung des Endothels wurde das GefäÙsegment in den Myographen eingespannt und ein Mäuseschnurrhaar durch das Lumen gezogen. Hiermit wurde die innere Oberfläche abgerieben, um die Endothelzellen zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Terbutalin DWK durchgeführt. In der graphischen Auswertung zeigte sich kein Unterschied in der Relaxation zwischen einer normalen PA und einer PA ohne Endothel.

Um sämtliche endothelialen Effekte auszuschalten, wurde das Endothel der GefäÙe, wie in Kapitel 2.4.1.1. beschrieben, entfernt und die Terbutalin DWK durchgeführt. Auch die komplette Entfernung des Endothels konnte die Relaxation durch Terbutalin in der PA nicht blockieren und führte zu keinem signifikanten Unterschied der pEC_{50} -Werte (Abbildung 18, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ ($n=5$) vs PA endothelfrei pEC_{50} :

$4,360 \pm 0,08358$ ($n=5$); $p=0,7814$). Die Relaxation von Terbutalin wird über einen endothelunabhängigen Weg vermittelt.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der pEC_{50} -Werte der einzelnen DWK, bei denen der Einfluss der endothelialen Mediatoren auf die Vasorelaxation durch Terbutalin untersucht wurde. Diese wurden mit der Standard Terbutalin DWK in der PA verglichen.

DWK	PA			p
	pEC_{50}	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + Indomethazin	4,227	0,06275	4	0,1436
Terbutalin + L-NAME	4,215	0,05808	4	0,1138
Terbutalin + Indomethazin + L-NAME	4,213	0,04648	3	0,1362
Terbutalin endothelfrei	4,360	0,08358	5	0,7814

Tabelle 8: pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK in der PA I

Verglichen wurden die pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC_{50} -Werten der Terbutalin DWK bei denen die endothelialen Mediatoren blockiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Terbutalin DWK und der PA der entsprechenden DWK ($p<0,05$).

3.2.2. Einfluss des G_i -Proteins

Die Inhibition des G_i -Proteins durch PTX (*siehe Kapitel 2.4.1.2*) führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Terbutalin vermittelten Relaxation der PA (*Abbildung 19*, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ ($n=5$) vs PA + PTX pEC_{50} : $4,273 \pm 0,0892$ ($n=4$); $p=0,3315$).

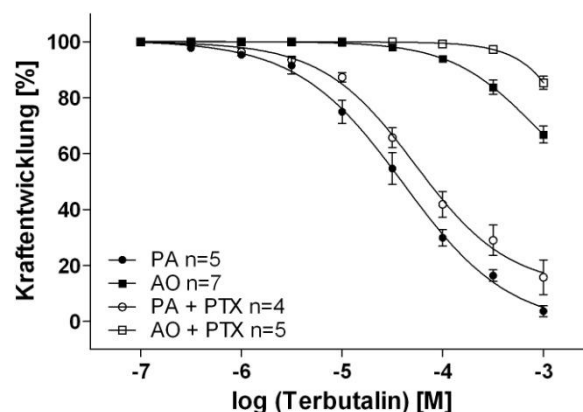


Abbildung 19: Terbutalin DWK + PTX

Nach Inhibition des G_i -Proteins mit PTX wurde die Relaxation der Gefäße nicht signifikant beeinflusst.

3.2.3. Einfluss des cAMP-Signalweges

Eine Blockierung der Proteinkinase A mit Rp-8-CPT-cAMPS [100 μ M], einem cAMP-Analogen, führte zu keiner signifikanten Veränderung der Terbutalinsensitivität der PA (Abbildung 20, PA pEC₅₀: 4,392 \pm 0,07379 (n=5) vs PA + Rp-8-CPT-cAMPS pEC₅₀: 4,332 \pm 0,07472 (n=4); p=0,5902).

Auch die Inkubation der Gefäße mit dem Adenylatzyklase-Inhibitor SQ 22,536 [100 μ M] konnte die Relaxation von Terbutalin in der PA nicht signifikant blockieren, die Signifikanzgrenze wurde knapp verfehlt (Abbildung 21, PA pEC₅₀: 4,392 \pm 0,07379 (n=5) vs PA + SQ 22,536 pEC₅₀: 4,834 \pm 0,2148 (n=3); p=0,0542).

Sowohl die Inkubation mit dem cAMP-Analogen, als auch die Inhibition der Adenylatzyklase führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Sensitivität von der PA gegenüber Terbutalin.

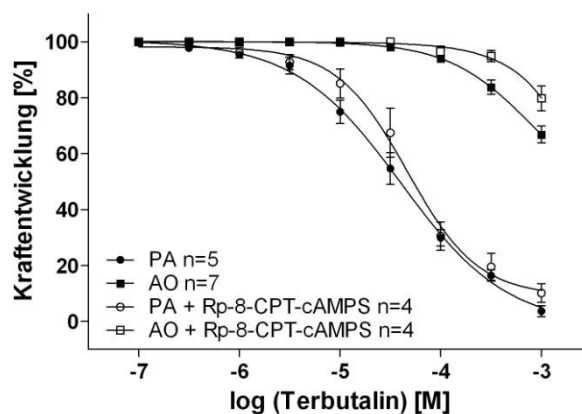


Abbildung 20: Terbutalin DWK + Rp-8-CPT-cAMPS

Die Inkubation mit dem zellmembranpermeablen cAMP-Analogen Rp-8-CPT-cAMPS [100 μ M] führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Terbutalin DWK in der PA.

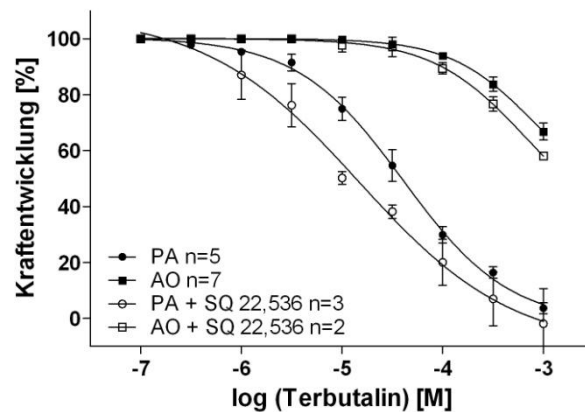


Abbildung 21: Terbutalin DWK + SQ 22,536

Auch die Inkubation der GefäÙe mit dem Adenylatzyklase-Inhibitor SQ 22,536 [100 µM] konnte die Relaxation der PA durch Terbutalin nicht blockieren.

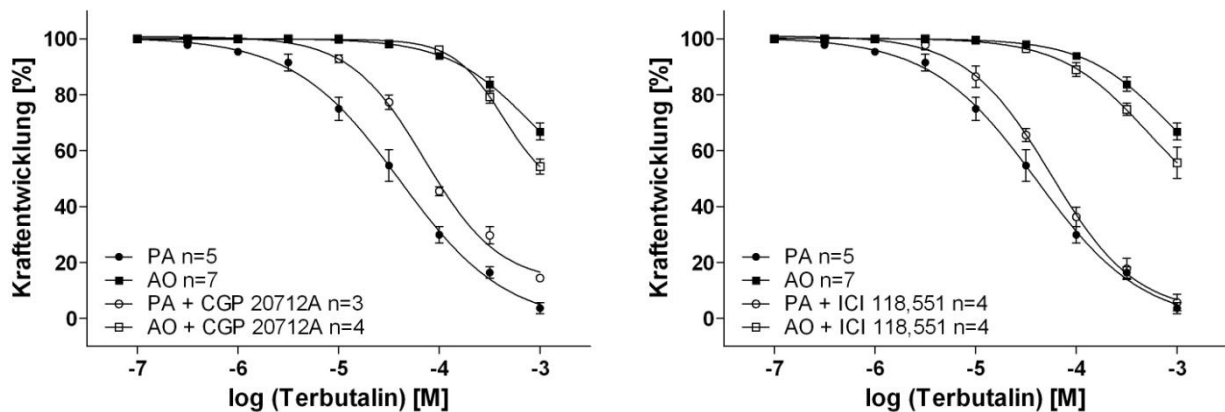
DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + Rp-8-CPT-cAMPS	4,332	0,07472	4	0,5902
Terbutalin + SQ 22,536	4,834	0,21480	3	0,0542

Tabelle 9: pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK in der PA II

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Terbutalin DWK bei denen der Einfluss des cAMP-Signalweg untersucht wurde.

3.2.4. Einfluss der β-Adrenozeptoren

Im statistischen Vergleich der pEC₅₀-Werte mit der Terbutalin DWK konnte weder die Inkubation mit dem β₁-Adrenozeptor-Antagonisten CGP 20712A [300 nM] noch die Inkubation mit dem β₂-Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118,551 [10⁻⁶ M] zu einer signifikanten Beeinflussung der Relaxation durch Terbutalin führen (*Abbildung 22*, PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + CGP 20712A pEC₅₀: 4,146 ± 0,03757 (n=3); p=0,0527. PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + ICI 118,551 pEC₅₀: 4,252 ± 0,05 (n=4); p=0,182).



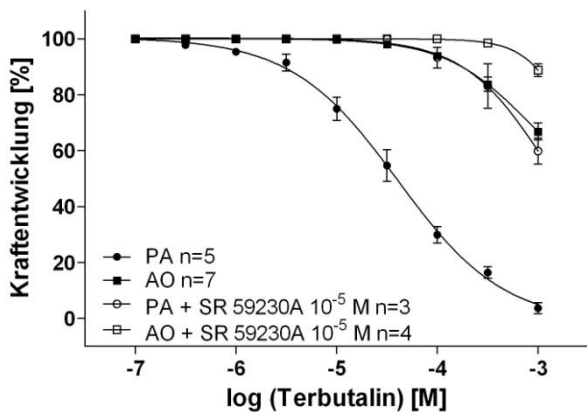
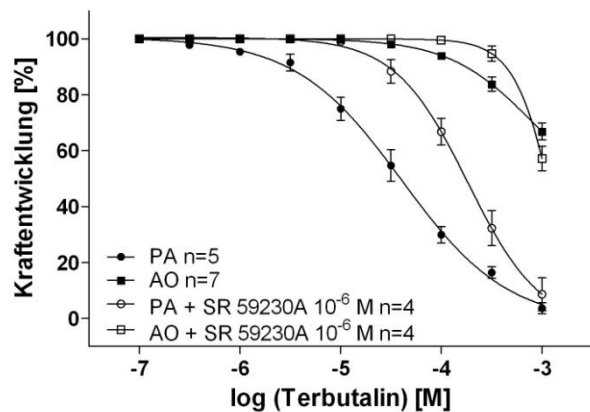
a. Terbutalin DWK + CGP 20712A

b. Terbutalin DWK + ICI 118,551

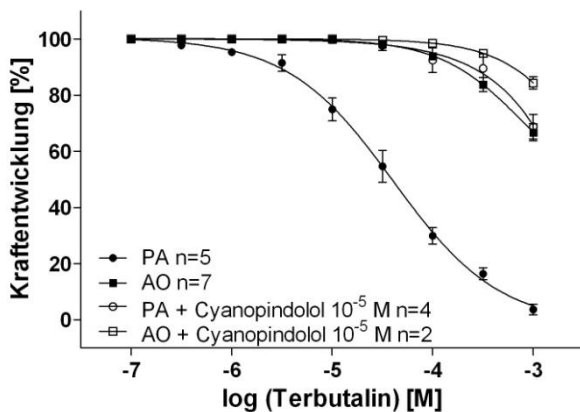
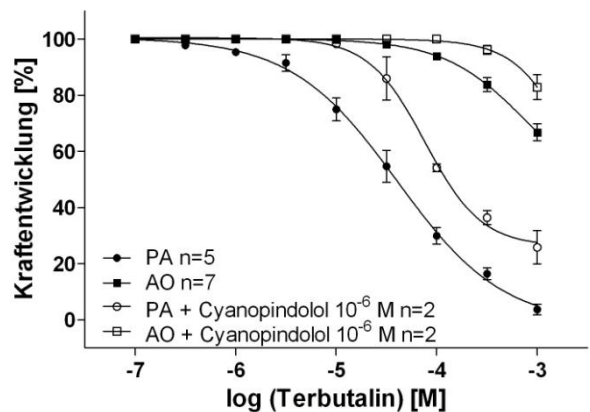
Abbildung 22: Einfluss der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren im Terbutalin-Signalweg

a. Terbutalin DWK + CGP 20712A [300 nM]. Die Blockade der β_1 -Adrenozeptoren erfolgte mit CGP 20712A. Der statistische Vergleich der pEC_{50} -Werte mit der Terbutalin DWK zeigte jedoch, dass die Blockade der β_1 -Adrenozeptoren durch CGP 20712A in der PA zu keinem signifikanten Unterschied führt. b. Terbutalin DWK + ICI 118,551 [10^{-6} M]. Zur Blockade der β_2 -Adrenozeptoren wurden die Gefäße mit ICI 118,551 inkubiert. Die Relaxation von Terbutalin wurde nicht beeinflusst.

Nach Inkubation der Gefäße mit dem β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten SR 59230A in einer Konzentration von 10^{-5} M konnte graphisch ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Standard Terbutalin DWK festgestellt werden (*Abbildung 23a*, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + SR 59230A 10^{-5} M pEC_{50} : $2,935 \pm 1,109$ (n=3); p ist statistisch nicht bestimmbar durch den hohen SEM). Jedoch blieb fraglich, ob diese Blockade der Relaxation nicht eventuell Ursache der höheren Phenylephrindosis war. Unter Verwendung der geringeren Konzentration des β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten [10^{-6} M] kam es ebenfalls zu einer signifikanten Inhibition der Terbutalin vermittelten Relaxation, diese war jedoch schwächer ausgeprägt als bei Verwendung der höheren SR 59230A Konzentration (*Abbildung 23b*, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + SR 59230A 10^{-6} M pEC_{50} : $3,736 \pm 0,0874$ (n=4); $p < 0,0001$).

a. Terbutalin DWK + SR 59230A 10^{-5} Mb. Terbutalin DWK + SR 59230A 10^{-6} M**Abbildung 23:** Terbutalin DWK + SR 59230A

a. Terbutalin DWK + SR 59230A [10^{-5} M]. Nach Inkubation der Gefäße mit dem β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten SR 59230A konnte die Relaxation von Terbutalin nahezu vollständig blockiert werden. Selbst in hohen Terbutalin-Konzentrationen relaxierte die PA nur schwach. Jedoch zeigt SR 59230A in dieser Konzentration auch Effekte auf die α -Adrenozeptoren, sodass zur submaximalen Vorkontraktion der Pulmonalarterien eine höhere Phenylephrindosis [2×10^{-7} M] notwendig war. b. Terbutalin DWK + SR 59230A [10^{-6} M]. Die Gefäße wurden für diesen Versuch mit einer geringeren Konzentration von SR 59230A inkubiert, bei der die Pulmonalarterien noch mit der standardmäßigen Phenylephrindosis kontrahieren konnten [10^{-7} M]. Der Effekt, den SR 59230A in der PA ausübte, führte zu einer signifikanten Blockierung der Relaxation durch Terbutalin.

a. Terbutalin DWK + Cyanopindolol 10^{-5} Mb. Terbutalin DWK + Cyanopindolol 10^{-6} M**Abbildung 24:** Terbutalin DWK + Cyanopindolol

a. Terbutalin DWK + Cyanopindolol [10^{-5} M]. Die Gefäße wurden mit Cyanopindolol [10^{-5} M], einem β_3 -Adrenozeptoren-Antagonisten inkubiert. Bei Verwendung von 10^{-5} M Cyanopindolol kam es ebenfalls zu einer starken Blockade der Relaxation durch Terbutalin. b. Terbutalin DWK + Cyanopindolol [10^{-6} M]. Gleichzeitig wurde noch eine geringere Konzentration Cyanopindolol 10^{-6} M zur Inkubation der Gefäße verwendet. Hierunter kam es zu keiner signifikanten Inhibition der Relaxation durch Terbutalin.

Die Inkubation mit Cyanopindolol [10^{-5} M] führte zu einer signifikanten Blockade der Relaxation von Terbutalin in der PA (*Abbildung 24a*, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + Cyanopindolol 10^{-5} M pEC_{50} : $2,626 \pm 0,1004$ (n=4); $p < 0,0001$). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass β_3 -Adrenozeptoren an dem Signalweg von Terbutalin beteiligt sind. Jedoch sind Effekte auf andere β -Adrenozeptoren und die 5-HT_{1A/1B}-Serotonin-Rezeptoren nicht auszuschließen.

Für die niedrigere Konzentration Cyanopindolol [10^{-6} M] konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Standard Terbutalin DWK festgestellt werden (*Abbildung 24b*, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + Cyanopindolol 10^{-6} M pEC_{50} : $4,118 \pm 0,05116$ (n=2); $p = 0,0824$).

Beide β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten beeinflussten in einer Konzentration von 10^{-5} M die Terbutalin DWK signifikant. Dies könnte ein möglicher Hinweis auf die Beteiligung von β_3 -Adrenozeptoren im Terbutalin-Signalweg sein.

DWK	PA			p
	pEC_{50}	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + CGP 20712A	4,146	0,03757	3	0,0527
Terbutalin + ICI 118,551	4,252	0,05000	4	0,1820
Terbutalin + SR 59230A 10^{-5} M	2,935	1,10900	3	-
Terbutalin + SR 59230A 10^{-6} M	3,736	0,08740	4	<0,0001 *
Terbutalin + Cyanopindolol 10^{-5} M	2,626	0,10040	4	<0,0001 *
Terbutalin + Cyanopindolol 10^{-6} M	4,118	0,05116	2	0,0824

Tabelle 10: pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK in der PA III

Verglichen wurden die pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC_{50} -Werten der Terbutalin DWK bei denen die unterschiedlichen β -Adrenozeptoren blockiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Terbutalin DWK und der PA der entsprechenden DWK ($p < 0,05$).

3.2.5. Einfluss der Kalium-Kanäle

Bei der Verwendung von Kaliumchlorid (KCl) zur submaximalen Vorkontraktion anstelle von Phenylephrin fiel auf, dass die Relaxation durch Terbutalin komplett aufgehoben war (*Abbildung 25*). Da dies ein Hinweis auf die Beteiligung von Kalium-Kanälen am Signalweg von Terbutalin sein konnte, wurden die einzelnen Kalium-Kanäle genauer untersucht.

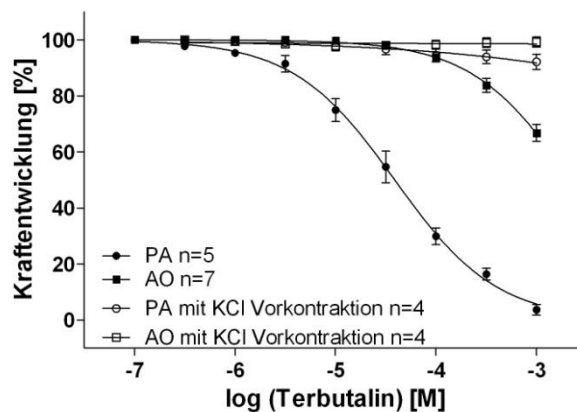
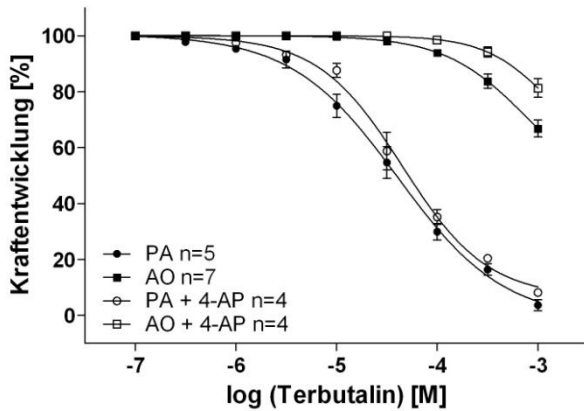


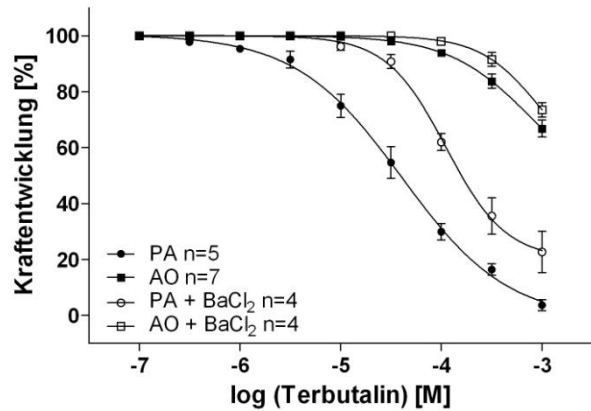
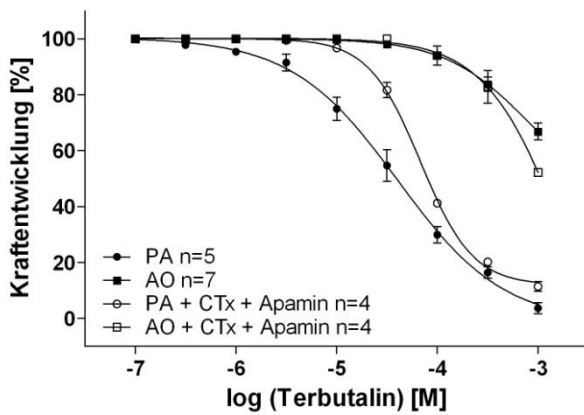
Abbildung 25: Terbutalin DWK mit KCl Vorkontraktion

Die submaximale Vorkontraktion mit KCl anstelle von Phenylephrin führte zur Blockade der Relaxation durch Terbutalin.

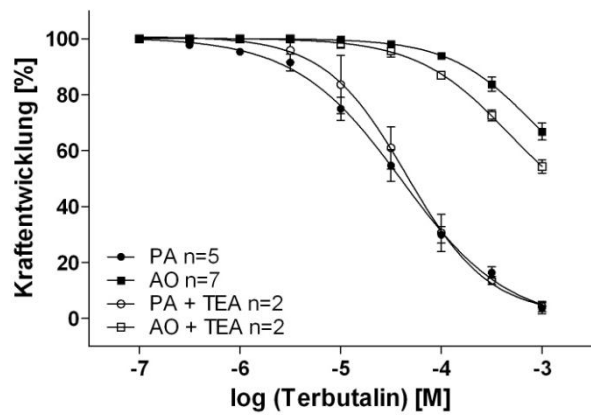
BaCl₂, zur Blockade der K_{ir}-Kanäle, und die Kombination von CTx und Apamin, zur Blockade der K_{Ca}-Kanäle, führten zu einem signifikanten Unterschied in der DWK der PA (*Abbildung 26b und 26c*, PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + BaCl₂ pEC₅₀: 3,953 ± 0,06486 (n=4); p=0,0034. PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + CTx + Apamin pEC₅₀: 4,167 ± 0,01736 (n=4); p=0,041.), was auf einen möglichen Einfluss dieser Kalium-Kanäle im Signalweg von Terbutalin hinweisen könnte. 4-AP, zur Blockade der K_v-Kanäle, und TEA, als unspezifischer Kalium-Kanal-Blocker, beeinflussten die Terbutalin DWK nicht signifikant (*Abbildung 26a und 26d*, PA pEC₅₀: 4,39 ± 0,07379 (n=5) vs PA + 4-AP pEC₅₀: 4,345 ± 0,05635 (n=4); p=0,6445. PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + TEA pEC₅₀: 4,342 ± 0,07806 (n=2); p=0,7165).



a. Terbutalin DWK + 4-AP

b. Terbutalin DWK + BaCl₂

c. Terbutalin DWK + CTx + Apamin



d. Terbutalin DWK + TEA

Abbildung 26: Einfluss der Kalium-Kanäle im Terbutalin-Signalweg

a. Terbutalin DWK + 4-AP [1 mM]. Die Inkubation der Gefäße mit 4-AP blockierte K_v -Kanäle. Dies führte jedoch zu keiner Beeinflussung der Terbutalin DWK in der PA. b. Terbutalin DWK + BaCl₂ [30 μ M]. Durch den K_{ir} -Kanal Blocker BaCl₂ kam es zu einer signifikanten Blockade der durch Terbutalin induzierten Vasorelaxation in der PA. c. Terbutalin DWK + CTx + Apamin [jeweils 10⁻⁷ M]. Die Blockade der K_{Ca} -Kanäle führte zu einer signifikanten Blockade der Relaxation. Vor allem in den niedrigen Terbutalin Konzentrationen ist in der graphischen Auswertung die Blockade deutlich erkennbar. d. Terbutalin DWK + TEA [1 mM]. Durch die unspezifische Blockade der Kalium-Kanäle mit TEA wurde die Relaxation von Terbutalin in der PA nicht beeinflusst.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + 4-AP	4,345	0,05635	4	0,6445
Terbutalin + BaCl ₂	3,953	0,06486	4	0,0034 *
Terbutalin + CTx + Apamin	4,167	0,01736	4	0,0410 *
Terbutalin + TEA	4,342	0,07806	2	0,7165

Tabelle 11: pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK in der PA IV

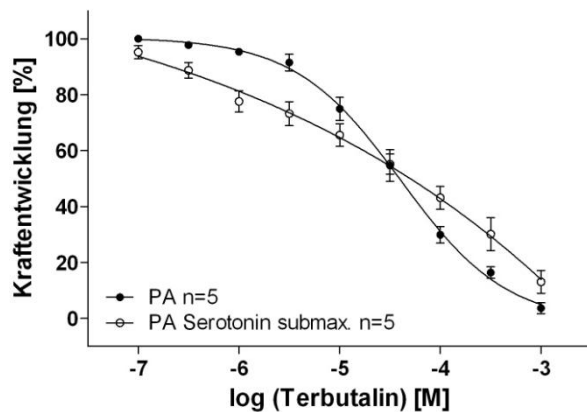
Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Terbutalin DWK bei denen die unterschiedlichen Kalium-Kanäle blockiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Terbutalin DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05).

3.2.6. Einfluss der Vorkontraktion durch verschiedene Vasokonstriktoren

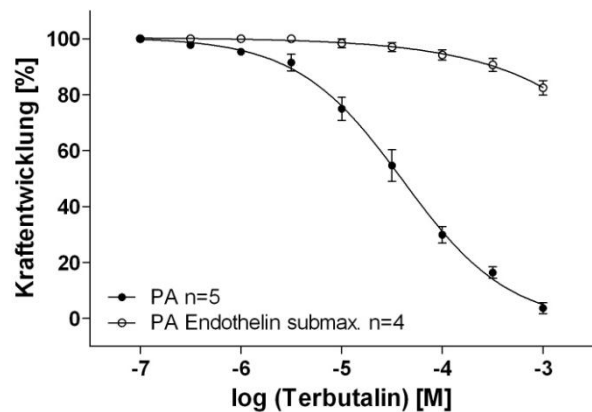
Bei Verwendung des β_3 -Rezeptor-Antagonisten SR 59230A konnte die Vasorelaxation durch Terbutalin in der PA nahezu vollständig blockiert werden. Dies war entweder auf die Blockade der β_3 -Adrenozeptoren oder auf die Beeinflussung der α -Adrenozeptoren zurückzuführen. Möglicherweise wird die Relaxation von Terbutalin nicht über β -Adrenozeptoren vermittelt, sondern über α -adrenolytische Effekte. Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur beschrieben. Nach Kozłowska et al. 2005 relaxieren β_2 -Agonisten die Gefäße, die mit Phenylephrin oder Noradrenalin vorkontrahiert wurden, hauptsächlich über α_1 -adrenolytische Effekte (Kozłowska et al., 2005).

Bei Durchführung der Terbutalin DWK wurde bisher ausschließlich Phenylephrin für die submaximale Kontraktion verwendet. Um den Einfluss des α -Adrenozeptor genauer zu untersuchen und mögliche α -adrenolytische Effekte auszuschalten wurde im nächsten Schritt die submaximale Vorkontraktion variiert. Hierzu wurden verschiedene, nicht über α_1 -Adrenozeptoren wirkende, vasokonstriktorische Substanzen wie Endothelin und U 46619 verwendet.

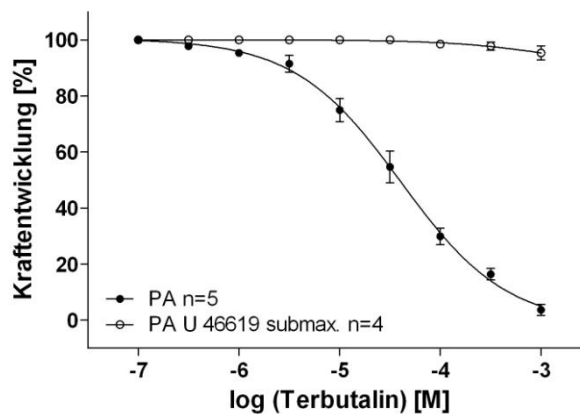
Die Verwendung von Serotonin [PA 5×10^{-7} M] zur submaximalen Vorkontraktion der Gefäße führte zu einer deutlichen Relaxation unter Terbutalin, die in den niedrigen Konzentrationen in der graphischen Auswertung sogar ausgeprägter war als bei Verwendung von Phenylephrin zur submaximalen Kontraktion (Abbildung 27a, PA pEC₅₀: $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + Serotonin submax. pEC₅₀: $4,405 \pm 0,07211$ (n=5); p=0,9028).



a. Terbutalin DWK mit Serotonin submaximal



b. Terbutalin DWK mit Endothelin submaximal



c. Terbutalin DWK mit U 46619 submaximal

Abbildung 27: Terbutalin DWK nach Vorkontraktion mit versch. Vasokonstriktoren

a. Terbutalin DWK mit Serotonin [PA 5×10^{-7} M] in der submaximalen Kontraktion. Die PA relaxierte nach der Serotonin Vorkontraktion unter Terbutalin. b. Terbutalin DWK mit Endothelin [PA 3×10^{-9} M] in der submaximalen Kontraktion. Nur die höchsten Terbutalin Konzentrationen führten zu einer geringen Relaxation. c. Terbutalin DWK mit U 46619 [PA 10^{-7} M] in der submaximalen Kontraktion. Die PA relaxiert nicht nach einer Vorkontraktion mit U 46619. Dargestellt wurden nur die PA, die DWK der Aorta wurden der Übersicht halber weggelassen.

Nach der Vorkontraktion mit Endothelin [PA 3×10^{-9} M] konnte Terbutalin nur in den höchsten Konzentrationen eine geringe Relaxation auslösen. Der Unterschied zur Standard Terbutalin DWK mit Phenylephrin in der submaximalen Vorkontraktion war signifikant (Abbildung 27b, PA pEC_{50} : $4,392 \pm 0,07379$ (n=5) vs PA + Endothelin submax. pEC_{50} : $1,843 \pm 0,2043$ (n=4); $p < 0,0001$).

Bei einer Vorkontraktion mit dem Thromboxan A_2 Rezeptor-Agonisten U 46619 [PA 10^{-7} M] war die Vasorelaxation durch Terbutalin selbst in den höchsten Konzentrationen aufgehoben. Die Vorkontraktion mit U 46619 führte zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Standard Terbutalin DWK (Abbildung 27c,

PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + U 46619 submax. pEC₅₀: 1,091 ± 0,7897 (n=4); p=0,0252).

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + Serotonin submaximal	4,405	0,07211	5	0,9028
Terbutalin + Endothelin submaximal	1,843	0,20430	4	<0,0001 *
Terbutalin + U 46619 submaximal	1,091	0,78970	4	0,02520 *

Tabelle 12: pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK in der PA V

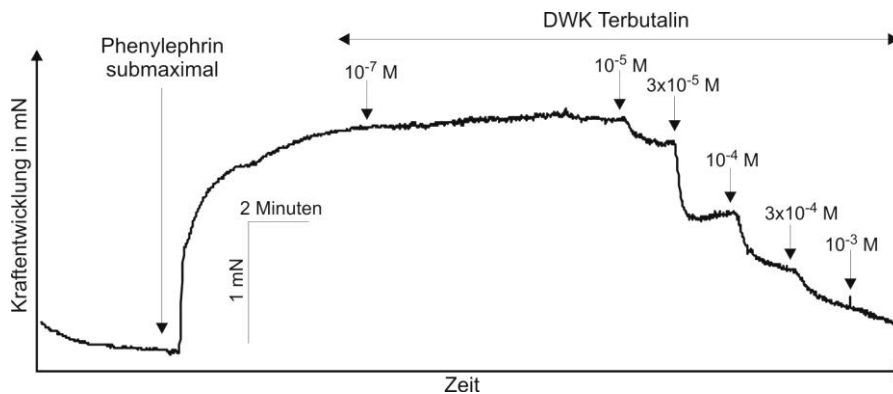
Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Terbutalin DWK bei denen die unterschiedlichen Substanzen zur submaximalen Kontraktion verwendet wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Terbutalin DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05).

3.2.7. Einfluss von Phentolamin auf die Terbutalin Dosis-Wirkungskurve

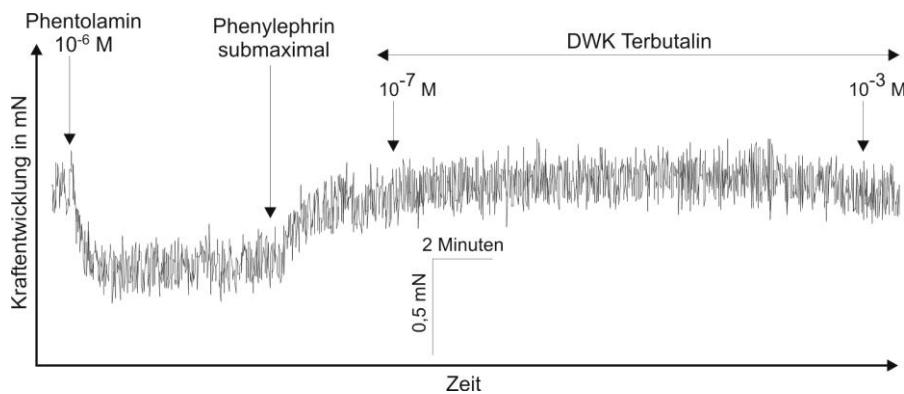
Ziel war es nach dem Versuchsergebnis mit dem β_3 -Rezeptor-Antagonisten SR 59230A weiterhin zu untersuchen, ob Terbutalin die PA über α -adrenolytische Wege relaxiert und auch um die Hypothese von Kozłowska et al. 2005, dass β_2 -Agonisten Gefäße, die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden, hauptsächlich über α_1 -adrenolytische Effekte relaxieren, genauer zu untersuchen.

Dazu wurden bei den Gefäßen vor der submaximalen Vorkontraktion die α_1 -Adrenozeptoren durch Phentolamin blockiert. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten. Damit sollten zum einen die α_1 -Adrenozeptoren für die Relaxation durch Terbutalin blockiert sein und zum anderen konnte so gezeigt werden, ob die für die Vorkontraktion gewählte Substanz α_1 -Adrenozeptoren aktiviert. Würde das Ausmaß der Vorkontraktion nach einer Inkubation der Gefäße mit Phentolamin abgeschwächt sein, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass diese Substanz durch die fehlende Aktivierung der α_1 -Rezeptoren das volle Ausmaß der Kontraktion nicht erreichen kann. Die Gefäße wurden mit Phentolamin [10^{-6} M] für 5 Minuten inkubiert, bevor sie für die Terbutalin DWK mit verschiedenen Substanzen submaximal kontrahiert wurden.

Standard Terbutalin Dosis-Wirkungskurve nach Phenylephrin Vorkontraktion



a.



b.

Abbildung 28: Versuchsablauf Terbutalin DWK + Phentolamin

a. zeigt die Standard Terbutalin DWK einer PA bei der Phenylephrin zur submaximalen Kontraktion verwendet wurde. Nach Applikation der submaximalen Dosis des α_1 -Rezeptor-Agonisten wurde eine Kontraktion $> 1,5$ mN erreicht. b. zeigt die Terbutalin DWK einer PA mit Phenylephrin in der submaximalen Kontraktion, jedoch wurde das Gefäß zuvor für 5 Minuten mit Phentolamin [10^{-6} M], einem α_1 -Rezeptor-Antagonisten, inkubiert. Die Kontraktion unter Phenylephrin war abgeschwächt, $< 0,5$ mN.

Vor Durchführung der Standard Terbutalin DWK wurden die Gefäße mit Phentolamin inkubiert. Durch die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren mit Phentolamin wurde zum einen die Kontraktion durch Phenylephrin im Vergleich zur Standard Terbutalin DWK ohne Phentolamin deutlich abgeschwächt, aber auch die Relaxation durch Terbutalin nahezu vollständig aufgehoben. Der eher lineare Abfall (Drift) der Kraftentwicklung in der graphischen Auswertung ist darauf zurückzuführen, dass die Gefäße nur gering kontrahiert haben ($< 0,5$ mN) und die entwickelte Kraft nicht über längere Dauer auf konstantem Niveau halten konnten (*Abbildung 28*). Der pEC_{50} -Wert unterschied sich signifikant von der Standard Terbutalin DWK und spiegelt damit die deutlich geringere

Relaxation unter α_1 -Blockade wieder (*Abbildung 29*, PA pEC₅₀: 4,392 ± 0,07379 (n=5) vs PA + Phentolamin pEC₅₀: 2,834 ± 0,2121 (n=4); p=0,0061).

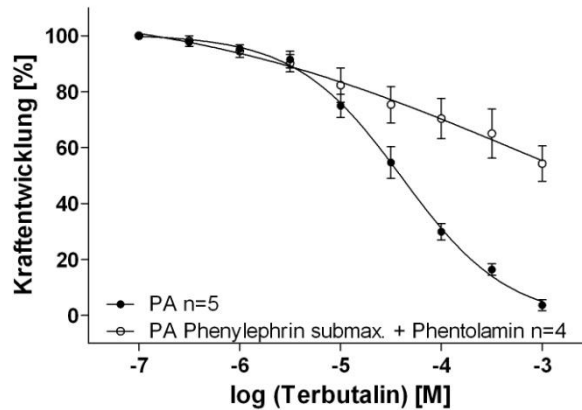
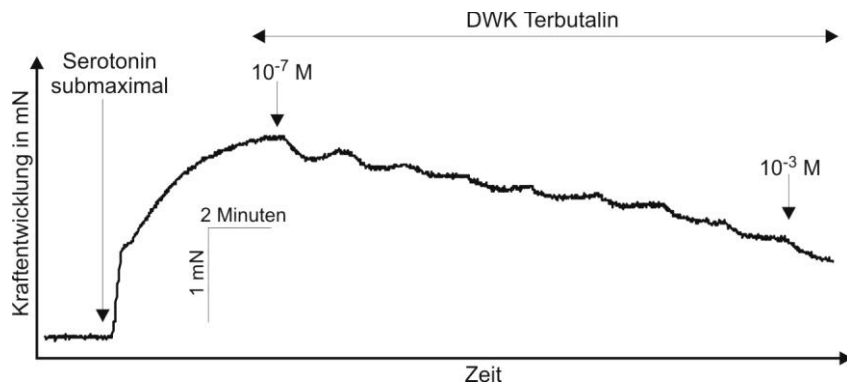


Abbildung 29: Terbutalin DWK + Phentolamin

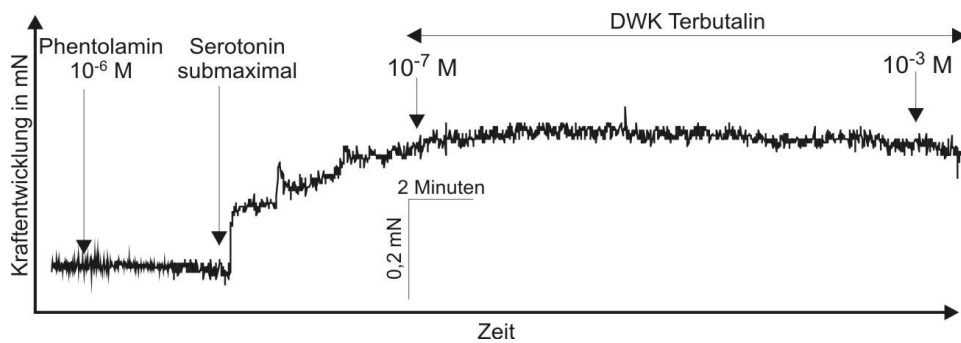
Die Inkubation der Gefäße mit Phentolamin [10^{-6} M] führt zu einer Blockade der Vasorelaxation durch Terbutalin.

Terbutalin Dosis-Wirkungskurve nach Serotonin Vorkontraktion

Auch bei der Terbutalin DWK nach Serotonin Vorkontraktion wurden die Gefäße zuvor mit Phentolamin inkubiert. Im Vergleich zur Terbutalin DWK nach Serotonin Vorkontraktion ohne Phentolamin war erkennbar, dass die Gefäße im Anschluss an die Inkubation mit dem α_1 -Adrenozeptor-Antagonist unter der submaximalen Serotonindosis nur noch abgeschwächt kontrahierten. Die Relaxation von Terbutalin wurde in der PA durch Phentolamin deutlich blockiert (*Abbildung 30*). In der graphischen Auswertung zeigte sich, dass die Relaxation unter Terbutalin nach Inkubation mit dem α_1 -Adrenozeptor-Antagonist blockiert wurde. Eine deutliche Relaxation erfolgte erst unter der höchsten Terbutalin-Konzentration [10^{-3} M]. Auch der Vergleich der pEC₅₀-Werte führte zu einem signifikanten Unterschied in der PA in Anwesenheit des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin (*Abbildung 31*, PA + Serotonin submax. pEC₅₀: 4,405 ± 0,07211 (n=5) vs PA + Serotonin submax. + Phentolamin pEC₅₀: 2,835 ± 0,03788 (n=4); p<0,0001).



a.



b.

Abbildung 30: Versuchsablauf Terbutalin DWK mit Serotonin submax. + Phentolamin

a. zeigt die Terbutalin DWK nach Serotonin Vorkontraktion. Hier wurde unter Serotonin eine maximale Kontraktion ~ 2 mN erreicht. Das Gefäß relaxierte bereits deutlich bei niedrigen Konzentrationen Terbutalin. b. zeigt die gleiche DWK wie a., jedoch wurde das Gefäß zuvor für 5 Minuten mit Phentolamin [10^{-6} M] inkubiert. Das Gefäß kontrahierte deutlich schwächer als ohne Phentolamin, es wurde eine maximale Kontraktion von $\sim 0,3$ mN erreicht.

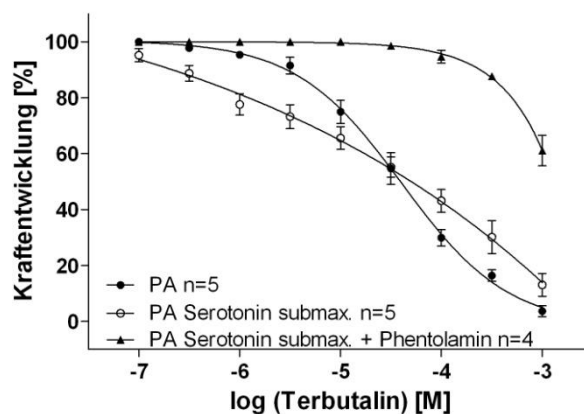


Abbildung 31: Terbutalin DWK mit Serotonin submaximal + Phentolamin

Nach Inkubation der Gefäße mit Phentolamin [10^{-6} M] und anschließender Kontraktion mit der submaximalen Serotonindosis ist die Relaxation von Terbutalin in den niedrigen Konzentrationen komplett blockiert worden. Ab einer Konzentration von 3×10^{-5} M beginnt die PA unter Terbutalin zu relaxieren.

Terbutalin Dosis-Wirkungskurve nach Endothelin Vorkontraktion

Wurden die Gefäße vor submaximaler Kontraktion mit Endothelin mit Phentolamin inkubiert, so zeigte sich unter Terbutalin kein Unterschied im Vergleich zur DWK ohne den α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten. Das Ausmaß der Kontraktion in absoluten Werten blieb unbeeinflusst. Die Gefäße relaxierten nicht unter Terbutalin nach Endothelin Vorkontraktion, eine Blockade der α_1 -Adrenozeptoren konnte dieses nicht beeinflussen. Vergleicht man die pEC_{50} -Werte der PA in An- und Abwesenheit des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin so ist der Unterschied nicht signifikant (*Abbildung 32*, PA + Endothelin submax. pEC_{50} : $1,843 \pm 0,2043$ (n=4) vs PA + Endothelin submax. + Phentolamin pEC_{50} : $2,472 \pm 0,9673$ (n=4); $p=0,5698$).

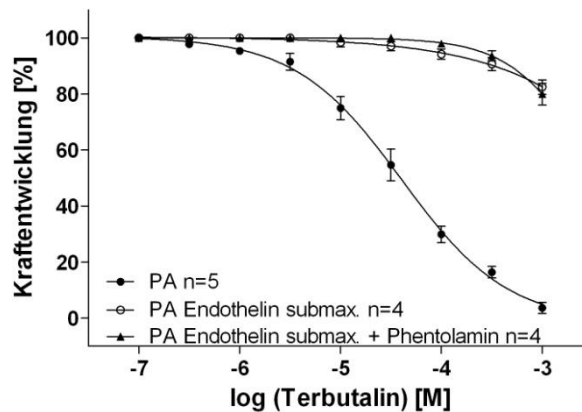


Abbildung 32: Terbutalin DWK mit Endothelin submaximal + Phentolamin

Die Gefäße, die mit Endothelin submaximal kontrahiert wurden, relaxierten nicht unter Terbutalin. Auch nach Inkubation mit Phentolamin [10^{-6} M] relaxierten diese unter Terbutalin nicht.

Terbutalin Dosis-Wirkungskurve nach U 46619 Vorkontraktion

Auch bei Verwendung von U 46619 nach Inkubation mit Phentolamin, konnte kein signifikanter Unterschied zur DWK in Abwesenheit des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten festgestellt werden. Das Ausmaß der Vorkontraktion in absoluten Werten blieb auch hier unbeeinflusst. Die Relaxation unter Terbutalin blieb auch bei Vorkontraktion mit U 46619 aus und wurde nicht durch die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren beeinflusst. Ein Vergleich der pEC_{50} -Werte führte zu keinem signifikanten Unterschied (*Abbildung 33*, PA + U 46619 submax. pEC_{50} : $1,091 \pm 0,7897$ (n=4) vs PA + U 46619 submax. + Phentolamin pEC_{50} : $1,756 \pm 0,2675$ (n=4); $p=0,4555$).

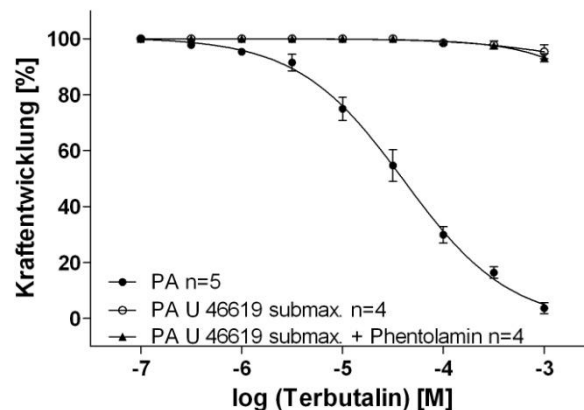


Abbildung 33: Terbutalin DWK mit U 46619 submaximal + Phentolamin

Die Gefäße, die mit U 46619 submaximal kontrahiert wurden, relaxierten nicht unter Terbutalin. Auch nach Inkubation mit Phentolamin [10^{-6} M] relaxierten diese unter Terbutalin nicht. Die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren beeinflusst die Terbutalin DWK in Gefäßen, die mit U 46619 submaximal kontrahiert wurden, nicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inkubation der Pulmonalarterien mit dem α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin zu einer Abschwächung der absoluten Phenylephrin und Serotonin Vorkontraktion führte. Das Ausmaß der Vorkontraktion von Endothelin und U 46619 wurde nicht beeinflusst. Gleichzeitig kam es durch die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren nach Phenylephrin und Serotonin Vorkontraktion zu einer signifikanten Verringerung der von Terbutalin induzierten Vasorelaxation.

3.3. Ermittlung der Wirkpotenz verschiedener Antagonisten mittels Schild-Plot

Um den Einfluss und die Beteiligung der α_1 -Adrenozeptoren für die einzelnen Agonisten quantitativ zu untersuchen, wurden verschiedene Schild-Plots ermittelt. Hierbei wurde die antagonistische Potenz einer Substanz für einen bestimmten Agonisten bestimmt.

3.3.1. Schild-Plot Phenylephrin - Phentolamin

Zur Anfertigung dieses Schild-Plots wurden mehrere DWK mit Phenylephrin durchgeführt. Die Gefäße wurden zuvor mit Phentolamin inkubiert. In den unterschiedlichen Versuchen wurde Antagonisten-Konzentration jeweils gesteigert [10^{-6} M; 3×10^{-6} M; 10^{-5} M], um die antagonistische Potenz von Phentolamin am α_1 -Adrenozeptor mit Hilfe des Schild-Plots bestimmen zu können.

In der graphischen Auswertung zeigte sich mit steigender Antagonisten-Konzentration eine deutliche Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK (*Abbildung 34*). Um in Anwesenheit des Antagonisten das gleiche Ausmaß an Kontraktion zu erreichen wie ohne, musste eine höhere Phenylephrindosis aufgebracht werden. Damit nach Inkubation mit Phentolamin eine ausreichende Kontraktion der Gefäße erreicht werden konnte wurde die Phenylephrin DWK auf höhere Phenylephrin-Konzentrationen (bis 10^{-2} M) erweitert. Die pEC_{50} -Werte nahmen ebenfalls mit steigender Antagonisten-Konzentration zu. Die Kontraktion von Phenylephrin (α_1 -Adrenozeptor-Agonist) wurde durch Phentolamin (α_1 -Adrenozeptor-Antagonist) stark blockiert. Im ANOVA-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied der einzelnen DWK zueinander. Aus den pEC_{50} -Werten der DWK konnte der Schild-Plot ermittelt werden (*Abbildung 35*).

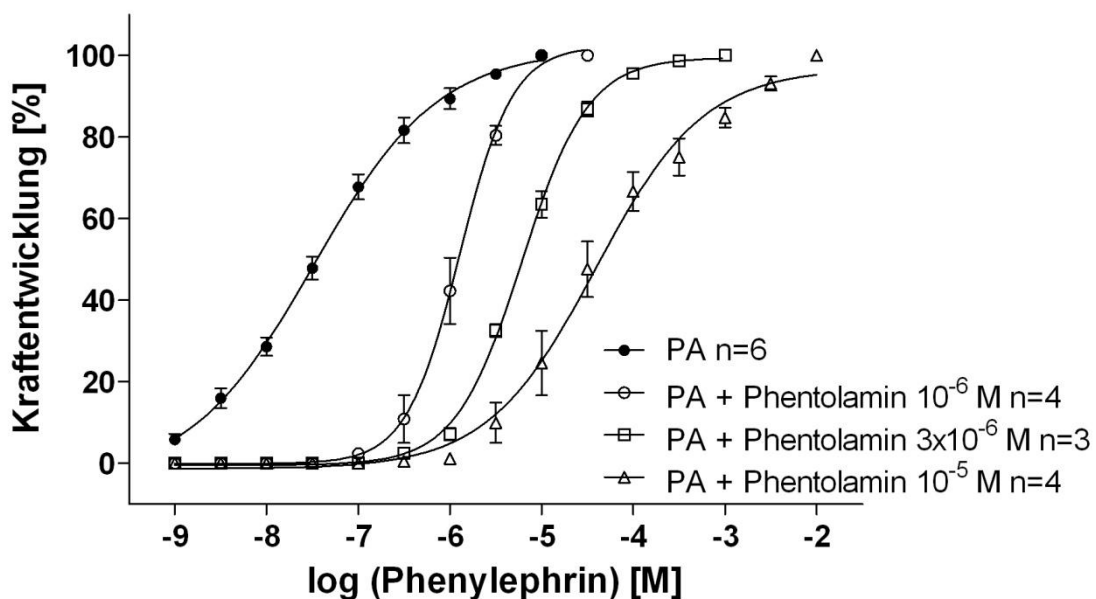


Abbildung 34: Phenylephrin DWK + Phentolamin

Zunächst wurde die Phenylephrin DWK an der PA ohne Phenylephrin durchgeführt. In weiteren Versuchen wurden unterschiedliche Konzentrationen des Antagonisten [10^{-6} M; 3×10^{-6} M; 10^{-5} M] hinzugegeben. Mit steigender Antagonisten-Konzentration kam es zu einer Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Phenylephrin	7,430	0,03535	6	
Phenylephrin + Phentolamin 10 ⁻⁶ M	5,895	0,03688	4	<0,001 *
Phenylephrin + Phentolamin 3x10 ⁻⁶ M	5,214	0,01582	3	<0,001 *
Phenylephrin + Phentolamin 10 ⁻⁵ M	4,410	0,07097	4	<0,001 *

Tabelle 13: pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK + Phentolamin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK mit den pEC₅₀-Werten der Phenylephrin DWK bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen Phentolamin inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Phenylephrin DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05). Vergleicht man den pEC₅₀-Wert aller DWK einzeln miteinander, so erhält man für jedes Paar einen p-Wert <0,001.

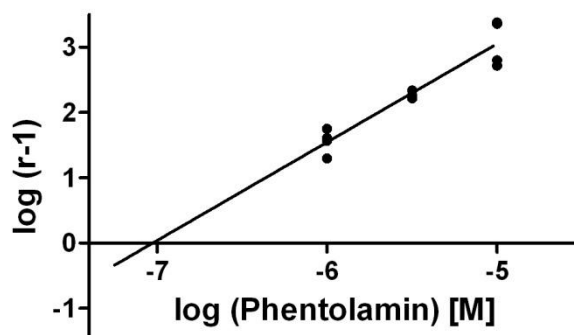


Abbildung 35: Schild-Plot Phenylephrin - Phentolamin

Dargestellt ist die Hemmwirkung des Antagonisten (Phentolamin) als $\log(r-1)$ in Abhängigkeit von der Phentolamin-Konzentration ($\log(\text{Phentolamin})$). Graphisch lässt sich der pA₂-Wert für den Antagonisten Phentolamin bei der Phenylephrin DWK aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ermitteln. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Die Steigung der Regressionsgeraden ist 1,508; der pA₂-Wert beträgt 7,026.

Aus dem Schild-Plot konnte graphisch der pA₂-Wert für Phentolamin aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ermittelt werden. Dieser beträgt 7,026, bestimmt man diesen Wert rechnerisch, so beträgt er 7,8. Dies bedeutet, dass bei einer Phentolamin-Konzentration von 10^{-7,026} M die Konzentration von Phenylephrin verdoppelt werden müsste, um denselben Effekt wie bei Abwesenheit des Antagonisten zu erreichen. Da es sich bei Phentolamin um einen α -Adrenozeptor-Antagonisten handelt, ist dieser ein hoch potenter Antagonist für Phenylephrin und der pA₂-Wert, wie zu erwarten war, entsprechend hoch.

3.3.2. Schild-Plot Serotonin - Phentolamin

Im Weiteren wurde auch die antagonistische Potenz von Phentolamin bei Serotonin Kontraktion bestimmt. Hierzu wurden mehrere DWK mit Serotonin durchgeführt und die Gefäße mit jeweils unterschiedlichen Phentolamin-Konzentrationen inkubiert [3×10^{-7} M; 10^{-6} M; 3×10^{-6} M]. In der graphischen Auswertung kam es auch hier mit steigender Antagonisten-Konzentration zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der DWK (Abbildung 36). Bei der Durchführung des ANOVA-Tests war der Unterschied der einzelnen DWK zueinander signifikant. Desweiteren wurde aus den pEC_{50} -Werten der Schild-Plot bestimmt, um die antagonistische Potenz von Phentolamin genauer zu quantifizieren (Abbildung 37). Der graphisch bestimmte pA_2 -Wert beträgt 7,405, der rechnerische 7,78. Dieser Wert zeigt, dass Phentolamin auch für Serotonin eine ähnlich hohe antagonistische Potenz hat wie für Phenylephrin.

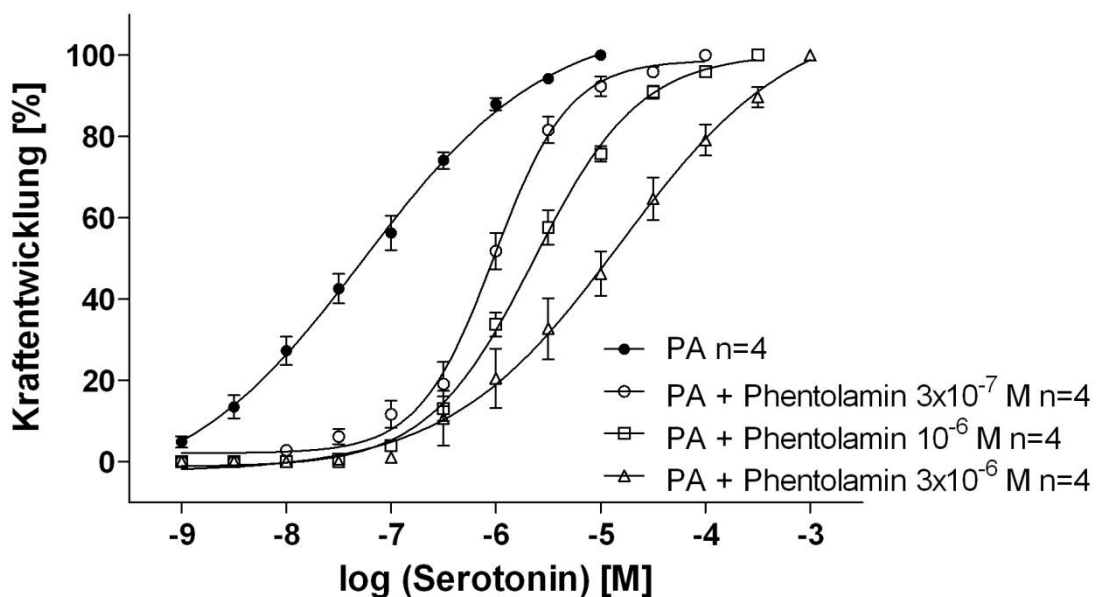


Abbildung 36: Serotonin DWK + Phentolamin

Dargestellt ist die Serotonin DWK und weitere Serotonin DWK, bei denen die Gefäße zuvor mit unterschiedlichen Phentolamin-Konzentrationen [3×10^{-7} M; 10^{-6} M; 3×10^{-6} M] inkubiert worden sind. Mit steigender Antagonisten-Konzentration kam es zu einer Rechtsverschiebung der DWK.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Serotonin	7,258	0,03607	4	
Serotonin + Phentolamin 3x10 ⁻⁷ M	6,016	0,03816	4	<0,001 *
Serotonin + Phentolamin 10 ⁻⁶ M	5,638	0,03337	4	<0,001 *
Serotonin + Phentolamin 3x10 ⁻⁶ M	4,809	0,15520	4	<0,001 *

Tabelle 14: pEC₅₀-Werte der Serotonin DWK + Phentolamin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Serotonin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Serotonin DWK bei denen die GefäÙe mit unterschiedlichen Konzentrationen Phentolamin inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Serotonin DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05). Vergleicht man den pEC₅₀-Wert aller DWK einzeln miteinander so erhält man für jedes Paar einen p-Wert <0,05 bzw. <0,001.

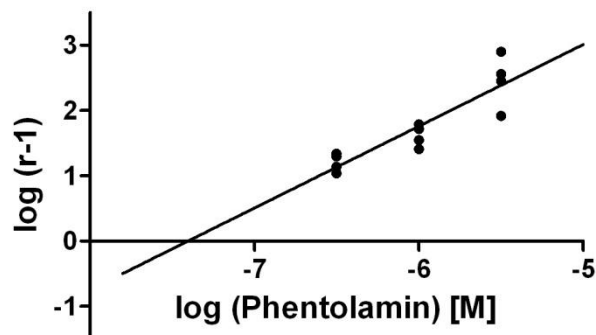


Abbildung 37: Schild-Plot Serotonin - Phentolamin

Graphisch ermittelter pA₂-Wert für den Antagonisten Phentolamin bei der Serotonin DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 1,253; pA₂ = 7,405.

3.3.3. Schild-Plot Endothelin - Phentolamin

Für die Endothelin DWK wurden Phentolamin-Konzentrationen von 3x10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M und 3x10⁻⁵ M verwendet. In der graphischen Auswertung zeigte sich ebenfalls eine Rechtsverschiebung der DWK, diese war jedoch geringer ausgeprägt als bei den DWK mit Phenylephrin und Serotonin (*Abbildung 38*). Eine höhere Endothelin-Konzentration wurde benötigt um denselben Effekt zu erreichen, wie in Abwesenheit des Antagonisten. Im ANOVA-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen DWK.

Aus den pEC₅₀-Werten der einzelnen DWK wurde der Schild-Plot bestimmt (*Abbildung 39*). Der graphisch ermittelte pA₂-Wert beträgt 5,731, der rechnerische 6,03. Diese lagen niedriger als bei Phentolamin und Serotonin, sodass sich hieraus schließen lässt, dass Phentolamin eine geringere antagonistische Potenz für Endothelin besitzt als für die anderen beiden Substanzen. Dies war auch in der graphischen Auswertung

ersichtlich, denn die Rechtsverschiebung der DWK war bei steigender Phentolamin-Konzentration geringer ausgeprägt.

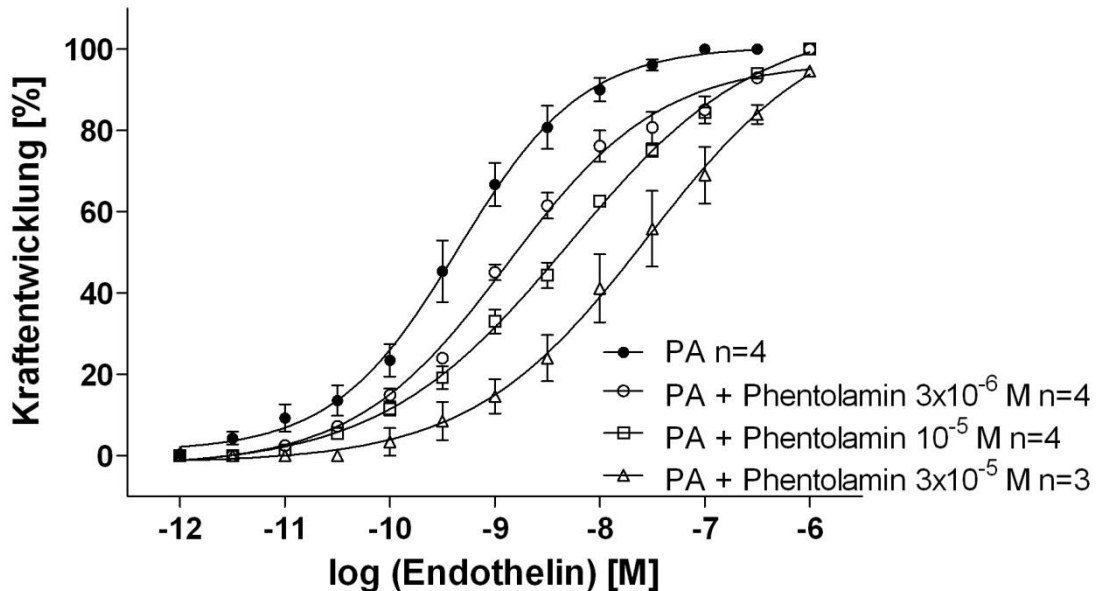


Abbildung 38: Endothelin DWK + Phentolamin

Dargestellt ist die Endothelin DWK in den PA und weitere Endothelin DWK, bei denen die GefäÙe zuvor mit Phentolamin [3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M] inkubiert wurden. In der graphischen Auswertung zeigt sich mit steigender Antagonisten-Konzentration eine Rechtsverschiebung der DWK.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Endothelin	9,381	0,04566	4	
Endothelin + Phentolamin 3×10^{-6} M	8,879	0,05859	4	<0,050 *
Endothelin + Phentolamin 10^{-5} M	8,293	0,05957	4	<0,001 *
Endothelin + Phentolamin 3×10^{-5} M	7,545	0,21500	3	<0,001 *

Tabelle 15: pEC₅₀-Werte der Endothelin DWK + Phentolamin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Endothelin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Endothelin DWK, bei denen die GefäÙe mit unterschiedlichen Konzentrationen Phentolamin inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Endothelin DWK und der PA der entsprechenden DWK ($p < 0,05$). Vergleicht man den pEC₅₀-Wert aller DWK einzeln miteinander so war auch jedes Paar einzeln signifikant zueinander.

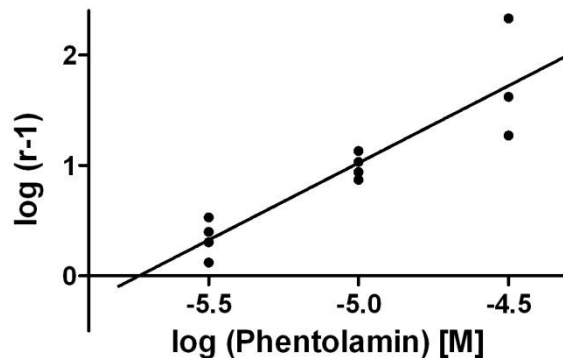


Abbildung 39: Schild-Plot Endothelin - Phentolamin

Graphisch ermittelter pA_2 -Wert für den Antagonisten Phentolamin bei der Endothelin DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 1,397; $pA_2 = 5,731$.

3.3.4. Schild-Plot U 46619 - Phentolamin

Für die DWK mit dem Thromboxan A_2 Rezeptor-Agonisten U 46619 wurden Phentolamin-Konzentrationen von 3×10^{-6} M, 10^{-5} M und 3×10^{-5} M verwendet. In der graphischen Auswertung zeigte sich auch bei steigenden Antagonisten-Konzentrationen keine signifikante Rechtsverschiebung der DWK (*Abbildung 40*). Im ANOVA-Test ergab sich ein $p > 0,05$ bei der U 46619 DWK + Phentolamin 3×10^{-6} M vs U 46619 DWK + Phentolamin 10^{-5} M bzw. die U 46619 DWK + Phentolamin 10^{-5} M vs U 46619 DWK + Phentolamin 3×10^{-5} M, Die Rechtsverschiebung zwischen den einzelnen DWK war mit steigender Antagonisten-Konzentration nicht signifikant. Ein Schild-Plot wurde angefertigt um den pA_2 -Wert zu bestimmen (*Abbildung 41*). Der graphisch bestimmte pA_2 -Wert liegt bei 5,076, der rechnerisch ermittelte Wert bei 5,12. Im Vergleich mit den drei zuvor gezeigten Schild-Plots ist dieser Wert deutlich kleiner, was bedeutet, dass Phentolamin eine niedrigere antagonistische Potenz für U 46619 hat als für Phenylephrin, Serotonin und Endothelin.

Tabelle 17 zeigt gibt einen Überblick über die ermittelten pA_2 -Werte für Phentolamin in den bisherigen Schild-Plot Versuchen.

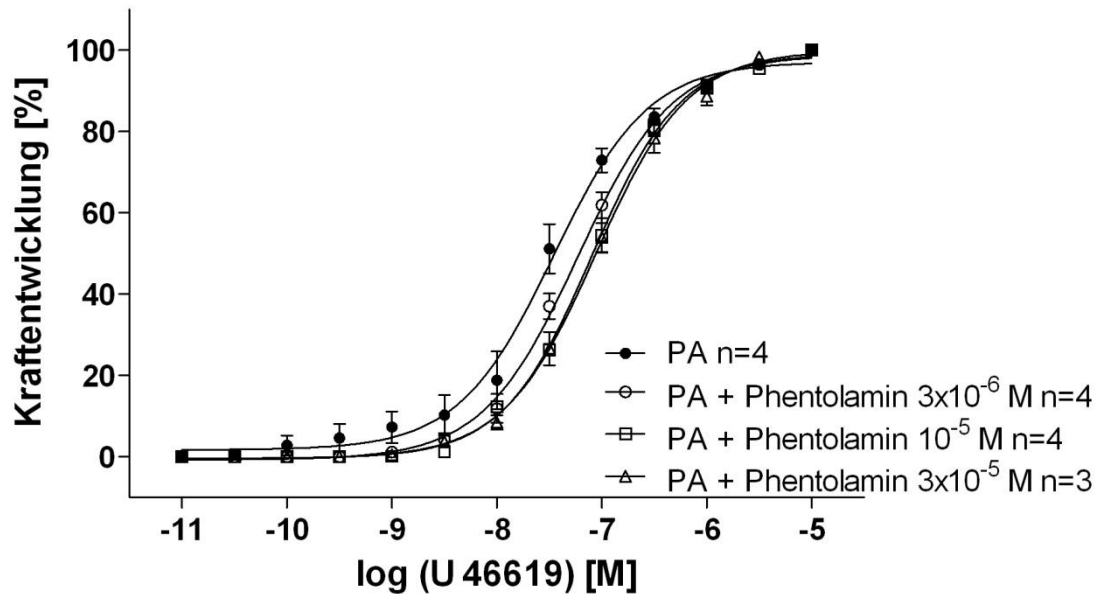


Abbildung 40: U 46619 DWK + Phentolamin

Dargestellt sind die DWK mit dem Thromboxan A₂ Rezeptor-Agonisten U 46619. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen Phentolamin verwendet [3×10^{-6} M, 10^{-5} M und 3×10^{-5} M], um den Einfluss des α -Adrenozeptor-Antagonisten für U 46619 DWK genauer zu untersuchen. In der graphischen Auswertung zeigt sich kein Unterschied zwischen den DWK mit und ohne Phentolamin.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
U 46619	7,439	0,04229	4	
U 46619 + Phentolamin 3×10^{-6} M	7,230	0,02872	4	<0,010 *
U 46619 + Phentolamin 10^{-5} M	7,095	0,02210	4	<0,001 *
U 46619 + Phentolamin 3×10^{-5} M	7,057	0,03052	3	<0,001 *

Tabelle 16: pEC₅₀-Werte der U 46619 DWK + Phentolamin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der U 46619 DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der U 46619 DWK, bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen Phentolamin inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der U 46619 DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05).

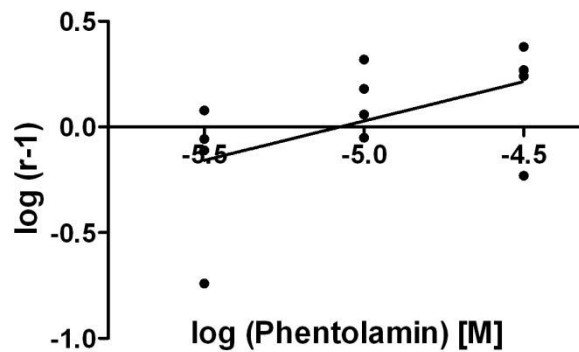


Abbildung 41: Schild-Plot U 46619 - Phentolamin

Graphisch ermittelter pA_2 -Wert für den Antagonisten Phentolamin bei der U 46619 DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 0,3723; $pA_2 = 5,076$.

Agonist – Antagonist	pA_2 -Wert (graphisch)	pA_2 -Wert (rechnerisch)
Phenylephrin - Phentolamin	7,026	7,80
Serotonin - Phentolamin	7,405	7,78
Endothelin - Phentolamin	5,731	6,03
U 46619 - Phentolamin	5,076	5,12

Tabelle 17: Übersicht pA_2 -Werte für Phentolamin

3.3.5. Schild-Plot Phenylephrin - Terbutalin

Um die antagonistische Potenz von Terbutalin für Phenylephrin, bzw. die vermuteten α -adrenolytischen Wirkungen von Terbutalin genauer zu untersuchen, wurden Versuche zur Anfertigung eines Schild-Plots durchgeführt. Die Gefäße wurden hierfür vor Beginn der Phenylephrin DWK mit Terbutalin inkubiert [10^{-6} M; 10^{-5} M; 10^{-4} M]. In der graphischen Auswertung zeigte sich eine deutliche Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK (*Abbildung 42*). Mit steigender Terbutalin-Konzentration waren immer höhere Phenylephrinmengen nötig, um denselben Effekt zu erreichen wie ohne Terbutalin. Vergleicht man im ANOVA-Test die einzelnen DWK einzeln miteinander, so waren diese mit Ausnahme der Phenylephrin DWK vs Phenylephrin DWK + Terbutalin 10^{-6} M alle signifikant zueinander mit einem p-Wert $<0,001$. Aus den pEC_{50} -Werten der einzelnen DWK wurde der Schild-Plot bestimmt (*Abbildung 43*). Der graphisch ermittelte pA_2 -Wert für Terbutalin lag im Schild-Plot bei 6,327, der rechnerische bei 6,12. Zusammen mit der graphischen Auswertung lässt sich festhalten, dass Terbutalin eine antagonistische Potenz für Phenylephrin hat. Bei einer Terbutalin-

Konzentration von $10^{-6,327}$ M muss die Phenylephrin-Konzentration verdoppelt werden, um denselben Effekt zu erreichen wie bei Abwesenheit von Terbutalin.

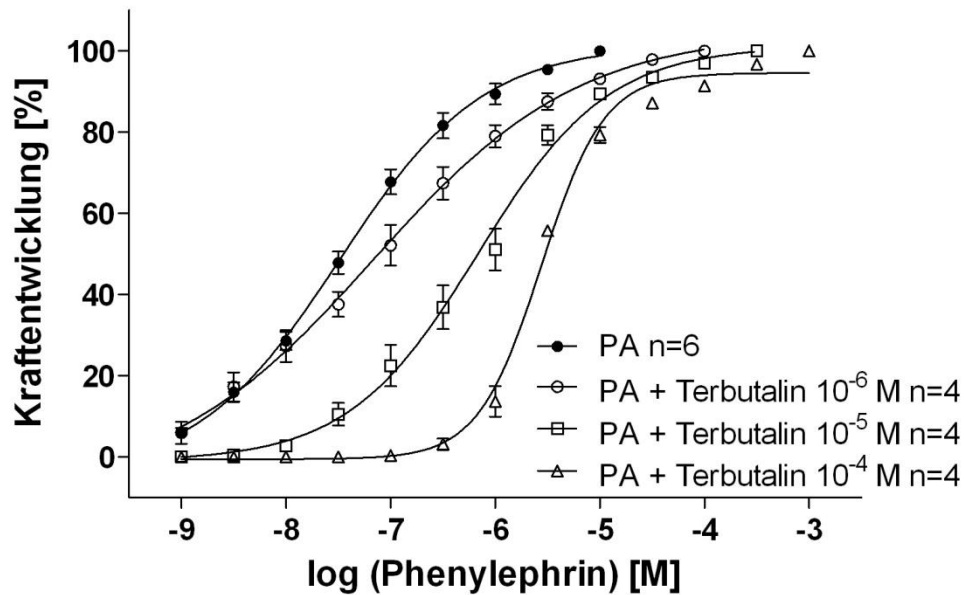


Abbildung 42: Phenylephrin DWK + Terbutalin

Dargestellt ist die Phenylephrin DWK und die Phenylephrin DWK, die zuvor mit Terbutalin [10^{-6} M; 10^{-5} M; 10^{-4} M].inkubiert wurden. Mit steigender Terbutalin-Konzentration kam es zu einer Rechtsverschiebung der DWK.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Phenylephrin	7,430	0,03535	6	
Phenylephrin + Terbutalin 10^{-6} M	7,167	0,15780	4	>0,05
Phenylephrin + Terbutalin 10^{-5} M	6,164	0,06058	4	<0,001 *
Phenylephrin + Terbutalin 10^{-4} M	5,560	0,02218	4	<0,001 *

Tabelle 18: pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK + Terbutalin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Phenylephrin DWK bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen Terbutalin inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Phenylephrin DWK und der PA der entsprechenden DWK (p<0,05).

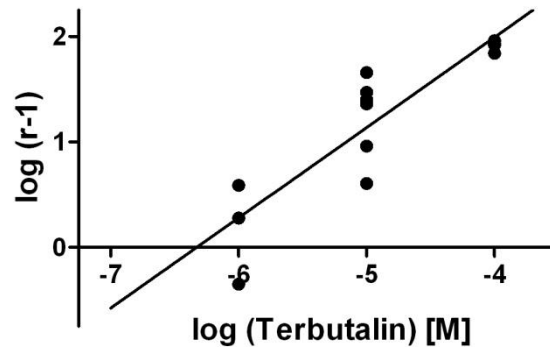


Abbildung 43: Schild-Plot Phenylephrin - Terbutalin

Graphisch ermittelter pA_2 -Wert für Terbutalin bei der Phenylephrin DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 0,8563; $pA_2 = 6,327$.

3.3.6. Schild-Plot Phenylephrin - U 46619

Für diesen Schild-Plot wurden die Pulmonalarterien vor der Phenylephrin DWK mit steigenden Konzentrationen des Thromboxan A_2 Rezeptor-Agonisten U 46619 [10^{-11} M; 3×10^{-10} M; 10^{-9} M] inkubiert. Ziel war es, mit Hilfe dieses Schild-Plots den pA_2 -Wert für eine Substanz in der Phenylephrin DWK zu bestimmen, die keinen Einfluss auf die α -Adrenozeptoren hat (siehe Schild-Plot U 46619 – Phentolamin). In der graphischen Auswertung zeigte sich keine Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK (Abbildung 44). Die Pulmonalarterien zeigten sogar in den niedrigen Phenylephrin-Konzentrationen eine stärkere Kontraktion als in Abwesenheit des U 46619. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass auch die niedrigen Konzentrationen des U 46619 einen geringen vasokonstriktorisches Effekt ausüben und so die Kontraktion unter Phenylephrin verstärkt wurde. Die Standard DWK war im ANOVA-Test signifikant zur Phenylephrin DWK + U 46619 10^{-11} M, alle anderen DWK sind zueinander nicht signifikant. Dadurch dass die pEC_{50} -Werte der Phenylephrin DWK + U 46619 vom Wert her niedriger sind als der pEC_{50} -Wert der Standard Phenylephrin DWK lässt sich hieraus kein Schild-Plot und kein pA_2 -Wert bestimmen. Es lässt sich lediglich aus der graphischen Auswertung folgern, dass U 46619 keine antagonistische Potenz für Phenylephrin hat, eine weitere Quantifizierung mittels pA_2 -Wert war für diese Versuche nicht möglich.

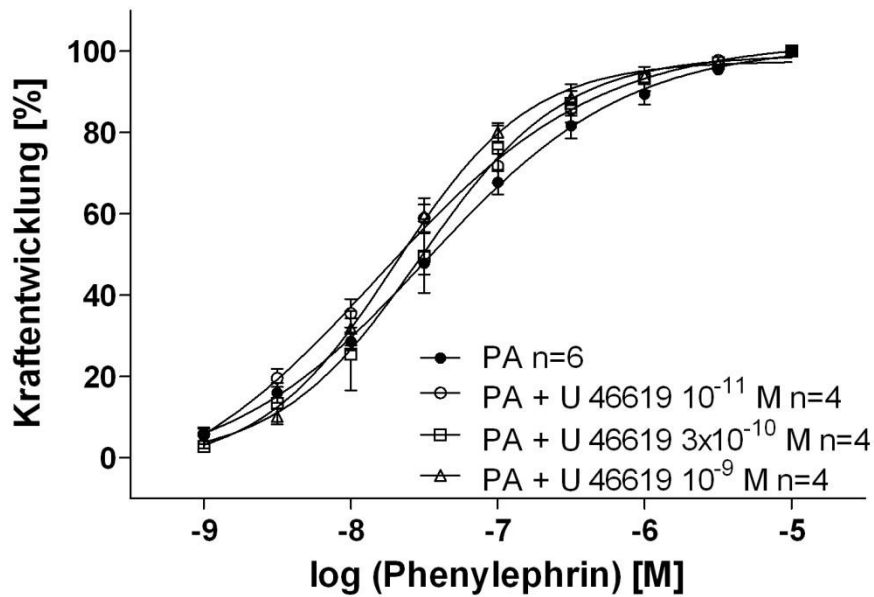


Abbildung 44: Phenylephrin DWK + U 46619

Dargestellt ist die Phenylephrin DWK und die Phenylephrin DWK, die zuvor mit U 46619 [10^{-11} M; 3×10^{-10} M; 10^{-9} M] inkubiert wurden. Inkubation mit dem Thromboxan A_2 Rezeptor-Agonisten verändert die Phenylephrin DWK nicht.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Phenylephrin	7,430	0,03535	6	
Phenylephrin + U 46619 10^{-11} M	7,815	0,12740	4	<0,05 *
Phenylephrin + U 46619 3×10^{-10} M	7,528	0,11170	4	>0,05
Phenylephrin + U 46619 10^{-9} M	7,698	0,05651	4	>0,05

Tabelle 19: pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK + U 46619

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Phenylephrin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Phenylephrin DWK bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen U 46619 inkubiert wurden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der PA der Phenylephrin DWK und der PA der entsprechenden DWK ($p < 0,05$).

3.3.7. Schild-Plot Terbutalin - ICI 118,551

Desweiteren wurden DWK mit dem β_2 -Rezeptor-Agonisten Terbutalin durchgeführt und die Gefäße zuvor mit verschiedenen Konzentrationen des β_2 -Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118,551 inkubiert [55 nM; 10^{-7} M; 10^{-6} M]. Hierbei sollte untersucht werden, ob ICI 118,551 als β_2 -Adrenozeptor-Antagonist tatsächlich antagonistisch gegenüber Terbutalin wirkt oder ob die Terbutalin Effekte in der PA unabhängig vom β_2 -Adrenozeptor vermittelt werden. In der graphischen Auswertung waren die DWK mit

Antagonisten nahezu identisch mit der Standard Terbutalin DWK (*Abbildung 45*). Eine Steigerung der Konzentration des β_2 -Antagonisten ICI 118,551 hatte keinen Einfluss auf die DWK Terbutalin; die Relaxation konnte hierdurch nicht gehemmt werden. Eine Rechtsverschiebung blieb aus. Im ANOVA-Test zeigte sich, dass der Unterschied zwischen den einzelnen DWK nicht signifikant war. Aus den pEC_{50} -Werten der einzelnen DWK wurde der Schild-Plot bestimmt (*Abbildung 46*). Der im Schild-Plot graphisch bestimmte pA_2 -Wert für ICI 118,551 beträgt 4,452, der rechnerische hingegen 6,23.

DWK	PA			p
	pEC_{50}	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + ICI 118,551 55 nM	4,280	0,06096	4	>0,05
Terbutalin + ICI 118,551 10^{-7} M	4,198	0,08147	4	>0,05
Terbutalin + ICI 118,551 10^{-6} M	4,252	0,05000	4	>0,05

Tabelle 20: pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK + ICI 118,551

Verglichen wurden die pEC_{50} -Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC_{50} -Werten der Terbutalin DWK bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen ICI 118,551 inkubiert wurden.

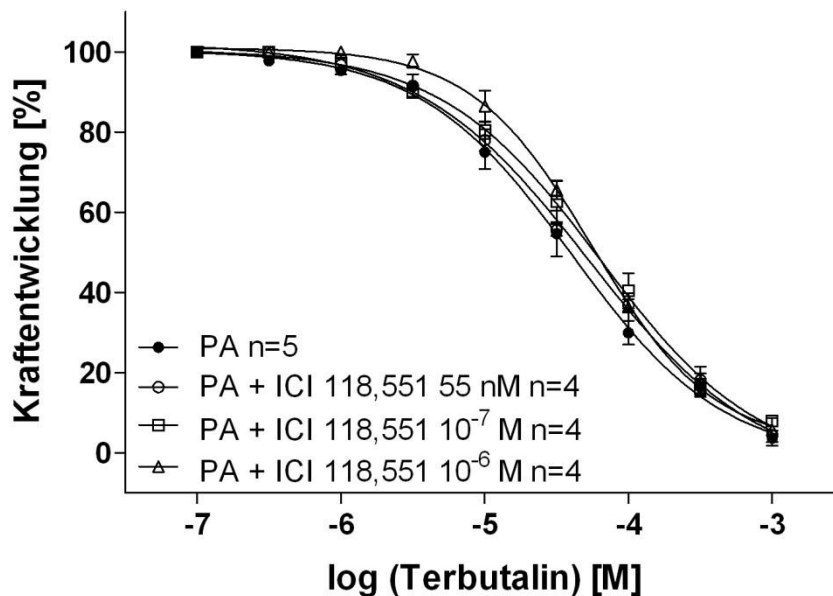


Abbildung 45: Terbutalin DWK + ICI 118,551 (Schild-Plot)

Dargestellt ist die Terbutalin DWK ohne und mit verschiedenen Konzentrationen des β_2 -Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118,551 [55 nM; 10^{-7} M; 10^{-6} M]. Hier blieb eine Rechtsverschiebung der DWK auch mit steigender Antagonisten-Konzentration aus.

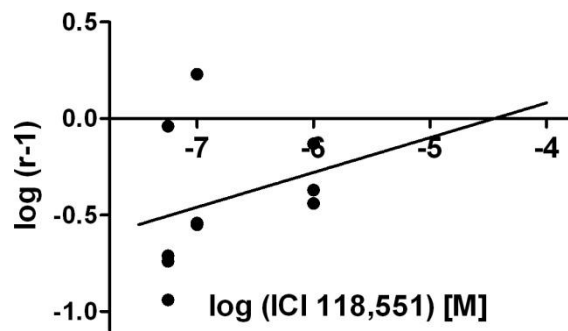


Abbildung 46: Schild-Plot Terbutalin - ICI 118,551

Graphisch ermittelter pA_2 -Wert für ICI 118,551 in der Terbutalin DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 0,1802; $pA_2 = 4,452$.

3.3.8. Schild-Plot Terbutalin - Phentolamin

Für die Anfertigung dieses Schild-Plots wurden die Gefäße vor der Terbutalin DWK mit unterschiedlichen Konzentrationen des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin inkubiert [10^{-7} M; 3×10^{-7} M, 10^{-6} M]. Dabei war zu berücksichtigen, dass die Phentolamin-Konzentrationen derart gewählt werden mussten, sodass die Pulmonalarterien gerade noch mit der standardmäßigen Phenylephrin-Konzentration kontrahieren konnten. Mit diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren mit unterschiedlichen Phentolamin-Konzentrationen einen Einfluss auf die Relaxation durch Terbutalin hat. Die Bestimmung des pA_2 -Wertes durch den Schild-Plot sollte die antagonistische Potenz für Phentolamin in der Terbutalin DWK genauer quantifizieren. In der graphischen Auswertung zeigte sich bei Phentolamin-Konzentrationen von 10^{-7} M und 3×10^{-7} M keine Inhibition der von Terbutalin induzierten Relaxation (*Abbildung 47*). Erst bei einer Phentolamin-Konzentration von 10^{-6} M konnte die Relaxation von Terbutalin deutlich blockiert werden. Problematisch an diesem Versuch war, dass die Gefäße, durch die Blockade der α_1 -Adrenozeptoren, mit steigenden Phentolamin-Konzentrationen in absoluten Werten nur sehr gering kontrahierten. Im ANOVA-Test ergab sich bei Vergleich der einzelnen DWK miteinander kein signifikanter Unterschied. Aus den pEC_{50} -Werten der einzelnen DWK wurde der Schild-Plot bestimmt (*Abbildung 48*). Im Schild-Plot wurde ein graphischer pA_2 -Wert von 6,93 bestimmt, der rechnerische lag bei 7,56. Dieser pA_2 -Wert ist höher als der für ICI 118,551 in der Terbutalin DWK, dies weist

darauf hin, dass es sich bei Phentolamin um einen stärkeren Antagonisten für Terbutalin handelt als bei ICI 118,551.

DWK	PA			p
	pEC ₅₀	SEM	n	
Terbutalin	4,392	0,07379	5	
Terbutalin + Phentolamin 10 ⁻⁷ M	4,379	0,11330	3	>0,05
Terbutalin + Phentolamin 3x10 ⁻⁷ M	4,355	0,15370	3	>0,05
Terbutalin + Phentolamin 10 ⁻⁶ M	3,270	6,46100	4	>0,05

Tabelle 21: pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK +Phentolamin

Verglichen wurden die pEC₅₀-Werte der Terbutalin DWK der PA mit den pEC₅₀-Werten der Terbutalin DWK bei denen die Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen Phentolamin inkubiert wurden.

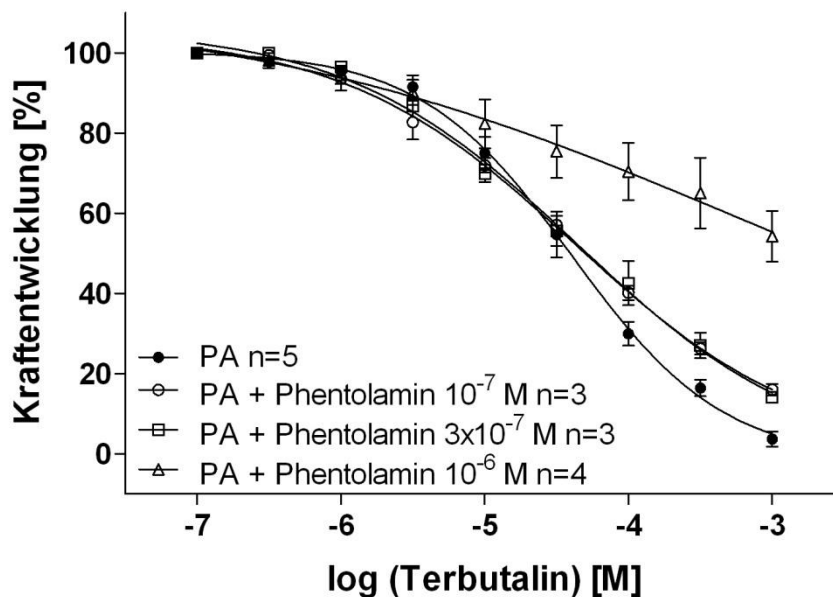


Abbildung 47: Terbutalin DWK + Phentolamin

Dargestellt ist die Terbutalin DWK ohne und mit verschiedenen Konzentrationen des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin [10⁻⁷ M; 3x10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M]. Bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M Phentolamin konnte die Relaxation durch Terbutalin am deutlichsten inhibiert werden. Bei der Verwendung niedrigerer Phentolamin-Konzentrationen wurde die Relaxation nicht blockiert.

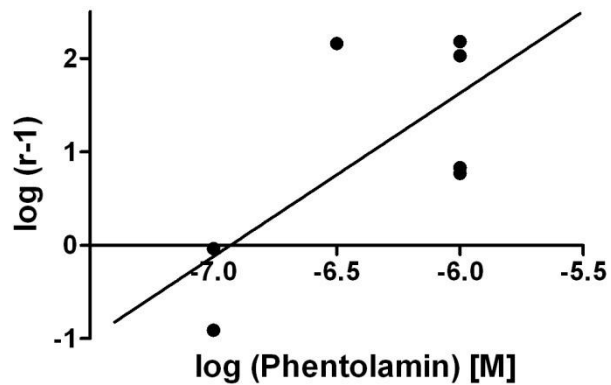


Abbildung 48: Schild-Plot Terbutalin - Phentolamin

Graphisch ermittelter pA_2 -Wert für Phentolamin in der Terbutalin DWK. Jeder Punkt repräsentiert ein eigenes Experiment. Steigung der Regressionsgeraden = 1,751; $pA_2 = 6,93$.

Agonist – Antagonist	pA_2 -Wert (graphisch)	pA_2 -Wert (rechnerisch)
Phenylephrin - Phentolamin	7,026	7,80
Serotonin - Phentolamin	7,405	7,78
Endothelin - Phentolamin	5,731	6,03
U 46619 - Phentolamin	5,076	5,12
Phenylephrin - Terbutalin	6,327	6,12
Phenylephrin - U 46619	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
Terbutalin - ICI 118,551	4,452	6,23
Terbutalin - Phentolamin	6,930	7,56

Tabelle 22: Übersicht pA_2 -Werte

4. Diskussion

4.1. Allgemeines zur Therapie der pulmonalen Hypertonie

Obwohl sich die Therapiemöglichkeiten der PH in den letzten Jahren verbessert haben, ist man von einer Heilung der Erkrankung noch weit entfernt. Für die Behandlung stehen verschiedene Substanzklassen mit unterschiedlichen Ansatzpunkten zur Verfügung (Chin und Rubin, 2008). Oft wird der Behandlungserfolg durch eine unkomfortable Anwendung und der daraus resultierenden mangelnden Compliance, sowie durch das nicht zu vernachlässigende Nebenwirkungsprofil einzelner Medikamente eingeschränkt.

Zu den Nebenwirkungen der Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten zählen systemische Hypotension, die Entstehung eines Lungenödems, Rechtsherzversagen bis hin zum Tod. Aus diesen Gründen ist von einer generellen Gabe der Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten bei allen Patienten abzusehen (Widlitz und Barst, 2003). Nur für Patienten, die sich bei der Testung der Lungengefäßreagibilität als Responder herausstellen, sind Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten die Therapie der ersten Wahl (Yung et al., 2004). Die inhalative Therapie mit NO kommt vor allem bei akuten Exazerbationen oder zur Kurzzeittherapie in verschiedenen klinischen Situationen zum Einsatz (Breuer et al., 1995; Rosenzweig und Barst, 2005). Für die Langzeittherapie liegen jedoch nur unzureichende klinische Untersuchungen bezüglich der potenziellen Nebenwirkungen wie Methämoglobinbildung, sekundäre Lungenschädigung durch Peroxynitrit- und Nitrogendioxidbildung vor (Fineman und Zwass, 1995). Die Therapie mit dem Prostazyklin-Analogen Epoprostenol ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit (3-5 Minuten) nur über eine kontinuierliche zentralvenöse Infusion möglich (Haworth, 2008; Humbert et al., 2004b). Durch die zentralvenöse Gabe entstehen häufig katheterassoziierte Probleme, wie Infektionen oder Thrombosen des Katheters. Eine akute Unterbrechung der Applikation durch technische Gründe kann zu einer Verschlechterung oder zu einem Rebound der PH führen, die sogar tödlich enden kann. Zu dosisabhängigen Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Kieferschmerzen, Durchfall und Muskelschmerzen (De Wolf, 2009). Damit wird Epoprostenol nicht als First-Line Therapie eingesetzt, sondern nur bei Verschlechterung der klinischen Gesamtsituation unter oraler und inhalativer Therapie. Das inhalierbare Iloprost muss vom Patienten

zwischen 6-12 mal täglich inhaliert werden (Humbert et al., 2004b), da bei diesem stabileren Prostazyklin-Analogen die Halbwertszeit immer noch unter 2 Stunden liegt (Haworth, 2008). Die Therapie scheitert häufig an der Compliance der Patienten aufgrund der zeitaufwendigen Applikationsform. Weitere Nebenwirkungen können Husten und Symptome im Zusammenhang mit der systemischen Vasodilatation sein (Humbert et al., 2004b). Unter der Therapie mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten kommt es neben einer Erhöhung der Leberenzyme auch zu einer Interaktion mit anderen ebenfalls über die Cytochrom-P450-Isoenzyme CYP3A4 und CYP2C9 der Leber verstoffwechselten Medikamente (Humbert et al., 2004b; Raja und Dreyfus, 2008). Weitere Nebenwirkungen können Kopfschmerzen, Flush, Ödeme an den unteren Extremitäten und Anämien sein (De Wolf, 2009). Bosentan ist teratogen (Humbert et al., 2004b), sodass bei Frauen unter Therapie auf eine sichere Kontrazeption geachtet werden muss. Sildenafil aus der Substanzgruppe der PDE-Hemmer wird generell gut vertragen, wobei die häufigsten Nebenwirkungen Kopfschmerzen, Flush, gastrointestinale Symptome, Epistaxis (De Wolf, 2009) und Erektionen sind (Haworth, 2008). Problematisch und gefürchtet unter der Therapie mit Sildenafil sind die auftretenden systemischen Hypotensionen (Haworth, 2008; Stocker et al., 2003). Aufgrund dieser zum Teil nicht unerheblichen Nebenwirkungen und des fehlenden Langzeiterfolges in der Therapie der PAH ist die Entwicklung neuer pharmakologischer Ansatzpunkte und die Weiterentwicklung bestehender Therapiemodalitäten notwendig.

4.2. Terbutalin Dosis-Wirkungskurve

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des β_2 -Adrenozeptor-Agonisten Terbutalin auf den pulmonalen Kreislauf genauer zu untersuchen. Es wurde ein β_2 -Adrenozeptor-Agonist verwendet, da β -Adrenozeptoren in der Lunge weit verbreitet sind und der dominierende Subtyp der β_2 -Adrenozeptor ist (Johnson, 1998). Desweiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass β_2 -Adrenozeptoren in den Pulmonalarterien eine bedeutende Rolle für die Vasorelaxation spielen können (Pourageaud et al., 2005). Terbutalin besitzt eine Halbwertszeit von 3-4 Stunden (Lemmer und Brune, 2006) und wird bislang zur bronchodilatorischen Therapie des Asthma bronchiale und der COPD eingesetzt, sodass die Nebenwirkungen dieses Medikamentes bereits gut untersucht und verstanden sind (Broadley, 2006).

In der PA kam es nach submaximaler Kontraktion mit Phenylephrin unter kumulativer Terbutalin Zugabe bei einer Terbutalin Konzentration von 10^{-3} M zu einer stark ausgeprägten Relaxation des Gefäßes um fast 100 %. Auf die Aorta hingegen wirkte Terbutalin kaum, bis zu einer Konzentration von 3×10^{-5} M fand keine Relaxation statt, unter der höchsten Terbutalin Konzentration [10^{-3} M] relaxierte die Aorta insgesamt nur um ca. 35 %. Diese Versuche zeigten bereits, dass Terbutalin relativ spezifisch auf die pulmonalen Gefäße wirkte und die systemischen Gefäße nahezu unbeeinflusst lies.

In der Literatur wurde gezeigt, dass β -adrenerge Vasorelaxation über verschiedene endotheliale Mediatoren vermittelt werden kann (Ferro et al., 2004; Priest et al., 1997; Trochu et al., 1999). Daher wurde für die Untersuchung des Terbutalin-Signalweges die Bildung von Prostaglandinen und NO inhibiert und in weiteren Versuchen das Endothel komplett entfernt. Die Inhibition der COX-1 für die Prostaglandin-Synthese und der eNOS für die NO-Bildung führte zu keinem signifikanten Unterschied in der pulmonalen Gefäßrelaxation durch Terbutalin, der Signalweg von Terbutalin ist endothelunabhängig. Da Liganden von β -Adrenozeptoren ihre Wirkung auch über das G_i -Protein vermitteln können (Wenzel et al., 2009), wurden die Gefäße mit PTX inkubiert. Aber auch die Inhibition des G_i -Proteins konnte die Terbutalin DWK nicht signifikant beeinflussen.

Für die Untersuchung des cAMP-Signalweges wurde das cAMP-Analogon Rp-8-CPT-cAMPS und der Adenylatzyklase-Inhibitor SQ 22,536 verwendet. Die Terbutalin DWK wurde nicht signifikant verändert. Bei den verwendeten Substanzen für die Untersuchung des cAMP-Signalweges handelt es sich zwar um membranpermeable Substanzen, jedoch war nicht sicher festzustellen, ob während der bereits vervierfachen bzw. verdoppelten Inkubationszeit eine vollständige Permeation stattgefunden hat. Für die Bestimmung einer geeigneten und wirksamen Konzentration des cAMP-Analogon Rp-8-CPT-cAMPS wurden im Vorfeld Versuche (Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Hierbei wurden die Gefäße mit Phenylephrin submaximal kontrahiert und alle acht Minuten eine steigende Dosis Rp-8-CPT-cAMPS hinzugegeben [3 μ M bis 300 μ M]. Bei 300 μ M Rp-8-CPT-cAMPS relaxierten die Gefäße leicht. Die nächst kleinere Konzentration Rp-8-CPT-cAMPS [100 μ M] wurde als geeignete Konzentration für die Gefäße angesehen. Es muss bei diesen Versuchen berücksichtigt werden, dass eine mögliche Fehlerquelle in der nicht vollständigen Membranpermeabilität liegt. Da aber sowohl das cAMP-Analogon und der Adenylatzyklase-Inhibitor zu keinem signifikanten

Effekt führten, ist davon auszugehen, dass der Signalweg von Terbutalin in der PA cAMP unabhängig ist.

4.2.1. Einfluss der β -Adrenozeptoren im Terbutalin-Signalweg

Da es sich bei Terbutalin um einen β_2 -Adrenozeptor-Agonist handelt, wurden für die Untersuchung des Signalweges die einzelnen β -Adrenozeptoren selektiv blockiert. Für die Blockade der β_2 -Adrenozeptoren wurde ICI 118,551 und für die Blockade der β_1 -Adrenozeptoren CGP 20712A verwendet. Überraschenderweise führten weder der β_2 -Antagonist noch der β_1 -Antagonist zu einem signifikanten Unterschied in der Terbutalin DWK.

4.2.1.1. Der β_3 -Rezeptor-Antagonist SR 59230A

Nachdem weder ICI 118,551 noch CGP 20712A als β_1 -Adrenozeptor-Antagonist die Relaxation durch Terbutalin inhibieren konnten, wurde der Einfluss der β_3 -Adrenozeptoren untersucht, denn Terbutalin kann in geringem Ausmaß neben dem β_2 -Adrenozeptor auch andere β -Adrenozeptor-Subtypen (β_1 -, β_3 -Adrenozeptoren) aktivieren (Baker, 2005; Hoffmann et al., 2004). Hierfür wurde SR 59230A als selektiver β_3 -Adrenozeptor-Antagonist verwendet (Manara et al., 1996). Die Gefäße wurden vor der submaximalen Kontraktion mit Phenylephrin für fünf Minuten mit dem β_3 -Adrenozeptor-Antagonist inkubiert. Problematisch daran war, dass die Pulmonalarterien bei einer Konzentration von 10^{-5} M SR 59230A unter Phenylephrin nicht mehr ausreichend kontrahieren konnten, um die Terbutalin DWK durchführen zu können. Daher wurde die Phenylephrin-Konzentration in der PA für diese Versuche auf 2×10^{-7} M verdoppelt. Daraufhin konnte die Relaxation durch Terbutalin in der PA durch den β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten nahezu vollständig inhibiert werden.

Es wurden weitere Versuche mit einer niedrigeren SR 59230A Konzentration [10^{-6} M] durchgeführt, bei der in den Pulmonalarterien mit der standardmäßig verwendeten Phenylephrinmenge [10^{-7} M] gerade noch eine ausreichende Kontraktion für die Durchführung der Terbutalin DWK erzielt werden konnte. Auch bei diesen Versuchen konnte die Relaxation von Terbutalin signifikant abgeschwächt werden, jedoch geringer als mit SR 59230A 10^{-5} M. Die stärkere Inhibition, die bei Verwendung der höheren Konzentration des β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten auffiel, könnte auf die vermehrte

Menge Phenylephrin, die zur Kontraktion verwendet wurde, zurückzuführen sein oder auf die Blockade von β_3 - oder α -Adrenozeptoren durch SR 59230A.

In einer Studie von Brahmadevara et al. 2003 kam es ebenfalls unter SR 59230A Konzentrationen, die größer als 1 μM waren zu einer Verringerung der Phenylephrin induzierten Kontraktion, die Kontraktion von Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) blieb durch SR 59230A jedoch unbeeinflusst. Das weist auf einen möglichen Einfluss von SR 59230A auf den α -Adrenozeptor Signalweg hin (Brahmadevara et al., 2003). Die Verwendung von Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ SR 59230A führte auch zu einer Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK und einer deutlich abgeschwächten maximalen Phenylephrin Antwort (Leblais et al., 2004). Die antagonistische Potenz von SR 59230A für Phenylephrin wurde mit Hilfe eines Schild-Plots genauer quantifiziert. Der pA_2 -Wert beträgt 7,08 (Leblais et al., 2005). Nach diesen Studien und den Ergebnissen unserer Versuche weist SR 59230A einen antagonistischen Effekt am α_1 -Adrenozeptor auf.

4.2.1.2. Der β_3 -Rezeptor-Antagonist Cyanopindolol

Für die weitere Untersuchung des Einflusses der β_3 -Adrenozeptoren auf die Terbutalin DWK wurde Cyanopindolol verwendet. Hierbei handelt es sich neben einem β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten, zusätzlich um einen $5\text{-HT}_{1A/1B}$ -Serotonin-Rezeptor-Antagonist (Grignaschi et al., 1995) und einen Partial-Agonisten für β -Adrenozeptoren (Kaumann, 1989). Dieser führt zu einer Aktivierung von atypischen β -Rezeptoren in Konzentrationen, die viel höher sind, als die, die benötigt werden um β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren zu blockieren (Engel et al., 1981). Obwohl Cyanopindolol ein Partial-Agonist ist, wurde es als relativ potenter β_3 -Rezeptor-Antagonist in Darmgewebe verwendet (MacDonald und Watt, 1999). Eine Konzentration von 1 μM Cyanopindolol hat sich auch in anderen Geweben für eine antagonistische Wirkung am β_3 -Adrenozeptor als geeignet erwiesen (Khan et al., 2005). In der Ratten Aorta kam Cyanopindolol in einer Konzentration von 1 μM als Antagonist zum Einsatz, allerdings kam es auch bei dieser Konzentration zu geringen agonistischen Wirkungen an atypischen β -Adrenozeptoren (Brawley et al., 2000).

Cyanopindolol wurde in der Terbutalin DWK zur Blockade der β_3 -Adrenozeptoren in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet [10^{-5} M und 10^{-6} M]. Die Inkubation der

Gefäße mit der hohen Konzentration Cyanopindolol [10^{-5} M] führte zu einer starken Blockade der durch Terbutalin induzierten Relaxation. Die niedrigere Konzentration von Cyanopindolol [10^{-6} M], wie sie auch von Brawley et al. 2000 in Ratten Aorten verwendet wurde, führte in der Terbutalin DWK zu keinem signifikanten Unterschied.

Sowohl SR 59230A als auch Cyanopindolol, die für die Blockade der β_3 -Adrenozeptoren verwendet wurden, wirken nicht spezifisch auf die β_3 -Adrenozeptoren. Eine Aussage bezüglich der Beteiligung dieser Rezeptoren am Terbutalin-Signalweg war daher nicht eindeutig möglich. Die Hemmung der Gefäßrelaxation durch Terbutalin nach Inkubation mit SR 59230A kann neben der Beteiligung durch β_3 -Adrenozeptoren auch durch die Blockade von α_1 -Adrenozeptoren zu Stande kommen. Die nach Inkubation mit Cyanopindolol beobachteten Effekte in der PA können auch durch die unspezifische Aktivierung oder Blockade von 5-HT_{1A/1B}-Serotonin-Rezeptoren oder anderen β -Adrenozeptoren zu Stande kommen.

4.2.2. Einfluss der Kalium-Kanäle im Terbutalin-Signalweg

Bei Vorkontraktion der Gefäße mit KCl war die Relaxation durch Terbutalin aufgehoben. Da KCl in der Zelle zu einer Depolarisation führt, ergab sich die Vermutung, dass Terbutalin durch eine Hyperpolarisation der Zellen über Kalium-Kanäle wirken könnte. Daher wurde die Beteiligung der Kalium-Kanäle am Terbutalin-Signalweg untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Terbutalin DWK, die mit BaCl₂ und CTx/Apamin inkubiert wurden. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung der K_{ir}- und K_{Ca}-Kanäle an der Relaxation durch Terbutalin hin. K_{Ca}-Kanäle sind neben den K_v-Kanälen die dominierenden Subtypen im pulmonalen Kreislauf (Bonnet und Archer, 2007). Die Inkubation mit dem K_v-Kanal-Blocker 4-AP führte zu keinem signifikanten Effekt in der PA. Überraschenderweise führte TEA in der Terbutalin DWK zu keinem signifikanten Unterschied. Dabei gilt TEA als unspezifischer Kalium-Kanal-Blocker, sodass man einen deutlicheren Effekt der Blockade erwartet hätte.

In der Literatur wurde TEA in einigen Versuchen als selektiver Antagonist zur Blockade von K_v-Kanälen angewendet (Mathie et al., 1998). Andere Quellen geben an, dass TEA auch an K_{Ca}-Kanälen (Quast und Cook, 1989), K_{ATP}-Kanälen und an Rezeptor-gekoppelten Kalium-Kanälen antagonistisch wirken kann (Watson und Girdlestone,

1995). In hohen Konzentrationen soll TEA vor allem den späten spannungsabhängigen Kalium-Kanal blockieren (Fagni et al., 1994).

Das Ergebnis nach Inkubation mit TEA in der Terbutalin DWK könnte darauf zurückzuführen sein, dass es in der verwendeten Konzentration zu einer vermehrten Blockade der K_v -Kanälen kam, die entsprechend unserer Experimente nicht an der Vasorelaxation durch Terbutalin beteiligt sind. Denn auch nach Inkubation mit dem spezifischeren K_v -Kanal-Blocker 4-AP konnte in der Terbutalin DWK kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.3. Wirkung von Terbutalin auf den α -Adrenozeptor

In den Versuchen mit dem β_3 -Adrenozeptor-Antagonisten SR 59230A konnte die Relaxation durch Terbutalin in der PA nahezu vollständig inhibiert werden. Die Ursache der Blockade kann entweder auf die antagonistische Wirkung von SR 59230A an den β_3 -Adrenozeptoren zurückzuführen sein oder aber auf die Blockade der α -Adrenozeptoren, die ebenfalls durch SR 59230A vermittelt wurde. Dann wäre die Relaxation von Terbutalin nicht von β_3 -Adrenozeptoren abhängig, sondern würde über α -adrenolytische Effekte ausgelöst.

Eine mögliche Beeinflussung von α -Rezeptoren oder über α -Adrenozeptoren vermittelte Signalwege durch β -Rezeptor-Agonisten wurde bereits von Brahmadevara et al. 2003 postuliert. Hier wurde zum einen gezeigt, dass SR 59230A einen möglichen Einfluss auf den α -Adrenozeptor haben kann. Zum anderen aber auch, dass CGP 12177 (β_1 - und β_2 -Rezeptor-Antagonist und Partial-Agonist am β_3 -Rezeptor) eine Relaxation in Ratten Aorten, die mit Phenylephrin vorkontrahiert waren, auslöste, die jedoch in Aorten, die mit $PGF_{2\alpha}$ vorkontrahiert wurden, ausblieb. Durch diese Studie wurde der Aspekt aufgebracht, dass die Wahl der Substanz für die Vorkontraktion für die Untersuchung von β -Adrenozeptor vermittelter Vasorelaxation eine bedeutende Rolle spielen kann, und, dass eine Interaktion von einigen β -Adrenozeptor-Liganden mit dem α -Adrenozeptor möglich ist (Brahmadevara et al., 2003). Leblais et al. kamen 2004 zu den gleichen Ergebnissen in Pulmonalarterien von Ratten. Auch hier wurde nochmals gezeigt, dass SR 59230A einen antagonistischen Effekt auf den α_1 -Adrenozeptor hat (Leblais et al., 2004). Kozłowska et al. zeigten 2005, dass Liganden von β_2 -Adrenozeptoren Gefäße bei Ratten (Mesenterialarterien) und Menschen

(Pulmonalarterien), die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden, im Wesentlichen über α_1 -adrenolytische Effekte relaxierten. Aufgrund der Ergebnisse von Brahmadevara et al. 2003 und Leblais et al. 2004 untersuchten sie die vasorelaxierende Potenz von β -Adrenozeptor-Agonisten in Gefäßen, die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden und im Weiteren die antagonistische Potenz dieser β -Adrenozeptor-Agonisten am α_1 -Adrenozeptor. Fenoterol und Salbutamol führten zu einer Blockade der α_1 -Adrenozeptoren in gleichen oder sogar geringeren Konzentrationen, die für vasodilatorische Effekte verwendet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte für die Untersuchung der β -Adrenozeptoren in Gefäßen die zur Vasokonstriktion verwendete Substanz mit großer Sorgfalt ausgewählt werden (Kozłowska et al., 2005).

4.3.1. Änderung der Vorkontraktion in der Terbutalin Dosis-Wirkungskurve

Bisher wurde als Standard für die submaximale Vorkontraktion Phenylephrin, ein α_1 -Rezeptor-Agonist, verwendet. Um den Einfluss des α_1 -Adrenozeptors im Terbutalin-Signalweg genauer zu untersuchen, wurde die Substanz zur Vorkontraktion variiert. Daher sollten weitere Substanzen zur Vorkontraktion getestet werden, die keine reinen α_1 -Adrenozeptor-Agonisten sind, um mögliche α_1 -adrenolytische Effekte auszuschalten. Nach submaximaler Kontraktion mit Serotonin kam es zu einer ähnlich stark ausgeprägten Relaxation durch Terbutalin, wie nach Phenylephrin Kontraktion. Nach Kontraktion mit Endothelin oder U 46619 war die Relaxation von Terbutalin nahezu komplett aufgehoben.

Die Arbeitsgruppe um Kozłowska konnte bei anderen β_2 -Rezeptor-Agonisten ähnliche Ergebnisse zeigen. In Mesenterialarterien der Ratten führte Fenoterol zu einer deutlichen Relaxation von Gefäßen, die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden. Bei Verwendung von Serotonin zur Vorkontraktion wurde die Relaxation um ~ 20 % abgeschwächt, bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ und U 44069, einem Thromboxan A_2 Analogon, hingegen war sie nahezu komplett aufgehoben (Kozłowska et al., 2003). Die Auswahl der Vorkontraktion spielt eine entscheidende Rolle und das Ausmaß der Relaxation kann in Abhängigkeit von der gewählten Substanz stark beeinflusst werden.

Auch wir konnten zeigen, dass das Ausmaß der durch Terbutalin hervorgerufenen Vasorelaxation in der PA stark von der für die Vorkontraktion gewählten Substanz abhängt.

4.3.2. Einfluss von Phentolamin auf Vorkontraktion und Relaxation

Der reversible α_1 -Adrenozeptor-Antagonist Phentolamin wurde verwendet, um zu untersuchen, ob die für die Vorkontraktion gewählte Substanz α_1 -Adrenozeptoren bei der Kontraktion aktiviert. Außerdem sollen durch Phentolamin die α_1 -Adrenozeptoren für die Relaxation durch Terbutalin blockiert sein und so untersucht werden, ob Terbutalin Pulmonalarterien tatsächlich über α_1 -adrenolytische Wirkungen relaxiert. Denn sollte Terbutalin über α_1 -adrenolytische Effekt vasorelaxierend auf die PA wirken, wäre nach Phentolamin Inkubation eine deutliche Abschwächung der Relaxation zu erwarten.

Bei Phenylephrin handelt es sich um einen α_1 -Adrenozeptor-Agonisten. Nach Inkubation des Gefäßes mit Phentolamin wurde die Relaxation von Terbutalin signifikant inhibiert. Dies zeigt, dass Terbutalin die Relaxation über α_1 -adrenolytische Wirkungen ausübt und nach Blockade der α_1 -Adrenozeptoren die PA nicht mehr relaxieren kann. Gleichzeitig war nach Phentolamin Inkubation das absolute Ausmaß der Phenylephrin Kontraktion deutlich abgeschwächt, das Kontraktionsniveau konnte über eine längere Dauer nicht konstant gehalten werden. Dieses Ergebnis war jedoch zu erwarten, da es sich bei Phentolamin um einen spezifischen Antagonisten für Phenylephrin handelt.

Wurde Serotonin zur Kontraktion verwendet und die Gefäße mit Phentolamin inkubiert, erzielte man ein ähnliches Ergebnis. Die Relaxation von Terbutalin wurde durch Phentolamin Inkubation deutlich inhibiert und die Serotonin Kontraktion wurde abgeschwächt. Die abgeschwächte Kontraktion nach Blockade der α_1 -Adrenozeptoren ist darauf zurückzuführen, dass Serotonin in der PA für die Kontraktion nicht nur Serotonin-Rezeptoren, sondern auch α_1 -Adrenozeptoren aktiviert.

In der PA der Ratte führten die α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Prazosin und Phentolamin zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Serotonin DWK, vereinbar mit einer Aktivierung der α_1 -Adrenozeptor durch Serotonin. Sowohl die Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren als auch von α_1 -Adrenozeptoren ist nach Shaw et al. 2000 Teil der kontraktile Antwort von Serotonin (Shaw et al., 2000). Bunazosin, ein weiterer selektiver α_1 -Rezeptor-Blocker, inhibierte ebenfalls partiell die von Serotonin induzierte Kontraktion in der Ratten PA, nicht jedoch in der AO. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Serotonin in der PA seine vasokonstriktischen Effekte nicht ausschließlich über 5-HT₂-Rezeptoren, wahrscheinlich auch über α_1 -Adrenozeptoren vermittelt (Ogawa et al., 1995). Allerdings konnte Prazosin in humanen Pulmonalarterien

die vasokonstriktorische Potenz von Serotonin nicht beeinflussen (Kozłowska et al., 2006).

In den DWK nach submaximaler Kontraktion mit Endothelin oder U 46619 hatte Phentolamin keinen Einfluss auf die Terbutalin DWK. Das Ausmaß der Kontraktion wurde durch Phentolamin nicht abgeschwächt und Terbutalin führte nicht zu einer Relaxation. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Substanzen bei der Kontraktion keine α_1 -Adrenozeptoren aktivieren, sodass Terbutalin mit seinen α_1 -adrenolytischen Wirkungen diese Pulmonalarterien nicht relaxieren kann und auch nach Blockade der α_1 -Adrenozeptoren kein Unterschied in der DWK erkennbar war.

4.4. Quantifizierung von antagonistischen Potenzen mittels Schild-Plot

Um die Beteiligung der α_1 -Adrenozeptoren an den Kontraktionen durch verschiedene Agonisten genauer zu quantifizieren, wurden Schild-Plots durchgeführt und die pA_2 -Werte für die Antagonisten bestimmt. Je höher der pA_2 -Wert ist, desto stärker ist die antagonistische Potenz des Antagonisten für den Agonisten ausgeprägt.

Dabei ergab sich bei der Verwendung von Phentolamin als Antagonist für Phenylephrin ein pA_2 -Wert von 7,026. Da es sich bei Phentolamin um einen spezifischen Antagonisten für α_1 -Agonisten Phenylephrin handelt, war ein entsprechend hoher pA_2 -Wert zu erwarten. Der pA_2 -Wert bedeutet, dass bei einer Phentolamin-Konzentration von $10^{-7,026}$ M die Phenylephrin-Konzentration verdoppelt werden muss, um denselben Effekt zu erreichen, wie in Abwesenheit des Antagonisten. Für Phentolamin als Antagonist für Phenylephrin existieren ähnliche pA_2 -Werte in der Raten Aorta mit einem pA_2 -Wert von 7,92 (Smith et al., 1987) und in der Kaninchen PA mit 7,48 (Starke et al., 1975). Der starke Antagonismus von Phentolamin war bereits in der graphischen Auswertung der Phenylephrin DWK ersichtlich. Hier führte die steigende Applikation des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten zu einer Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK, es waren immer höhere Dosen nötig um dieselbe maximale Kontraktion zu erreichen wie in Abwesenheit von Phentolamin.

Die Kontraktion von Serotonin wurde in der PA durch Phentolamin, wie bereits erwähnt, deutlich inhibiert. Dass Serotonin seine vasokonstriktorisches Effekte nicht

ausschließlich über 5-HT₂-Rezeptoren, sondern auch über α_1 -Adrenozeptoren vermitteln kann, wurde bereits beschrieben (Ogawa et al., 1995). Auch bei Durchführung der DWK für die Anfertigung des Schild-Plots fiel auf, dass es mit steigender Phentolamin-Konzentration zu einer Rechtsverschiebung der DWK kam, dies wurde zuvor ebenfalls von Shaw et al. 2000 in Ratten-Pulmonalarterien beschrieben (Shaw et al., 2000). Wie hoch die antagonistische Potenz von Phentolamin für Serotonin genau ist, zeigte sich im Schild-Plot mit einem pA₂-Wert von 7,405. Der pA₂-Wert ist ähnlich hoch wie für Phenylephrin und belegt, dass Serotonin in einem nicht unerheblichen Maße bei der Vasokonstriktion der PA die α_1 -Adrenozeptoren aktiviert. Dies bestärkt auch die Hypothese, dass Terbutalin in der PA über α_1 -adrenolytische Effekte vasorelaxierend wirkt. In anderen Studien ergab sich ebenfalls eine Beeinträchtigung der Kontraktion von Serotonin durch Phentolamin bzw. eine Rechtsverschiebung der DWK mit pA₂-Werten von 6,69 und 6,52 (Marin et al., 1981; Ribeiro et al., 1991). Die pA₂-Werte sind etwas geringer, als die von uns ermittelten, jedoch handelt es sich hierbei auch um Versuche an der Arteria uterina und an zerebralen Arterien, sodass dieser geringe Unterschied auf die verschiedenen Gewebstypen zurückzuführen sein kann.

Die pA₂-Werte für Phentolamin waren in der Endothelin DWK und U 46619 DWK entsprechend niedriger, 5,731 und 5,076. Die Endothelin DWK wurde mit steigender Phentolamin-Konzentration leicht nach rechts verschoben, was eine möglicherweise auf eine geringgradige Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren schließen lassen könnte. Jedoch wird berichtet, dass in Ratten Pulmonalarterien und -venen eine Phentolamin-Konzentration von 3 μ M nicht zu einer Beeinflussung der von Endothelin ausgelösten Kontraktion führte (Russell und Roberts, 1991). Die niedrige antagonistische Potenz von Phentolamin gegenüber der U 46619 DWK zeigte sich auch in der graphischen Auswertung der U 46619 DWK, hier führt die Applikation von steigenden Dosen Phentolamin zu keinerlei Beeinflussung der DWK. Dieses Ergebnis belegt, dass U 46619 in der PA nicht auf α_1 -Adrenozeptoren wirkt.

Verwendet man Terbutalin als Antagonist für Phenylephrin in einem Schild-Plot so findet man in der graphischen Auswertung eine Rechtsverschiebung der Phenylephrin DWK, als Hinweis auf eine antagonistische Potenz für Terbutalin an der Phenylephrin DWK. Es ergibt sich für Terbutalin ein pA₂-Wert von 6,327. Dies lässt zu dem Schluss

kommen, dass Terbutalin α_1 -adrenolytische Wirkungen besitzt, die die Relaxation in Pulmonalarterien nach Vorkontraktion mit Phenylephrin oder Serotonin vermitteln. Dies erklärt im Nachhinein auch, warum die Pulmonalarterien nach Vorkontraktion mit KCl nicht mehr relaxiert haben.

Um auch den Einfluss des β_2 -Adrenozeptors im Signalweg von Terbutalin weiter zu untersuchen, wurde ein Schild-Plot mit ICI 118,551 als Antagonist in der Terbutalin DWK durchgeführt. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die Effekte von Terbutalin, die über β_2 -Adrenozeptoren vermittelt werden eine Rolle für die Vasorelaxation der PA spielen. Mit steigender ICI 118,551-Konzentration wurde die Terbutalin DWK nicht beeinflusst, eine Rechtsverschiebung blieb aus, der pA_2 -Wert lag graphisch bei 4,452, rechnerisch hingegen bei 6,23. Aus der graphischen Auswertung lässt sich schließen, dass ICI 118,551 keinen antagonistischen Effekt auf die Terbutalin DWK hat. Von daher war ein relativ niedriger pA_2 -Wert zu erwarten. Der große Unterschied zwischen dem graphisch bestimmten und dem rechnerisch ermittelten ist unter Umständen auf die geringe Steigung der Regressionsgeraden im Schild-Plot (0,1802) und die große Streuung der einzelnen Werte zurückzuführen, sodass der pA_2 -Wert wahrscheinlich zwischen dem graphisch und rechnerisch bestimmten liegen wird. Für die Steigung der Regressionsgeraden gilt, dass wenn diese 1 ist, dies als ein Hinweis auf das Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus angesehen werden kann. In unserem Schild-Plot zeigen die einzelnen Punkte jedoch keinen linearen Verlauf, sodass nicht mehr von einem rein kompetitiven Antagonismus gesprochen werden kann. Wenn die Funktion zwei oder mehrere lineare Abschnitte aufweist, so deutet dies auf eine Konkurrenz zwischen Agonist und Antagonist um zwei oder mehrere Bindungsstellen am Rezeptor hin. Gleichzeitig kann eine Steigung < 1 auch auf eine Inaktivierung oder einen Uptake des eingesetzten Antagonisten oder Agonisten zurückgeführt werden (Kenakin, 1993; Schild, 1997).

Bei Durchführung des Schild-Plots Terbutalin - Phentolamin ergab sich für den Antagonisten Phentolamin ein pA_2 -Wert von 6,93. Dieser liegt in einem ähnlichen Bereich wie der pA_2 -Wert für Phentolamin in der Phenylephrin DWK. Phentolamin besitzt somit einen ähnlich stark ausgeprägten Antagonismus für Terbutalin wie für Phenylephrin. Zu berücksichtigen ist, dass bei der Durchführung dieses Schild-Plots die Phentolamin-Konzentrationen so gewählt werden mussten, dass die Gefäße unter

Phenylephrin noch ausreichend vorkontrahieren konnten für die Terbutalin DWK. Sind die α_1 -Adrenozeptoren durch Phentolamin 10^{-6} M blockiert worden, konnte Terbutalin die PA nicht mehr durch seine α_1 -adrenolytischen Effekte relaxieren.

4.5. Terbutalin als neuer Therapieansatz der PAH

Terbutalin relaxierte selektiv in murinen Gefäßen den pulmonalen Kreislauf, der systemische blieb nahezu unbeeinflusst. Damit hätte Terbutalin eine wichtige Eigenschaft, die von Vorteil in der Therapie der PAH wäre. Die bei anderen Medikamenten, wie Sildenafil, gefürchteten systemischen Hypotensionen (Haworth, 2008; Stocker et al., 2003) könnten vermindert werden.

Da die PAH oft mit einer endothelialen Dysfunktion in den Pulmonalarterien vergesellschaftet ist (Humbert et al., 2004a), ist die Möglichkeit einer endothelunabhängigen Relaxierung durch Terbutalin ein pharmakologisch interessantes Ziel, um den pulmonalen Widerstand in dieser pathologischen Situation gezielt zu senken.

Die Relaxation von Terbutalin in der PA wurde nicht über β -adrenerge Wirkungen sondern über α_1 -adrenolytische Effekte vermittelt und war somit abhängig von der Vorkontraktion der Gefäße.

Erhöhte Plasmalevel von Noradrenalin und anderen Katecholaminen konnten bei Patienten mit PH und kongenitalen Herzfehlern (Knirsch et al., 2002), sowie bei Patienten mit PAH nachgewiesen werden (Nagaya et al., 2000; Nootens et al., 1995). Es wurde ebenfalls eine vermehrte Aktivität des sympathischen Nervensystems bei Patienten mit PAH festgestellt (Velez-Roa et al., 2004). Auch Serotonin spielt neben den Katecholaminen eine wichtige Rolle als Vasokonstriktor im vaskulären System (Barnes und Liu, 1995; MacLean et al., 2000). Wie in den Versuchen gezeigt werden konnte, führte Serotonin in den Pulmonalarterie nicht nur über 5-HT-Serotonin-Rezeptoren zu einer Kontraktion, sondern auch über α_1 -Adrenozeptoren. Da die Vasokonstriktion der PA im Rahmen der PH in somit hohem Maße durch eine Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren zu Stande kommt, ist der α_1 -Adrenozeptor ein geeignetes therapeutisches Ziel. Reine α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten kamen bereits bei der Therapie der PH zum Einsatz, haben sich jedoch als ineffektiv erwiesen, da sie zum einen nur eine kurze Halbwertszeit aufwiesen und gleichzeitig zu diversen

Nebenwirkungen, wie z.B. Übelkeit, Hypoxämie, Flush und fehlendem Langzeiterfolg führten (Alpert et al., 1994). Der Vorteil von Terbutalin ist seine weitestgehend selektive pulmonale Vasodilatation über α_1 -Adrenozeptoren im therapeutischen Dosisbereich.

Im Gegensatz zu anderen neuen Medikamenten in der Therapie der PH sind die Nebenwirkungen von Terbutalin durch den Einsatz in der Therapie des Asthma bronchiale und der COPD weitestgehend bekannt. So könnte man sich z.B. auf die gefürchtete Hypokaliämie (Broadley, 2006) vorbereiten und gezielt darauf reagieren. In welcher Applikationsform Terbutalin am besten wirkt, bleibt noch offen, jedoch würde die inhalative Verabreichung eine komfortable Möglichkeit für die Patienten darstellen. Würden sich für länger wirksame β_2 -Sympathomimetika die gleichen Effekte nachweisen lassen, wäre auch das Problem der häufigen Inhalationstherapie gelöst.

In einigen Studien wurde bereits der Einfluss von Terbutalin auf die pulmonale Zirkulation untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die i.v. Gabe von Terbutalin zu einer Abnahme des pulmonalvaskulären Widerstandes führt und neben einer Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion erhöht und das rechtsventrikuläre enddiastolische Volumen reduziert (Eliassen et al., 1991). Bei Patienten mit schwerer Atemwegobstruktion und PH kam es nach i.v. Applikation von Terbutalin, im Rahmen eines Rechtsherzkatheters, zu einer Verbesserung der alveolären Ventilation, des pulmonalarteriellen Druckes und des Cardiac Index (Jones et al., 1982).

Die Applikation von Terbutalin könnte sich zwar positiv auf den pulmonalen Widerstand auswirken, jedoch wird das Remodelling, das im Rahmen der PH in den Pulmonalarterien entsteht durch Terbutalin wahrscheinlich nicht beeinflusst. Um dies positiv zu beeinflussen, müsste Terbutalin eventuell mit weiteren Medikamenten kombiniert werden. Die frühzeitige Kombinationstherapie ist jedoch sowieso ein Trend, der sich in der Behandlung der PH abzeichnet. So können synergistische Effekte auf das Krankheitsbild ausgenutzt werden. Limitierend kommen hier jedoch die hohen Kosten der einzelnen medikamentösen Therapien und die Interaktion in der hepatischen Elimination zum Tragen. Auch hier würde sich Terbutalin durch seine geringen Therapiekosten positiv von den bisherigen Therapien abheben.

5. Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie ist eine seltene, jedoch schwer verlaufende Erkrankung, die sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter auftreten kann. Im Rahmen dieser Erkrankung kommt es zu erhöhten Druckverhältnissen in den Pulmonalarterien (PA). Die Therapiemöglichkeiten haben in den letzten Jahren deutliche Fortschritte gemacht, von einer Heilung ist man jedoch noch weit entfernt. Neben dem zum Teil nicht unerheblichen Nebenwirkungsprofil einzelner Medikamente führt die häufig auftretende gleichzeitige Reduktion des systemarteriellen Gefäßwiderstands trotz erfolgreicher Vasodilatation im pulmonalarteriellen System zu einer Verschlechterung des Cardiac Index. Der Schwerpunkt dieser Arbeit soll auf der Untersuchung von Unterschieden in der pharmakologischen Wirkung von Terbutalin auf das pulmonal- und systemarterielle Gefäßsystem im Mausmodell liegen. Die beteiligten Rezeptoren und intrazellulären Signalwege von Terbutalin im pulmonalarteriellen Gefäßsystem wurden durch die möglichst selektive Blockade einzelner Rezeptoren und Mediatoren untersucht. Zur Bestimmung der pharmakologischen Potenz der einzelnen Substanzen wurden Schild-Plot Analysen durchgeführt.

Die PA zeigte eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Terbutalin als die Aorta. Die Relaxation von Terbutalin in der PA nach Phenylephrin Kontraktion konnte nur durch SR 59230A, einem β_3 -Rezeptor-Antagonisten der auch α_1 -Adrenozeptoren blockiert, nahezu vollständig aufgehoben werden. Eine Blockade von β_1 - und β_2 -Rezeptoren beeinflusste die Terbutalin Dosis-Wirkungskurve (DWK) nicht. Wurde die Vorkontraktion variiert und Serotonin anstelle von Phenylephrin zur Vorkontraktion der Gefäße verwendet, war die Relaxation unter Terbutalin ähnlich stark ausgeprägt. Eine Vorkontraktion mit Endothelin oder U 46619 verhinderte die anschließende Relaxation durch Terbutalin. Die pharmakologische Vorkontraktion war für das Ansprechen der PA auf Terbutalin entscheidend. Mit Phentolamin, einem α_1 -Adrenozeptor-Antagonist, wurden im Weiteren die α_1 -Adrenozeptoren blockiert und die Gefäße mit den verschiedenen Substanzen vorkontrahiert, bevor die Terbutalin DWK durchgeführt wurde. Phentolamin führte bei Phenylephrin und Serotonin Vorkontraktion zu einer Reduktion der absoluten Kontraktion und einer anschließenden Blockade der Relaxation

unter Terbutalin. Das Ausmaß der Kontraktion von Endothelin oder U 46619 und die Terbutalin DWK wurden durch α_1 -Adrenozeptor-Blockade nicht beeinflusst. Mittels Schild-Plots wurde die α_1 -Adrenozeptor-Aktivierung der einzelnen Vasokonstriktoren durch den pA_2 -Wert genauer quantifiziert. Terbutalin vermittelt seine vasorelaxierenden Effekte in der PA nicht über β_2 -Adrenozeptoren, sondern, wie die Ergebnisse und auch der Schild-Plot Terbutalin mit Phentolamin zeigen, über α_1 -adrenolytische Effekte.

Da es bei Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie zu erhöhten Noradrenalin- und Katecholamin-Spiegeln im Rahmen der neurohumoralen Aktivierung kommt und scheinbar ein Teil der serotonergen Widerstandserhöhung über α -Adrenozeptoren vermittelt wird, stellt eine pulmonalselektive α_1 -adrenolytische Wirkung durch das eventuell sogar inhalativ zu verabreichende Terbutalin einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie dar.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Terbutalin.....	24
Abbildung 2: Präparation der Pulmonalarterien.....	30
Abbildung 3: Nachweis der Endothelentfernung	31
Abbildung 4: Myograph DMT 610M der Firma Danish Myo Technologies	32
Abbildung 5: Einspannen des Drahtes in den Myographen	32
Abbildung 6: Einspannen des Gefäßes in den Myographen	33
Abbildung 7: Vorspannen des Gefäßes	34
Abbildung 8: Bestimmung des IC ₉₀	35
Abbildung 9: Versuchsablauf Phenylephrin DWK	36
Abbildung 10: Versuchsablauf Terbutalin DWK	37
Abbildung 11: Phenylephrin DWK.....	41
Abbildung 12: Serotonin DWK.....	43
Abbildung 13: Endothelin DWK.....	43
Abbildung 14: U 46619 DWK	44
Abbildung 15: Terbutalin DWK.....	45
Abbildung 16: Einfluss der endothelialen Mediatoren im Terbutalin-Signalweg	46
Abbildung 17: Terbutalin DWK + Indomethazin + L-NAME	47
Abbildung 18: Terbutalin DWK endothelfrei	47
Abbildung 19: Terbutalin DWK + PTX.....	48
Abbildung 20: Terbutalin DWK + Rp-8-CPT-cAMPS.....	49
Abbildung 21: Terbutalin DWK + SQ 22,536.....	50
Abbildung 22: Einfluss der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren im Terbutalin-Signalweg.....	51
Abbildung 23: Terbutalin DWK + SR 59230A.....	52
Abbildung 24: Terbutalin DWK + Cyanopindolol	52
Abbildung 25: Terbutalin DWK mit KCl Vorkontraktion	54
Abbildung 26: Einfluss der Kalium-Kanäle im Terbutalin-Signalweg.....	55
Abbildung 27: Terbutalin DWK nach Vorkontraktion mit versch. Vasokonstriktoren	57

Abbildung 28: Versuchsablauf Terbutalin DWK + Phentolamin	59
Abbildung 29: Terbutalin DWK + Phentolamin	60
Abbildung 30: Versuchsablauf Terbutalin DWK mit Serotonin submax. + Phentolamin	61
Abbildung 31: Terbutalin DWK mit Serotonin submaximal + Phentolamin	61
Abbildung 32: Terbutalin DWK mit Endothelin submaximal + Phentolamin	62
Abbildung 33: Terbutalin DWK mit U 46619 submaximal + Phentolamin.....	63
Abbildung 34: Phenylephrin DWK + Phentolamin	64
Abbildung 35: Schild-Plot Phenylephrin - Phentolamin	65
Abbildung 36: Serotonin DWK + Phentolamin.....	66
Abbildung 37: Schild-Plot Serotonin - Phentolamin.....	67
Abbildung 38: Endothelin DWK + Phentolamin	68
Abbildung 39: Schild-Plot Endothelin - Phentolamin	69
Abbildung 40: U 46619 DWK + Phentolamin	70
Abbildung 41: Schild-Plot U 46619 - Phentolamin.....	71
Abbildung 42: Phenylephrin DWK + Terbutalin	72
Abbildung 43: Schild-Plot Phenylephrin - Terbutalin	73
Abbildung 44: Phenylephrin DWK + U 46619	74
Abbildung 45: Terbutalin DWK + ICI 118,551 (Schild-Plot).....	75
Abbildung 46: Schild-Plot Terbutalin - ICI 118,551.....	76
Abbildung 47: Terbutalin DWK + Phentolamin	77
Abbildung 48: Schild-Plot Terbutalin - Phentolamin	78

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der PH von 2003	11
Tabelle 2: Histopathologische Klassifikation der PH nach Heath und Edwards 1958 ...	14
Tabelle 3: Histopathologische Klassifikation der PH nach Rabinovitch 1978	14
Tabelle 4: Zusammensetzung PSS	28
Tabelle 5: Zusammensetzung low-Ca ²⁺ PSS	28
Tabelle 6: Zusammensetzung PBS	28
Tabelle 7: pEC ₅₀ -Werte der Standard DWK in PA und AO.....	44
Tabelle 8: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK in der PA I	48

Tabelle 9: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK in der PA II	50
Tabelle 10: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK in der PA III	53
Tabelle 11: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK in der PA IV	56
Tabelle 12: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK in der PA V	58
Tabelle 13: pEC ₅₀ -Werte der Phenylephrin DWK + Phentolamin	65
Tabelle 14: pEC ₅₀ -Werte der Serotonin DWK + Phentolamin	67
Tabelle 15: pEC ₅₀ -Werte der Endothelin DWK + Phentolamin	68
Tabelle 16: pEC ₅₀ -Werte der U 46619 DWK + Phentolamin	70
Tabelle 17: Übersicht pA ₂ -Werte für Phentolamin	71
Tabelle 18: pEC ₅₀ -Werte der Phenylephrin DWK + Terbutalin	72
Tabelle 19: pEC ₅₀ -Werte der Phenylephrin DWK + U 46619	74
Tabelle 20: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK + ICI 118,551	75
Tabelle 21: pEC ₅₀ -Werte der Terbutalin DWK + Phentolamin	77
Tabelle 22: Übersicht pA ₂ -Werte	78

7. Literaturverzeichnis

- Abenheim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N.Engl.J.Med.* 1996; 335: 609-616
- Alpert MA, Concannon MD, Mukerji B, Mukerji V. Pharmacotherapy of chronic pulmonary arterial hypertension: value and limitations. Part I: Primary pulmonary hypertension. *Angiology* 1994; 45: 667-676
- Baker JG. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br.J.Pharmacol.* 2005; 144: 317-322
- Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol.Rev.* 1995; 47: 87-131
- Barnett CF, Machado RF. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc.Health Risk Manag.* 2006; 2: 411-422
- Bonnet S, Archer SL. Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacol.Ther.* 2007; 115: 56-69
- Boucek MM, Aurora P, Edwards LB, Taylor DO, Trulock EP, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: tenth official pediatric heart transplantation report--2007. *J.Heart Lung Transplant.* 2007; 26: 796-807
- Braden GL, Germain MJ, Mulhern JG, Hafer JG, Bria WF. Hemodynamic, cardiac, and electrolyte effects of low-dose aerosolized terbutaline sulfate in asthmatic patients. *Chest* 1998; 114: 380-387
- Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A. Evidence against beta 3-adrenoceptors or low affinity state of beta 1-adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. *Br.J.Pharmacol.* 2003; 138: 99-106
- Brawley L, Shaw AM, MacDonald A. Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br.J.Pharmacol.* 2000; 129: 637-644

- Breuer J, Georgarakis A, Sieverding L, Baden W, Apitz J. Increased turnover of serotonin in children with pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Pediatr.Cardiol.* 1996; 17: 214-219
- Breuer J, von Brenndorff CI, Baden W, Sieverding L, Steil E, Haberle L, Fenchel G, Apitz J. Improvement of perioperative hemodynamics and gas exchange by inhalation of nitric oxide in children with congenital cardiopulmonary defects. *Z.Kardiol.* 1995; 84: 1009-1017
- Broadley KJ. Beta-adrenoceptor responses of the airways: for better or worse? *Eur.J.Pharmacol.* 2006; 533: 15-27
- Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc.Res.* 1997; 33: 196-200
- Chiang VW, Burns JP, Rifai N, Lipshultz SE, Adams MJ, Weiner DL. Cardiac toxicity of intravenous terbutaline for the treatment of severe asthma in children: a prospective assessment. *J.Pediatr.* 2000; 137: 73-77
- Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2008; 51: 1527-1538
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann.Intern.Med.* 1991; 115: 343-349
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390: 88-91
- Dawson CA. Role of pulmonary vasomotion in physiology of the lung. *Physiol Rev.* 1984; 64: 544-616
- De Wolf D. Clinical practice: pulmonary hypertension in children. *Eur.J.Pediatr.* 2009; 168: 515-522
- Dumas M, Dumas JP, Bardou M, Rochette L, Advenier C, Giudicelli JF. Influence of beta-adrenoceptor agonists on the pulmonary circulation. Effects of a beta3-adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Eur.J.Pharmacol.* 1998; 348: 223-228
- Egermayer P, Town GI, Peacock AJ. Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54: 161-168

- Eliassen K, Ringsted C, Munck O, Hjortso E, Heslet L. Pulmonary vasodilatation and augmentation of right ventricular function following terbutaline infusion in severe chronic pulmonary disease. *Clin.Physiol* 1991; 11: 231-243
- Engel G, Hoyer D, Berthold R, Wagner H. (+/-)[125Iodo] cyanopindolol, a new ligand for beta-adrenoceptors: identification and quantitation of subclasses of beta-adrenoceptors in guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1981; 317: 277-285
- Fagni L, Bossu JL, Bockaert J. Inhibitory effects of dihydropyridines on macroscopic K⁺ currents and on the large-conductance Ca(2⁺)-activated K⁺ channel in cultured cerebellar granule cells. *Pflugers Arch.* 1994; 429: 176-182
- Fanburg BL, Lee SL. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am.J.Physiol* 1997; 272: 795-806
- Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br.J.Pharmacol.* 2004; 143: 397-403
- Fineman JR, Zwass MS. Inhaled nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Acta Paediatr.Jpn.* 1995; 37: 425-430
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376
- Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* 2005; 353: 2148-2157
- Galie N, Manes A, Palazzini M, Negro L, Marinelli A, Gambetti S, Mariucci E, Dotti A, Branzi A, Picchio FM. Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. *Drugs* 2008; 68: 1049-1066
- Galie N, Manes A, Uguccioni L, Serafini F, De RM, Branzi A, Magnani B. Primary pulmonary hypertension: insights into pathogenesis from epidemiology. *Chest* 1998; 114: 184-194
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1995; 333: 214-221

- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1993; 328: 1732-1739
- Grignaschi G, Sironi F, Samanin R. The 5-HT_{1B} receptor mediates the effect of d-fenfluramine on eating caused by intra-hypothalamic injection of neuropeptide Y. *Eur.J.Pharmacol.* 1995; 274: 221-224
- Haworth SG. The management of pulmonary hypertension in children. *Arch.Dis.Child* 2008; 93: 620-625
- Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 1958; 18: 533-547
- Hoeper MM, Ghofrani HA, Grimminger F, Rosenkranz S. Dana Point: what is new in the treatment of pulmonary hypertension?. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2008; 133 Suppl 6: 191-195
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2004; 369: 151-159
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004a; 43: 13-24
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* 2004b; 351: 1425-1436
- Johnson M. The beta-adrenoceptor. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; 158: 146-153
- Johnson M, Butchers PR, Coleman RA, Nials AT, Strong P, Sumner MJ, Vardey CJ, Whelan CJ. The pharmacology of salmeterol. *Life Sci.* 1993; 52: 2131-2143
- Jones RM, Stockley RA, Bishop JM. Early effects of intravenous terbutaline on cardiopulmonary function in chronic obstructive bronchitis and pulmonary hypertension. *Thorax* 1982; 37: 746-750
- Kaumann AJ. Is there a third heart beta-adrenoceptor? *Trends Pharmacol.Sci.* 1989; 10: 316-320

- Kenakin T. Pharmacological analysis of drug-receptor interaction. New York: Raven Press, 1993
- Khan I, Omu AE, Fatinikun T, Chandrasekhar B, Kadavil EA, Oriowo MA. Evidence for the presence of beta-3-adrenoceptors mediating relaxation in the human oviduct. *Pharmacology* 2005; 74: 157-162
- Knapp J, Aleth S, Balzer F, Gergs U, Schmitz W, Neumann J. Comparison of contractile responses in isolated mouse aorta and pulmonary artery: Influence of strain and sex. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2006; 48: 820-826
- Knirsch W, Eiselt M, Nurnberg J, Haas NA, Berger F, Dahnert I, Uhlemann F, Lange PE. Pulmonary plasma catecholamine levels and pulmonary hypertension in congenital heart disease. *Z.Kardiol.* 2002; 91: 1035-1043
- Kozłowska H, Schlicker E, Kozłowski M, Baranowska M, Malinowska B. Potential involvement of a propranolol-insensitive atypical beta-adrenoceptor the vasodilator effect of cyanopindolol in the human pulmonary artery. *J.Physiol Pharmacol.* 2006; 57: 317-328
- Kozłowska H, Schlicker E, Kozłowski M, Siedlecka U, Laudanski J, Malinowska B. Ligands at beta2-, beta3-, and the low-affinity state of beta1-adrenoceptors block the alpha1-adrenoceptor-mediated constriction in human pulmonary and rat mesenteric arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2005; 46: 76-82
- Kozłowska H, Szymaska U, Schlicker E, Malinowska B. Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* 2003; 140: 3-12
- Leblais V, Pourageaud F, Ivorra MD, Guibert C, Marthan R, Muller B. Role of alpha-adrenergic receptors in the effect of the beta-adrenergic receptor ligands, CGP 12177, bupranolol, and SR 59230A, on the contraction of rat intrapulmonary artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004; 309: 137-145
- Leblais V, Pourageaud F, Ivorra MD, Marthan R, Muller B. Comparison of the alpha-adrenoceptor-mediated effects of beta3-adrenoceptor ligands in rat pulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2005; 371: 535-539
- Lemmer B, Brune K. *Das Lehrbuch der klinischen Pharmakologie.* Berlin: Springer, 2006
- MacDonald A, Watt K. Characterisation of the atypical beta-adrenoceptor in rabbit isolated jejunum using BRL 37344, cyanopindolol and SR 59230A. *J.Auton.Pharmacol.* 1999; 19: 91-95

- MacLean MR. Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now? *Int.J.Clin.Pract.Suppl* 2007; 27-31
- MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br.J.Pharmacol.* 2000; 131: 161-168
- Maiya S, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. Response to bosentan in children with pulmonary hypertension. *Heart* 2006; 92: 664-670
- Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, Giudice A, Guzzi U, Landi M, Le FG. Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 117: 435-442
- Mandegar M, Yuan JX. Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascul.Pharmacol.* 2002; 38: 25-33
- Marin J, Salaices M, Gomez B, Lluch S. Noradrenergic component in the vasoconstriction induced by 5-hydroxytryptamine in goat cerebral arteries. *J.Pharm.Pharmacol.* 1981; 33: 715-719
- Mathie A, Wooltorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen.Pharmacol.* 1998; 30: 13-24
- Matsushita M, Horinouchi T, Tanaka Y, Tsuru H, Koike K. Characterization of beta 3-adrenoceptor-mediated relaxation in rat abdominal aorta smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* 2003; 482: 235-244
- Matsushita M, Tanaka Y, Koike K. Studies on the mechanisms underlying beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta. *J.Smooth Muscle Res.* 2006; 42: 217-225
- McKenzie C, MacDonald A, Shaw A. Mechanisms of U46619-induced contraction of rat pulmonary arteries in the presence and absence of the endothelium. *Br.J.Pharmacol.* 2009; 157: 581-596
- Merkus D, de B, V, Houweling B, Duncker DJ. Control of pulmonary vascular tone during exercise in health and pulmonary hypertension. *Pharmacol.Ther.* 2008; 119: 242-263
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 11693-11697

- Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260: 617-619
- Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 102: 865-870
- Nootens M, Kaufmann E, Rector T, Toher C, Judd D, Francis GS, Rich S. Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1995; 26: 1581-1585
- Norel X, Walch L, Costantino M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E, Rossi F, Brink C. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 119: 149-157
- O'Donnell SR, Wanstall JC. Demonstration of both beta 1- and beta 2-adrenoceptors mediating relaxation of isolated ring preparations of rat pulmonary artery. *Br.J.Pharmacol.* 1981; 74: 547-552
- Ogawa Y, Takenaka T, Onodera S, Tobise K, Takeda A, Hirayama T, Morita K, Kikuchi K. Comparison of 5-hydroxytryptamine-induced contraction of rat pulmonary artery to that of aorta in vitro. *Jpn.Circ.J.* 1995; 59: 89-97
- Olschewski H. Dana Point: what is new in the diagnosis of pulmonary hypertension? *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2008; 133 Suppl 6: 180-182
- Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, nh-Xuan AT, Ridden C, Kealey T. Alpha-adrenoceptor stimulation of porcine pulmonary arteries. *Eur.J.Pharmacol.* 1993; 235: 169-175
- Pourageaud F, Leblais V, Bellance N, Marthan R, Muller B. Role of beta2-adrenoceptors (beta-AR), but not beta1-, beta3-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2005; 372: 14-23
- Priest RM, Hucks D, Ward JP. Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 122: 1375-1384
- Quast U, Cook NS. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol.Sci.* 1989; 10: 431-435

- Rabinovitch M, Haworth SG, Castaneda AR, Nadas AS, Reid LM. Lung biopsy in congenital heart disease: a morphometric approach to pulmonary vascular disease. *Circulation* 1978; 58: 1107-1122
- Raja SG, Dreyfus GD. Current status of bosentan for treatment of pulmonary hypertension. *Ann.Card Anaesth.* 2008; 11: 6-14
- Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br.J.Pharmacol.* 2002; 137: 153-161
- Rhodes CJ, Davidson A, Gibbs JS, Wharton J, Wilkins MR. Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol.Ther.* 2009; 121: 69-88
- Ribeiro CA, Macedo TR, Porfirio MH. Pharmacological characterization of the postsynaptic serotonergic receptor in the human uterine artery. *Pharmacology* 1991; 43: 264-272
- Rich S, Rubin L, Walker AM, Schneeweiss S, Abenheim L. Anorexigens and pulmonary hypertension in the United States: results from the surveillance of North American pulmonary hypertension. *Chest* 2000; 117: 870-874
- Rosenzweig EB, Barst RJ. Idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Curr.Opin.Pediatr.* 2005; 17: 372-380
- Rosenzweig EB, Ivy DD, Widlitz A, Doran A, Claussen LR, Yung D, Abman SH, Morganti A, Nguyen N, Barst RJ. Effects of long-term bosentan in children with pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2005; 46: 697-704
- Rothman RB, Ayestas MA, Dersch CM, Baumann MH. Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1999; 100: 869-875
- Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1997; 336: 111-117
- Rudner XL, Berkowitz DE, Booth JV, Funk BL, Cozart KL, D'Amico EB, El-Moalem H, Page SO, Richardson CD, Winters B, Marucci L, Schwinn DA. Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* 1999; 100: 2336-2343
- Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003; 361: 1533-1544
- Russell JA, Roberts JM. Functional antagonism in rabbit pulmonary veins contracted by endothelin. *Pulm.Pharmacol.* 1991; 4: 67-72

- Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ.Res.* 2004; 94: 1101-1108
- Schild HO. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. 1947. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 120: 29-46
- Shaw AM, Brown C, Irvine J, Bunton DC, MacDonald A. Role of the 5-HT(2A)receptor and alpha(1)-adrenoceptor in the contractile response of rat pulmonary artery to 5-HT in the presence and absence of nitric oxide. *Pulm.Pharmacol.Ther.* 2000; 13: 277-285
- Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004; 43: 5-12
- Smith JM, Jones SB, Bylund DB, Jones AW. Characterization of the alpha-1 adrenergic receptors in the thoracic aorta of control and aldosterone hypertensive rats: correlation of radioligand binding with potassium efflux and contraction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1987; 241: 882-890
- Starke K, Endo T, Taube HD. Relative pre- and postsynaptic potencies of alpha-adrenoceptor agonists in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1975; 291: 55-78
- Stocker C, Penny DJ, Brizard CP, Cochrane AD, Soto R, Shekerdemian LS. Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 1996-2003
- Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, Nagai A. Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998; 248: 722-727
- Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le MH, Berdeaux A, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br.J.Pharmacol.* 1999; 128: 69-76
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1999; 159: 1925-1932

- Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachery JL, Naeije R, van de BP. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation* 2004; 110: 1308-1312
- Waldeck B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur.J.Pharmacol.* 2002; 445: 1-12
- Watson S, Girdlestone D. 1995 Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol.Sci.* 1995; Suppl: 1-73
- Wenzel D, Knies R, Matthey M, Klein AM, Welschoff J, Stolle V, Sasse P, Roll W, Breuer J, Fleischmann BK. β_2 -adrenoceptor antagonist ICI 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G(i/o) protein/nitric oxide-coupled pathway. *Hypertension* 2009; 54: 157-163
- Wenzel D, Schmidt A, Reimann K, Hescheler J, Pfitzer G, Bloch W, Fleischmann BK. Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation. *Circ.Res.* 2006; 98: 1203-1211
- Widlitz A, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Eur.Respir.J.* 2003; 21: 155-176
- Yung D, Widlitz AC, Rosenzweig EB, Kerstein D, Maislin G, Barst RJ. Outcomes in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; 110: 660-665

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. J. Breuer für die Überlassung des Themas und die damit verbundene experimentelle Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. med. B.K. Fleischmann danke ich für die Aufnahme im Labor und dafür, dort unter optimalen Bedingungen arbeiten zu können.

Herrn Dr. med. R. Knies gilt mein Dank für seine freundliche und engagierte Betreuung dieser Dissertation. Vor allem für die geduldige, stundenlange Einarbeitung in die Präparationen zu Beginn meiner Versuche und die aufmunternden Worte.

Auch Frau Dr. med. D. Wenzel möchte ich für ihre Betreuung und stetige Hilfe vor Ort im Labor danken.

Herr Dr. med. R. Knies und Frau Dr. med. D. Wenzel haben meine Arbeit immer wieder mit konstruktiven Vorschlägen und Ideen vorangetrieben und standen mir mit ihren Erfahrungen zur Seite.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fleischmann gehört für die Unterstützung und die Zusammenarbeit mein Dank.

Besonders danken möchte ich allen, die mich während der Zeit der Doktorarbeit, vor allem in der Endphase, unterstützt und mich bei Zweifeln immer wieder bestärkt haben.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Oma danken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, mich in jeder Hinsicht unterstützt und in mich vertraut haben.