

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

2.1.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

Folgende Reagenzien wurden bestellt oder wurden in Form von Substanzspenden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

100-bp-DNA-Leiter (äquimolar), Agarose NEEO, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethidiumbromid und TAE-Puffer von Carl Roth, Deutschland; dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), M-MLV Reverse Transkriptase (einschließlich Puffer), Oligo-dT-Primer, *Random-Hexamers*, Taq-DNA-Polymerase (einschl. Puffer und MgCl₂) von Promega, USA; 5-Carboxamidotryptamin, 2'-Methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-(1,1'-biphenyl)-4-carbonsäure-[4-methoxy-3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]amid-hydrochlorid (GR 127935), Naratriptanhydrochlorid und Sumatriptansuccinat von GSK, Großbritannien; 5-Hydroxytryptamincreatininsulfat (5-HT) von Acros, Belgien; 5-Methoxytryptamin, Bradykinintriacetat, Brimonidin, 3-[4-(3-Chlorphenyl)piperazin-1-yl]-1,1-diphenyl-2-propanol-hydrochlorid (BRL 15572), α -Methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1*H*-indol-3-ethanamin-hydrochlorid (BW 723C86), Chloroethylclonidindihydrochlorid, Clozapin, Corticosteron, Idazoxanhydrochlorid, *N*^o-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME), Mepyraminhydrogenmaleat, Methiothepinmesylat, Pimozid, Prazosinhydrochlorid, (\pm)-Propranololhydrochlorid, *N*-(1-Methyl-1*H*-5-indolyl)-*N'*-(3-methyl-5-isothiazolyl)harnstoff (SB 204741), 5-Methyl-1-(3-pyridyl-carbamoyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,3-*f*]indol-hydrochlorid (SB 206553), 6-Chlor-5-methyl-1-{[2-(2-methyl-3-pyridyloxy)-5-pyridyl]carbamoyl}indolin-dihydrochlorid (SB 242084), (*R*)-3-{2-[2-(4-Methylpiperidin-1-yl)ethyl]pyrrolidin-1-sulfonyl}phenol-hydrochlorid (SB 269970) und Spiperonhydrochlorid von Sigma-Aldrich, Deutschland; 5-Methylurapidil und (\pm)-1,3,5-Trimethyl-6-[(3-{4-[(2,3-dihydro-2-hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-5-yl]-1-piperazinyl}propyl)amino]-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (B8805-033) von ALTANA, Deutschland; 8-Hydroxy-2-(dipropylamino)-tetralin-hydrobromid (8-OH-DPAT), α -Methyl-5-hydroxytryptaminmaleat, *N*-[5-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-2-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl]methansulfonamid-hydrobromid (A-61603), 8-{2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-8-azaspiro[4.5]decan-7,9-dion-dihydrochlorid (BMY 7378), Buspironhydrochlorid, 8-[2-(1,4-Benzodioxan-2-ylmethylamino)ethyl]-8-azaspiro[4.5]decan-7,9-dion-hydrochlorid (MDL 73005EF), *N*-[2-(2-Cyclopropylmethoxyphenoxy)-ethyl]-5-chlor- α,α -dimethyl-1*H*-indol-3-ethanaminhydrochlorid (RS-17053), *N*-{3-[3-(Dimethylamino)ethoxy]-4-methoxyphenyl}-2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-(1,1'-biphenyl)carboxamid-hydrochlorid (SB 216641) und 2-(2,3-Dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl-1,4-benzodioxan-hydrochlorid (WB 4101) von Tocris, Großbritannien; Almotriptanhydrogenmaleat von

Bayer, Deutschland; L-Ascorbinsäure, Cocainhydrochlorid und Noradrenalinhydrochlorid von Merck (Darmstadt), Deutschland; Dinoprosttrometamin (PGF_{2α}) von Upjohn, Deutschland; Eletriptanhydrobromid von Pfizer, Großbritannien; Frovatriptan von UCB, Belgien; Ketanserintartrat und Yohimbinhydrochlorid von Janssen, Belgien; 4-Amino-2-(4-{1-(benzyloxycarbonyl)-2-(S)-[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl}piperazinyl)-6,7-dimethoxychinazolin (L-765314) von Merck & Co., USA; 6-Methyl-1-(1-methylethyl)-ergolin-8β-carbonsäure-2-hydroxy-1-methylpropylester-maleat (LY 53857) von Eli Lilly, USA; Mesulerginhydrogenmaleat und Methysergidhydrogenmaleat von Novartis, Schweiz; Phenylephrin von Winthrop, Deutschland; Rizatriptanbenzoat von MSD, Irland; Tamsulosin von Prof. M.C. Michel, Universität Amsterdam, Niederlande, sowie Zolmitriptan von AstraZeneca, Großbritannien.

Die Ergoline α-Ergokryptin, Ergocristin, 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyldihydrolysergsäure, 1-Allylluol, 1-Allylergotamin, 1-Allyldihydroergotamin, 1-Allyllisurid, 1-Allyltergurid, 6'-Desoxo-α-ergokryptin, 6'-Desoxodihydro-α-ergokryptin, 6'-Desoxobromocriptin, 6'-Desoxoergocristin, 6'-Desoxodihydroergocristin und 6'-Desoxodihydroergotamin wurden freundlicherweise von Dr. M. Flieger, Akademie věd České republiky, Prag, Tschechien, zur Verfügung gestellt. Festuclavin, Lysergol und Ergotamin wurden an der Freien Universität Berlin synthetisiert. Dihydroergotamin wurde von Sigma-Aldrich, Deutschland, bezogen. Lisurid und Tergurid waren Substanzspenden der Firma NeuroBiotec, Deutschland.

Die Substanzen wurden in demineralisiertem Wasser zu 3, 10, 30 oder 100 mM gelöst (Stammlösung). Stabilitäts- oder löslichkeitsbedingt fanden abweichend davon folgende Lösungsmittel Verwendung: 50% Ethanol (Mesulergin, Methysergid, Prazosin, SB 242084 und Spiperon), 96% Ethanol (Brimonidin) oder DMSO (5-Methylurapidil, B8805-033, Corticosteron, L-765314, RS-17053, SB 204741, SB 206553 und Tamsulosin). Almotriptan, Clozapin und Zolmitriptan wurden unter Zusatz einer äquimolaren Menge HCl in demineralisiertem Wasser gelöst. Pimozid und alle im Kapitel 3.3. untersuchten Ergoline wurden unter Zusatz einer äquimolaren Menge HCl in 50% Ethanol gelöst. Eine weitere Verdünnung dieser Stammlösungen erfolgte mit demineralisiertem Wasser.

Zur Herstellung von Nähr- und Pufferlösungen (siehe Kapitel 2.1.1.3.) wurden folgende Salze verwendet: Calciumchloriddihydrat, D-Glucosemonohydrat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfatheptahydrat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphatdihydrat und Natriumhydrogenphosphat von Merck, Deutschland.

2.1.1.2. Kits

Für die Bestimmung der cAMP-Konzentration und für die quantitative Proteinbestimmung wurde ein Enzymimmunoassay-Kit („cyclic AMP EIA Kit“, BIOMOL, USA) bzw. der „DC Protein Assay“ Kit von BIO-RAD verwendet. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus dem Gewebe erfolgte unter Verwendung des „RNAgents® Isolation System“ von Promega, USA.

2.1.1.3. Nähr- und Pufferlösungen für Untersuchungen an isolierten Organen

Die in Tabelle 1 genannten Lösungen wurden für Untersuchungen an isolierten Organen genutzt (siehe auch Kapitel 2.3.1.1.). Diese wurden permanent mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigt und wiesen bei einer Temperatur von 37°C einen pH-Wert von ca. 7,4 auf.

Tab. 1. Verwendete Lösungen für Untersuchungen an isolierten Organen (Konzentration in mM).

	<i>modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung A)</i>	<i>modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung B)</i>	<i>modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung C)</i>	<i>Tyrode nach Eltze</i>
NaCl	118,07	118,07	118,07	130,00
KCl	4,70	4,70	4,70	2,00
NaHCO ₃	25,00	25,00	25,00	25,00
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0	0	0	0,42
KH ₂ PO ₄	1,20	1,20	1,20	0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,50	1,60	1,25	1,80
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,20	1,20	1,20	0,90
D-Glucose · H ₂ O	10,00	10,00	10,00	5,60

2.1.1.4. Oligonukleotide

Im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe Kapitel 2.3.3.3.) wurden die in Tabelle 2 genannten Oligonukleotide als Primer genutzt (TIB Molbiol, Deutschland):

Tab. 2. Verwendete spezifische Primer in der PCR.

<i>Gen</i>	<i>Sequenz (Sense- und Antisense-Primer)</i>	<i>Transkript</i>	<i>Literatur</i>
gpG6PDH	5'-GG(AGCT) GA(CT) (CT)T(AGCT) GC (AGCT) AA(AG) AA(AG) AA(AG) AT(ACT) TA(CT) GG(AGCT) AT(ACT) TGG TGG-3' 5'-ACC AT(AGCT) A(AG)(AG) TT(CT) TG (AGCT) ACC AT(CT) TC(CT) TT(AGCT) CC (AGCT) A(AG)(AG) TA(AG) TG(AG) TC-3'	ca. 520 bp ^a (ca. 160-680)	NP058702, NP032088 ^a
gp5-HT _{1B}	5'-GCC GCC ACC ATG GGG AAC CCT GAG TC-3' 5'-TGA CTC AGG TTG TGC ACT TAA A-3'	1170 bp (1-1170)	Pauwels <i>et al.</i> , 1998
gp5-HT _{1D}	5'-ATG TCC CCG CCA AAC CAG TC-3' 5'-CTA GGA GGC TTT CCG GAA ATG-3'	1134 bp (1-1134)	Bhalla <i>et al.</i> , 2000
gp5-HT _{1F}	5'-ATG GAT TTC TTA AAC TCT TCT G-3' 5'-GAA TGC TTT CTT GAA CTA CTT-3'	1075 bp (1-1075)	U80852, AF255663 ^b
pGAPDH	5'-GTC AAG GCT GAG AAT GGG AAG-3' 5'-GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG-3'	383 bp (513-895)	AF017079 ^b
p5-HT ₇	5'-GCA GTG GCG TTC TAC ATC CC-3' 5'-AGA GCT TCC GGT TGA TAT TCC-3'	499 bp (739-1237)	AF420595 ^b

^aDegenerierte Primer abgeleitet von der gemeinsamen Aminosäuresequenz der Proteine von Ratte und Maus (GenPept).

^bPrimer abgeleitet von der veröffentlichten Nukleotidsequenz (GenBank).

2.1.2. Apparative Ausstattung

Für die durchgeführten Experimente stand folgende apparative Ausrüstung zur Verfügung:

Dosierungstechnik: Kolbenhubpipetten „Gilson Pipetman[®] P“ mit unsterilen Einmalspitzen (Abimed, Deutschland) und sterilen, DNase-/RNase-freien Filterspitzen (Carl Roth, Deutschland); Dispenser-Pipette „HandyStep[®]“ mit Dispenser-Tips (Brand, Deutschland).

Organbadtechnik: Temperierbare, vertikale Einkammer-Glasbäder (20 ml) mit Überlauf, Diffusionssperre zum Zulauf und direkter Begasung über Organhalter für 1 bis 2 Organe je Bad (TSE, Deutschland) sowie Organhäkchen (L-förmige mit Durchmesser $d = 0,15$ mm und triangelförmige mit $d = 0,3$ mm aus Edelstahl, Eigenanfertigung) oder Organklammern (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) und Faden „Mersilene[®] EH 451“ (Ethicon, Deutschland) zur

Organfixierung, Kraftaufnehmer „TF6V5“ und Wegaufnehmer „TF6V5iso“ (Fleck, Deutschland), Verstärker „Transducer Coupler 4711“ (TSE, Deutschland) und Vierkanal- $x-t$ -Kompensationschreiber „Kompensograph C 1016“ (Siemens, Deutschland).

Mischen, Zerkleinern und Trennen: Ultraschallbad „Bandelin Sonorex TK52“, Reagenzglasschüttler „IKA LabDancer“ (Carl Roth, Deutschland), Tischzentrifuge „Mikro 20“ (Hettich, Deutschland) und Kugelmühle „Mikro-Dismembrator[®] U“ (B. Braun, Deutschland).

Molekularbiologie und Biochemie: Thermocycler „Stratagene[®] Robocycler[®] Gradient 40“ (Stratagene, Niederlande), Elektrophoresekammer „Midi 105 x 110 mm“ (C.B.S. Scientific, USA) mit Spannungsquelle bis 150 V (VWR, Deutschland). Die Nutzung des Geldokumentationssystems „Biometra[®] BioDocAnalyze[®]“, des UV-Vis-Photometers „Biometra[®] GeneRay[®]“ (Whatman Biometra, Deutschland) und eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes erfolgte mit freundlicher Genehmigung durch Priv. Doz. Dr. B. Kleuser (FU Berlin, Deutschland) und Priv. Doz. Dr. J. Stürzebecher (Universität Jena, Deutschland).

2.2. Tiere

Für die Versuche an isolierten Organen wurden männliche *Wistar*-Ratten, männliche *Dunkin-Harley*-Meerschweinchen sowie Schweine beider Geschlechts als Spendertiere verwendet.

Männliche *Wistar*-Ratten (*Rattus norvegicus*, 280 – 420 g) und männliche *Dunkin-Harley*-Meerschweinchen (*Cavia porcellus*, 250 – 450 g) wurden von der Versuchstieranlage des Bundesinstitutes für Risikobewertung (ehemals Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) und der Tierzucht Schönwalde GmbH erhalten. Die Tiere wurden getrennt nach *Species* in einem voll klimatisierten Tierstall bei 19 – 25°C und ca. 60% Luftfeuchte gehalten. Sie erhielten Trinkwasser und das Standardfutter Altromin[®] (Ratten) bzw. eine handelsübliche Nagetierfuttermischung (Meerschweinchen) nach Bedarf.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Nackenschlag (Meerschweinchen) oder durch Dekapitieren nach Betäubung mit CO₂ (Ratten). Nach dem Entbluten wurden die thorakale Aorta (*Aorta thoracalis*), Schwanzarterie (*A. caudalis*) und die Samenleiter (*Vasa deferentia*) der Ratte bzw. die Milz (*Splen*) und die Beckenschlagadern (*Aa. iliacae communes*) des Meerschweinchens entnommen.

Isolierte Organe (Herz, Lunge) von Schweinen (*Sus scrofa*) mit einem Gewicht von 100 – 120 kg (Schlachtschweine, Alter: ≥ 6 Monate) bzw. mit einem Gewicht von 20 – 45 kg (Absetzferkel und Läufer-schweine, Alter: 9 – 15 Wochen) wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow-

Ruhlsdorf sowie vom Institut für Tierernährung in Berlin-Dahlem bezogen. Die Organe wurden in eisgekühlter, mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigter *Krebs-Henseleit*-Lösung transportiert.

2.3. Methoden

2.3.1. Versuche an isolierten Organen

2.3.1.1. Allgemeine Durchführung

Die entnommenen Organe wurden in das verwendete Medium überführt, vom umliegenden Gewebe befreit und ggf. in kleinere Segmente unterteilt. Die so präparierten Organe wurden mittels Häkchen, Klammern oder Schlinge und Faden in 20-ml-Organbäder, die eine auf 37,0°C temperierte und mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigte Elektrolytlösung enthielten, eingebracht. Isometrische Änderungen der Kontraktionskraft oder isotonische Längenänderungen wurden mittels einer Apparatur, bestehend aus elektromechanischen Kraft- oder Wegaufnehmern (Transducer TF6V5 bzw. TF6V5iso), Verstärkern (Transducer Couplern TSE 4711) und Schreibern (Siemens C 1016 compensograph), nach einer initialen Äquilibrationsphase mit Medienwechseln (Spülzeit 3 min) und nach einer oder mehreren Vorstimulationen aufgezeichnet.

Je nach Versuchsdesign wurden 1 – 3 kumulative oder nichtkumulative $E/[A]$ -Kurven für einen Test- oder Referenzagonisten aufgenommen. Bei Verwendung der nichtkumulativen Technik wurde der Agonist jeweils nach Erreichen eines maximalen Effektes durch Spülung entfernt, bevor der Versuch mit der nächsthöheren Agonistenkonzentration fortgesetzt wurde. Bei Verwendung der kumulativen Technik wurde die Agonistenkonzentration nach Erreichen eines Plateau-effektes jeweils unmittelbar in halb-logarithmischen Schritten bis zur Erreichung des Maximal-effektes vergrößert. Nach Beendigung der kumulativen oder nichtkumulativen Zugabe eines Agonisten wurde dieser durch Spülung bis zur Erreichung des Basaleffektes entfernt (üblicherweise 5 – 15 min).

Zur Charakterisierung pharmakologischer Effekte von Antagonisten wurden diese während der Ruhephase vor der Zugabe des Test- oder Referenzagonisten inkubiert.

2.3.1.2. Rattensamenleiter (α_{1A} -Adrenozeptoren)

Die hier verwendete Methode zur Charakterisierung α_{1A} -Adrenozeptor-vermittelter Effekte ist eine Variante des von *Eltze* und *Boer* (1992) beschriebenen Verfahrens. Der Samenleiter der Ratte wird entnommen und vom umgebenden Gewebe befreit. Der prostatistische Teil des Samenleiters (1 – 2 cm Länge) wird mittels Schlinge und Faden vertikal im Organbad (*Tyrode*-Lösung nach *Eltze*) fixiert und mit einer Vorlast von 5 mN belegt (isotonische Registrierung). Die folgenden Experimente

wurden in Gegenwart von Cocain (10 μM) durchgeführt, um die neuronale Aufnahme von Noradrenalin zu unterdrücken. Nach einer initialen Stabilisierungsphase von 45 min mit einem Mediumwechsel nach 30 min erfolgte im Rhythmus von 40 min eine drei- bis viermalige Vorkontraktion der Organe mit jeweils 1 μM Noradrenalin bis zur Erreichung eines konstanten Effekts. Die Badflüssigkeit wurde nach jeder Stimulation ausgetauscht.

Nach einer 45-minütigen Ruhephase wurde eine nichtkumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin erstellt. Dazu wurden die Organe im Abstand von 10 min mit Noradrenalin in steigender Konzentration (0,1 – 100 μM) kontrahiert. Nach einer Spülung und einer weiteren mindestens 45-minütigen Ruhephase erfolgte die Aufnahme einer zweiten nichtkumulativen $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin (0,1 – 1000 μM) in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten. Die Antagonisten wurden 30 min (Ergoline: 60 min) vor der Aufnahme einer zweiten nichtkumulativen $E/[A]$ -Kurve äquilibriert und nach jedem Mediumwechsel erneut zugegeben.

Zwei aufeinander folgende $E/[A]$ -Kurven von Noradrenalin lieferten in Abwesenheit eines Antagonisten identische pEC_{50} - und E_{max} -Werte ($pEC_{50} = 5,21 \pm 0,20$ und $5,12 \pm 0,02$; $E_{\text{max}} = 96 \pm 4\%$ und $105 \pm 13\%$; $n = 4$). Kontrollexperimente lieferten einen validen pA_2 -Wert für 5-Methylurapidil an α_{1A} -Adrenozeptoren ($pA_2 = 8,52 \pm 0,22$; $n = 3$).

2.3.1.3. Rattenschwanzarterie (α_1 -Adrenozeptoren)

Allgemeine Durchführung: Die isolierte Rattenschwanzarterie wurde nach Entfernen des umgebenden Fettgewebes durch Einführen eines Drahtes aus rostfreien Stahl ($d = 0,3$ mm) in das Gefäßlumen vom Endothel befreit. Anschließend wurde sie in bis zu 20 Ringe von 3 – 5 mm Länge geteilt und auf L-förmigen Häkchen ($d = 0,15$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung A) enthielten, überführt. Ascorbinsäure (0,2 mM), Cocain (30 μM) und Corticosteron (30 μM) wurden zugesetzt, um den oxidativen Abbau, die neuronale Wiederaufnahme und die extraneuronale Aufnahme von Noradrenalin zu hemmen. Propranolol (1 μM), Idazoxan (0,1 μM) und Methysergid (1 μM) wurden zugesetzt, um β -Adrenozeptoren, α_2 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu blockieren. Zuvor konnte gezeigt werden, dass ein Zusatz dieser Antagonisten keinen Einfluss auf den Basaltonus und auf den durch α_1 -Adrenozeptoren vermittelten Effekt von Noradrenalin hat. Eine Ruhespannung von 7,5 mN wurde angelegt und die



Abb. 15. Querschnitt durch den Rattenschwanz (oben = ventral). Die Lage der Rattenschwanzarterie ist mit einem Pfeil markiert.

isometrischen Änderungen der Kontraktionskraft der Organe aufgezeichnet.

Während einer Stabilisierungsphase von 45 min mit einem Mediumwechsel nach 30 min wurde die Ruhespannung wiederholt auf 7,5 mN justiert. Es folgte eine Äquilibrationsperiode von 100 min, während der die Arteriensegmente dreimal submaximal mit 1 μM Noradrenalin und einmal maximal mit 100 μM Noradrenalin stimuliert wurden. Arteriensegmente mit mangelhafter Kontraktionskraft (< 2 mN) wurden verworfen. Nachfolgend wurden jeweils 2 – 3 kumulative $E/[A]$ -Kurven für Noradrenalin im Abstand von mindestens 60 min in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten aufgenommen.

Experimente nach α_{1A} -Adrenozeptorblockade: Die Arteriensegmente wurden wie oben genannt behandelt. Nachfolgend wurden jeweils 2 – 3 kumulative $E/[A]$ -Kurven für Noradrenalin (oder für einen Testagonisten) im Abstand von mindestens 60 min in Gegenwart des α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 (3 μM) und in An- oder Abwesenheit eines Testantagonisten aufgenommen. Die Inkubationszeit der Antagonisten betrug 30 min (Ergoline: 60 min).

In Experimenten mit Chloroethylclonidin wurde zunächst eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin (oder für einen Testagonisten) in Gegenwart von B8805-033 (3 μM) aufgenommen. Nach einem Mediumwechsel wurde der irreversible α_{1B} -Adrenozeptorantagonist Chloroethylclonidin (100 μM) für 30 min inkubiert. Eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin (oder für einen Testagonisten) konnte in Gegenwart von B8805-033 (3 μM) nach intensivem Waschen der Arteriensegmente (45 min diskontinuierliche Spülung) aufgenommen werden.

Experimente nach α_{1B} -Adrenozeptorinaktivierung: Nach dem Präparieren wurden die auf die Edelstahlhäkchen aufgehängten Arteriensegmente gemeinsam in ein 20 ml Organbad (*Krebs-Henseleit*-Lösung Lösung A) transferiert. Die so ohne Ruhespannung eingehängten Arteriensegmente wurden 50 min mit B8805-033 (3 μM) zwecks α_{1A} -Adrenozeptorblockade inkubiert. Während der letzten 30 min der Inkubationszeit wurde Chloroethylclonidin (100 μM) zugesetzt. Anschließend wurden die Arteriensegmente gespült (15 min), in separate Organbäder überführt und wie oben genannt weiter behandelt. Jeweils 2 – 3 kumulative $E/[A]$ -Kurven für Noradrenalin (oder für einen Testagonisten) wurden im Abstand von jeweils mindestens 60 min in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Testantagonisten aufgenommen. Die Antagonisten wurden 30 min lang inkubiert. Abweichend davon wurden Ergoline, RS-17053 und Tamsulosin auf Grund ihrer langsamen Rezeptorassoziations- und Rezeptordissoziationsgeschwindigkeit 60 min bzw. 120 min inkubiert.

2.3.1.4. Meerschweinchenmilz (α_{1B} -Adrenozeptoren)

Die Charakterisierung α_{1B} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Eltze, 1994). Dazu wurde die entnommene Milz in 6 gleich große Teile geschnitten und mittels zweier Klammern (Organclips) vertikal in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung A) enthielten, eingehängt. Das Medium enthielt zusätzlich Cocain (10 μ M), Corticosteron (30 μ M), Ascorbinsäure (200 μ M) und Propranolol (1 μ M) um die neuronale und zelluläre Aufnahme von Noradrenalin zu unterbinden, den oxidativen Abbau von Noradrenalin zu vermindern und β -Adrenozeptoren zu blockieren. Eine Vorspannung von 10 mN wurde angelegt und während der Ruhephasen regelmäßig erneuert. Die Änderung der Kontraktionskraft wurde isometrisch aufgezeichnet. Nach einer initialen Stabilisierungsphase von 45 min mit einem Mediumwechsel nach 30 min (Spülzeit 3 min) erfolgte im Rhythmus von 40 min eine dreimalige Vorkontraktion der Organe mit jeweils steigenden Konzentrationen Noradrenalin (kumulativ, jeweils 0,1, 1 und 10 μ M) bis die Kontraktionen reproduzierbar waren. Nach jeder Kontraktion wurde das Noradrenalin durch eine 5-minütige Spülung entfernt.

Nach einem Mediumwechsel (Spülzeit 15 min, 15 min Ruhe, 3 min erneute Spülung), gefolgt von einer 30 minütigen Ruhephase, wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin aufgenommen. Nach einem erneuten Mediumwechsel wurde eine zweite und ggf. eine dritte kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin (oder für einen Testagonisten) in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten (Inkubationszeit 30 min; Ergoline: 60 min) aufgenommen.

In Experimenten mit drei aufeinander folgenden $E/[A]$ -Kurven von Noradrenalin konnte eine geringfügige, aber statistisch signifikante Verringerung der pEC_{50} -Werte beobachtet werden ($pEC_{50} = 6,05 \pm 0,05$, $5,93 \pm 0,04$ und $5,84 \pm 0,04$; $E_{max} = 100\%$, $98 \pm 4\%$ und $87 \pm 6\%$; $n = 12$). Die Durchführung und Berücksichtigung von Kontrollexperimenten ist somit unerlässlich. Für Prazosin wurde ein pA_2 -Wert von $8,81 \pm 0,06$ ($n = 20$) ermittelt.

2.3.1.5. Rattenaorta (α_{1D} -Adrenozeptoren)

Die Charakterisierung α_{1D} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Kenny *et al.*, 1995). Der thorakale Teil der Aorta zwischen Aortenbogen und großer Mesenterialarterie wurde entnommen und vom umgebenden Gewebe befreit. Die Aorta wurde in 12 – 16 Ringe mit jeweils 2 – 3 mm Länge geschnitten. Das Endothel wurde durch vorsichtiges Rollen mit einer in das Lumen eingeführten Pinzette entfernt. Die so behandelten Aortensegmente wurden horizontal auf je zwei triangelförmigen Edelstahlhäkchen ($d = 0,3$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung

(Lösung C) enthielten, eingebracht. Das Medium enthielt zusätzlich Cocain (10 μM), Corticosteron (30 μM), Ascorbinsäure (200 μM), Propranolol (1 μM) und Yohimbin (0,1 μM), um die neuronale und zelluläre Aufnahme von Noradrenalin zu unterbinden, den oxidativen Abbau von Noradrenalin zu vermindern sowie β - und α_2 -Adrenozeptoren zu blockieren. Eine Ruhespannung von 10 mN wurde angelegt und die isometrische Änderung der Kontraktionskraft der Organe aufgezeichnet.

Nach einer initialen Stabilisierungsperiode von 45 min mit einem Mediumwechsel nach 30 min (3 min Spülzeit) und Justierung der Ruhespannung auf 10 mN wurden die Aortensegmente dreimal innerhalb eines Zeitraums von 180 min mit 0,3 μM Noradrenalin kontrahiert bis sich die Kontraktionskraft reproduzieren ließ. Nach einem Mediumwechsel (Spülzeit 15 min, 15 min Ruhe, 3 min erneute Spülung) gefolgt von einer 30-minütigen Ruhephase wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin aufgenommen. Nach einem erneuten Mediumwechsel wurde nach einer weiteren Stunde eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve für Noradrenalin (oder für einen der zu untersuchenden Agonisten) in Ab- bzw. Anwesenheit eines Testantagonisten aufgenommen.

Kontrollexperimente mit Noradrenalin in Abwesenheit eines Antagonisten lieferten für beide nacheinander aufgenommenen $E/[A]$ -Kurven nahezu identische pEC_{50} - und E_{\max} -Werte ($pEC_{50} = 8,03 \pm 0,04$ und $8,03 \pm 0,06$; $E_{\max} = 100\%$ und $93 \pm 1\%$; $n = 28$). Für den selektiven α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 wurde ein pA_2 -Wert von $8,10 \pm 0,06$ ($n = 18$) ermittelt (Abb. 16), der sich im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Affinität des Liganden zum α_{1D} -Adrenozeptoren befindet ($pK_i = 8,2$; Goetz *et al.*, 1995).

2.3.1.6. Meerschweinchenbeckenschlagader (5-HT₁-ähnliche Rezeptoren)

Die Charakterisierung 5-HT₁-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Sahin-Erdemli *et al.*, 1991). Beide Äste der

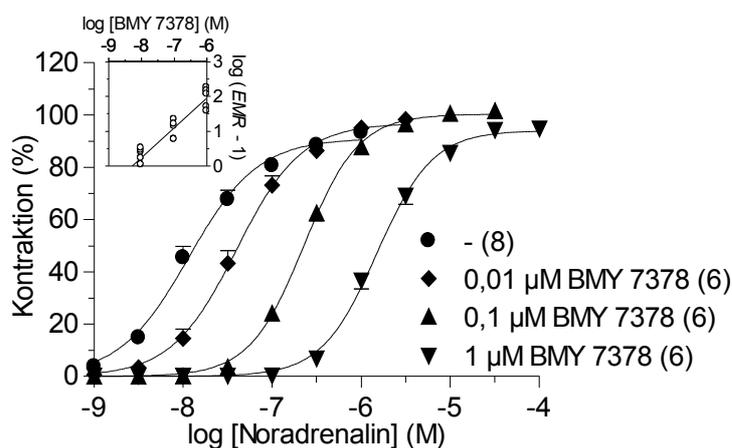


Abb. 16. Kompetitive Antagonisierung der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion der Rattenaorta durch den selektiven α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 (0,01 – 1 μM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. Mit Hilfe der Schild-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildung) wurde ein pA_2 -Wert von $8,10 \pm 0,06$ bei einem Anstieg der Ausgleichsgeraden im Schild-Plot von $0,86 \pm 0,07$ (nicht signifikant von 1 verschieden) ermittelt.

Beckenschlagader wurden entnommen und vom umliegenden Gewebe befreit. Die Arterien wurden in 2 – 3 Ringe zu 1,5 – 2 mm Länge geschnitten. Diese Arterienringe wurden auf zwei horizontal in das Gefäßlumen eingeführten Edelstahlhäkchen ($d = 0,15$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung C) enthielten, eingebracht. Das Medium enthielt zusätzlich Ketanserin (1 μM), Prazosin (1 μM), Idazoxan (1 μM), Mepyramin (0,3 μM), Cimetidin (30 μM) und Cocain (30 μM) um einerseits 5-HT_{2A}-, α_1 -, α_2 -, H₁- und H₂-Rezeptoren zu blockieren und andererseits die neuronale Aufnahme von 5-HT zu unterbinden. Eine Ruhespannung von 5 mN wurde angelegt und die isometrische Änderung der Kontraktionskraft der Organe aufgezeichnet.

Während einer initialen Stabilisierungsperiode von 100 min wurde das Medium zweimal im Abstand von 30 min gewechselt (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung auf 5 mN justiert. Die Arteriensegmente wurden anschließend mit 30 μM PGF_{2 α} (fast maximal wirksame Konzentration) kontrahiert. Nach einer Spülung (10 min Spülung, 15 min Ruhe, 3 min erneute Spülung), einer erneuten Justierung der Ruhespannung auf 5 mN und einer 30-minütigen Ruheperiode wurden die Segmente moderat mit einer EC₁₀ bis EC₂₀ (0,05 bis 0,5 μM) von PGF_{2 α} vorstimuliert. Die Fähigkeit von 5-HT (oder eines Testagonisten), die mittels PGF_{2 α} vorkontrahierte Meerschweinchenbecken-schlagader zu kontrahieren, wurde in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten durch Aufnahme einer kumulativen $E/[A]$ -Kurve untersucht. Die Inkubationszeit der Antagonisten betrug 45 – 60 min.

2.3.1.7. Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren)

Die Charakterisierung 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Pertz & Elz, 1995). Die Rattenschwanzarterie wurde entnommen und in eine mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigte *Krebs-Henseleit*-Lösung überführt. Nach Entfernen des umgebenden Fettgewebes wurde das Endothel durch Einführen eines Drahtes aus rostfreiem Stahl ($d = 0,3$ mm) in das Gefäßlumen entfernt. Die Rattenschwanzarterie wurde in bis zu 20 Ringe von 3 – 5 mm Länge geteilt und auf L-förmigen Häkchen ($d = 0,15$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung A) enthielten, überführt. Cocain (6 μM) und Prazosin (0,1 μM) wurden zugesetzt, um einerseits die Aufnahme von 5-HT zu unterdrücken und andererseits die Beteiligung von α_1 -Adrenozeptoren an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie auszuschließen. Eine Ruhespannung von 5 mN wurde angelegt und die isometrische Änderung der Kontraktionskraft der Organe aufgezeichnet.

Während der initialen Äquilibrationsphase von 60 min wurde die Ruhespannung von 5 mN erneuert und das Medium einmal nach 30 min gewechselt (3 min Spülzeit). Im Anschluss erfolgte eine Stimulation der Gefäße mit jeweils 1 und 10 μM 5-HT (kumulativ; submaximale und

maximale isometrische Kontraktion). Gefäße, die eine mangelhafte Kontraktionskraft zeigten (< 2 mN), wurden von den Experimenten ausgeschlossen. Nach einem Mediumwechsel (Spülzeit 10 min, 15 min Ruhe, 3 min erneute Spülung), gefolgt von einer 30-minütigen Ruhephase, wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für 5-HT aufgenommen. Nach erneutem Mediumwechsel wurden optional die zu untersuchenden Antagonisten inkubiert (60 min Inkubationszeit). Anschließend wurde eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve für 5-HT (oder für einen der zu untersuchenden Agonisten) aufgenommen.

Für 5-HT konnten in Kontrollexperimenten in Abwesenheit eines Antagonisten zwei deckungsgleiche $E/[A]$ -Kurven aufgenommen werden (1. Kurve: $pEC_{50} = 6,73 \pm 0,03$, $E_{max} = 100\%$; 2. Kurve: $pEC_{50} = 6,73 \pm 0,03$, $E_{max} = 101 \pm 1\%$, $n = 34$). Wie von *Elz* (1995) beschrieben wurde, führt Ketanserin (0,47 – 46,8 nM) zu einer kompetitiven Antagonisierung der durch 5-HT induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($pK_B = 9,55$).

2.3.1.8. Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren)

Die Charakterisierung 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte an der Koronararterie des Schlachtschweins erfolgte wie zuvor beschrieben (Strassner, 2003). Der absteigende Ast der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior*) wurde entnommen und vom umliegenden Gewebe befreit. Die Arterie wurde in 12 – 20 Ringe mit jeweils 2 – 3 mm Länge geschnitten und das Endothel durch vorsichtiges Rollen mittels einer in das Lumen eingeführten Pinzette entfernt. Diese Arterienringe wurden auf zwei horizontal in das Gefäßlumen eingeführten Edelstahlhäkchen ($d = 0,3$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung B) enthielten, überführt. Das Medium enthielt zusätzlich Prazosin (0,1 μ M) und Cocain (30 μ M), um einerseits α_1 -Adrenozeptoren zu blockieren und andererseits die neuronale Aufnahme von 5-HT zu unterbinden. Eine Ruhespannung von 20 mN wurde angelegt und die isometrische Änderung der Kontraktionskraft der Organe aufgezeichnet.

Nach einer initialen Stabilisierungsperiode von 60 min, in der die Badflüssigkeit einmal nach 30 min ge-

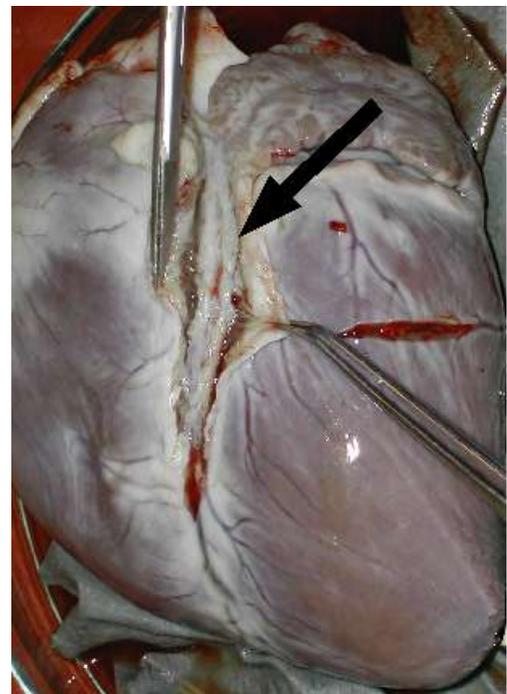


Abb. 17. Blick (von ventral) auf die Präparation des *Ramus interventricularis anterior* (schwarzer Pfeil) der *A. coronaria sinistra* des Schweineherzes (Foto: A. Moritz).

wechselt (3 min Spülzeit) und in der die Ruhespannung auf 20 mN justiert wurde, erfolgte zweimal im Abstand von 60 min eine Kontraktion der Arteriensegmente mit 50 mM KCl. Die quantitative Entfernung des Endothels wurde durch das Ausbleiben einer Vasorelaxation nach Zugabe von Bradykinin (0,1 μM) unmittelbar nach dem Erreichen der maximalen KCl-vermittelten Kontraktion bestätigt. Nach einer Spülung (10 min Spülung, 15 min Ruhe, 3 min erneute Spülung) und einer 60-minütigen Ruheperiode wurde die Fähigkeit von 5-HT (oder eines anderen Testagonisten), die Schweinekoronararterie zu kontrahieren, in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten durch Aufnahme einer kumulativen $E/[A]$ -Kurve untersucht. Die Antagonisten wurden jeweils während der 60-minütigen Ruheperiode inkubiert.

Kontrollexperimente mit 5-HT lieferten einen pEC_{50} -Wert von $6,76 \pm 0,02$ ($n = 40$). Ketanserin (3 – 300 nM) und Spiperon (3 – 300 nM) antagonisierten die durch 5-HT induzierte Kontraktion der Schweinekoronararterie (Abb. 18). Die Steigungen der Ausgleichsgeraden im *Schild*-Plot beider Substanzen waren mit $1,13 \pm 0,04$ ($n = 35$) und $1,16 \pm 0,03$ ($n = 30$) signifikant größer als 1. Dies deutet u.a. auf eine nicht ausreichende Äquilibration zwischen den Antagonisten und dem Rezeptor hin (Kenakin, 1993). Da die nötige Äquilibrationszeit mit abnehmender Antagonistenkonzentration zunimmt und temporale Inäquilibria insbesondere bei niedrigen Antagonistenkonzentrationen beobachtet werden können, wurden die ermittelten Werte für die niedrigsten Antagonistenkonzentrationen (3 nM Ketanserin bzw. 3 nM Spiperon) von der weiteren *Schild*-Regressionsanalyse ausgeschlossen. Nach Ausschluss dieser Daten betrugen die Steigungen der *Schild*-Regressionsgeraden $1,05 \pm 0,05$ bzw. $1,11 \pm 0,05$ (beide nicht signifikant von 1

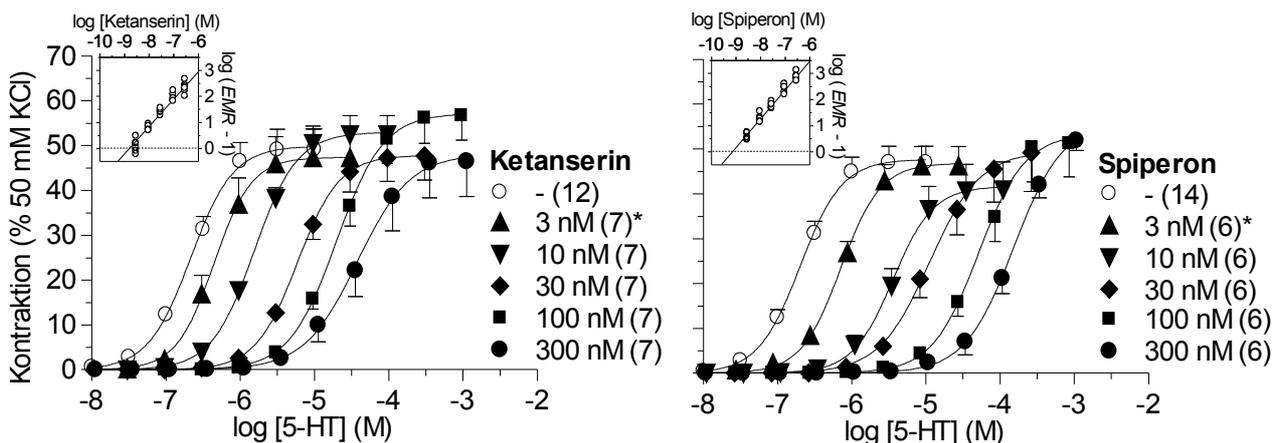


Abb. 18. Antagonisierung der durch 5-HT vermittelten Kontraktion der Schweinekoronararterie durch Ketanserin (3 – 100 nM) und Spiperon (3 – 100 nM). Die Werte für 3 nM Ketanserin* bzw. 3 nM Spiperon* wurden von der folgenden Analyse ausgeschlossen, da für diese Substanzen bei dieser Konzentration eine Inkubationszeit von 1 Stunde nicht ausreichte (siehe Text). Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $8,88 \pm 0,03$ für Ketanserin und $9,33 \pm 0,03$ für Spiperon ermittelt. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots waren (nach Exklusion der Werte für 3 nM) mit $1,05 \pm 0,05$ und $1,11 \pm 0,05$ nicht signifikant von 1 verschieden. Dargestellt sind die kontraktile Effekte $\pm S.E.M.$ aus (n) Experimenten.

verschieden). Die ermittelten pA_2 -Werte für Ketanserin ($8,88 \pm 0,04$, $n = 28$) bzw. Spiperon ($9,33 \pm 0,03$, $n = 24$) stimmen mit Referenzdaten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren überein (Hoyer *et al.*, 1994).

2.3.1.9. Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren)

Die Charakterisierung 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte an der Pulmonalarterie des Schlachtschweins erfolgte wie zuvor beschrieben (Glusa & Pertz, 2000). Ausgehend von der rechten Herzkammer (*Ventriculus dexter*) wurden aus den Lungen von Schlachtschweinen die Pulmonalarterien (*Aa. pulmonales*) zweiter bis vierter Ordnung entlang der Bronchien freigelegt, entnommen und vom umliegenden Gewebe befreit, ohne dabei das Endothel zu beschädigen (Abb. 19). Arterien mit einem Durchmesser von 2 – 3 mm wurden in Ringsegmente von 2 – 3 mm Länge geschnitten. Diese Arterienringe wurden auf zwei horizontal in das Gefäßlumen eingeführten Edelstahlhäkchen ($d = 0,3$ mm) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung A) enthielten, eingebracht. Das Medium enthielt zusätzlich Ketanserin ($0,1 \mu\text{M}$), um 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte kontraktile Effekte zu unterbinden. Eine Ruhespannung von 20 mN wurde angelegt und während der nachfolgenden 60-minütigen Stabilisierungsphase, in der nach 30 min das Medium gewechselt wurde, erneuert. Isometrische Änderungen der Kontraktionskraft der Organe wurden aufgezeichnet.

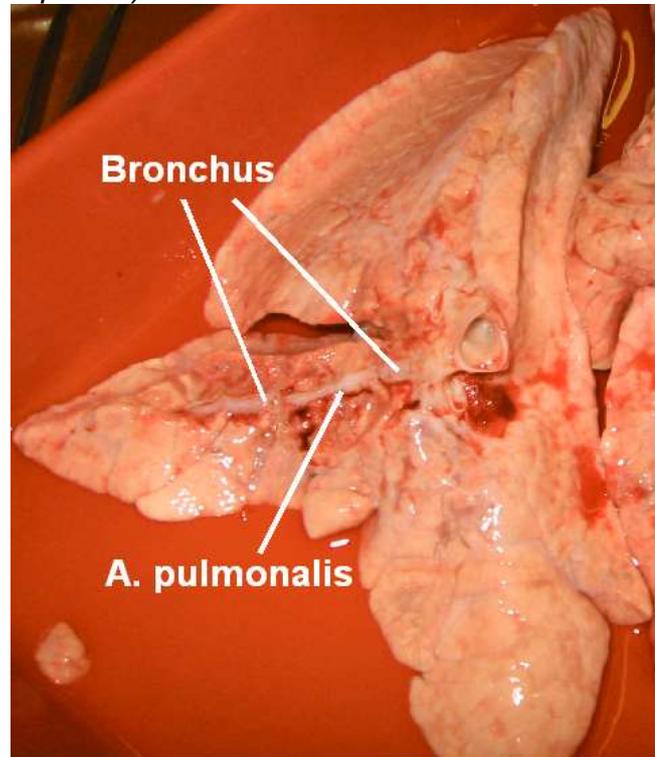


Abb. 19. Blick (von *medial*) auf die Präparation einer *A. pulmonalis* der linken Lunge eines jungen Schweins (40 kg). Nach (partieller) Entfernung des *Bronchus* kann die darunter liegende *A. pulmonalis* (Blickrichtung *lateral*) freigelegt und entnommen werden.

Nachfolgend wurden die Arteriensegmente im Abstand von 45 min einmal mit KCl (30 mM) und zweimal mit PGF_{2 α} (3 μM) stimuliert. Vor der anschließenden Spülung (10 min) wurde die Intaktheit des Endothels durch eine mindestens 80%ige Vasorelaxation nach Zugabe von Bradykinin (10 nM) überprüft. Nach einer 60-minütigen Ruheperiode, in der optional Testantagonisten inkubiert wurden, und einer dritten Stimulation mit PGF_{2 α} , wurde die Fähigkeit von 5-HT (oder eines anderen Testagonisten), die Schweinepulmonalarterien zu relaxieren, mittels Aufnahme

einer kumulativen $E/[A]$ -Kurve untersucht.

In Kontrollexperimenten führte $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$) zu einer Kontraktion von $19,4 \pm 1,3 \text{ mN}$. Bradykinin (10 nM) relaxierte die Gefäße um $92 \pm 2\%$. Für 5-HT wurde in Abwesenheit eines Antagonisten ein pEC_{50} -Wert von $8,62 \pm 0,04$ und ein E_{max} -Wert von $81 \pm 2\%$ ($n = 30$) ermittelt. Die 5-HT-induzierte Relaxation der Schweinepulmonalarterien wurde kompetitiv durch den selektiven $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptorantagonisten SB 204741 antagonisiert (Abb. 20). Der mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse für SB 204741 ermittelte pA_2 -Wert von $6,59 \pm 0,04$ ($n = 12$) ist vergleichbar mit Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptoren ($\text{pK}_i = 6,7$; Thomas *et al.*, 1996).

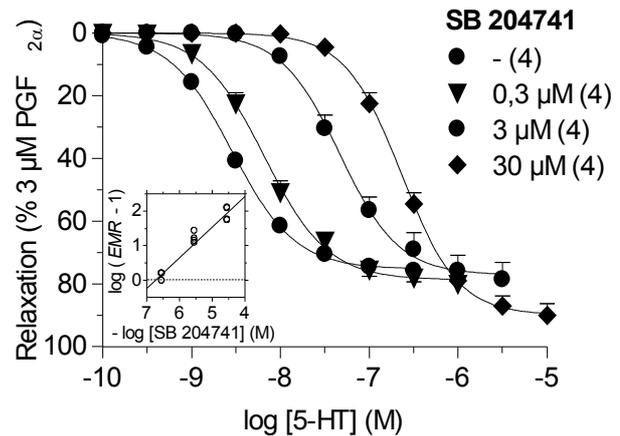


Abb. 20. Antagonisierung der durch 5-HT induzierten Relaxation der Schweinepulmonalarterien durch den selektiven $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptorantagonisten SB 204741 ($0,3 - 30 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm *S.E.M.* aus (n) Experimenten. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildung) wurde ein pA_2 -Wert von $6,59 \pm 0,04$ bei einem Anstieg der Ausgleichsgeraden im *Schild*-Plot von $0,90 \pm 0,05$ (nicht signifikant von 1 verschieden) ermittelt.

2.3.1.10. Pulmonalarterien des Läufer Schweins (relaxierende 5-HT-Rezeptoren)

Standardexperiment: Die Pulmonalarterien von Läufer Schweinen ($20 - 45 \text{ kg}$) wurden wie die Pulmonalarterien von Schlachtschweinen präpariert (siehe Kapitel 2.3.1.9.). Die Arterien ($d = 1,5 - 2 \text{ mm}$) wurden in Ringsegmente zu $2 - 3 \text{ mm}$ Länge geschnitten. Das Endothel wurde durch vorsichtiges Rollen mittels einer in das Lumen eingeführten Pinzette entfernt. Diese Arterienringe wurden auf zwei horizontal in das Gefäßlumen eingeführten Edelstahlhäkchen ($d = 0,3 \text{ mm}$) in die Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Lösung A) enthielten, überführt. Das Medium enthielt zusätzlich Ketanserin ($0,1 \mu\text{M}$), um $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -Rezeptor-vermittelte kontraktile Effekte zu unterbinden. Eine Ruhespannung von 20 mN wurde angelegt und während der nachfolgenden 60-minütigen Stabilisierungsphase, in der nach 30 min das Medium einmal gewechselt wurde, erneuert. Isometrische Änderungen der Kontraktionskraft der Organe wurden aufgezeichnet.

Nachfolgend wurden die Arteriensegmente im Abstand von 45 min einmal mit KCl (30 mM) und einmal mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1 \mu\text{M}$) stimuliert. Vor der folgenden 10-minütigen Spülung wurde die Entfernung des Endothels durch das Ausbleiben einer Vasorelaxation nach Zugabe von Bradykinin (10 nM) bestätigt. Nach einer 60-minütigen Ruheperiode und einer zweiten Stimulation mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde

die Fähigkeit von 5-Carboxamidotryptamin (oder eines anderen Testagonisten), die Schweinepulmonalarterien in Ab- und in Anwesenheit eines Antagonisten zu relaxieren, durch Aufnahme einer kumulativen $E/[A]$ -Kurve untersucht.

Experimente mit intaktem Endothel: Im Gegensatz zur oben genannten Methode wurde das Endothel nicht entfernt. Nach der beschriebenen Stabilisierungs- und Stimulierungsphase wurde die Intaktheit des Endothels durch eine mindestens 80%ige Vasorelaxation nach Zugabe von 10 nM Bradykinin unmittelbar nach der Kontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM) überprüft. Eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für 5-HT, BW 723C86 oder 5-Carboxamidotryptamin in Ab- bzw. Anwesenheit eines Testantagonisten wurde nach einer 60-minütigen Ruheperiode und einer zweiten Stimulation mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ aufgenommen. Die Antagonisten wurden während der 60-minütigen Ruhephase inkubiert.

cAMP Bestimmung: Jeweils 2 – 3 Arteriensegmente wurden auf Edelstahlhäkchen ohne Vorspannung in Organbäder, die eine modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung und Ketanserin (0,1 μM) enthielten, eingebracht. Nach einer 30-minütigen Stabilisierungsperiode wurde für weitere 50 min der Testantagonist SB 269970 oder das Vehikel (Wasser) inkubiert. Während der letzten 20 min wurde 5-Carboxamidotryptamin (1 nM – 10 μM) coinkubiert. Die Ringsegmente wurden danach unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und wie im Kapitel 2.3.2.1. genannt weiter behandelt.

2.3.1.11. Auswaschexperimente

Die Reversibilität der Bindung von Antagonisten und Partialagonisten wurde an α_1 -Adrenozeptoren nach α_{1B} -Adrenozeptorinaktivierung und an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie untersucht. Nach Vorbehandlung und Vorstimulation der Organe (wie in den Kapiteln 2.3.1.3. und 2.3.1.7. beschrieben) erfolgte eine Kontraktion der Organe mit Noradrenalin (10 μM) bzw. 5-HT (10 μM). Nach der anschließenden Spülung wurden die zu untersuchenden Testsubstanzen für 60 min inkubiert. Die Konzentration der Testsubstanzen wurde anhand vorangegangener Experimente so gewählt, dass sie zu einer etwa 80 – 95%igen Reduktion der durch Noradrenalin (10 μM) bzw. durch 5-HT (10 μM) induzierten Kontraktion führen. Nach der Inkubationsphase wurden die Organe 60 min lang gespült (diskontinuierliche Spülung). Die kontraktile Effekte von Noradrenalin (10 μM) bzw. 5-HT (10 μM) wurden nach einer Spülzeit von 0, 15, 30, 45 und 60 min ermittelt.

2.3.2. Biochemische Methoden

2.3.2.1. Second-messenger-Bestimmung

Probenvorbereitung: Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Blutgefäße wurden in ein auf -196 °C vorgekühltes Mikro-Dismembrator-Mahlgefäß aus PTFE ($V = 7$ ml) mit einer Wolframcarbide-

kugel ($d = 9$ mm) überführt. Nach Zugabe von 700 μ l 0,1 M HCl wurde die Probe für 60 s bei 2.000 min^{-1} mit einem Mikro-Dismembrator U homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 2.000 x g für 5 min zentrifugiert. Die cAMP-Bestimmung erfolgte unter Verwendung des Überstandes, während das Pellet für eine Proteinbestimmung herangezogen wurde.

cAMP-Bestimmung: Der Gehalt an cAMP wurde mittels eines Enzymimmunoassay-Kits (cyclic AMP EIA Kit) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Bestimmungsmethode. Das cAMP der Probe und eine mit cAMP kovalent gekoppelte Phosphatase konkurrieren um die Bindung an einem polyklonalen Anti-cAMP-Antikörper, welcher wiederum an einem auf der Mikrotiterplatte befindlichen Anti-IgG-Antikörper gebunden ist. Nach einer Auswaschphase wurde das Substrat p-Nitrophenylphosphat zugegeben und der sich bildende Farbstoff photometrisch bei 405 nm quantifiziert. Eine Kalibrierung erfolgte mittels eines mitgelieferten cAMP-Standards (0,05 – 500 pmol/l). Die Empfindlichkeit der Methode wurde durch Verwendung eines Acetylierungsreagenzes erhöht.

2.3.2.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach *Lowry* (*Lowry et al.*, 1951), die auf der Reaktion des Proteins mit einer Kupferartratlösung und *Folins* Reagenz beruht. Dazu wurde zunächst das gefällte Protein (siehe Kapitel 2.3.2.1.) in 1 ml 1 M NaOH für 24 h mittels eines Kippschüttlers (Mikro-Dismembrator U bei 40 min^{-1}) resuspendiert. Nach optionaler Probenverdünnung wurde der Proteingehalt mit Hilfe eines „DC Protein Assay“ Kits nach Herstelleranweisung durchgeführt. Eine Kalibriergerade von 0,2 – 1,4 mg/ml Protein wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard aufgenommen.

2.3.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.3.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Gewebe erfolgte nach dem Verfahren von *Chomczynski* und *Sacchi* (1987). Die RNA-Isolierung aus der Schweinepulmonalarterie (Schlachtschweine und Läuferchweine) erfolgte unter Verwendung des RNAgents®-Isolation-Systems. Dazu wurden eingefrorene Gewebestücke (ca. 50 mg) in einem 2-ml-Kryoröhrchen mit Hilfe einer Guanidiniumisothiocyanat-Denaturierungslösung und einer Wolframcarbidkugel ($d = 5$ mm) im Mikro-Dismembrator U für 60 s bei 2.000 min^{-1} homogenisiert.

Die molekularbiologischen Untersuchungen an der Meerschweinchenbeckenschlagader und am Meerschweinchengehirn wurden freundlicherweise von Hr. O. Radtke am Robert-Koch-Institut

übernommen. Abweichend vom RNA-Aufschluss aus den Schweinepulmonalarterien wurde die Homogenisierung der Meerschweinchenbeckenschlagader und des Meerschweinchengehirns mit Hilfe des TRIzol[®]-Reagenzes und einem Tissue-Tearor[®] (Biospec, USA) durchgeführt.

Nach der Zugabe der vorgeschriebenen Menge phenolgesättigten Chloroforms und einer 15-minütigen Zentrifugierung bei 10.000 x g und 4 °C konnten die genomische DNA und die Proteine abgetrennt werden. Die in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und einer anschließenden 10-minütigen Zentrifugierung bei 10.000 x g und 4 °C gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Ethanol (75% V/V; 4 °C) wurde die RNA in Wasser resuspendiert und UV-photometrisch bei 260 nm quantifiziert.

2.3.3.2. Reverse Transkription (RT)

2 µg der isolierten RNA aus der Schweinepulmonalarterie wurden zusammen mit 0,5 µg Oligo-dT-Primern bei 70 °C denaturiert. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte unter Zugabe des RT-Puffers (7 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 70 mM KCl und 10 mM DTT), 0,5 mM dNTPs und 50 u Reverse Transkriptase (M-MLV) in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 60 min bei 42 °C. Kontrollexperimente in Abwesenheit der Reversen Transkriptase wurden durchgeführt. Die Experimente an isolierten Organen des Meerschweinchens wurden abweichend davon mit 1 µg RNA und 2 µg Random-Hexamer-Primer bei 37 °C durchgeführt.

2.3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein Zehntel der synthetisierten cDNA (oder ein Aliquot dessen) wurde unter Zusatz des PCR-Puffers (10 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 50 mM KCl, 0,15 % Triton X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTPs, 1,25 u Taq-DNA-Polymerase und je 1 µM der spezifischen Sense- und Antisense-Primer (siehe Kapitel 2.1.1.4.) in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Hilfe des Robocycler[®] Gradient[®] 40 unter Verwendung der *HotStart*-Technik amplifiziert. 35 (pGAPDH und p5-HT₇) bzw. 42 Amplifikationszyklen (gpG6PDH, gp5-HT_{1B}, gp5-HT_{1D} und gp5-HT_{1F}) mit je einer Denaturierungsphase (94 °C, 45 s), einer Annealingphase (56 °C, 45 s) und einer Synthesephase (72 °C, 90 s) wurden durchgeführt.

2.3.3.4. Elektrophorese

Die PCR-Amplifikate (je 5 µl) wurden mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels in einer 1%igen TAE-Pufferlösung nach Zusatz von 500 ng/ml Ethidiumbromid zum Gel und zum Puffer elektrophoretisch getrennt und anschließend unter Fluoreszenzanregung (302 nm) fotografiert.

2.4. Datenanalyse und Statistik

2.4.1. Pharmakologische Parameter

Die Verwendung von Symbolen, Parametern und Begriffen in dieser Arbeit erfolgte unter Berücksichtigung der Empfehlungen des Komitees für Rezeptornomenklatur und Wirkstoffklassifizierung der IUPHAR (Jenkinson *et al.*, 1995; Neubig *et al.*, 2003).

Allgemeine Definitionen:

$c_x, [X]$	Konzentration der Substanz X
$\log x$	Dekadischer Logarithmus von x (= $\log_{10} x = \lg x$)
Agonist	<p>Eine Substanz, die an einen Rezeptor bindet, ihn aktiviert und somit einen Effekt hervorruft</p> <p>Ein Partialagonist hingegen aktiviert den Rezeptor nur teilweise, während ein inverser Agonist einen spontan aktiven Rezeptor deaktiviert. Ein Agonist kann vereinfacht über seine Potenz (pEC_{50}) und über den von ihm vermittelten Maximaleffekt (E_{max}) charakterisiert werden.</p>
Antagonist	<p>Eine Substanz, die an einen Rezeptor bindet und dabei den Effekt einer anderen Substanz, üblicherweise eines Agonisten, reduziert</p> <p>Ein Antagonist kann über seine Potenz (pA_2-Wert oder pD'_2-Wert) charakterisiert werden.</p>
Affinität	<p>Fähigkeit einer Substanz, an einen Rezeptor zu binden</p> <p>Ihr Maß, die Affinitätskonstante, entspricht dem Reziproken der Rezeptor-Dissoziationskonstante.</p>
Potenz („Potency“)	<p>Ausdruck für die Aktivität einer Verbindung, dargestellt als eine Konzentration zur Erreichung eines Effektes oder, weniger gebräuchlich, als ihr Maximaleffekt</p> <p>Im Rahmen dieser Arbeit wird die „agonistische Potenz“ als pEC_{50}-Wert und die „antagonistische Potenz“ als pA_2-Wert oder als pD'_2-Wert angegeben.</p>

Wirksamkeit („ <i>Efficacy</i> “)	<p>Beschreibt in der experimentellen Pharmakologie die Fähigkeit von verschiedenen Agonisten, bei gleicher relativer Rezeptorbesetzung unterschiedlich ausgeprägte Effekte zu erzielen</p> <p>Als Maß für die Wirksamkeit dient u.a. e_A, das Verhältnis aus Anteil besetzter Rezeptoren (p_{AR}) und dem Signal S_A (Stephenson, 1956). Alternative Definitionen der Wirksamkeit sind die intrinsische Wirksamkeit ε_A („<i>intrinsic efficacy</i>“; Furchgott, 1966) und das Umwandlungsverhältnis τ („<i>transducer ratio</i>“; Black & Leff, 1993; Black <i>et al.</i>, 1985). Als ein indirektes Maß der agonistischen Wirksamkeit findet in dieser Arbeit der maximale agonistische Effekt (α) und der maximale beobachtete Effekt (E_{max}) Anwendung.</p>
--------------------------------------	--

Entsprechend der IUPHAR-Empfehlungen wurden die untersuchten Substanzen mit den folgenden pharmakologischen Parametern charakterisiert:

Agonisten, Partialagonisten:

EC_{50} , $[A]_{50}$, pEC_{50} , $p[A]_{50}$	<p>Stoffmengenkonzentration (bzw. der negative dekadische Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration) eines Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt (Kraftzunahme, Kraftabnahme, Längenänderung, Konzentrationsänderung eines <i>Second messengers</i> o.ä.) hervorruft</p> <p>Sie ist ein Maß für die Potenz eines Agonisten, liefert aber u.a. auf Grund des Phänomens der Rezeptorreserve für volle Agonisten keine direkte Aussage über die Affinität des Agonisten zum Rezeptor.</p>
E_{max}	Maximaler beobachteter Effekt
α	Maximaler agonistischer Effekt, dargestellt als Verhältnis zwischen E_{max} des Testagonisten und E_{max} eines Referenzagonisten unter gleichen Bedingungen
K_P , pK_P	<p>Gleichgewichtsdissoziationskonstante (bzw. der negative dekadische Logarithmus der molaren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten) eines Komplexes aus partiellem Agonisten und dem Rezeptor</p> <p>Sie entspricht in grober Näherung dem pEC_{50}-Wert des Partialagonisten, wenn $\alpha \ll 1$ ist. Zur genaueren Abschätzung des pK_P-Wertes haben sich mehrere Verfahren bewährt:</p>

Methode A:

Die Bestimmung des pK_P -Wertes als Ergebnis der agonistischen Wirksamkeit eines Partialagonisten erfolgte durch Vergleich der äquieffektiven Konzentrationen eines vollen Agonisten A und des partiellen Testagonisten P unter gleichen Bedingungen (Kenakin, 1993).

Der Berechnung lag folgender, aus der klassischen Rezeptortheorie und damit aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteter Zusammenhang zu Grunde, der einer Geradengleichung entspricht:

$$[A] = \frac{K_P}{\left(\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} - 1\right)} \cdot \frac{[A]}{[P]} + \frac{K_A}{\left(\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_P} - 1\right)} \quad [1]$$

$$[A] = m \cdot \frac{[A]}{[P]} + b, \quad [2]$$

wobei ε_A und ε_P die „intrinsic efficacies“ des vollen bzw. partiellen Agonisten repräsentieren und K_A die scheinbare Affinitätskonstante des vollen Agonisten A ist. Falls $\varepsilon_P \ll \varepsilon_A$, was bei schwachen partiellen Agonisten zutrifft, kann der K_P -Wert wie folgt berechnet werden:

$$K_P = m \cdot \left(\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} - 1\right) \quad [3]$$

$$K_P = -m \quad [4]$$

Der K_P -Wert entspricht somit der negativen Steigung der Ausgleichsgeraden im $[A]/([A]/[P])$ -Diagramm (Abb. 21).

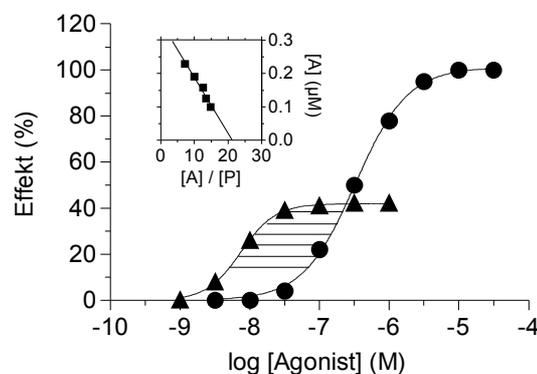


Abb. 21. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_P eines Partialagonisten P aus den Konzentrations-Wirkungskurven eines vollen Agonisten A (●) und des Partialagonisten P (▲).

Methode B:

Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für einen Partialagonisten, erhalten aus Experimenten, in denen dieser als Antagonist fungierte, erfolgte durch den Vergleich der äquieffektiven Konzentrationen des vollen Agonisten A in Ab- bzw. Anwesenheit des Partialagonisten P nach *Marano* und *Kaumann* (1976, 1982).

Der Berechnung lag ebenfalls eine aus der klassischen Pharmakologie abgeleitete Geradengleichung zu Grunde:

$$[A] = \frac{1}{1 + \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \cdot \frac{[P]}{K_P}} \cdot [A]^* + \frac{\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} \cdot \frac{[P]}{K_P} \cdot K_A}{1 + \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \cdot \frac{[P]}{K_P}} \quad [5]$$

$$[A] = m \cdot [A]^* + b \quad , \quad [6]$$

wobei $[A]$ und $[A]^*$ die äquieffektiven Konzentrationen des vollen Agonisten A in Ab- bzw. Anwesenheit des Partialagonisten darstellen. Für $\varepsilon_A \gg \varepsilon_P$ ergibt sich somit:

$$K_P = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \quad [7]$$

$$K_P = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \quad , \quad [8]$$

wobei m die Steigung der gewichteten Ausgleichsgeraden im $[A]/[A]^*$ -Diagramm ist (Abb. 22). Die Gewichte w_i werden dazu aus der Beziehung

$$w_i = \left([A]^* + [A]_{50}\right)^{-4} \quad [9]$$

errechnet. Auf eine weiterführende Analyse der partialagonistischen Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mit Hilfe des *Kaumann-Marano*-Plots unter Verwendung mehrerer Partialagonistenkonzentrationen $[P]$ wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

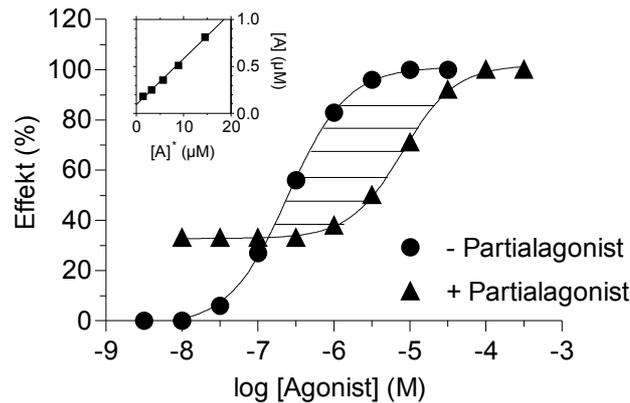


Abb. 22. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_p eines Partialagonisten P aus den Konzentrations-Wirkungskurven eines vollen Agonisten A in Ab- (●) bzw. Anwesenheit von P (▲).

Antagonisten:

EMR Verhältnis der Agonistenkonzentrationen in An- ($[A]^*$) bzw. Abwesenheit ($[A]$) eines Antagonisten B , welche zur Erzielung gleicher (üblicherweise halbmaximaler) Effekte notwendig sind

$$EMR = \frac{[A]_{50}^*}{[A]_{50}} \quad [10]$$

pA_2 Konzentration eines Antagonisten B , die es erforderlich macht, die Agonistenkonzentration $[A]$ zu verdoppeln, um den gleichen agonistischen Effekt zu erzielen

Die Bestimmung des pA_2 -Wertes erfolgt üblicherweise nach der Methode nach *Arunlakshana* und *Schild* (1959). Liegen für B experimentelle Daten über einen größeren Konzentrationsbereich vor, so kann der pA_2 -Wert aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden im $\log (EMR-1) / -\log [B]$ - Diagramm (*Schild Plot*) mit der X-Achse ermittelt werden (Abb. 23). Sind die Mindestanforderungen an einen kompetitiven Antagonismus erfüllt (parallele Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve ohne Depression des Maximums), so wird auf Linearität zwischen $\log (EMR-1)$ und $-\log [B]$ geprüft. Ist die Steigung m der Ausgleichsgeraden nicht signifikant von 1 verschieden, so kann der pA_2 -Wert mittels einer Ausgleichsgeraden mit $m = 1$ ermittelt werden. Der Antagonismus wird als kompetitiv eingestuft.

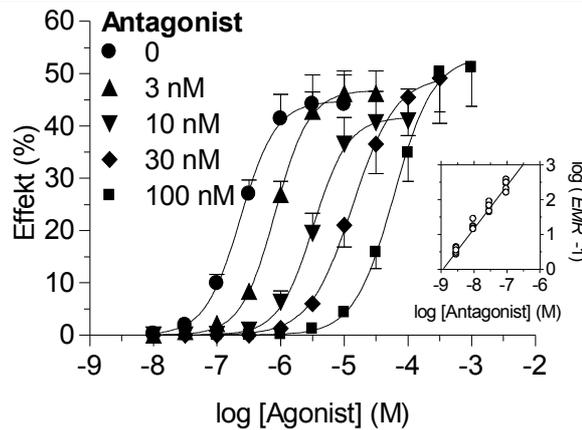


Abb. 23. Bestimmung des pA_2 -Wertes eines Antagonisten nach *Arunlakshana* und *Schild*.

Vereinfacht kann ein „scheinbarer pA_2 -Wert“ für eine einzelne Antagonistenkonzentration $[B]$ unter Annahme einer Steigung der *Schild*-Regressionsgeraden von $m = 1$ abgeschätzt werden (Schild, 1949):

$$pA_2 = -\log[B] + \log(EMR - 1) \quad [11]$$

pD'_2

Konzentration eines Antagonisten B , die den Maximaleffekt eines Agonisten A um 50% reduziert

Der pD'_2 -Wert wird durch Vergleich der Maximaleffekte eines Agonisten (E_{max} bzw. E^*_{max}) in Ab- bzw. Anwesenheit eines Antagonisten berechnet:

$$pD'_2 = -\log[B] + \log \frac{E_{max}}{E^*_{max}} \quad [12]$$

K_B, pK_B

Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (bzw. der negative dekadische Logarithmus der molaren Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten) eines Antagonist-Rezeptor-Komplexes

Liegen für einen kompetitiven Antagonisten B experimentelle Daten über einen größeren Konzentrationsbereich vor, so liefert der pA_2 -Wert nach *Arunlakshana* und *Schild* (1959, siehe oben) eine valide Schätzung des pK_B -Wertes. Auch der vom „scheinbaren pA_2 -Wert“ abgeleitete „scheinbare pK_B -Wert“ ist gebräuchlich.

2.4.2. Statistik

2.4.2.1. Datenpräsentation

Alle Daten wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*SEM*) für n Experimente im Text, in Tabellen sowie in Diagrammen angegeben. Sofern nicht anders angegeben

wurden alle Experimente an mindestens 3 verschiedenen Tieren durchgeführt, um individuelle Unterschiede weitgehend auszuschließen.

\bar{x}	Arithmetischer Mittelwert
n	Stichprobenumfang (Anzahl der Experimente)
s	Stichproben-Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
P	Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der die Nullhypothese abgelehnt wird (α -Fehler)

2.4.2.2. Datenanalyse mittels nichtlinearer Regression

Die experimentell gewonnenen Konzentrations-Wirkungs-Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Hierbei kam ein iteratives, auf der Minimierung der Summe der Abstandsquadrate beruhendes Verfahren zur Anwendung (z.B. *Levenberg-Marquardt*-Algorithmus). Die Anpassung erfolgte an eine, auf der klassischen Rezeptortheorie beruhende, vierparametrische logistische Funktion (*Hill*-Gleichung; Gleichung 13) zwecks Ermittlung der Parameter E_{\max} , pEC_{50} und der Steigung n_H (*Hill*-Koeffizient).

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{(-pEC_{50} - \log[A])n_H}} \quad [13]$$

Obwohl diese Gleichung den Effekt lediglich als ein Maß für den Anteil der mit dem Agonisten besetzten Rezeptoren zur Gesamtrezeptorpopulation ansieht und somit jegliche Beeinflussung durch die Signaltransduktion („*transducer function*“, Black & Leff, 1983; Black *et al.*, 1985) vernachlässigt wird, hat sich diese Gleichung zur Anpassung *in-vitro*-pharmakologischer Daten an ein mathematisches Modell bewährt (Jenkinson *et al.*, 1995; Neubig *et al.*, 2003). Eine eventuelle Asymmetrie der $E/[A]$ -Daten (Van der Graaf & Schoemaker, 1999) wurde ebenfalls vernachlässigt. Individuelle Unterschiede in E_{\max} und pEC_{50} wurden mit Hilfe routinemäßig durchgeführter Kontrollexperimente aufgezeichnet.

2.4.2.3. Korrelationsanalyse, Lineare Regression

Nach Überprüfung auf Linearität mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way-ANOVA) wurde die Steigung der Ausgleichsgeraden durch Lineare Regression ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß r^2 diente dabei zur Beurteilung der Güte der Regression.

Eine Korrelation zwischen beiden zu beurteilenden Parametern wurde durch eine Steigung der Ausgleichsgeraden, die signifikant von 0 verschieden war (Ein-Stichproben-*t*-Test), aufgezeigt.

2.4.2.4. Statistische Beurteilung

Der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests nach *Student* oder mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse in Verbindung mit einem geeigneten *Post-hoc*-Test, wenn mehrere Werte miteinander verglichen werden sollten. Ein Signifikanzniveau von $P = 0,05$ wurde angenommen.

Prüfung auf Normalverteilung: Eine Prüfung auf Normalverteilung, die als Voraussetzung für die angewendeten statistischen Testverfahren sowie für die valide Angabe arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler gilt, erfolgte für ausreichend große Stichproben ($n \geq 12$) mit Hilfe des *D'Agostino-Pearson-K²*-Omnibustests (exemplarisch siehe Tabelle 3). Bereits zuvor konnte eine Normalverteilung von pEC_{50} -, pK_B - und E_{max} -Werten in verschiedenen Experimenten an der Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}) und der Rattenaorta (α_{1D}) gezeigt werden (Elz, 1995; siehe auch Christopoulos, 1998).

Tab. 3. Exemplarische Prüfung der pEC_{50} - und E_{max} -Werte von Referenzagonisten an isolierten Organen auf Normalverteilung mit Hilfe des Tests nach *D'Agostino & Pearson*.

<i>Modell</i>	<i>Agonist</i>	<i>n</i>	<i>E_{max}</i> (%)	<i>P</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>P</i>
Rattenschwanzarterie (α_{1A})	Noradrenalin	95	61 ± 2	0,72	6,14 ± 0,02	0,44
Meerschweinchenmilz (α_{1B})	Noradrenalin	12	98 ± 4	0,83	5,93 ± 0,04	0,10
Rattenschwanzarterie (α_{1B})	Noradrenalin	130	41 ± 2	0,001 ^a	6,55 ± 0,02	0,07
Meerschweinchenbeckenschlagader (5-HT _{1B})	5-HT	67	33 ± 1	0,09	7,52 ± 0,02	0,31
Schweinekoronararterie (5-HT _{2A})	5-HT	40	56 ± 3	0,55	6,76 ± 0,02	0,56
Schweinepulmonalarterien (5-HT _{2B})	5-HT	30	81 ± 2	0,81	8,62 ± 0,04	0,99
Läuferschweinepulmonalarterien (5-HT ₇)	5-CT	33	120 ± 6	0,05	7,51 ± 0,04	0,80

^aDie Nullhypothese „Normalverteilung“ muss mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P abgelehnt werden.

Vergleich zweier Mittelwerte: Für als normalverteilt anzusehende Größen wurde nach Überprüfung der Varianzen mittels *F*-Test nach *Fisher* bei Varianzhomogenität der Zwei-

Stichproben- t -Test für unabhängige Stichproben (Gleichung 14) bzw. seine Modifikation für paarweise angeordnete Messwerte (Gleichung 15) angewendet.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \right] \cdot \left[\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]}} \quad [14]$$

$$t = \frac{\sum (\bar{x}_{1i} - \bar{x}_{2i})}{\sqrt{\frac{n \cdot \sum (\bar{x}_{1i} - \bar{x}_{2i})^2 - \left(\sum (\bar{x}_{1i} - \bar{x}_{2i}) \right)^2}{(n-1)}}} \quad [15]$$

Lag keine Gleichheit der Varianzen vor, so erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte mit Hilfe des nach *Welch* modifizierten t -Tests zur Lösung des *Fisher-Behrens*-Problems:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad [16]$$

Da der t -Test nach *Welch* als zu liberal gilt, wurden die Freiheitsgrade, wie von *Sachs* (2002) vorgeschlagen, nach *Hsu* berechnet:

$$df = \text{Min}(n_1, n_2) - 1 \quad [17]$$

Vergleich eines Wertes mit einem Sollwert: Der Vergleich eines Mittelwertes einer Stichprobe mit einem Sollwert erfolgte mit Hilfe des Ein-Stichproben- t -Tests:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s} \cdot \sqrt{n} \quad [18]$$

Multiple Vergleiche: Für mehr als 2 Gruppen jeweils als normalverteilt anzusehender Größen wird initial mittels einfaktorieller Varianzanalyse überprüft, ob alle Gruppen aus derselben Grundgesamtheit stammen. Zum anschließenden, jeweils paarweisen Vergleich der Mittelwerte fand der nach *Bonferroni* modifizierte t -Test Anwendung, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit P von

$$P = 1 - (1 - \alpha)^k \quad [19]$$

angenommen wurde und k der Anzahl der durchgeführten Vergleiche entspricht.