

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Adrenozeptoren

3.1.1. Identifizierung der α_1 -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie

Die Identifizierung der kontraktilen Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Schon *Medgett* und *Langer* (1984) äußerten den Verdacht, dass mehr als ein α_1 -Adrenozeptorsubtyp an der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie beteiligt sei. Experimentell konnte ebenso gezeigt werden, dass postsynaptische α_2 -Adrenozeptoren in die Kontraktion der Rattenschwanzarterie involviert sind. Diese spielen allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da relevante kontraktile Effekte durch α_2 -Adrenozeptoragonisten nur in vorkontrahierten Gefäßen beobachtet werden konnten (*Templeton et al.*, 1989; *MacLean & McGrath*, 1990).

Mit Hilfe des selektiven α_{1A} -Adrenozeptoragonisten A-61603 und diverser α_1 -Adrenozeptorantagonisten, einschließlich der α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten RS-17053, SNAP 5089 und Tamsulosin, konnte die Beteiligung von α_{1A} -Adrenozeptoren an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie gezeigt werden (*Lachnit et al.*, 1997). Eine zusätzliche Beteiligung der α_1 -Adrenozeptorsubtypen B und D an der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie ließ sich durch die Unwirksamkeit des selektiven α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 und des bevorzugt α_{1B} -Adrenozeptor alkylierenden Reagenzes Chloroethylclonidin (10 μM) mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen (*Piasek et al.*, 1995; *Hrometz et al.*, 1999).

Dem gegenüber standen Beobachtungen, dass höhere Konzentrationen Chloroethylclonidin (100 μM) zu einer partiellen Hemmung der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion führen (*Villalobos-Molina et al.*, 1998). Auch die Beobachtung von *Lachnit et al.* (1997), dass der α_{1A} -Adrenozeptorantagonist RS-17053 zu einer monophasischen Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von A-61603, jedoch zu einer biphasischen Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin führt, sprach für die Beteiligung eines weiteren α_1 -Adrenozeptors an der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war daher die weitere funktionelle Identifizierung der an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie beteiligten α_1 -Adrenozeptorsubtypen unter Verwendung subtypselektiver Liganden, der Korrelationsanalyse sowie der selektiven Rezeptorprotektion und Rezeptorinaktivierung. Zu diesem Zweck wurde u.a. ein neuer, selektiver α_{1A} -Adrenozeptorantagonist, B8805-033, eingesetzt. Diese Substanz, ein Abkömmling des Antihypertensivums Urapidil, zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu rekombinanten und nativen

α_{1A} -Adrenozeptoren verschiedener Spezies aus (pK_i , $pK_B = 7,7 - 8,7$), während seine Affinität zu α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren gering ist ($pK_i < 5,6$ bzw. $pK_i < 5,5$; Eltze *et al.*, 2001a). Ein weiteres Ziel war die Etablierung eines Testsystems zur Charakterisierung α_1 -Adrenozeptor-vermittelter vaskulärer Effekte neuer Arzneistoffe.

3.1.1.1. Effekte von Noradrenalin

Noradrenalin verursachte eine konzentrationsabhängige Kontraktion der Rattenschwanzarterie. Die $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin war scheinbar monophasisch ($pEC_{50} = 6,47 \pm 0,03$, $E_{max} = 7,3 \pm 0,4$ mN, $n_H = 0,85 \pm 0,02$, $n = 61$). Wie auch nach Zugabe von RS-17053 (Lachnit *et al.*, 1997) zeigte die $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin in Anwesenheit steigender Konzentrationen des selektiven α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 (0,03 – 3 μ M) einen biphasischen Verlauf (Abb. 24).

Eine Untersuchung der durch B8805-033 induzierten Rechtsverschiebung der 2. Phase der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin ergab mit Hilfe der Schild-Regressionsanalyse basierend auf der Änderung der pEC_{75} -Werte einen pA_2 -Wert von $8,06 \pm 0,05$ mit einem Geradenanstieg von $1,07 \pm 0,07$ (nicht signifikant von 1 verschieden). Die somit ermittelte Affinität dieses Antagonisten lag im gleichen Bereich wie die Affinität des Liganden zu nativen α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters ($pK_B = 8,4$) und des Rattenkortex ($pK_i = 8,7$) sowie zu rekombinanten humanen α_{1A} -Adrenozeptoren ($pK_i = 7,7$) (Eltze *et al.*, 2001a).

Basierend auf diesen Ergebnissen unter Verwendung des selektiven α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 konnten die Thesen von Lachnit *et al.* (1997) bestätigt werden: Auf Grund der biphasischen Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin durch B8805-033 ist die Involvierung von mehr als einem α_1 -Adrenozeptorsubtyp anzunehmen. Der ermittelte pA_2 -Wert für B8805-033 deutet u.a. auf eine Beteiligung von α_{1A} -Adrenozeptoren an der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie hin.

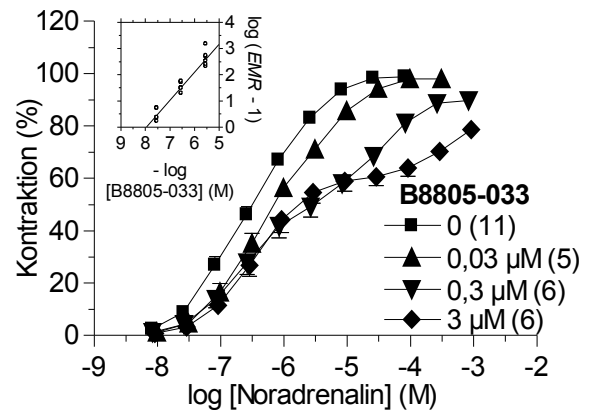


Abb. 24. Antagonisierung der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch steigende Konzentrationen B8805-033 (0,03 – 3 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. Mit Hilfe der auf dem Vergleich der pEC_{75} -Werte beruhenden Schild-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildung) wurde ein pA_2 -Wert von $8,06 \pm 0,05$ bei einem Anstieg der Ausgleichsgeraden im Schild-Plot von $1,07 \pm 0,07$ (nicht signifikant von 1 verschieden) ermittelt.

3.1.1.2. Experimente nach α_{1A} -Adrenozeptorblockade

Das Ziel dieser Untersuchungen war, die B8805-033-insensitive Komponente der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Experimente in permanenter Gegenwart des selektiven α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 (3 μM) durchgeführt. Diese Konzentration führt zu einer etwa 99,9%igen Blockade von α_{1A} -Adrenozeptoren (basierend auf einem pK_B -Wert von 8,40 am Rattensamenleiter; Eltze *et al.*, 2001a), während α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren nicht oder nur partiell beeinflusst werden (pK_B -Wert von 5,21 an der Meerschweinchenmilz bzw. 5,52 an der Rattenaorta; Eltze *et al.*, 2001a).

Agonisten: In permanenter Anwesenheit des α_{1A} -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 (3 μM) verursachte Noradrenalin eine konzentrationsabhängige Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($\text{pEC}_{50} = 6,55 \pm 0,02$, $E_{\text{max}} = 4,1 \pm 0,2 \text{ mN}$, $n_H = 0,99 \pm 0,01$, $n = 130$). Auch Phenylephrin und Brimonidin konnten als Agonisten identifiziert werden (Abb. 25). Die kontraktile Effekte von Noradrenalin und Phenylephrin waren mit Hilfe des irreversiblen α_{1B} -Adrenozeptorantagonisten Chloroethylclonidin (100 μM) und des kompetitiven α_{1B} -Adrenozeptorantagonisten L-765314 (0,3 μM) inhibierbar (Tab. 4).

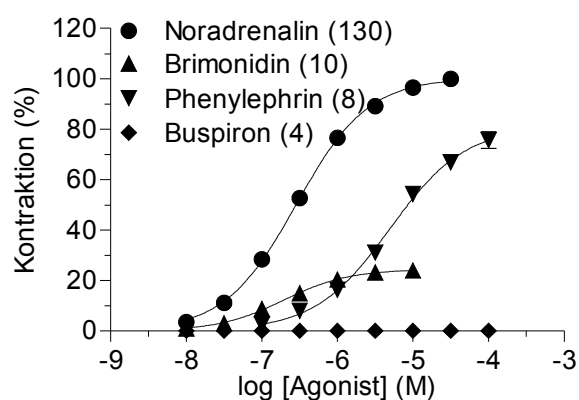


Abb. 25. Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch Noradrenalin, Brimonidin, Phenylephrin und Bupiron in permanenter Gegenwart von B8805-033 (3 μM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten.

Die von Brimonidin hervorgerufenen Kontraktionen wurden nur durch Chloroethylclonidin (100 μM), aber nicht durch L-765314 (0,3 μM) antagonisiert (Tab. 4). Somit befindet sich, im Gegensatz zu Noradrenalin und Phenylephrin, die durch Brimonidin vermittelte Kontraktion der Rattenschwanzarterie unter diesen experimentellen Bedingungen nicht im Einklang mit einer Aktivierung von α_{1B} -Adrenozeptoren. Für die durch Brimonidin vermittelten kontraktile Effekte ist nach Durchbrechung der Blockade durch das im Organbad vorhandene Idazoxan (0,1 μM ; pK_i (α_2 -Adrenozeptoren) = 7,92 – 9,25; PDSP Database: <http://kidb.cwru.edu/>) eine Aktivierung postsynaptischer α_2 -Adrenozeptoren denkbar, die in diesem Gewebe vorkommen (Templeton *et al.*, 1989; MacLean & McGrath, 1990). Die durch α_2 -Adrenozeptoren vermittelten Effekte sind durch Chloroethylclonidin, das ebenfalls α_2 -Adrenozeptoren irreversibel blockiert, hemmbar, aber nicht durch L-765314 (Michel *et al.*, 1993; Patane *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu Noradrenalin, Phenylephrin und Brimonidin führte der postulierte selektive α_{1D} -

Adrenozeptoragonist Buspiron zu keiner Kontraktion der Rattenschwanzarterie (Abb. 25). Aus der Unwirksamkeit von Buspiron kann geschlossen werden, dass an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie im Gegensatz zur Kontraktion der Rattenaorta keine α_{1D} -Adrenozeptoren beteiligt sind. Diese Aussage wird durch Erkenntnisse bestätigt, die mit Hilfe des α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 gewonnen wurden (Piascik *et al.*, 1995).

Tab. 4. Pharmakologische Eigenschaften von α_1 -Adrenozeptoragonisten an der Rattenschwanzarterie in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M).

	<i>pEC₅₀</i> (<i>n</i>)	<i>E_{max}</i>	<i>Hemmung durch Chloroethylclonidin (%)^a</i>	<i>Hemmung durch L-765314 (pK_B)^b</i>
Noradrenalin	6,55 ± 0,02 (130)	100	83 ± 4 (4)	7,36 ± 0,12 (7)
Phenylephrin	5,31 ± 0,05 (8)	81 ± 3	76 ± 3 (4)	7,44 ± 0,08 (4)
Buspiron	– (4)	0	–	–
Brimonidin	6,64 ± 0,10 (10)	24 ± 3	86 ± 8 (4)	< 6,5 (5)

^aRelative Hemmung der Kontraktion durch 100 μ M Chloroethylclonidin bei 10 μ M Agonist. ^bScheinbarer pK_B-Wert berechnet für 0,3 μ M L-765314.

Antagonisten: Die in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) durch Noradrenalin induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie konnte durch Prazosin, Tamsulosin, WB 4101, Spiperon, L-765314, 5-Methylurapidil, BMY 7378 und MDL 73005EF antagonisiert werden. Der Maximaleffekt von Noradrenalin blieb in Gegenwart dieser Antagonisten unbeeinflusst (Abb. 26). Die *Schild*-Regressionsanalyse für diese Antagonisten zeigte eine Linearität zwischen log (*EMR*-1) und dem negativen dekadischen Logarithmus der molaren Antagonistenkonzentration mit einem Anstieg von 1 (Abb. 28). Somit konnte für diese Liganden ein kompetitiver Antagonismus bestätigt werden. Im Gegensatz dazu führte RS-17053 neben einer Rechtsverschiebung der *E/[A]*-Kurve von Noradrenalin konzentrationsabhängig zu einer Depression des Maximaleffekts (Abb. 27).

Alle im Rahmen dieser Untersuchungen getesteten Antagonisten (mit Ausnahme von Prazosin) sind geeignet, zwischen den α_1 -Adrenozeptorsubtypen zu unterscheiden. Die Identität des unter diesen experimentellen Bedingungen für die Noradrenalin-induzierte Kontraktion verantwortlichen α_1 -Adrenozeptorsubtyps wurde mit Hilfe der Korrelationsanalyse ermittelt.

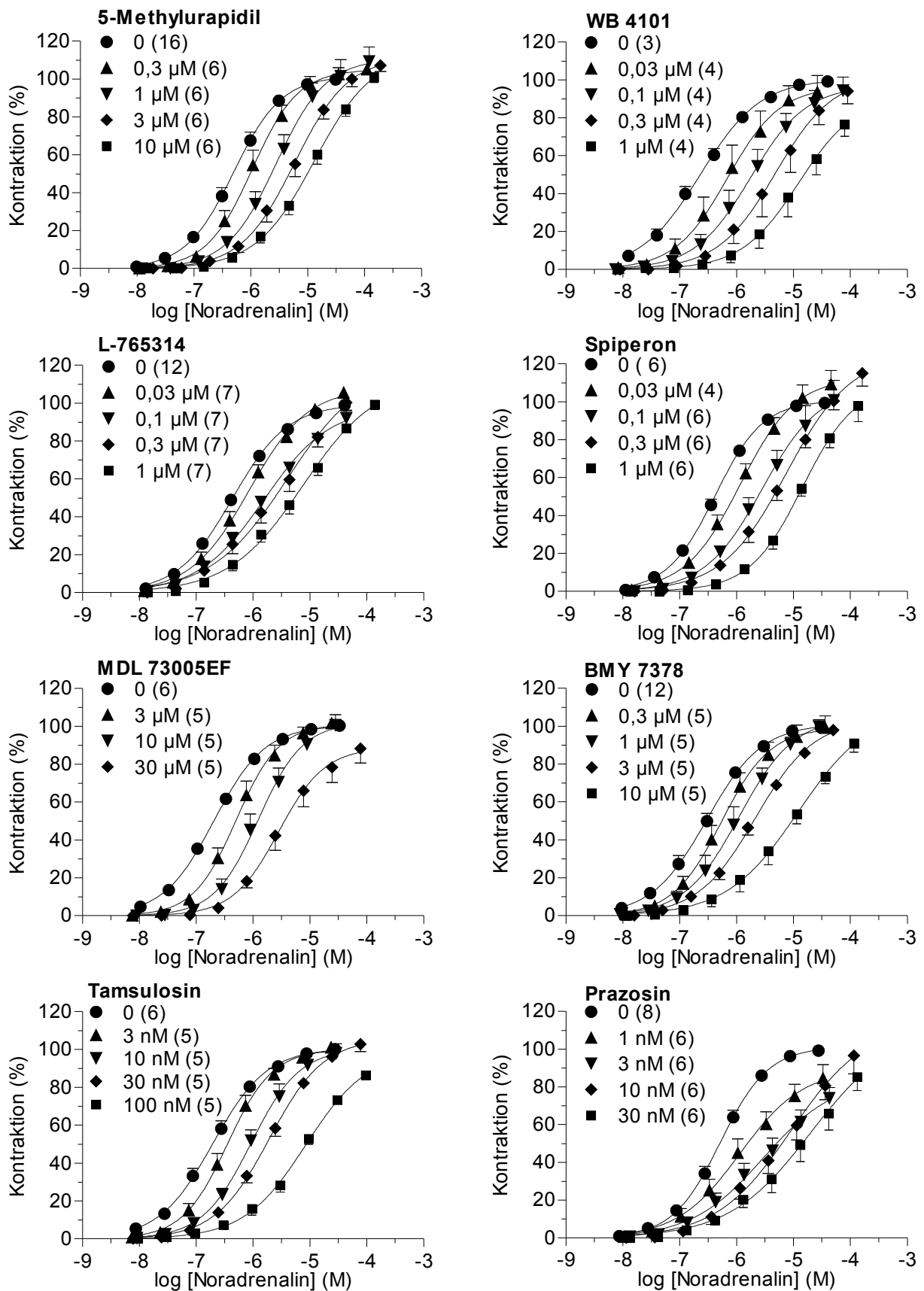


Abb. 26. Antagonisierung der durch Noradrenalin in Gegenwart von B8805-033 (3 μM) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch steigende Konzentrationen kompetitiver Antagonisten (5-Methylurapidil, WB 4101, L-765314, Spiperon, MDL 73005EF, BM Y 7378, Tamsulosin und Prazosin). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten.

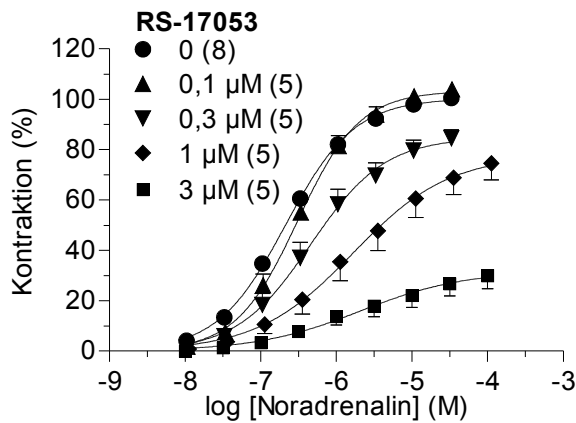


Abb. 27. Nichtkompetitive Antagonisierung der durch Noradrenalin in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch steigende Konzentrationen RS-17053. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten.

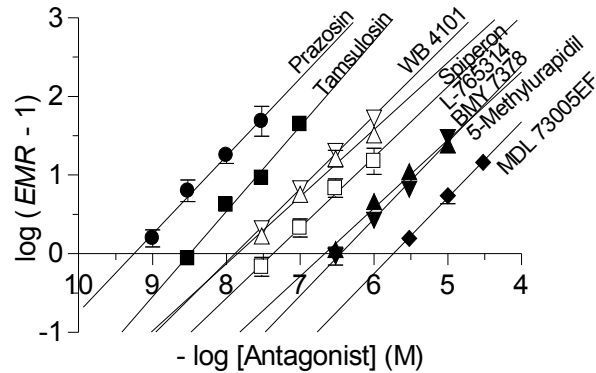


Abb. 28. Schild Plots von Prazosin, Tamsulosin, WB 4101, Spiperon, L-765314, BMY 7378, 5-Methylurapidil und MDL 73005EF in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M).

Die in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) ermittelten pK_B -Werte für die untersuchten α_1 -Adrenozeptorantagonisten korrelierten sehr gut mit ihren Radioligandbindungswerten (pK_i) an rekombinanten humanen α_{1B} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0,87$, $P = 0,0002$) sowie mit funktionell ermittelten antagonistischen Potenzen (pA_2) an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz ($r^2 = 0,97$, $P < 0,0001$) und der Mäusemilz ($r^2 = 0,96$, $P = 0,0001$). Keine Korrelation bestand hingegen zu publizierten Radioligandbindungsaffinitäten zu rekombinanten humanen α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0,41$, $P > 0,05$ bzw. $r^2 = 0,40$, $P > 0,05$) sowie zu funktionell ermittelten pA_2 -Werten an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters ($r^2 = 0,45$, $P > 0,05$) und an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta (Eltze, 1996; Eltze *et al.*, 2002; $r^2 = 0,42$, $P > 0,05$) (Tab. 5, Abb. 29).

In diesem Zusammenhang ist die beobachtete geringe antagonistische Potenz des α_{1B} -Adrenozeptorantagonisten L-765314 erwähnenswert. Der ermittelte pK_B -Wert ($pK_B = 7,31$) liegt um 1,0 bzw. 1,4 logarithmische Einheiten niedriger als die mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien ermittelten pK_i -Werte an rekombinanten α_{1B} -Adrenozeptoren der Ratte ($pK_i = 8,27$) und des Menschen ($pK_i = 8,70$). Andererseits stimmte der an der Rattenschwanzarterie ermittelte pK_B -Wert gut mit der funktionell ermittelten antagonistischen Potenz des Liganden an nativen α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenmilz ($pA_2 = 7,55$; Chang *et al.*, 1998b), der Meerschweinchenmilz ($pA_2 = 7,22$; Eltze *et al.*, 2002) und der Kaninchenaorta ($pA_2 = 7,27$; Eltze *et al.*, 2002) überein. Ähnliche Diskrepanzen zwischen funktionell ermittelten Affinitäten aus Experimenten an isolierten Organen und Radioligandbindungsaffinitäten zu rekombinanten Rezeptoren wurden bereits zuvor für die postulierten α_{1B} -Adrenozeptorantagonisten AH11110A und (+)-Cystazosin beschrieben (Stam *et al.*,

Tab. 5. Ermittelte Affinitätsdaten für α_1 -Adrenozeptorantagonisten gegen Noradrenalin an der Rattenschwanzarterie in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) und Korrelation mit publizierten Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen α_1 -Adrenozeptoren.

	<i>Rattenschwanzarterie</i>		<i>Radioligandbindungsaffinitäten^a</i>		
	<i>pK_B (n)</i>	<i>m</i>	<i>α_{1a}</i>	<i>α_{1b}</i>	<i>α_{1d}</i>
5-Methylurapidil	6,55 ± 0,04 (24)	0,87 ± 0,07	8,58	6,97	7,49
BMY 7378	6,43 ± 0,04 (20)	0,98 ± 0,08	6,37	6,78	8,63
L-765314	7,31 ± 0,06 (26)	0,91 ± 0,11	6,38	8,70	7,47
MDL 73005EF	5,71 ± 0,04 (15)	0,96 ± 0,11	6,10	6,88	8,16
Prazosin	9,24 ± 0,07 (23)	0,99 ± 0,12	9,42	9,53	9,57
RS-17053	6,55 ± 0,17 ^b (4)	–	8,95	7,53	7,60
Spiperon	7,69 ± 0,04 (24)	0,86 ± 0,07	7,03	8,24	7,38
Tamsulosin	8,55 ± 0,04 (20)	1,09 ± 0,06	10,38	9,50	10,04
WB 4101	7,81 ± 0,02 (16)	0,93 ± 0,04	9,43	8,22	9,05
<i>r</i> ²			0,41	0,87	0,40
<i>P</i>			> 0,05	0,0002	> 0,05

^aMittelwerte von publizierten Radioligandbindungsdaten (pK_i) an klonierten humanen α_1 -Adrenozeptorsubtypen von Buckner *et al.* (1996), Eltze *et al.* (2001a), Ford *et al.* (1997), Goetz *et al.* (1994), Kenny *et al.* (1995, 1996), Patane *et al.* (1998), Saussy *et al.* (1996), Taniguchi *et al.* (1997) und Zhang *et al.* (1999). ^bUnüberwindbarer Antagonismus (siehe Abb. 27). Scheinbarer pK_B von RS-17053 berechnet anhand einer Konzentration, die nahezu keine Depression des Maximaleffekts von Noradrenalin verursachte (0,3 μ M).

1998; Eltze *et al.*, 2001b). Derartige Differenzen können u.a. anhand unterschiedlicher Diffusionsbarrieren in den für funktionelle Experimente genutzten nativen Geweben einerseits und andererseits in den für Experimente mit rekombinanten Rezeptoren genutzten Zellkulturen erklärt werden. Ein diffusionsbedingtes temporales Inäquilibrium zwischen Antagonist und Rezeptor, speziell in funktionellen Experimenten an isolierten Organen, kann zu einer Unterschätzung des pK_B -Wertes führen (Kenakin, 1993). Eine weitere mögliche Erklärung ist eine unterschiedlich starke Konkurrenz des Antagonisten mit dem Agonisten (funktionelle Studien) bzw. mit dem Radioliganden (Radioligandbindungsstudien) durch Besetzung zumindest partiell unterschiedlicher Bindungsstellen am Rezeptor. Eine Beteiligung eines weiteren Rezeptors an der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie in Gegenwart von B8805-033 erscheint unwahrscheinlich, da der *Hill*-Koeffizient n_H von Noradrenalin nicht signifikant von 1,00 verschieden war. Die Steigungen der Regressionsgeraden im *Schild*-Plot, einschließlich der von

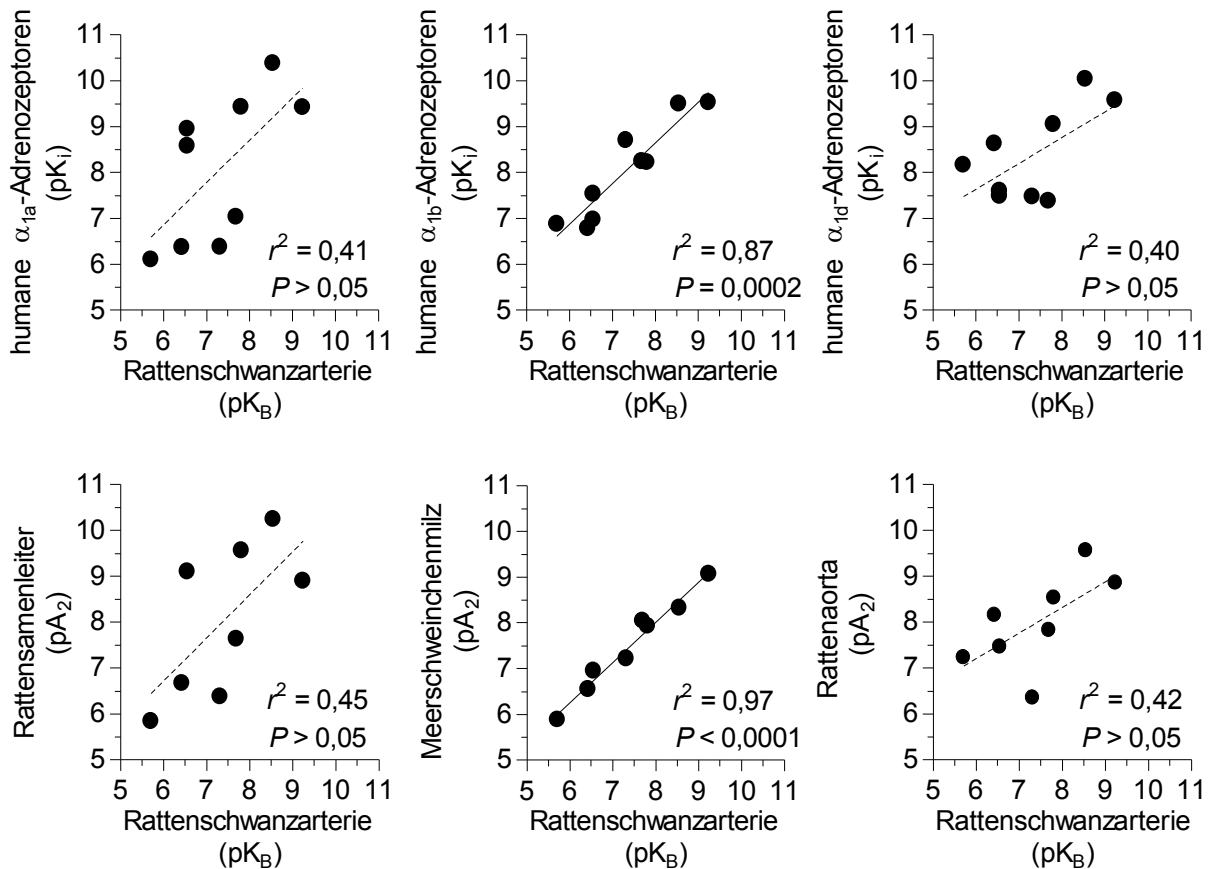


Abb. 29. Korrelation zwischen ermittelten Ligand-Rezeptor-Dissoziationskonstanten (pK_B) für α_1 -Adrenozeptorantagonisten, die in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) gegen Noradrenalin an der Rattenschwanzarterie ermittelt wurden, und Radioligandbindungsdaten (pK_i) an rekombinanten humanen α_1 -Adrenozeptorsubtypen bzw. antagonistischen Potenzen (pA_2) aus funktionellen Experimenten am Rattensamenleiter, an der Meerschweinchenmilz und an der Rattensaorta.

L-765314, von 1,00 sprachen ebenfalls für eine Noradrenalin-induzierte Aktivierung einer einheitlichen α_{1B} -Adrenozeptorpopulation.

Die Rattenschwanzarterie als funktioneller Assay: Es konnte mit Hilfe von Agonisten und Antagonisten gezeigt werden, dass die Rattenschwanzarterie in permanenter Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) ein geeigneter funktioneller *In-vitro*-Assay zur Charakterisierung α_{1B} -Adrenozeptorvermittelter Effekte ist. Andere Adrenozeptoren, insbesondere α_{1A} -Adrenozeptoren, spielen unter diesen experimentellen Bedingungen nur bei sehr hohen Agonistenkonzentrationen eine Rolle ($[\text{Noradrenalin}] \geq 100 \mu\text{M}$). Für die Untersuchung von Antagonisten steht somit ein Konzentrationsfenster von 1 – 1,5 logarithmischen Einheiten zur Verfügung.

3.1.1.3. Experimente nach α_{1B} -Adrenozeptorinaktivierung

Das Ziel dieser Experimente war die nähere Untersuchung der B8805-033-empfindlichen Komponente der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin (Abb. 24). Zu diesem Zweck wurden die für die B8805-033-unempfindliche Komponente der Kontraktion verantwortlichen α_{1B} -Adrenozeptoren (siehe Kapitel 3.1.1.2.) mit Hilfe des bevorzugt α_{1B} -Adrenozeptoren alkylierenden Reagenzes Chloroethylclonidin (100 μ M) deaktiviert. Da aber die Selektivität dieser Substanz limitiert ist und in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit auch α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptoren irreversibel blockiert werden (Michel *et al.*, 1993; Docherty & O'Rourke, 1997; Xiao & Jeffries, 1998), wurden die Organe zwecks Protektion von α_{1A} -Adrenozeptoren vor der Alkylierung mit B8805-033 (3 μ M) behandelt.

Agonisten: Nach einer Adrenozeptor-Inaktivierung mit Hilfe von Chloroethylclonidin (100 μ M) kombiniert mit einer vorausgegangenen selektiven Protektion des α_{1A} -Adrenozeptors mittels B8805-033 (3 μ M) führte Noradrenalin zu einer konzentrationsabhängigen Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($pEC_{50} = 6,14 \pm 0,02$, $E_{max} = 6,1 \pm 0,2$ mN, $n_H = 0,93 \pm 0,01$, $n = 95$).

Agonistische Effekte konnten auch für A-61603, Phenylephrin und Brimonidin beobachtet werden (Abb. 30). Die $E/[A]$ -Kurven von Noradrenalin, A-61603, Phenylephrin und Brimonidin waren in Anwesenheit von B8805-033 (0,1 μ M) signifikant nach rechts verschoben. Die aus diesen Rechtsverschiebungen

ermittelten scheinbaren pK_B -Werte für B8805-033 von 7,50 – 7,95 (Tab. 6) waren vergleichbar mit dem in der Literatur beschriebenen Wert für B8805-033 an α_{1A} -Adrenozeptoren (Eltze *et al.*, 2001a). Somit stehen unter diesen experimentellen Bedingungen nicht nur die durch A-61603, Noradrenalin und Phenylephrin vermittelten kontraktile Effekte in Einklang mit einer Aktivierung von α_{1A} -Adrenozeptoren, sondern auch die durch Brimonidin induzierte schwache Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($E_{max} = 13 \pm 2$; $n = 4$). Obwohl Brimonidin als α_2 -Adrenozeptor-selektiv gilt, sind in der Literatur auch (partial-) agonistische Effekte dieser Substanz an α_1 -Adrenozeptoren beschrieben worden. So aktiviert Brimonidin sowohl α_1 - als auch α_2 -Adrenozeptoren in humanen Resistenzarterien der Haut (Jarajapu *et al.*, 2001a).

Im Gegensatz zu Noradrenalin, A-61603, Phenylephrin und Brimonidin konnte der α_{1D} -

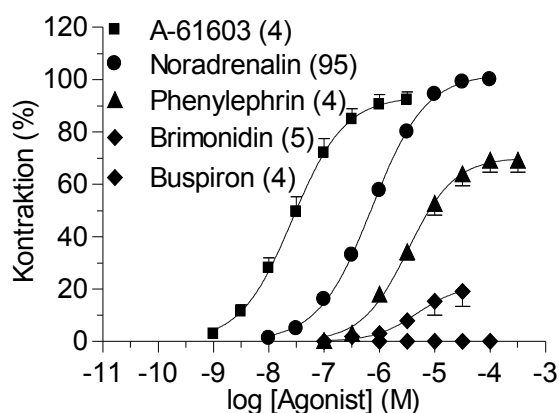


Abb. 30. Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch A-61603, Noradrenalin, Brimonidin, Phenylephrin und Bupirofen nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μ M) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten.

Tab. 6. Pharmakologische Eigenschaften von α_1 -Adrenozeptoragonisten an der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM).

	pEC_{50} (n)	E_{max}	Hemmung durch B8805-033 (pK_B) ^a
A-61603	7,57 \pm 0,09 (4)	93 \pm 3	7,77 \pm 0,11 (4)
Noradrenalin	6,14 \pm 0,02 (95)	100	7,84 \pm 0,05 (5)
Phenylephrin	5,48 \pm 0,03 (4)	70 \pm 4	7,95 \pm 0,03 (4)
Buspiron	– (4)	0	–
Brimonidin	5,28 \pm 0,07 (4)	13 \pm 2	7,5 \pm 0,2 (5) ^b

^aScheinbarer pK_B -Wert berechnet für 0,1 μM B8805-033. ^bDurch Extrapolation ermittelter Schätzwert, da die $E/[A]$ -Kurve bei 30 μM Brimonidin kein Plateau erreichte.

Adrenozeptoragonist Buspiron die Rattenschwanzarterie auch unter diesen experimentellen Bedingungen nicht kontrahieren (Abb. 30). Eine Beteiligung von α_{1D} -Adrenozeptoren an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie kann somit ausgeschlossen werden.

Antagonisten: Die durch Noradrenalin induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie wurde nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM) konzentrationsabhängig durch Tamsulosin, 5-Methylurapidil, RS-17053, B8805-033, L-765314 und BMY 7378 ohne signifikante Depression des Maximaleffekts antagonisiert (Abb. 31). Die *Schild*-Regressionsanalyse für 5-Methylurapidil, RS-17053, B8805-033, L-765314 und BMY 7378 zeigte eine Linearität zwischen $\log(EMR-1)$ und der Antagonistenkonzentration auf. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden im *Schild*-Plot waren nicht signifikant von 1,00 verschieden (Abb. 32). Somit konnte ein kompetitiver Antagonismus für diese Antagonisten bestätigt werden. Die für diese Substanzen ermittelten Affinitätsdaten sind in Tabelle 7 angegeben.

Für Tamsulosin hingegen wurde im *Schild*-Plot eine Steigung, die signifikant größer als 1 war, gefunden ($m = 1,34 \pm 0,14$, $pA_2 = 10,10 \pm 0,07$). Dies spricht für eine unvollständige Äquilibrierung zwischen Agonist und Antagonist, was charakteristisch für eine nicht ausreichend lange Inkubation sehr niedriger Konzentrationen hochpotenter Antagonisten ist (Kenakin, 1993). Auf eine weitere Verlängerung der bereits 120-minütigen Inkubationszeit wurde verzichtet. Wurde die *Schild*-Regressionsanalyse hingegen unter Ausschluss der niedrigsten Antagonistenkonzentration (0,03 nM) durchgeführt, so konnte ein pK_B -Wert von $10,32 \pm 0,05$ bei einer Steigung der Ausgleichsgeraden des *Schild*-Plots von $1,17 \pm 0,12$ (nicht signifikant von 1 verschieden) ermittelt werden (Tab. 7).

Da somit die Steigungen der *Schild*-Regressionsgeraden aller untersuchten Antagonisten nicht

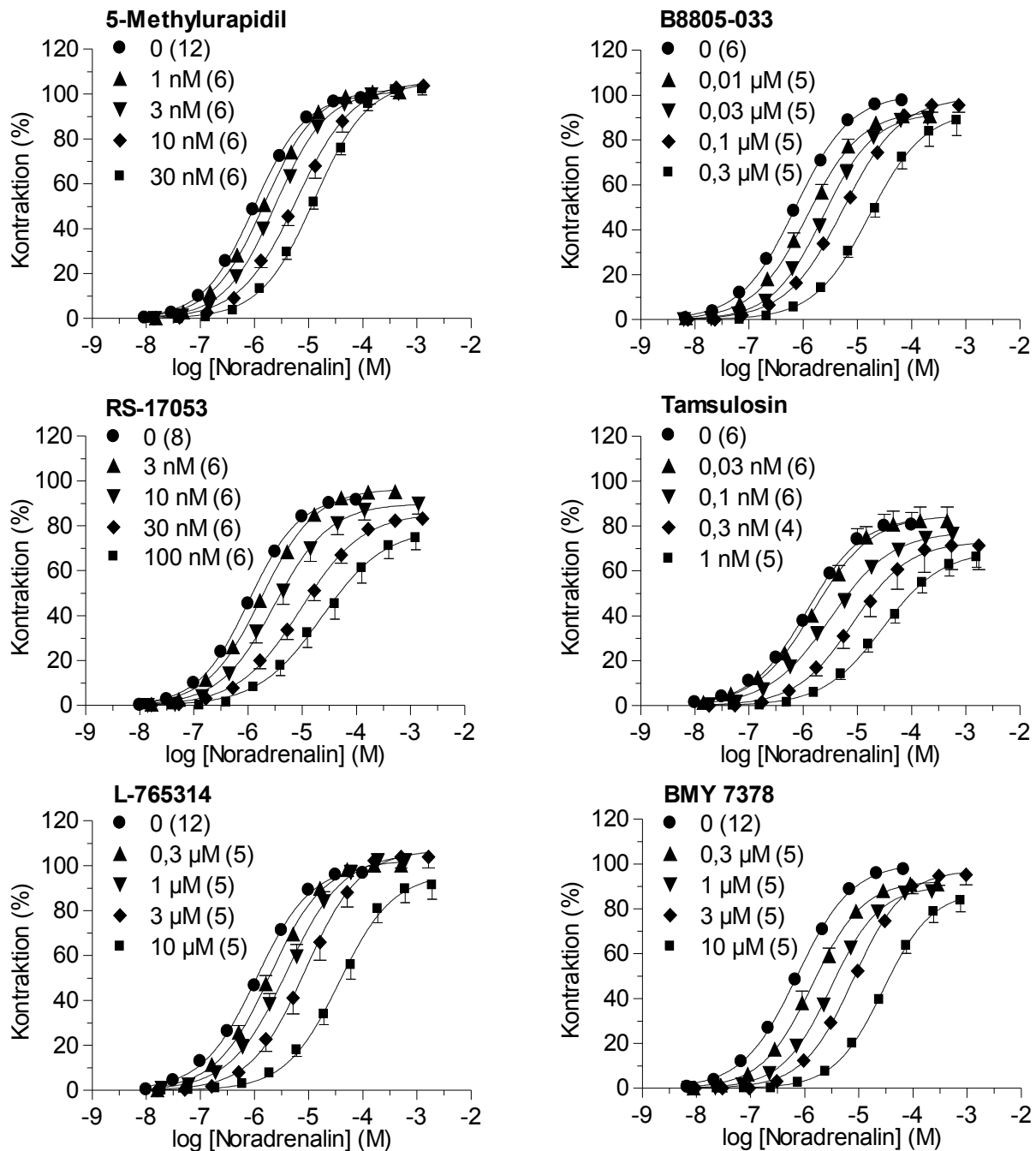


Abb. 31. Antagonisierung der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM) durch steigende Konzentrationen 5-Methylurapidil, B8805-033, RS-17053, Tamsulosin, L-765314 und BMY 7378. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten.

signifikant von 1,00 verschieden waren, ist anzunehmen, dass eine einheitliche Rezeptorpopulation für die Kontraktion der Rattenschwanzarterie unter diesen experimentellen Bedingungen verantwortlich ist. Die Identität dieser Rezeptoren wurde mit Hilfe der Korrelationsanalyse ermittelt.

Die nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM) mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse ermittelten Ligand-Rezeptor-Dissoziationskonstanten (pK_B) korrelierten mit Radioligandbindungsdaten (pK_i) an

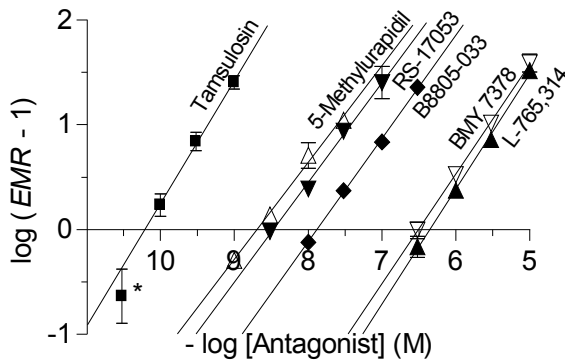


Abb. 32. Schild-Plots von Tamsulosin, 5-Methylurapidil, RS-17053, B8805-033, BMY 7378 und L-765314 an der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mittels Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM). * Der log (EMR-1)-Wert von Tamsulosin (0,03 nM) wurde von der Schild-Regressionsanalyse auf Grund nicht ausreichender Äquibrierung ausgeschlossen (siehe Text).

rekombinanten humanen α_{1a} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0,98$; $P = 0,0002$) und mit funktionell ermittelten pA_2 -Werten an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters ($r^2 = 0,97$; $P = 0,002$; Eltze, 1996; Eltze *et al.*, 2001a, 2002) (Abb. 33). Ebenso lagen die unter diesen experimentellen Bedingungen für 5-Methylurapidil, BMY 7378, RS-17053 und Tamsulosin bestimmten pK_B -Werte (8,66, 6,54, 8,44 und 10,32) im gleichen Konzentrationsbereich wie die von Lachnit *et al.* (1997) an der Rattenschwanzarterie unter Verwendung des selektiven α_{1A} -Adrenozeptoragonisten A-61603 bestimmten pA_2 -Werte (9,0, 6,3, 9,2 und 11,2). Keine Korrelation bestand hingegen zu Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen α_{1b} - oder α_{1d} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0,11$; $P > 0,05$ bzw. $r^2 = 0,16$; $P > 0,05$) sowie zu funktionell ermittelten Affinitätsdaten an α_{1B} -

Tab. 7. Ermittelte Affinitätsdaten für α_1 -Adrenozeptorantagonisten gegen Noradrenalin an der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM) und Korrelation mit publizierten Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen α_1 -Adrenozeptoren.

	<i>Rattenschwanzarterie</i>		<i>Radioligandbindungsaffinitäten^a</i>		
	pK_B	m	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
5-Methylurapidil	8,66 \pm 0,04 (24)	0,93 \pm 0,07	8,58	6,97	7,49
B8805-033	7,87 \pm 0,02 (20)	0,99 \pm 0,04	7,71	5,16	5,49
BMY 7378	6,54 \pm 0,04 (20)	1,05 \pm 0,06	6,37	6,78	8,63
L-765314	6,41 \pm 0,03 (20)	1,10 \pm 0,06	6,38	8,70	7,47
RS-17053	8,44 \pm 0,04 (24)	0,95 \pm 0,07	8,95	7,53	7,60
Tamsulosin	10,32 \pm 0,05 (15)	1,17 \pm 0,12	10,38	9,50	10,04
r^2			0,98	0,11	0,16
P			0,0002	> 0,05	> 0,05

^aMittelwerte von publizierten Radioligandbindungsdaten (pK_i) an klonierten humanen α_1 -Adrenozeptorsubtypen aus Buckner *et al.* (1996), Eltze *et al.* (2001a), Ford *et al.* (1997), Goetz *et al.* (1994), Kenny *et al.* (1995, 1996), Patane *et al.* (1998), Saussy *et al.* (1996), Taniguchi *et al.* (1997) und Zhang *et al.* (1999).

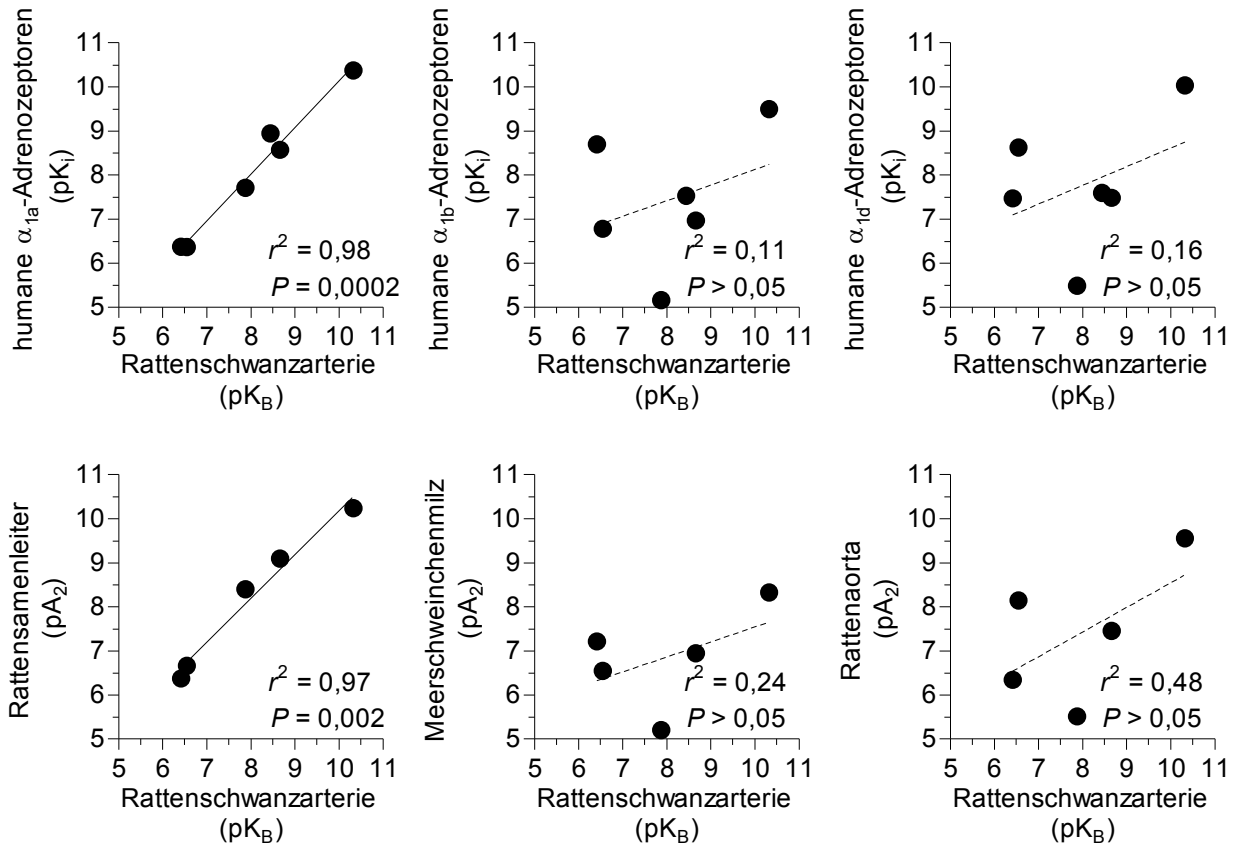


Abb. 33. Korrelation zwischen ermittelten Affinitätsdaten (pK_B) für α₁-Adrenozeptorantagonisten gegen Noradrenalin nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μM) an der Rattenschwanzarterie und Radioligandbindungsaffinitäten (pK_i) an rekombinanten humanen α₁-Adrenozeptorsubtypen sowie zu Affinitäten aus funktionellen Experimenten am Rattensamenleiter, an der Meerschweinchenmilz und der Rattenaorta.

Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz ($r^2 = 0,24$; $P > 0,05$) und an α_{1D}-Adrenozeptoren der Rattenaorta ($r^2 = 0,48$; $P > 0,05$) (Abb. 33).

Der niedrige pK_B-Wert von L-765314, der im Rahmen dieser Arbeit nach irreversibler Blockade der α_{1B}-Adrenozeptoren gefunden wurde (pK_B = 6,41), stimmt mit dem von Chang *et al.* (1998b) funktionell an nativen α_{1A}-Adrenozeptoren ermittelten Wert überein (pK_B = 6,38). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Noradrenalin die Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 exklusiv über eine Aktivierung von α_{1A}-Adrenozeptoren kontrahiert.

Die Rattenschwanzarterie als funktioneller Assay: Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Rattenschwanzarterie nach einer Vorbehandlung mit Chloroethylclonidin (100 μM) und B8805-033 (3 μM) als ein funktioneller *In-vitro*-Assay zur selektiven Charakterisierung α_{1A}-Adrenozeptor-vermittelter Effekte herangezogen werden kann.

3.1.1.4. Physiologische Bedeutung

Die Rattenschwanzarterie weist einen äußeren Durchmesser von ca. 0,3 – 0,6 mm und einen luminalen Durchmesser von $\leq 0,3$ mm auf. Berücksichtigt man nur Größe und Histologie dieses Gefäßes, so unterscheidet es sich nicht nennenswert von Widerstandsgefäßen. Dem gegenüber besitzt die Schwanzarterie die Funktion eines Verteilungsgefäßes (Daly *et al.*, 2002).

Das Expressionsmuster der α_1 -Adrenozeptorsubtypen im kardiovaskulären System der Ratte variiert in Abhängigkeit von Größe und Funktion der Blutgefäße (Guarino *et al.*, 1996). Wie auch in humanen Gefäßen (Rudner *et al.*, 1999) kann eine tendenzielle Zunahme der mRNA-Expression von α_{1A} -Adrenozeptoren bei gleichzeitiger Abnahme der mRNA-Expression von α_{1D} -Adrenozeptoren mit abnehmenden Gefäßdurchmesser beobachtet werden. Auch in funktionellen Experimenten an Arterien diverser *Species* konnte gezeigt werden, dass α_{1A} -Adrenozeptoren in kleinen Blutgefäßen, wie in den an der Blutdruckregulation beteiligten Widerstandsgefäßen (z.B. Arteriolen der humanen Haut und Skelettmuskulatur; Jarajapu *et al.*, 2001a,b), dominieren (Tab. 8). Dies erscheint paradox, da die α_{1A} -Adrenozeptor-Subtypselektivität von Alphablockern, die zur Behandlung der Benigen Prostatahyperplasie eingesetzt werden (z.B. Tamsulosin), mit einer Abnahme hypotensiver Nebenwirkungen in Zusammenhang gebracht wird (Lee & Lee, 1997; Schäfers *et al.*, 1999). α_{1D} -Adrenozeptoren sind (zumindest bei Nagetieren) insbesondere für die Kontraktion großer Arterien verantwortlich (z.B. Aorta von Ratte und Maus; Yamamoto & Koike, 2001a,b; Daly *et al.*, 2002; Kenny *et al.*, 1995). Kontraktile α_{1B} -Adrenozeptoren besitzen eine deutlich geringere Bedeutung bei der Regulation des Gefäßtonus. Sie konnten funktionell bisher nur in wenigen Blutgefäßen, wie z.B. der Kaninchenaorta, nachgewiesen werden (Muramatsu *et al.*, 1998).

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, einschließlich der Korrelationsanalyse, konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass Noradrenalin die Rattenschwanzarterie über eine Aktivierung von α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren kontrahiert. Die dominierende Rolle der α_{1A} -Adrenozeptoren an der Kontraktion der Rattenschwanzarterie, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Lachnit *et al.*, 1997; Villalobos-Molina *et al.*, 1998), kann insbesondere bei höheren Noradrenalkonzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$) beobachtet werden. Kontraktile Effekte bei niedrigen Noradrenalkonzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) werden hingegen gleichermaßen von α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren vermittelt (Abb. 34). Die Abwesenheit von α_{1D} -Adrenozeptoren konnte u.a. durch die fehlende Wirksamkeit des α_{1D} -Adrenozeptoragonisten Buspiron gezeigt werden (Kapitel 3.1.1.1. – 3.1.1.3.). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit aktuellen Befunden aus Radioligandbindungsstudien, in denen zwei verschiedene, als α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren

Tab. 8. Steuerung der glattmuskulären Kontraktion in einigen Blutgefäßen bei Maus, Ratte, Kaninchen und Mensch durch α_1 -Adrenozeptorsubtypen.

<i>Blutgefäß</i>	<i>d (mm)</i>	<i>Rezeptor</i>	<i>Literatur</i>
Maus			
<i>Aorta thoracalis</i>	0,5 – 1,0	α_{1D}	Yamamoto & Koike, 2001a; Daly <i>et al.</i> , 2002
<i>A. mesenterica superior</i>	0,3 – 0,4	α_{1A} , α_{1D}	Yamamoto & Koike, 2001b; Daly <i>et al.</i> , 2002
<i>A. caudalis</i>	ca. 0,2	α_{1A}	Daly <i>et al.</i> , 2002
Ratte			
<i>Aorta thoracalis</i>	1,8 – 2,5	α_{1D}	Kenny <i>et al.</i> , 1995; Piascik <i>et al.</i> , 1995
<i>Aa. pulmonales</i>	1,0 – 1,5	α_{1D}	Hussain & Marshall, 1997
<i>A. carotis communis</i>	0,7 – 1,2	α_{1D}	Villalobos-Molina & Ibarra, 1996
<i>A. mesenterica superior</i>	0,7 – 1,0	α_{1D} , α_{1A}	Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Piascik <i>et al.</i> , 1997
<i>A. iliaca communis</i>	0,5 – 0,9	α_{1D}	Piascik <i>et al.</i> , 1995
<i>A. renalis</i>	0,4 – 0,8	α_{1A} , α_{1D}	Villalobos-Molina <i>et al.</i> , 1997; Hrometz <i>et al.</i> , 1999
<i>A. caudalis</i>	0,3 – 0,6	α_{1A} , α_{1B}	Lachnit <i>et al.</i> , 1997; Jähnichen <i>et al.</i> , 2004a
<i>A. mesenterica inferior</i>	ca. 0,3	α_{1L}	Stam <i>et al.</i> , 1999
<i>Vasa intestini tenuis</i>	ca. 0,2	α_{1A} , α_{1B}	Chen <i>et al.</i> , 1996; Piascik <i>et al.</i> , 1997
Kaninchen			
<i>Aorta thoracalis</i>	3,0 – 4,0	α_{1B}	Muramatsu <i>et al.</i> , 1998
<i>A. iliaca communis</i>	1,0 – 2,0	α_{1D}	Satoh <i>et al.</i> , 1998
<i>A. renalis</i>	1,0 – 1,5	α_{1D}	Satoh <i>et al.</i> , 1998
<i>A. auricularis posterior</i>	ca. 0,8	α_{1A}	Fagura <i>et al.</i> , 1997
Mensch			
<i>A. mammaria interna</i>	2,0 – 2,5	α_{1B} , α_{1A}	Giessler <i>et al.</i> , 2002
Widerstandsgefäße der Haut	ca. 0,2	α_{1A}	Jarajapu <i>et al.</i> , 2001a
Widerstandsgefäße der Skelettmuskulatur	ca. 0,2	α_{1A}	Jarajapu <i>et al.</i> , 2001b

identifizierte Bindungsstellen gefunden wurden (Tanaka *et al.*, 2004).

Mit diesen Untersuchungen gelang ein weiterer Beweis für die funktionelle Beteiligung von α_{1B} -Adrenozeptoren am kardiovaskulären System. Da dieser Subtyp offensichtlich keine dominierende Bedeutung besitzt und die durch ihn vermittelten Effekte durch α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptoren überlagert werden, können die durch α_{1B} -Adrenozeptoren vermittelten Effekte nur nach Ausschaltung störender Rezeptorgene (Knockout-Experimente; Daly *et al.*, 2002), nach Hemmung der Expression der „Störrezeptoren“ (Antisense-Experimente; Piascik *et al.*, 1997; Hrometz *et al.*, 1999) oder nach selektiver Blockade der „Störrezeptoren“ aufgedeckt werden (diese Arbeit).

Andererseits folgt aus dieser konkreten, wenn auch untergeordneten Beteiligung von α_{1B} -Adrenozeptoren an der Regulation des Gefäßtonus, dass eine selektive Blockade der anscheinend dominierenden α_{1A} - und α_{1D} -Adrenozeptoren nur zu einem partiellen Blutdruckabfall *in vivo* führt. Dies kann eine Erklärung für die weitgehend fehlenden hypotensiven Nebenwirkungen von Tamsulosin (Selektivität: $\alpha_{1A} > \alpha_{1D} > \alpha_{1B}$) im Gegensatz zu Alfuzosin, Terazosin und Doxazosin (Selektivität: $\alpha_{1A} = \alpha_{1D} = \alpha_{1B}$) bei der Therapie der Benigen Prostatahyperplasie sein (Lee & Lee, 1997; Schäfers *et al.*, 1999).

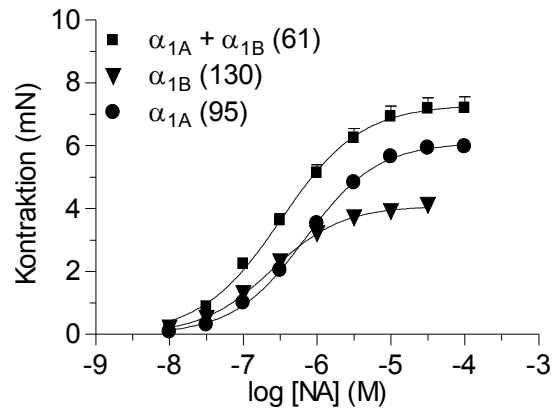


Abb. 34. Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch Noradrenalin über α_{1B} -Adrenozeptoren (in Anwesenheit von B8805-033), über α_{1A} -Adrenozeptoren (nach Vorbehandlung mit Chloroethylclonidin und B8805-033), sowie über α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren (gepoolte Kontrolldaten aus den Kapiteln 3.1.1.1. – 3.1.1.3.). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten.

3.2. 5-HT-Rezeptoren

5-HT kontrahiert Blutgefäße insbesondere über 5-HT_{2A}-Rezeptoren, über „5-HT₁-ähnliche“ Rezeptoren oder über beide Rezeptoren (Hoyer *et al.*, 1994). Welcher dieser Wege für die Vermittlung vasokontraktile Effekte verantwortlich ist, variiert dabei in Abhängigkeit von *Species* und Gewebe. Auch individuelle Unterschiede, wie z.B. an der Koronararterie des Menschen, können beobachtet werden (Kaumann *et al.*, 1994). Inzwischen konnte der vasokontraktile, historisch als „5-HT₁-ähnlich“ bezeichnete Rezeptor überwiegend als 5-HT_{1B}-Rezeptor identifiziert werden (Saxena *et al.*, 1998), wenngleich auch vereinzelt 5-HT_{1D}-Rezeptoren an der Kontraktion von Blutgefäßen beteiligt sein mögen (Akin & Gurdal, 2002; Murdoch *et al.*, 2003). Eine Zuordnung vaskulärer, durch 5-HT₁-ähnliche Rezeptoren vermittelter Effekte *a priori* zum 5-HT_{1B}-Rezeptor ist daher nicht korrekt und muss experimentell bestätigt werden (Watts & Cohen, 1999).

3.2.1. 5-HT₁-ähnliche Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader

An der Beckenschlagader des Meerschweinchens führt 5-HT nach einer moderaten Vorkontraktion mit PGF_{2α} (0,1 – 1 μM) über eine Aktivierung von Ketanserin-empfindlichen und Ketanserin-unempfindlichen Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion. Die Ketanserin-empfindliche Komponente der Kontraktion wird durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt. Die Rezeptoren, welche die Ketanserin-unempfindliche Komponente der Kontraktion vermitteln, wurden als 5-HT₁-ähnlich identifiziert (Sahin-Erdemli *et al.*, 1991; Schoeffter & Sahin-Erdemli, 1992; Pertz, 1993). Beide Komponenten der Kontraktion werden durch „stille“ Rezeptoren vermittelt (Pertz, 1993). „Stille“ 5-HT-Rezeptoren, wie sie z.B. auch in der Ohrarterie, Mesenterialarterie, Renalarterie und Beckenschlagader des Kaninchens vorkommen, sind *ex vivo* erst nach moderater Vorkontraktion mit einem geeigneten Co-Stimulanz (z.B. PGF_{2α}, U 46619, Phenylephrin, Angiotensin II oder KCl) und einer damit verbundenen Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle aktivierbar (Movahedi & Purdy, 1997; Yildiz & Tuncer, 1995a,b; Choppin & O'Connor, 1993, 1995; Smith *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2000).

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war die Charakterisierung und Identifizierung der 5-HT₁-ähnlichen Rezeptoren, welche für die 5-HT-induzierte Ketanserin-insensitive Komponente der Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader verantwortlich sind. Die folgenden Experimente wurden daher in Gegenwart von Ketanserin (1 μM) durchgeführt (siehe Methoden). Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der durch Migränetherapeutika der Klasse der Triptane hervorgerufenen vaskulären Effekte.

3.2.1.1. Rezeptoridentifizierung mit Hilfe der RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde auf mRNA-Ebene untersucht, welcher kontraktile 5-HT₁-ähnliche Rezeptor (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} oder 5-HT_{1F}) in der Beckenschlagader des Meerschweinchens exprimiert wird.

Während die mRNA für alle drei 5-HT-Rezeptoren im Gehirn des Meerschweinchens (Positivkontrolle) gefunden wurde, konnte in der Beckenschlagader lediglich ein Transkript mit Hilfe des 5-HT_{1B}-Rezeptor-Primerpaars nachgewiesen werden. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination mit genomischer DNA konnte durch Untersuchung von Negativproben (entsprechende RNA-Proben ohne Behandlung mit der Reversen Transkriptase) ausgeschlossen werden. Die Amplifikation eines Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-(G6PDH)-Transkripts (Haushaltsgen) bestätigte die Qualität der Proben und der Methode (Abb. 35).

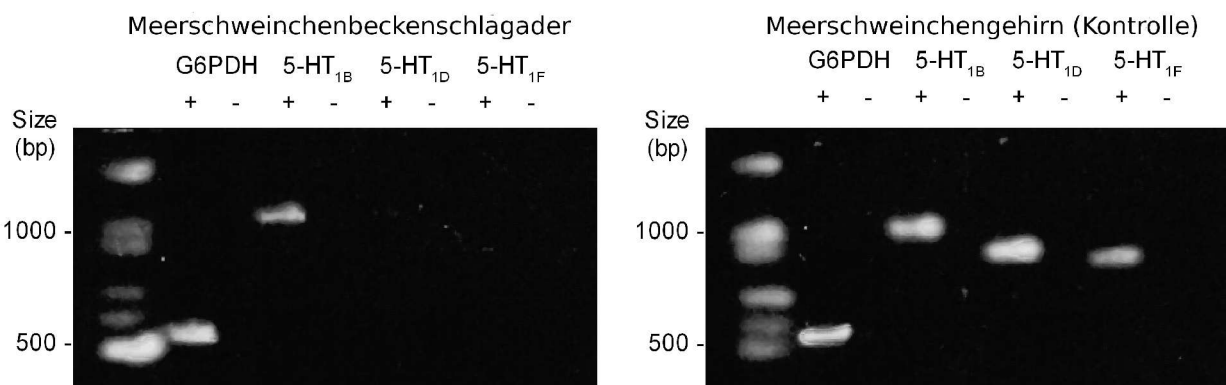


Abb. 35. Nachweis des RT-PCR-Produkts des 5-HT_{1B}-Rezeptors in der Meerschweinchenbeckenschlagader mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese. Amplifikate für 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptoren konnten in diesem Gewebe nicht detektiert werden (links). Sowohl 5-HT_{1B}- als auch 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptoren konnten hingegen im Meerschweinengehirn (Kontrolle, rechts) nachgewiesen werden. Zum Ausschluss einer Verfälschung des Ergebnisses durch genomische DNA wurden Proben ohne Behandlung mit der Reversen Transkriptase (–) mitgeführt.

3.2.1.2. Rolle des Endothels

Zur Klärung der Frage, ob die kontraktilen, durch 5-HT₁-ähnliche Rezeptoren vermittelten Effekte vom Endothel beeinflusst werden, wurden vergleichende Experimente mit 5-HT und Sumatriptan nach moderater Vorkontraktion mit PGF_{2α} (0,1 – 1 μM) an Arteriensegmenten einerseits mit intaktem und andererseits mit mechanisch entferntem Endothel durchgeführt. Zusätzlich wurden Untersuchungen in Ab- bzw. Anwesenheit eines Inhibitors (L-NAME; 200 μM) der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durchgeführt.

Nach mechanischer Entfernung des Endothels verringerte sich die durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($30 \mu\text{M}$) induzierte Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader von $12,3 \pm 0,8 \text{ mN}$ (Kontrollwert an Arteriensegmenten mit intaktem Endothel; $n = 5$) auf $6,9 \pm 1,1 \text{ mN}$ ($n = 6$; $P < 0,05$). Da nach mechanischer Entfernung des Endothels gleichzeitig die Wirksamkeit (E_{max}) von 5-HT von $6,0 \pm 1,1 \text{ mN}$ ($n = 5$) auf $1,6 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n = 5$) und von Sumatriptan von $4,6 \pm 0,8 \text{ mN}$ ($n = 5$) auf $1,7 \pm 0,7 \text{ mN}$ ($n = 5$) abnahm ($P < 0,05$), konnte geschlussfolgert werden, dass durch den Versuch der mechanischen Entfernung des Endothels auch der Gefäßmuskel beschädigt wurde. Eine Beteiligung eines „*Endothelium-derived contraction factors*“ (EDCF), wie z.B. Thromboxan (TXA_2), Prostaglandin H_2 (PGH_2), Superoxidanionen, Endothelin-1 (ET-1) oder Uridin-Adenosintetraphosphat (Vanhoutte & Katusic, 1988; Lüscher *et al.*, 1992; Jankowski *et al.*, 2005), ist unwahrscheinlich, da eine Entfernung des Endothels die Maximaleffekte aller eingesetzten Vasokonstringenzen in gleicher Weise verringerte. Im Gegensatz zur mechanischen Entfernung des Endothels zeigte der Einsatz des eNOS-Inhibitors L-NAME ($200 \mu\text{M}$) keine signifikanten Auswirkungen auf die Maximaleffekte von 5-HT und Sumatriptan sowie auf die durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzierte Kontraktion (Tab. 9). Eine Abschwächung der von 5-HT₁-ähnlichen Rezeptoren vermittelten Kontraktion durch eine simultane endotheliale Freisetzung von NO, die zuvor an den Rinderpulmonalarterien (MacLean *et al.*, 1994) sowie an der Saphenavene und an der Basilararterie des Kaninchens beschrieben wurde (Valentin *et al.*, 1996; Bhattacharya *et al.*, 2004), konnte somit an der Meerschweinchenbeckenschlagader nicht gefunden werden. Die folgenden Untersuchungen konnten daher an Arteriensegmenten mit intaktem Endothel durchgeführt werden.

Tab. 9. Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader durch $\text{PGF}_{2\alpha}$, 5-HT und Sumatriptan in Ab- bzw. Anwesenheit von L-NAME ($200 \mu\text{M}$).

	<i>Kontrolle</i>			<i>+ L-NAME (200 μM)</i>		
	<i>n</i>	<i>E_{max} (mN)</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>n</i>	<i>E_{max} (mN)</i>	<i>pEC₅₀</i>
$\text{PGF}_{2\alpha}$ ($30 \mu\text{M}$)	10	$12,3 \pm 1,2$	–	10	$11,2 \pm 0,9$	–
5-HT	5	$6,0 \pm 1,1$	$7,58 \pm 0,05$	5	$5,8 \pm 1,0$	$7,65 \pm 0,05$
Sumatriptan	5	$4,6 \pm 0,8$	$5,72 \pm 0,06$	5	$4,1 \pm 0,7$	$5,70 \pm 0,06$

3.2.1.3. Rezeptorcharakterisierung mit Hilfe von Triptanen

Effekte von 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und Triptanen: In diesen Experimenten wurden die unterschiedlichen Wirkungen von 5-HT-Rezeptoragonisten einschließlich 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und Triptanen (Almotriptan, Eletriptan, Frovatriptan, Naratriptan,

Tab. 10. Agonistische Eigenschaften von 5-HT, 5-CT und Triptanen an der Meerschweinchenbeckenschlagader nach moderater Vorkontraktion mit PGF_{2α} und Vergleich mit Daten an der Koronararterie und der mittleren Meningealarterie des Menschen.

	<i>Meerschweinchen- beckenschlagader</i>			<i>Koronararterie (Mensch)</i>	<i>Mittelmeningeal- arterie (Mensch)</i>
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^b</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>pEC₅₀</i>
5-HT	67	7,52 ± 0,02	33 ± 1		
5-CT	12	7,55 ± 0,06	29 ± 3		
Almotriptan	11	5,25 ± 0,06	28 ± 3	5,3 ^c	7,5 ^c
Eletriptan ^a	8	6,62 ± 0,05	26 ± 4	5,5 ^d	7,3 ^d
Frovatriptan	6	7,54 ± 0,06	25 ± 3	7,4 ^e	
Naratriptan	7	6,19 ± 0,05	29 ± 3	6,8 ^f	
Rizatriptan	7	6,36 ± 0,06	22 ± 4	6,3 ^f	7,1 ^g
Sumatriptan	21	5,84 ± 0,04	30 ± 2	6,1 ^f	7,2 ^g
Zolmitriptan	6	6,71 ± 0,02	28 ± 4	6,3 ^f	7,4 ^h

^aErste Phase der Kontraktion (0,01 – 3 μM). ^bProzent der PGF_{2α}-Kontraktion. ^cDaten von Bou *et al.* (2001). ^dDaten von Van den Broek *et al.* (2000). ^eDaten von Parsons *et al.* (1998). ^fDaten von MaassenVanDenBrink *et al.* (1998). ^gDaten von Longmore *et al.* (1998). ^hDaten von Razzaque *et al.* (1999).

Rizatriptan, Sumatriptan und Zolmitriptan) an Segmenten der Meerschweinchenbeckenschlagader untersucht. 5-HT kontrahierte die Meerschweinchenbeckenschlagader mit einem pEC₅₀-Wert von 7,52 ± 0,02 bei einem Maximaleffekt von 33 ± 1% relativ zu der durch PGF_{2α} (30 μM) induzierten Kontraktion (*n* = 67). Vergleichbare Effekte wurden auch durch 5-Carboxamidotryptamin hervorgerufen (pEC₅₀ = 7,55 ± 0,06, E_{max} = 29 ± 3%, *n* = 12). Wie auch 5-HT und 5-Carboxamidotryptamin verhielten sich alle getesteten Triptane als Agonisten an der Meerschweinchenbeckenschlagader (Abb. 37). Geordnet nach ihrer agonistischen Potenz (pEC₅₀) kontrahierten die Triptane die Beckenschlagader des Meerschweinchen in der Reihenfolge: Frovatriptan > Zolmitriptan ≥ Eletriptan (erste Phase, siehe unten) > Rizatriptan ≥ Naratriptan > Sumatriptan > Almotriptan (Tab. 10).

Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Triptanen zeigte die E/[A]-Kurve von Eletriptan einen biphasischen Verlauf (Abb. 37d). Für die erste Phase der Kontraktion (0,01 – 3 μM) wurde ein pEC₅₀-Wert von 6,62 ± 0,05 geschätzt, während eine Quantifizierung der Kontraktion der zweiten

Phase wegen des Nichterreichens des Maximaleffekts nicht möglich war. Die Beobachtung einer biphasischen Kontraktion durch Eletriptan steht im Einklang mit publizierten Befunden an der Koronararterie des Menschen. Auch an diesem Organ konnte eine kontinuierliche Zunahme der Kontraktion bei steigender Eletriptankonzentration beobachtet werden, ohne dass ein Maximaleffekt erreicht wurde (MaassenVanDenBrink *et al.*, 2000).

Rizatriptan, das einzige derzeit in der Migränetherapie befindliche Triptan ohne eine Sulfon- oder eine Amidstruktur, unterschied sich von den anderen Triptanen durch eine nur partielle Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader im Vergleich zur 5-HT-Kontrolle (Rizatriptan: $E_{\max} = 22 \pm 4\%$, 5-HT: $E_{\max} = 43 \pm 3\%$).

Kinetische Untersuchungen: In den folgenden Experimenten wurde die Rezeptorassoziationsgeschwindigkeit von 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und der Triptane an der Meerschweinchenbeckenschlagader untersucht. Als indirektes Maß dafür wurde die Zeit zur Erreichung eines Plateaueffekts nach Gabe einer etwa halbmaximal wirksamen Konzentration (pEC_{50}) dieser Liganden ermittelt (Abb. 36).

Nach Applikation von 5-HT wurde das Plateau innerhalb von 138 ± 7 s ($n = 67$) erreicht. 5-Carboxamidotryptamin und die Triptane Almotriptan, Frovatriptan, Naratriptan, Rizatriptan, Sumatriptan und Zolmitriptan unterschieden sich hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften nicht nennenswert von 5-HT (Plateau nach 134 – 226 s). Eletriptan hingegen benötigte gegenüber 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und allen anderen getesteten Triptanen eine signifikant längere Inkubationszeit für das Erreichen des agonistischen Effekts (Plateau nach 470 ± 46 s; $n = 9$), was vermutlich auf seine vergleichsweise hohe Lipophilie zurückzuführen ist.

Bewertung der agonistischen Effekte: Wie auch 5-HT und 5-Carboxamidotryptamin kontrahierten alle getesteten Triptane die moderat mit $PGF_{2\alpha}$ vorkontrahierte Meerschweinchenbeckenschlagader mit intaktem Endothel. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pEC_{50} -Werte für Almotriptan, Eletriptan, Frovatriptan, Naratriptan, Rizatriptan, Sumatriptan und Zolmitriptan stimmen mit publizierten pEC_{50} -Werten an peripheren humanen Blutgefäßen, wie z.B. der Koronararterie und der Saphenavene, überein (MassenVanDenBrink *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu liegen die an der Meerschweinchenbeckenschlagader ermittelten agonistischen Potenzen im

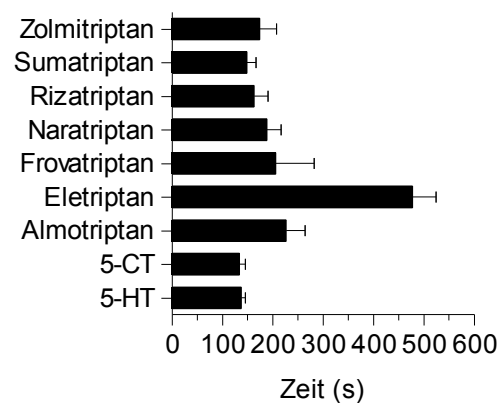


Abb. 36. Vergleich der Zeit zum Erreichen eines Plateaueffekts nach Gabe einer etwa halbmaximal wirksamen Konzentration 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) oder eines Triptans.

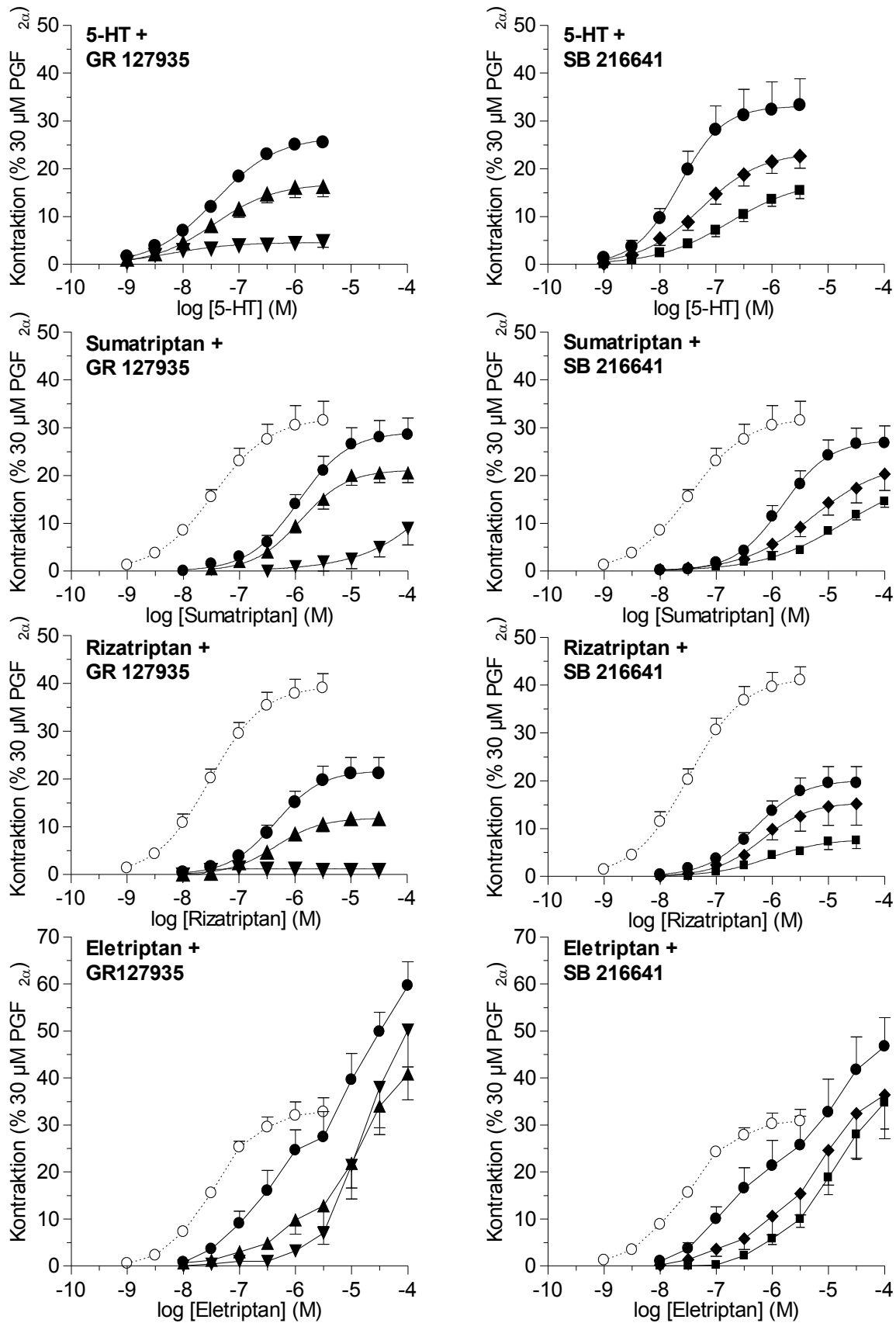


Abb. 37. Exemplarische Abbildung der $E/[A]$ -Kurven von 5-HT, Sumatriptan, Rizatriptan und Eletriptan an der Meerschweinchenbeckenschlagader in Ab- (●) und in Anwesenheit des 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonisten GR 127935 (1 nM: ▲; 10 nM: ▼) oder des 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten SB 216641 (3 nM: ◆; 10 nM: ■). Die entsprechenden 5-HT-Kontrollkurven (○) wurden gestrichelt dargestellt. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus 4 - 7 Experimenten.

Durchschnitt um eine logarithmische Einheit unter den pEC_{50} -Werten der Triptane an der humanen Mittelmeningealarterie (Tab. 10). Während die isolierte Mittelmeningealarterie des Menschen als ein Standardassay zur *Ex-vivo*-Untersuchung der Antimigränewirksamkeit neuer Arzneistoffe dient, ist die humane Koronararterie ein geeignetes Modell zur Vorhersage kardiovaskulärer Nebenwirkungen von Triptanen (MaassenVanDen Brink *et al.*, 1998; Van den Broek *et al.*, 2002). Auf Grund der beobachteten agonistischen Eigenschaften von Triptanen an der Meerschweinchenbeckenschlagader, die in guter Übereinstimmung mit denen an der Koronararterie des Menschen stehen, konnte eine Eignung der Meerschweinchenbeckenschlagader zur experimentell-pharmakologischen Prüfung von Migränetherapeutika auf mögliche kardiovaskuläre Nebenwirkungen gezeigt werden.

Neben der Etablierung der Meerschweinchenbeckenschlagader als Modell zur Untersuchung vaskulärer Eigenschaften von Migränetherapeutika stand die Identifizierung des 5-HT₁-Rezeptors im Vordergrund, der an den kontraktile Effekten von 5-HT und anderen 5-HT-Rezeptoragonisten beteiligt ist. Die an der Meerschweinchenbeckenschlagader ermittelten agonistischen Potenzen (pEC_{50}) stimmen gut mit publizierten Werten aus GTP γ S-Bindungsexperimenten an rekombinanten 5-HT_{1B}-Rezeptoren des Meerschweinchens, welche in humanen C6-Gliazellen exprimiert wurden, überein ($r^2 = 0,87$; $P = 0,02$; Pauwels *et al.*, 1998). Auch zu ermittelten pEC_{50} -Werten an der Saphenavene des Kaninchens, einem Standardassay zur Untersuchung 5-HT_{1B}-Rezeptor-vermittelter Effekte, besteht eine signifikante Korrelation ($r^2 = 0,91$; $P = 0,01$; Cohen *et al.*, 1997; Wurch *et al.*, 1997; Cohen & Schenck, 1999).

Eine Aussage über eine mögliche Beteiligung von 5-HT_{1F}-Rezeptoren an den Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader konnten Rizatriptan und Frovatriptan liefern. Beide Liganden zeigen zu 5-HT_{1B}-Rezeptoren eine 30 bis 40fach höhere Affinität als zu 5-HT_{1F}-Rezeptoren, während alle anderen Triptane nicht oder nur geringfügig zwischen beiden Subtypen diskriminieren (Johnson *et al.*, 1997; Comer, 2002). In der Gruppe der Triptane führte Rizatriptan zu der schwächsten 5-HT_{1F}-Rezeptor-vermittelten Hemmung neurogener Entzündungsprozesse in der *Dura mater* des Meerschweinchens mit einer um Faktor 5 geringeren agonistischen Potenz als Sumatriptan (Johnson *et al.*, 1997; Waincott *et al.*, 1998a). An der Beckenschlagader des Meerschweinchens hingegen war Rizatriptan dreimal potenter als Sumatriptan. Auf Grund dessen kann eine Beteiligung von 5-HT_{1F}-Rezeptoren an der Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe von Triptanen kein pauschaler Ausschluss von 5-HT_{1D}-Rezeptoren an den kontraktile Effekten von 5-HT-Rezeptoragonisten in der Meerschweinchenbeckenschlagader erfolgen, da Triptane nicht in der Lage sind, zwischen 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-

Rezeptoren zu diskriminieren. Um zu klären, ob 5-HT_{1D}-Rezeptoren an der Kontraktion dieses Organs beteiligt sind, wurden zusätzlich Experimente mit Hilfe subtypselektiver Antagonisten durchgeführt.

3.2.1.4. Rezeptoridentifizierung mit Hilfe von Antagonisten

Die Identifizierung der 5-HT₁-ähnlichen Rezeptoren wurde mit Hilfe von Antagonisten unterschiedlicher Subtypselektivität durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde BRL 15572, ein Antagonist mit einer ca. 60fach höheren Selektivität zu humanen 5-HT_{1D}-Rezeptoren als zu humanen 5-HT_{1B}-Rezeptoren, genutzt (Price *et al.*, 1997). Weitere Experimente wurden mit dem 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten SB 216641 durchgeführt, der eine etwa 30fach höhere Selektivität zu humanen 5-HT_{1B}-Rezeptoren gegenüber humanen 5-HT_{1D}-Rezeptoren aufweist (Price *et al.*, 1997). Der nicht subtypselektive 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonist GR 127935 kam ebenfalls zum Einsatz (Skingle *et al.*, 1996).

Effekte von BRL 15572: Niedrige Konzentrationen BRL 15572 (0,1 μ M) führten zu keiner Inhibition der durch 5-HT oder Sumatriptan induzierten Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader. In diesen submikromolaren Konzentrationen ist eine selektive Blockade humaner 5-HT_{1D}-Rezeptoren durch BRL 15572 beschrieben worden (Price *et al.*, 1997). Wurde hingegen BRL 15572 in hoher Konzentration inkubiert (3 μ M), so konnte eine Rechtsverschiebung der *E/[A]*-Kurve sowohl von 5-HT als auch von Sumatriptan beobachtet werden (Abb. 38). Basierend auf dieser Rechtsverschiebung wurden scheinbare pK_B -Werte von $5,6 \pm 0,1$ bzw. $5,5 \pm 0,1$ ermittelt, die im Einklang mit denen an humanen 5-HT_{1B}-Rezeptoren stehen (Price *et al.*, 1997; Schlicker *et al.*, 1997). Aktuelle Untersuchungen an rekombinanten 5-HT_{1D}-Rezeptoren des Schweins konnten

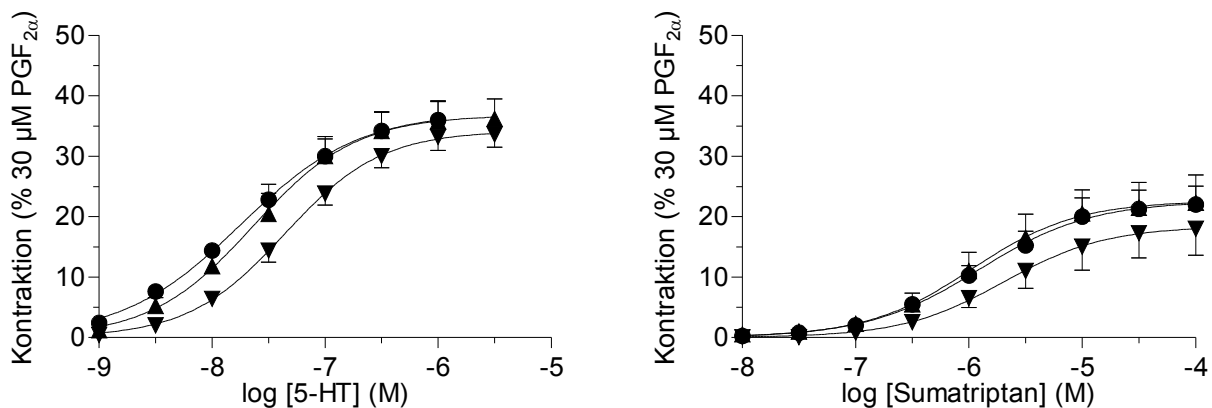


Abb. 38. *E/[A]*-Kurven von 5-HT und Sumatriptan an der Meerschweinchenbeckenschlagader in Ab- (●) bzw. Anwesenheit des 5-HT_{1D}-Rezeptorantagonisten BRL 15572 (0,1 μ M: ▲; 3 μ M: ▼). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm *S.E.M.* aus 3 – 5 Experimenten.

jedoch zeigen, dass die Subtypselektivität von BRL 15572 nicht bei jeder *Species* gegeben ist (Bhalla *et al.*, 2000). Da derzeit noch keine Affinitätsdaten von BRL 15572 an rekombinanten 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren des Meerschweinchens veröffentlicht wurden, sind funktionell-pharmakologische Experimente mit diesem Liganden nur von eingeschränkter Aussagekraft.

Effekte von GR 127935 und SB 216641: Die kontraktile Effekte von 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin, Sumatriptan, Almotriptan, Rizatriptan, Naratriptan, Zolmitriptan und Frovatriptan konnten sowohl durch den nicht subtypselektiven 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonisten GR 127935 (1 – 10 nM) als auch durch den selektiven 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten SB 216641 (3 – 10 nM) inhibiert werden (Abb. 37). GR 127935 (10 nM) antagonisierte die Effekte von 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und der Triptane nichtkompetitiv durch eine Depression des Maximaleffekts ($pD'_2 = 8,5 - 8,8$; Tab. 11). Deutlich komplexer war hingegen die Antagonisierung der Effekte durch SB 216641. So führte SB 216641 (10 nM) bei 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin, Frovatriptan, Zolmitriptan, Naratriptan, Sumatriptan und Almotriptan zu einer Depression des Maximaleffekts kombiniert mit einer Rechtsverschiebung der *E*/[*A*]-Kurve (scheinbarer $pK_B = 8,4 - 9,1$; Tab. 11).

Tab. 11. Hemmung der 5-HT-, 5-CT- und Triptan-vermittelten Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader nach moderater Vorkontraktion mit PGF_{2α} durch den 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonisten GR 127935 und den 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten SB 216641. Daten aus (*n*) Experimenten.

	GR 127935 (pD'_2)	SB 216641 (pK_B)^a
5-HT	8,7 ± 0,1 (6)	8,7 ± 0,2 (7)
5-CT	8,6 ± 0,1 (6)	8,4 ± 0,2 (7)
Almotriptan	8,5 ± 0,1 (6)	9,1 ± 0,3 (5)
Eletriptan ^b	n.e. ^c	n.e. ^c
Frovatriptan	8,6 ± 0,1 (5)	8,9 ± 0,2 (5)
Naratriptan	8,8 ± 0,1 (4)	8,8 ± 0,1 (4)
Rizatriptan	8,8 ± 0,2 (4)	8,2 ± 0,2 ^d (4)
Sumatriptan	8,6 ± 0,2 (5)	9,1 ± 0,2 (5)
Zolmitriptan	8,5 ± 0,2 (4)	8,6 ± 0,1 (4)

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^bErste Phase der Kontraktion (0,01 – 3 μM).

^cNicht ermittelt. ^d pD'_2 -Wert.

Als besonders interessant kann die Wirkung von GR 127935 und SB 216641 auf die kontraktile Effekte von Eletriptan und Rizatriptan angesehen werden. Die erste Phase der Kontraktion durch Eletriptan (0,01 – 3 μM) konnte sowohl mittels GR 127935 und mittels SB 216641 antagonisiert werden, während die zweite Phase der Kontraktion (> 3 μM) unverändert blieb (Abb. 37). Es konnte somit gezeigt werden, dass Eletriptan im Gegensatz zu allen anderen Triptanen über eine Aktivierung von zwei verschiedenen Bindungsstellen die Kontraktion der Meerschweinchen-

beckenschlagader hervorruft. Kontraktile Effekte bei niedrigen Eletriptankonzentrationen (0,01 – 3 μM) konnten als 5-HT_{1B}-Rezeptor-vermittelt erkannt werden, während die Identität der Rezeptoren, die für die Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader bei hohen Konzentrationen verantwortlich ist, unbekannt blieb.

Wurde hingegen der Partialagonist Rizatriptan eingesetzt, führte SB 216641 (10 nM) ohne Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve zu einer vergleichsweise moderaten Reduktion des Maximal-effekts (Abb. 37). Da Rizatriptan sich chemisch durch seinen Triazolsubstituenten von allen anderen Triptanen unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, dass Rizatriptan eine (partiell) abweichende Bindungsstelle im aktiven Zentrum des 5-HT_{1B}-Rezeptors belegt.

Bewertung der antagonistischen Effekte: Erste Hinweise auf die Identität des kontraktiven 5-HT₁-ähnlichen Rezeptors der Meerschweinchenbeckenschlagader lieferten in der Literatur beschriebene Experimente mit Ketanserin (Pertz, 1993). Außer zur Blockade von 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist dieser Ligand auch zu einer moderaten Diskriminierung zwischen 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren des Meerschweinchens geeignet ($pK_i = 6,15$ bzw. $6,86$; Zgombick *et al.*, 1997). Während die 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte Kontraktion durch Ketanserin (1 μM) gehemmt wurde, blieb die durch 5-HT₁-ähnliche Rezeptoren vermittelte Phase unbeeinflusst, was eine Beteiligung von 5-HT_{1D}-Rezeptoren an der Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader weitgehend ausschloss (Pertz, 1993).

Die für GR 127935 und SB 216641 an der Meerschweinchenbeckenschlagader ermittelten antagonistischen Potenzen (pD'_2 - bzw. scheinbare pA_2 -Werte) lagen im gleichen Bereich wie die Affinitätskonstanten beider Liganden an rekombinanten humanen 5-HT_{1B}-Rezeptoren (jeweils $pK_i = 9,0$; Price *et al.*, 1997) und sprachen somit für eine Beteiligung von 5-HT_{1B}-Rezeptoren und gegen eine Beteiligung von 5-HT_{1D}-Rezeptoren (pK_i an rekombinanten humanen 5-HT_{1D}-Rezeptoren: $8,6$ für GR 127935 bzw. $7,6$ für SB 216641; Price *et al.*, 1997) an der Kontraktion dieses Blutgefäßes. Es kann daher im Zusammenhang mit den durchgeführten molekularbiologischen Experimenten (Kapitel 3.2.1.1.) und den Experimenten mit Hilfe von Triptanen (Kapitel 3.2.1.3.) geschlossen werden, dass ausschließlich 5-HT_{1B}-Rezeptoren für die Ketanserin-insensitive Phase der Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader durch 5-HT und andere 5-HT-Rezeptoragonisten verantwortlich sind.

3.2.2. 5-HT-Rezeptoren der Pulmonalarterien des Läufer Schweins

Mit Hilfe der RT-PCR konnte in Pulmonalarterien des Schweins die mRNA für 5-HT_{1B}-, 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}-, 5-HT₄- und 5-HT₇-Rezeptoren nachgewiesen werden (Ullmer *et al.*, 1995). Nicht alle dieser 5-HT-Rezeptoren sind jedoch an den vaskulären Effekten von 5-HT in diesem Organ beteiligt. An isolierten Pulmonalarterien des Schlachtschweins (Alter: > 6 Monate; Gewicht: > 100 kg) (Abb. 39a) führt 5-HT als hochpotenter Agonist zu einer Vasorelaxation, die exklusiv über eine Aktivierung endothelialer 5-HT_{2B}-Rezeptoren und einer Freisetzung von NO vermittelt wird (pEC₅₀ 8,7; Glusa & Roos, 1993; Glusa & Richter, 1996; Glusa & Pertz, 2000).

Dem gegenüber konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass die 5-HT-induzierte Relaxation der Pulmonalarterien bei den deutlich jüngeren Läufer Schweinen (Alter: 2 – 3,5 Monate; Gewicht: 20 – 45 kg) komplexer ist und über eine Aktivierung mehrerer 5-HT-Rezeptoren vermittelt wird (Abb. 39c).

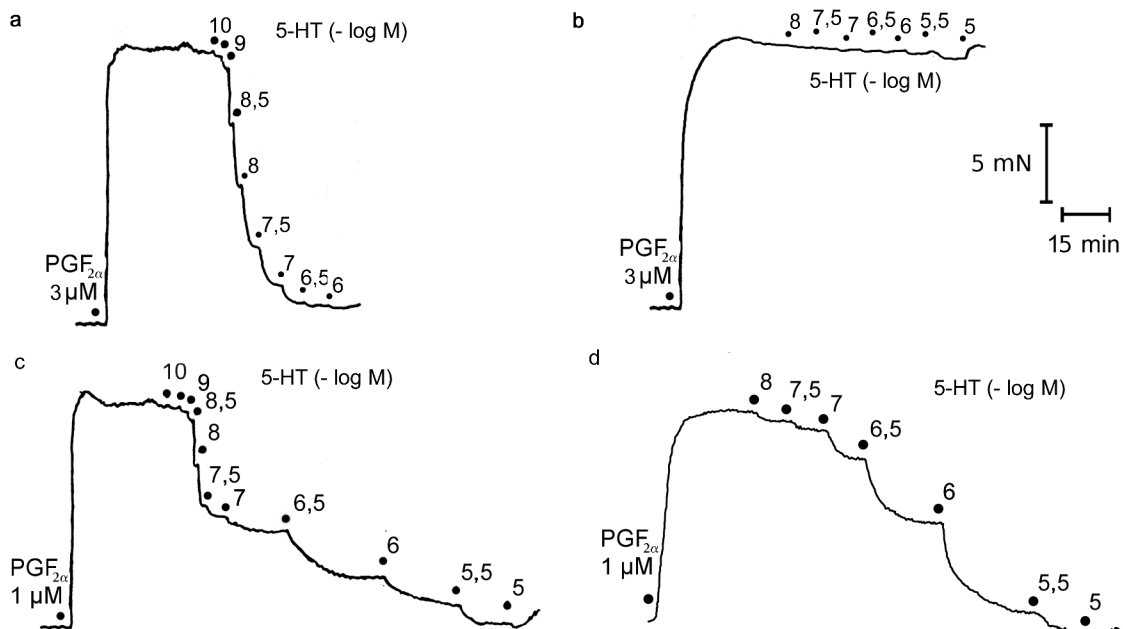


Abb. 39. Relaxation der Schweinepulmonalarterien (Schlachtschwein: > 100 kg) mit intaktem Endothel (a) und nach mechanischer Entfernung des Endothels (b) sowie Relaxation der Pulmonalarterien des Läufer Schweins (20 – 45 kg) mit intaktem Endothel (c) und nach mechanischer Entfernung des Endothels (d) durch kumulative Zugabe (●) von 5-HT nach Vorkontraktion mit 3 bzw. 1 μ M PGF_{2 α} .

3.2.2.1. Endothelabhängige Effekte

An Läufer Schweinpulmonalarterien mit intaktem Endothel führte PGF_{2 α} (1 μ M) zu einer Kontraktion von $12,8 \pm 1,9$ mN ($n = 17$). Die Intaktheit des Endothels konnte durch eine $94 \pm 2\%$ -ige Relaxation nach Applikation von Bradykinin (10 nM) nachgewiesen werden. An diesen mit PGF_{2 α} vorkontrahierten Pulmonalarterien des Läufer Schweins führte 5-HT (0,1 nM – 10 μ M) zu

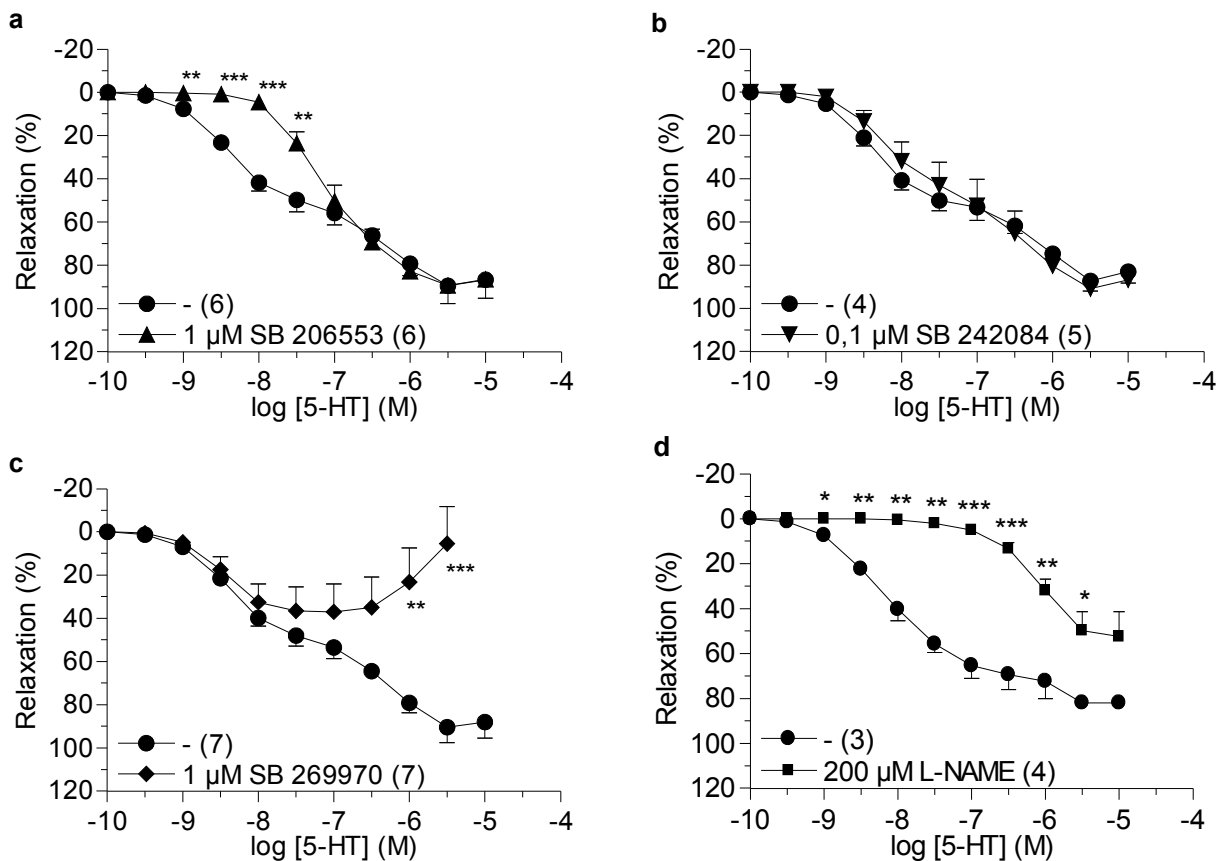


Abb. 40. Beeinflussung der durch 5-HT induzierten Relaxation der Läuferpulschweinpulmonalarterien mit intaktem Endothel durch SB 206553 (1 μ M) (a), SB 242084 (0,1 μ M) (b), SB 269970 (1 μ M) (c) und L-NAME (200 μ M) (d). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

einer konzentrationsabhängigen Relaxation (Abb. 39c), die sich in einer biphasischen $E/[A]$ -Kurve widerspiegelte (Abb. 40). Während niedrige Konzentrationen von 5-HT (0,3 – 30 nM) zu schnellen Relaxationen der Pulmonalarteriensegmente führten (Plateau nach ca. 2 min), induzierte 5-HT in höherer Konzentration (30 nM – 3 μ M) langsame Relaxationen (Plateau nach 20 – 40 min).

Die schnellen Relaxationen, die ca. 40% der Gesamtrelaxation ausmachten, konnten durch Inkubation des eNOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M; Abb. 40d) und durch mechanische Entfernung des Endothels unterdrückt werden (Abb. 42a). Ebenso führte eine Inkubation des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (1 μ M), nicht aber die Inkubation des selektiven 5-HT_{2C}-Rezeptorantagonisten SB 242084 (0,1 μ M), zu einer Antagonisierung der schnellen, endothelabhängigen Relaxationen (Abb. 40a,b). Die durch höhere 5-HT-Konzentrationen induzierten langsamen Relaxationen blieben hingegen auch nach Hemmung der endothelialen NO-Synthese mit Hilfe von L-NAME (200 μ M) und nach mechanischer Entfernung des Endothels bestehen (Abb. 40d; Abb. 42a). Die langsamen Relaxationen konnten aber mittels des selektiven 5-HT₇-Rezeptorantagonisten SB 269970 (1 μ M) antagonisiert werden (Abb. 40c).

Auch der selektive 5-HT_{2B}-Rezeptoragonist BW 723C86 führte in nanomolarer Konzentration (1 –

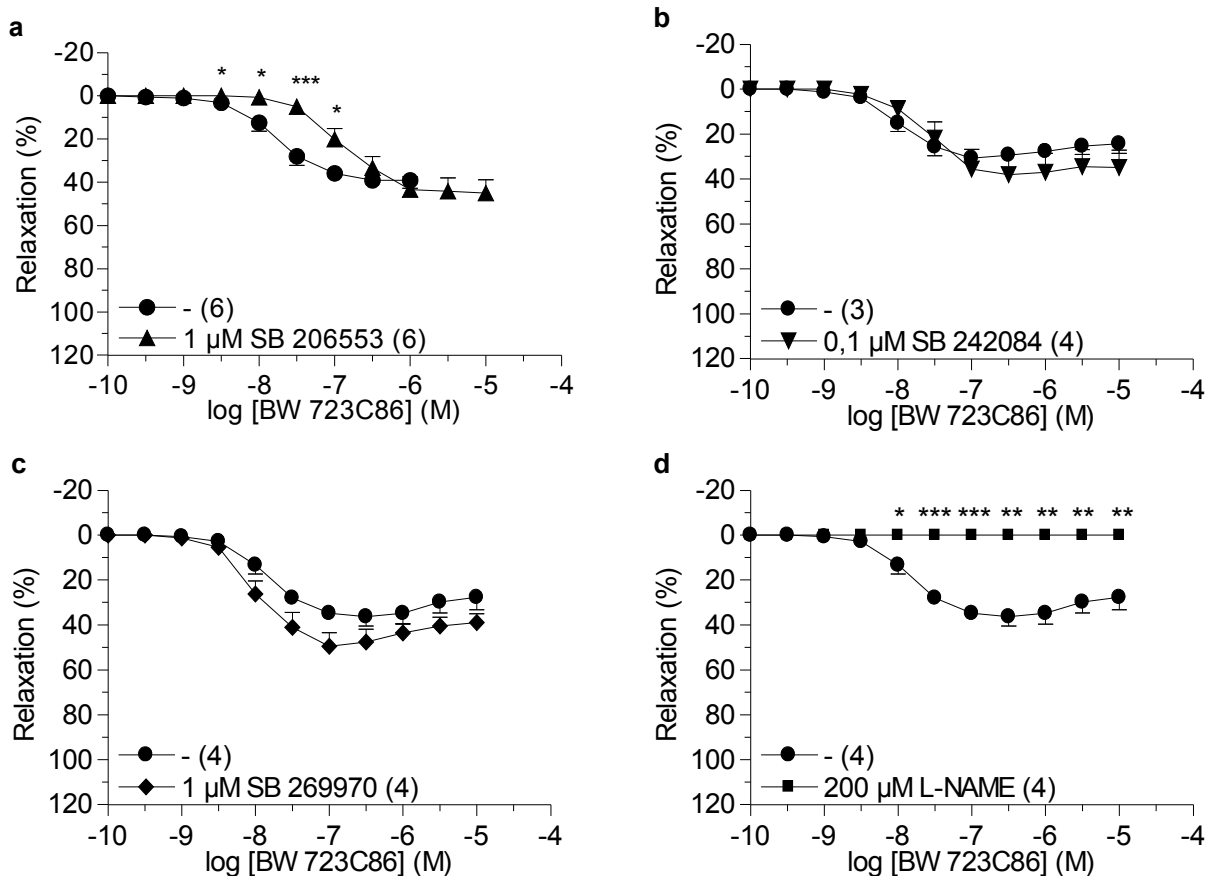


Abb. 41. Beeinflussung der durch BW 723C86 induzierten Relaxation der Läuferpulschweinpulmonalarterien mit intaktem Endothel durch SB 206553 (1 μ M) (a), SB 242084 (b), SB 269970 (1 μ M) (c) und L-NAME (200 μ M) (d). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

300 nM) zu einer schnellen Relaxation der Läuferpulschweinpulmonalarterien ($pEC_{50} = 7,82 \pm 0,09$; $E_{max} = 39 \pm 3\%$; $n = 10$; Abb. 41). Das Ausmaß (E_{max}) dieser durch BW 723C86 induzierten Relaxation stimmte mit dem Ausmaß der ersten Phase der Relaxation durch 5-HT überein. Im Gegensatz zu 5-HT konnte BW 723C86 in höherer Konzentration (0,3 – 10 μ M) keine weitere Relaxation der Pulmonalarterien verursachen. Die BW-723C86-induzierte Relaxation wurde durch den 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (1 μ M) gehemmt (Abb. 41a). Der für SB 206553 ermittelte scheinbare pK_B -Wert von $6,76 \pm 0,10$ ($n = 6$) ist vergleichbar mit dem unter gleichen Bedingungen an 5-HT_{2B}-Rezeptoren des Schlachtschweins ermittelten pK_B -Wert (7,20; Glusa & Pertz, 2000). Eine Inkubation des eNOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M) bzw. eine mechanische Entfernung des Endothels führten zu einer vollständigen Unterdrückung der durch BW 723C86 induzierten Relaxation der Pulmonalarterien des Läuferpulschweins (Abb. 41d; Abb. 42b). Keine Beeinflussung der $E/[A]$ -Kurve von BW 723C86 konnte hingegen in Anwesenheit des 5-HT₇-Rezeptorantagonisten SB 269970 oder in Anwesenheit des 5-HT_{2C}-Rezeptorantagonisten SB 242084 beobachtet werden (Abb. 41c,b).

Mit Hilfe des selektiven 5-HT_{2B}-Rezeptoragonisten BW 723C86 und des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 konnte gezeigt werden, dass die Phase endothelabhängiger, schneller Relaxationen nach Applikation von 5-HT (bzw. BW 723C86) durch 5-HT_{2B}-Rezeptoren vermittelt wird. Diese endothelabhängige Relaxation der Pulmonalarterien des Läufer Schweins wird somit durch den gleichen Rezeptor wie die Relaxation der Pulmonalarterien des Schlachthaus Schweins vermittelt. Der Anteil der endothelabhängigen Relaxation an der Gesamtreaxation ist jedoch beim Läufer Schwein deutlich geringer als beim älteren Schlachtschwein.

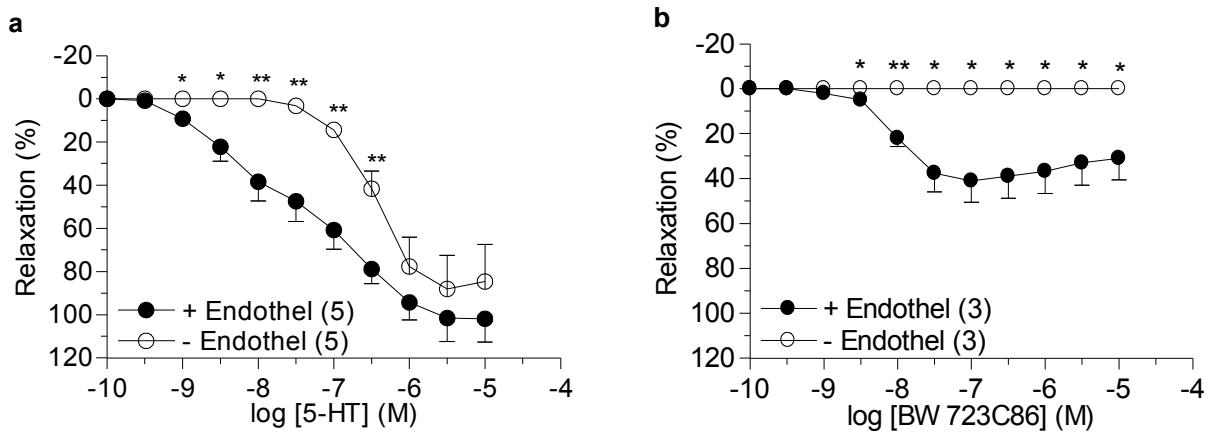


Abb. 42. Vergleich relaxierender Effekte von 5-HT (a) bzw. BW 723C86 (b) an Läufer Schweinpulmonalarterien mit intaktem Endothel (+ Endothel) und an Läufer Schweinpulmonalarterien nach mechanischer Entfernung des Endothels (- Endothel). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

3.2.2.2. Endothelunabhängige Effekte

Um die endothelunabhängige Komponente der 5-HT-induzierten Relaxation näher zu charakterisieren, wurden Experimente an Pulmonalarterien durchgeführt, die mechanisch vom Endothel befreit wurden. An diesen Arterien führte PGF_{2 α} (1 μ M) zu einer Kontraktion von $10,9 \pm 0,6$ mN ($n = 64$), welche vergleichbar mit der PGF_{2 α} -induzierten Kontraktion in Läufer Schweinpulmonalarterien mit intaktem Endothel war (vgl. Kapitel 3.2.2.1.). 5-HT (0,01 – 10 μ M) führte zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation der so vorkontrahierten Pulmonalarterien des Läufer Schweins (Abb. 39d), die sich in einer monophasischen $E/[A]$ -Kurve widerspiegelte (Abb. 42a).

Effekte von Agonisten: Nach mechanischer Entfernung des Endothels relaxierten auch 5-Carboxamidotryptamin, 5-Methoxytryptamin und Frovatriptan die Pulmonalarterien des Läufer Schweins (Abb. 43). Basierend auf den für die Vasorelaxation ermittelten pEC_{50} -Werten nahm die Potenz der Agonisten in der Reihenfolge 5-Carboxamidotryptamin > 5-HT > 5-Methoxytryptamin > Frovatriptan ab (Tab. 12). Eine analoge Rangfolge der agonistischen Potenz (5-Carboxamidotryptamin > 5-HT > 5-Methoxytryptamin) wurde auch an 5-HT₇-Rezeptoren des Myometriums und des Eileiters des Schweins beobachtet (Kitazawa *et al.*, 1998; Kitazawa *et al.*, 2000; Inoue *et al.*,

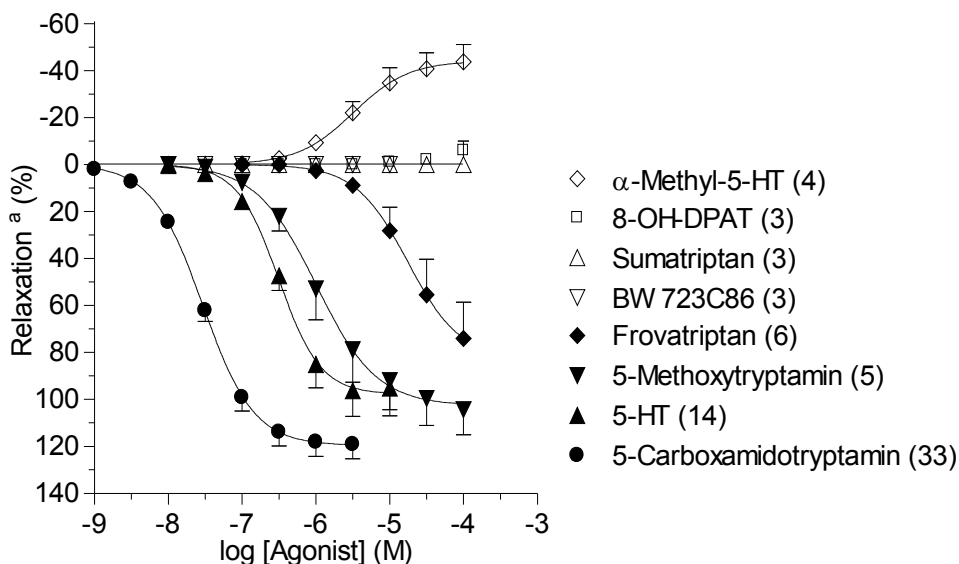


Abb. 43. Relaxierende (und kontraktile) Effekte von 5-HT-Rezeptoragonisten an den Läuferpulschweinpulmonalarterien nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. ^aNegative Werte entsprechen einer Kontraktion.

2003). Auch die etwa 10fach höhere agonistische Potenz von 5-Carboxamidotryptamin gegenüber 5-HT ist ein Hinweis auf eine Beteiligung von 5-HT₇-Rezeptoren an der Relaxation der Läuferpulschweinpulmonalarterien.

Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete relaxierende Effekt von Frovatriptan verdient besonderer Erwähnung. Frovatriptan ist ein Migränetherapeutikum mit hoher Affinität zu humanen 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren und einer moderaten Affinität zu 5-HT₇-Rezeptoren (Comer, 2002). Dieser Dualismus konnte auch auf funktioneller Ebene an Koronararterien des Menschen beobachtet werden. Die $E/[A]$ -Kurve von Frovatriptan zeigte an diesem Organ einen glockenförmigen Verlauf (Parsons *et al.*, 1998). Bei niedrigen Konzentrationen ($0,02 - 2 \mu\text{M}$) standen durch 5-HT_{1B}-Rezeptoren vermittelte Kontraktionen im Vordergrund, während bei hohen Konzentrationen ($> 2 \mu\text{M}$) Relaxationen beobachtet wurden, die mit einer Aktivierung von 5-HT₇-Rezeptoren assoziiert wurden (Parsons *et al.*, 1998). Die agonistische Potenz von Frovatriptan an den Pulmonalarterien des Läuferpulschweins war vergleichbar mit dessen vasorelaxierender Potenz an den Koronararterien des Menschen.

Eine Beteiligung von 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren an der Relaxation der Pulmonalarterien des Läuferpulschweins konnte hingegen ausgeschlossen werden. Weder der 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoragonist Sumatriptan noch Frovatriptan in niedriger Konzentration ($< 1 \mu\text{M}$) beeinflussten den Gefäßtonus. Auch der 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT und der 5-HT_{2B}-Rezeptoragonist BW 723C86 hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Gefäßtonus (Abb. 43). Hohe Konzentrationen des 5-HT₂-Rezeptor-selektiven Agonisten α -Methyl-5-HT ($\geq 1 \mu\text{M}$) führten hingegen zu einer Kontraktion der Gefäße (Abb. 43). Diese Kontraktion ($pEC_{50} = 5,47 \pm 0,05$; $n = 4$) kann

Tab. 12. Pharmakologische Eigenschaften von 5-HT-Rezeptoragonisten an den vom Endothel befreiten Pulmonalarterien des Läufer Schweins nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM).

	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max} (%)	<i>n</i>	<i>Hemmung durch SB 269970 (pK_B)</i> ^a
5-HT	14	6,49 ± 0,02	98 ± 11	8	8,62 ± 0,05
5-Carboxamidotryptamin	33	7,51 ± 0,04	120 ± 6	8	8,59 ± 0,06
5-Methoxytryptamin	7	5,94 ± 0,09	87 ± 11	7	8,85 ± 0,05
Frovatriptan ^b	6	4,58 ± 0,14	91 ± 13	5	8,21 ± 0,12
Sumatriptan	3	-	0	-	-
BW 723C86	3	-	0	-	-
8-OH-DPAT	4	-	-13 ± 7 ^c	-	-
α-Methyl-5-HT	4	-	-44 ± 7 ^c	-	-

^aScheinbarer pK_B -Wert für 30 nM SB 269970. ^b pEC_{50} - bzw. E_{max} -Werte von Frovatriptan und pK_B -Werte von SB 269970 gegen Frovatriptan sind Schätzwerte, die durch Extrapolation ermittelt wurden, da der Maximaleffekt von Frovatriptan bei einer Testkonzentration von 100 μM nicht erreicht wurde. ^cKontraktion.

möglicherweise mit einer Durchbrechung der Rezeptorblockade des unter Versuchsbedingungen anwesenden reversiblen 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin (0,1 μM ; siehe Methoden) durch hohe Konzentrationen α-Methyl-5-HT ($\geq 1 \mu\text{M}$) erklärt werden.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des 5-HT₇-Rezeptors an der Relaxation der Läufer Schweinpulmonalarterien lieferte die Beobachtung, dass die durch 5-Carboxamidotryptamin, 5-HT, 5-Methoxytryptamin und Frovatriptan induzierten Relaxationen mittels SB 269970 antagonisiert werden konnten. Die dabei für SB 269970 ermittelten pK_B -Werte lagen in einem einheitlichen Konzentrationsbereich von 8,21 – 8,85 (Tab. 12) und stimmten mit Literaturdaten für SB 269970 an 5-HT₇-Rezeptoren überein (Lovell *et al.*, 2000, Hagan *et al.*, 2000).

Effekte von Antagonisten: Da Experimente mit Agonisten nur eine eingeschränkte Aussagekraft über die Identität eines Rezeptors haben (Hoyer & Boddeke, 1993), wurden weitere Experimente mit Hilfe des selektiven 5-HT₇-Rezeptorantagonisten SB 269970 und einer Reihe weiterer Liganden mit hoher Affinität zum 5-HT₇-Rezeptor (Pimozid, Mesulergin, Methysergid, Methiothepin, Clozapin und Spiperon) an Pulmonalarterien des Läufer Schweins, die mechanisch vom Endothel befreit wurden, durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, antagonisierte SB 269970 die durch 5-HT und die durch 5-Carboxamidotryptamin induzierte Vasorelaxation. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse wurde ein pA_2 -Wert von $8,62 \pm 0,03$ für SB 269970 gegen 5-HT ermittelt (Tab. 13). Für die Antagonisierung der 5-Carboxamidotryptamin-induzierten Relaxation durch SB 269970 wurde ein vergleichbarer pA_2 -Wert von $8,52 \pm 0,03$ ermittelt (Tab. 13). In den jeweiligen *Schild*-Plots konnte ein linearer Zusammenhang zwischen $\log(EMR-1)$ und dem negativen dekadischen Logarithmus der molaren Antagonistenkonzentration aufgezeigt werden. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots betragen $1,14 \pm 0,07$ (gegen 5-HT) bzw. $0,95 \pm 0,05$ (gegen 5-Carboxamidotryptamin) (beide nicht signifikant von 1 verschieden) und deuteten einerseits auf eine kompetitive Antagonisierung der 5-HT- bzw. 5-Carboxamidotryptamin-induzierten Relaxation der Läufer-schweinpulmonalarterien durch SB 269970 und andererseits auf die Beteiligung einer einheitlichen Rezeptorpopulation an den 5-HT- bzw. 5-Carboxamidotryptamin-induzierten relaxierenden Effekten.

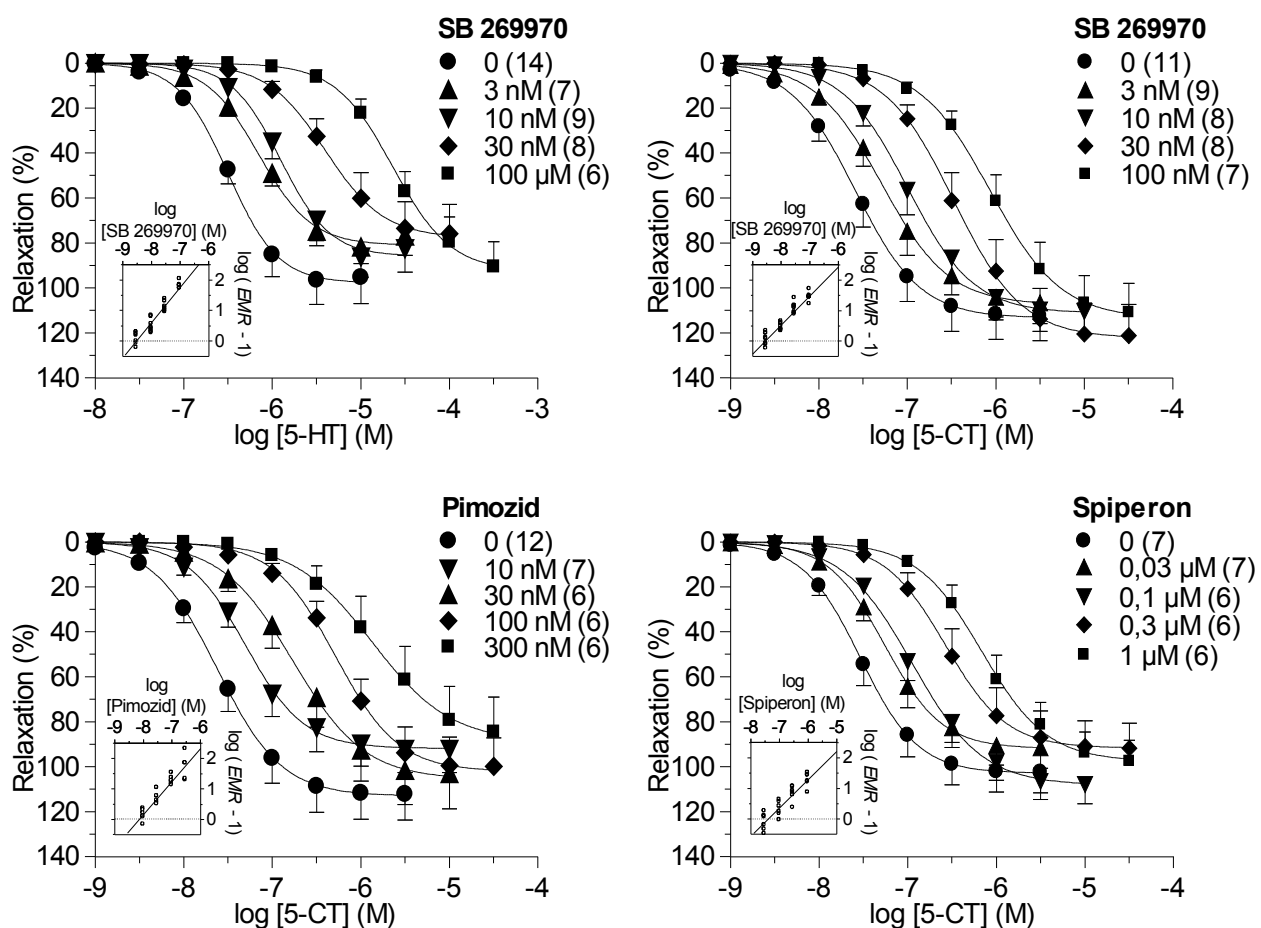


Abb. 44. $E/[A]$ -Kurven von 5-HT bzw. Carboxamidotryptamin (5-CT) in Ab- und Anwesenheit steigender Konzentrationen eines kompetitiven Antagonisten (SB 269970, Pimozid und Spiperon). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $8,62 \pm 0,03$ für SB 269970 gegen 5-HT sowie $8,52 \pm 0,03$ für SB 269970, $8,21 \pm 0,05$ für Pimozid und $7,34 \pm 0,05$ für Spiperon gegen 5-CT ermittelt.

Die 5-Carboxamidotryptamin-induzierte Vasorelaxation wurde ebenfalls kompetitiv durch Pimozid ($pA_2 = 8,21 \pm 0,05$, Steigung im *Schild*-Plot: $1,09 \pm 0,09$) und durch Spiperon ($pA_2 = 7,34 \pm 0,05$, Steigung im *Schild*-Plot: $0,93 \pm 0,09$) antagonisiert (Abb. 44). Die Inkubation von Methiothepin (10 nM), Mesulergin (0,1 μ M), Methysergid (0,1 μ M) bzw. Clozapin (0,1 μ M) führte zu einer parallelen Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-Carboxamidotryptamin ohne eine signifikante Veränderung des Maximaleffekts (ohne Abbildung).

Die für SB 269970, Pimozid, Spiperon, Methiothepin, Mesulergin, Methysergid und Clozapin experimentell ermittelten Affinitätskonstanten (pK_B) sind in Tabelle 13 aufgelistet. Sie zeigten eine hohe Übereinstimmung mit publizierten Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen 5-HT₇-Rezeptoren. Keine Korrelation bestand hingegen zwischen den ermittelten pK_B -Werten und

Tab. 13. Ermittelte Affinitätsdaten für 5-HT-Rezeptorantagonisten gegen 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) an den vom Endothel befreiten Pulmonalarterien des Läufer Schweins und Korrelation zu publizierten Radioligandbindungsdaten an rekombinanten humanen 5-HT-Rezeptoren.

	<i>Läuferschweinpulmonalarterien</i>				<i>Radioligandbindungsaffinitäten^a</i>			
	<i>n</i>	<i>Konz. (nM)</i>	<i>pK_B^b</i>	<i>m</i>	<i>5-HT_{2B}</i>	<i>5-ht_{5A}</i>	<i>5-ht₆</i>	<i>5-HT₇</i>
SB 269970 (5-HT)	30	3 - 100	$8,62 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,07$				
SB 269970 (5-CT)	32	3 - 100	$8,52 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,05$	5,00	7,20	5,20	8,90
Pimozid	24	10 - 300	$8,21 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,09$			7,15	9,30
Spiperon	25	30 - 1000	$7,34 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,09$	6,50	4,20		7,57
Methiothepin	8	10	$9,67 \pm 0,14$	-	9,23	8,90	9,38	9,36
Mesulergin	6	100	$7,72 \pm 0,07$	-	8,72		5,42	8,11
Methysergid	5	100	$7,45 \pm 0,09$	-	9,19	7,00	6,75	7,58
Clozapin	7	100	$7,57 \pm 0,09$	-	8,46	6,00	8,02	7,66
<i>r</i> ²					0,02	0,70	0,19	0,75
<i>P</i>					> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,01

^aAus der Literatur entnommene Radioligandbindungsdaten (pK_i) an humanen rekombinanten 5-HT_{2B}-Rezeptoren in AV 12 Zellen, [³H]Rauwolscin (Wainscott *et al.*, 1998b), 5-ht_{5A}-Rezeptoren in Cos M6 Zellen, [³H]5-CT (Rees *et al.*, 1994), 5-ht₆-Rezeptoren in Cos-7 Zellen, [³H]LSD (Kohen *et al.*, 1996) und 5-HT_{7(a)}-Rezeptoren in HEK293 Zellen, [³H]5-HT (Krobert *et al.*, 2001). Radioligandbindungsdaten (pK_i) für SB 269970 von Lovell *et al.* (2000). Radioligandbindungsdaten (pK_i) für Pimozid von Kroetze *et al.* (2003). ^bVolle (SB 269970, Pimozid und Spiperon) und scheinbare pK_B -Werte (Methiothepin, Mesulergin, Methysergid und Clozapin).

Zu publizierten pK_i -Werten an rekombinanten humanen 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}-, 5-ht_{1E}-, 5-HT_{1F}-, 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2C}-, 5-HT₃- und 5-HT₄-Rezeptoren bestand keine signifikante Korrelation.

pK_i -Werten an allen anderen rekombinanten humanen 5-HT-Rezeptoren (Tab. 13). Die für Methiothepin, SB 269970, Pimozid, Mesulergin, Clozapin, Methysergid und Spiperon ermittelten pK_B -Werten standen ebenfalls im Einklang mit den an nativen 5-HT₇-Rezeptoren der Jugularvene des Langschwanzmakaken, der Hundekoronararterie und der Hundecerebralarterie ermittelten Daten (Leung *et al.*, 1996; Terrón, 1996; Terrón & Falcón-Neri, 1999).

Basierend auf den gewonnenen Daten aus Experimenten mit Agonisten und Antagonisten konnte geschlussfolgert werden, dass 5-HT₇-Rezeptoren exklusiv für die endothelunabhängige Relaxation der Pulmonalarterien des Läufer Schweins verantwortlich sind.

3.2.2.3. Second-Messenger-Untersuchungen

Eine Aktivierung des G_s-Protein-gekoppelten 5-HT₇-Rezeptors ist mit einer Stimulation der Adenylylcyclase und mit einem Anstieg an intrazellulärem cAMP verknüpft (Bard *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993; Ruat *et al.*, 1993b; Shen *et al.*, 1993).

Um zu zeigen, ob die beobachtete Vasorelaxation mit einer Aktivierung der Adenylylcyclase verbunden ist, wurde der cAMP-Spiegel an Arteriensegmenten, die mechanisch vom Endothel befreit wurden, nach Stimulation mit 5-Carboxamidotryptamin bestimmt. Die Basalkonzentration von cAMP betrug in diesem Versuch $1,53 \pm 0,14$ pmol/mg Protein. Die Inkubation von Pulmonalarteriensegmenten des Läufer Schweins mit 5-Carboxamidotryptamin führte konzentrationsabhängig zu einer bis zu ca. 2fachen Vergrößerung des cAMP-Spiegels über Basallevel ($pEC_{50} = 7,2 \pm 0,2$, $n = 6$; Abb. 45). Die Inkubation von Forskolin ($0,1 \mu\text{M}$) führte im Vergleich dazu zu einer Vergrößerung des cAMP-Spiegels um Faktor 3,6. Eine Vorinkubation mit SB 269970 (100 nM) führte zu einer Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-Carboxamidotryptamin ohne signifikante Depression des Maximaleffekts (Abb. 45). Die aus der Inhibition der 5-Carboxamidotryptamin-induzierten Akkumulation von cAMP ermittelte scheinbare Dissoziationskonstante für SB 269970 ($pK_B = 8,6 \pm 0,2$, $n = 6$) war vergleichbar mit dem anhand der Inhibition der 5-Carboxamidotryptamin-vermittelten Vasorelaxation bestimmten pK_B -Wert dieser Substanz.

Die Fähigkeit von 5-Carboxamidotryptamin, konzentrationsabhängig den cAMP-Spiegel in den Pulmonalarterien des Läufer Schwein zu erhöhen, spricht ebenfalls für eine Beteiligung von 5-HT₇-

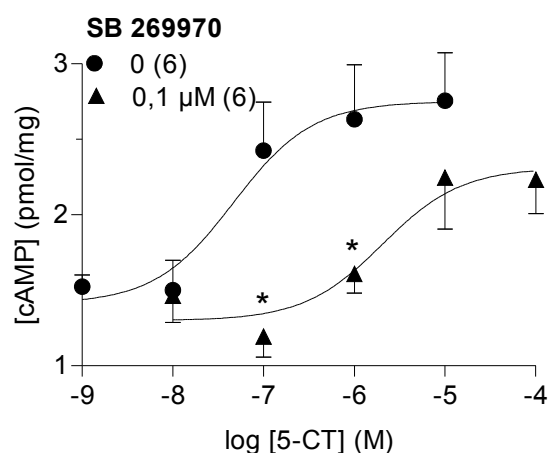


Abb. 45. Vergrößerung des cAMP-Spiegels durch 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) in Ab- bzw. Anwesenheit des 5-HT₇-Rezeptorantagonisten SB 269970. Dargestellt ist die cAMP-Konzentration \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. * $P < 0,05$.

Rezeptoren an den glattmuskulären Effekten in diesem Organ. Abgesehen vom 5-HT₇-Rezeptor sind lediglich 5-HT₄- und 5-HT₆-Rezeptoren positiv an die Adenylylcyclase gekoppelt. Die hohe agonistische Potenz von 5-Carboxamidotryptamin und die Hemmbarkeit der 5-Carboxamidotryptamin-induzierten cAMP-Akkumulation durch SB 269970 stehen im Einklang mit einer Aktivierung von 5-HT₇-Rezeptoren, nicht aber mit einer Aktivierung von 5-HT₄- oder 5-HT₆-Rezeptoren.

3.2.2.4. Molekularbiologische Untersuchungen

Die mRNA des 5-HT₇-Rezeptors konnte bereits zuvor nicht nur in der oberen Hohlvene (*V. cava superior*), in der Saphenavene und der Koronararterie des Schweins gefunden werden, sondern auch in den Pulmonalarterien nachgewiesen werden (Ullmer *et al.*, 1995; Bhalla *et al.*, 2002b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ergänzend untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der mRNA-Expression in den Pulmonalarterien besteht.

Unter Verwendung des 5-HT₇-Rezeptor-Primerpaars konnte sowohl aus den Läuferpulschweinpulmonalarterien als auch aus den Pulmonalarterien des Schlachtschweins mit Hilfe der RT-PCR ein Amplifikat gewonnen werden, dessen Länge von ca. 500 bp identisch mit der vorhergesagten Größe von 499 bp war. Die Expression des 5-HT₇-Rezeptors in diesen Gefäßen konnte somit auf molekularbiologischer Ebene bestätigt werden. Die Amplifizierung eines Transkripts mit Hilfe des GAPDH-Primerpaars diente als Standard für die Quantifizierung der mRNA-Expression. Während für das Haushaltsgen GAPDH in den Schweinepulmonalarterien unabhängig vom Alter der Tiere vergleichbar intensive Signale erhalten wurden, lag das Expressionslevel der 5-HT₇-Rezeptor-

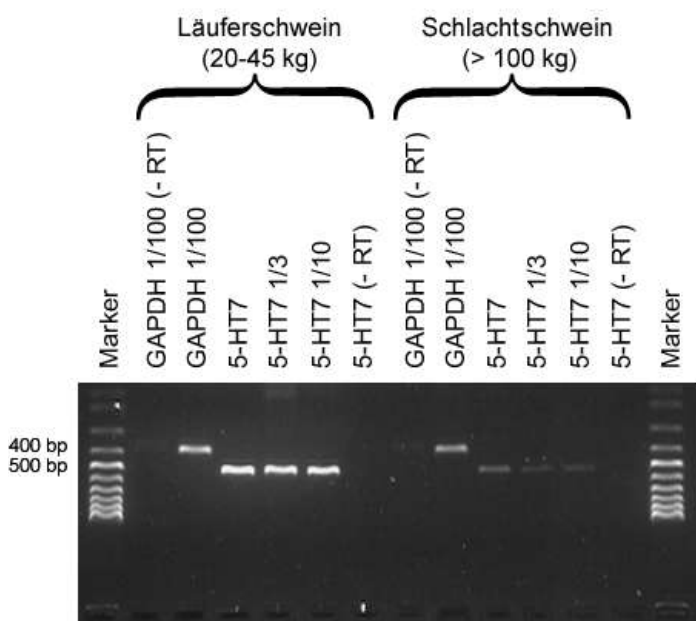


Abb. 46. Vergleichende Untersuchung der Expression der mRNA des 5-HT₇-Rezeptors in Pulmonalarterien des Läuferpulschweins und des Schlachtschweins mit Hilfe der RT-PCR und der Agarose-Gel-Elektrophorese. Ausgehend von ca. 0,16 µg RNA (bzw. einem Aliquot dessen: 1/3, 1/10 und 1/100) konnte nach der Reversen Transkription und 35 PCR-Zyklen für das 5-HT₇-Rezeptortranskript eine erhöhte Expression in den Pulmonalarterien des Läuferpulschweins nachgewiesen werden, während vergleichbar intensive Banden für das GAPDH-Transkript beim Läuferpulschwein und beim Schlachtschwein detektiert wurden. Zum Ausschluss einer Verfälschung des Ergebnisses durch genomische DNA wurden Proben ohne Behandlung mit der Reversen Transkriptase (- RT) mitgeführt.

mRNA in den Pulmonalarterien des Läufer Schweins deutlich über dem in den Pulmonalarterien des Schlachtschweins (Abb. 46).

3.2.2.5. Altersphysiologische Untersuchungen

Allgemeine entwicklungsbedingte Veränderungen der Struktur und der Physiologie der Schweinepulmonalarterien sind in der Literatur beschrieben (Haworth & Hislop, 1981; Hall & Haworth, 1986). Als Anpassung an das Leben außerhalb des Uterus ist bei neugeborenen Ferkeln unmittelbar nach der Geburt mit einsetzender Atmung ein 10fach höherer pulmonaler Blutfluss und ein rapider Abfall des pulmonal-arteriellen Widerstands zu beobachten (Abb. 47). Zusätzlich zu der akuten Vasodilatation kommt es innerhalb der ersten zwei Wochen zu einem Abbau der Muskulatur der Blutgefäße der Lunge. Anschließend setzt ein Wachstum und ein *Remodeling* der Pulmonalarterien ein, das mit einem Alter von 6 Monaten abgeschlossen ist (Haworth & Hislop, 1981; Hall & Haworth, 1986). Während dieser Phase sind auch funktionelle Veränderungen zu beobachten. In diesem Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob zwischen den von 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren vermittelten relaxierenden Effekten und dem Alter der untersuchten Schweine ein genereller Zusammenhang besteht.

Altersabhängige Unterschiede der endothelabhängigen Relaxation der Pulmonalarterien des Läufer Schweins und des Schlachtschweins durch 5-HT und durch den selektiven 5-HT_{2B}-Rezeptoragonisten BW 723C86 sind im Rahmen dieser Arbeit bereits in Kapitel 3.2.2.1. beschrieben. Während der Anteil der endothelabhängigen Relaxation an der biphasischen Gesamtreaxation der Pulmonalarterie des Läufer Schweins durch 5-HT nur ca. 40% betrug, konnte an Pulmonalarterien des Schlachtschweins praktisch ausschließlich eine endothelabhängige Relaxation beobachtet werden. Auch der Maximaleffekt der monophasischen, endothelabhängigen Relaxation der Läufer Schweinpulmonalarterien durch BW 723C86 ($39 \pm 3\%$) ist deutlich geringer als der in der Literatur beschriebene Maximaleffekt an Pulmonalarterien des Schlachtschweins ($89 \pm 4\%$; Glusa & Pertz, 2000).

Dem gegenüber nahm das Ausmaß der endothelunabhängigen Relaxation der Pulmonalarterien des Schweins durch 5-Carboxamidotryptamin und 5-HT mit zunehmenden Alter der Tiere ab. Während

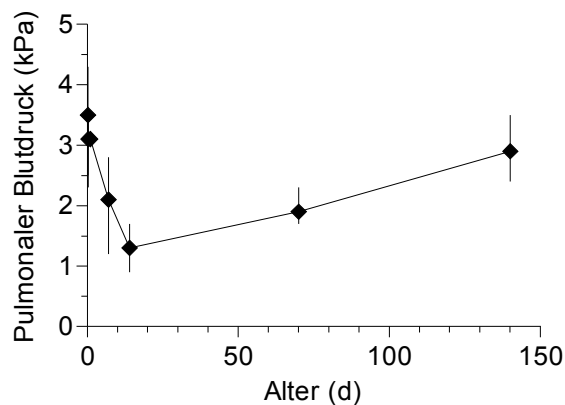


Abb. 47. Altersabhängige Änderung des pulmonal-arteriellen Blutdrucks beim Schwein. Modifiziert nach Haworth und Hislop (1981).

an den vom Endothel befreiten Pulmonalarterien des Läuferchweins 5-Carboxamidotryptamin zu einer $120 \pm 6\%$ igen Relaxation der Gefäße führte ($n = 33$), konnte an Arterien des Schlachtschweins ein Effekt von lediglich $58 \pm 11\%$ ($n = 6$) beobachtet werden. Die bei Läuferchweinen beobachtete endothelunabhängige Relaxation der Pulmonalarterie durch 5-HT von $98 \pm 11\%$ ($n = 14$; Abb. 39d) konnte beim Schlachtschwein nicht mehr beobachtet werden (Abb. 39b). Dieser vollständige oder zumindest partielle Verlust der agonistischen Wirksamkeit von 5-HT und 5-Carboxamidotryptamin an Pulmonalarterien des Schlachtschweins nach mechanischer Entfernung des Endothels kann auf molekularbiologischer Ebene auf eine vergleichsweise geringere Expression des 5-HT₇-Rezeptors zurückgeführt werden (siehe Kapitel 3.2.2.4.).

Für die weitere Untersuchung der 5-HT₇-Rezeptor-vermittelten, endothelunabhängigen Relaxation durch 5-Carboxamidotryptamin wurden die Läuferchweine anhand ihres Gewichtes in 3 Klassen unterteilt: 20 – 30 kg (entsprechend eines Alters von 9 – 12 Wochen), 30 – 40 kg (10 – 15 Wochen) und 40 – 45 kg (13 – 15 Wochen). Mit zunehmendem Alter nahm das Ausmaß der 5-Carboxamidotryptamin-induzierten direkten Relaxation der Pulmonalarterien kontinuierlich von $126 \pm 9\%$ beim Läuferchwein (20 – 30 kg; $n = 8$) über $123 \pm 6\%$ (30 – 40 kg; $n = 14$) bis zu $96 \pm 7\%$ (> 40 kg; $n = 6$) und $58 \pm 11\%$ beim Schlachtschwein (> 100 kg; $n = 6$) ab (Abb. 48).

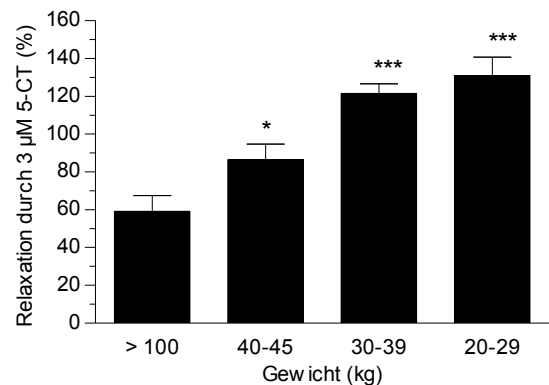


Abb. 48. Vergleich der relaxierenden Effekte von 5-CT (3 µM) an Pulmonalarterien des Läuferchweins (20 – 45 kg) und des Schlachtschweins (> 100 kg) in Abhängigkeit vom Gewicht des Tiers. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete altersabhängige Zunahme endothelabhängiger, über die Freisetzung von NO vermittelter Effekte der Schweinepulmonalarterien ist im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Befunden für andere Vasorelaxantien. Eine Zunahme der endothelabhängigen Relaxation der Pulmonalarterien beim Ferkel durch Acetylcholin und Bradykinin innerhalb der ersten 30 Lebenstage wurde beschrieben (Zellers & Vanhoutte, 1991). Dieses Phänomen kann mit einer kontinuierlichen Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber NO erklärt werden, wie Experimente mit der direkt NO freisetzenden Substanz Nitroprussidnatrium zeigten (Liu *et al.*, 1992). Eine physiologische Freisetzung von NO in geringer Konzentration, wie sie *in vivo* bereits unter Basalbedingungen zu beobachten ist, spielt eine entscheidende Rolle um den Tonus der pulmonalen Blutgefäße auf einem niedrigen Niveau zu halten (Wiklund *et al.* 1990).

Die ausgeprägte, 5-HT₇-Rezeptor-vermittelte Relaxation der Pulmonalarterien bei jungen

Schweinen kann hingegen möglicherweise als Kompensationsreaktion auf den schlagartig erhöhten pulmonalen Blutfluss nach der Geburt interpretiert werden. Während der nachfolgenden Wachstumsphase nimmt diese endothelunabhängige Relaxation kontinuierlich wieder ab. Um die entwicklungsphysiologische Bedeutung des 5-HT₇-Rezeptors zu bestätigen sind allerdings weitere Untersuchungen u.a. an neugeborenen Ferkeln nötig.

3.2.2.6. Die Pulmonalarterie des Läufer Schweins als vaskulärer Bioassay

Es konnte gezeigt werden, dass nach mechanischer Entfernung des Endothels die durch 5-HT und durch 5-Carboxamidotryptamin verursachten relaxierenden Effekte der Pulmonalarterien des Läufer Schweins exklusiv durch 5-HT₇-Rezeptoren vermittelt werden. Ebenso gelang die Etablierung der vom Endothel befreiten Läufer Schweinpulmonalarterien als Bioassay zur Charakterisierung von 5-HT₇-Rezeptor-vermittelten agonistischen und antagonistischen Effekten neuer Arzneistoffe (Kapitel 3.2.2.2.).

Da die Zucht und Schlachtung von Schweinen vorrangig anderen Interessen dient, konnte mit der Pulmonalarterie des Läufer Schweins ein funktioneller *Ex-vivo*-Assay ohne Verwendung von Labortieren etabliert werden. Dieser Assay ist somit eine ethisch zu bevorzugende Alternative gegenüber den derzeit verwendeten 5-HT₇-Standardmodellen am Meerschweinchenileum (Carter *et al.*, 1995; Lucchelli *et al.*, 2000), an der Hundekoronararterie (Terrón, 1996), an der Hundecerebralarterie (Terrón & Falcón-Neri, 1999) sowie an der externen und internen *A. carotis* des Hundes (Centurión *et al.*, 2000; Villalón *et al.*, 1997).

Es sei anzumerken, dass die beim Läufer Schwein bzw. Schlachtschwein beobachtete Funktion von 5-HT als Vasorelaxans in Pulmonalarterien im Vergleich zu anderen Säugetieren wahrscheinlich einzigartig ist. In Pulmonalarterien der Katze, des Rinds, des Hundes, der Ziege, des Meerschweinchens, des Kaninchens, der Ratte und des Schafs konnten lediglich kontraktile Effekte nach Applikation von 5-HT beobachtet werden (Morcillo & Cortijo, 1999). Auch an Pulmonalarterien des Menschen vermittelt 5-HT kontraktile Effekte, die sowohl von 5-HT_{1B}- als auch von 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt werden (Cortijo *et al.*, 1997). Bedingt durch diese Speciesunterschiede der Rezeptordistribution darf nicht von den 5-HT-vermittelten Effekten an den Schweinepulmonalarterien auf mögliche Effekte an humanen Pulmonalgefäßen geschlussfolgert werden. Andererseits ist eine allgemeine Vorhersage vaskulärer Effekte an 5-HT₇-Rezeptoren des Menschen aufgrund der geringen molekularbiologischen (Bhalla *et al.*, 2002b) und pharmakologischen (Inoue *et al.*, 2003) Unterschiede des Rezeptors zwischen Mensch und Schwein denkbar.

3.3. Ergoline

Ergoline zeichnen sich durch eine hohe Aktivität im kardiovaskulären System aus. Sie vermitteln ihre Effekte als Antagonisten oder als Partialagonisten insbesondere an vaskulären α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren sowie an vaskulären 5-HT-Rezeptoren (Berde & Stürmer, 1978; Silberstein, 1997). Im folgenden Abschnitt wurden daher die pharmakologischen Eigenschaften natürlich vorkommender Ergoline und ihrer partialsynthetischen Abkömmlinge an Blutgefäßen verschiedener *Species* untersucht.

3.3.1. Natürlich vorkommende Ergoline und ihre Dihydroderivate

3.3.1.1. Effekte an α_1 -Adrenozeptoren

Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren): Nach einer selektiven Inaktivierung der an der Rattenschwanzarterie vorkommenden α_{1B} -Adrenozeptoren mittels Chloroethylclonidin (100 μ M) in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) wurden die pharmakologischen Eigenschaften von Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin, α -Ergokryptin, Lysergol und Festuclavin untersucht. Keines dieser Ergoline vermochte unter den experimentellen Bedingungen die Rattenschwanzarterie zu kontrahieren. Die Ergopeptine Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin antagonisierten in nanomolarer Konzentration (Testkonzentration 100 nM) die vasokontraktile Wirkung von Noradrenalin durch eine deutliche Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve, während der Maximaleffekt nahezu unbeeinflusst blieb (Abb. 49). Bemerkenswert ist insbesondere die hohe Affinität von Dihydroergotamin zum α_{1A} -Adrenozeptor der Rattenschwanzarterie (scheinbarer $pK_B = 8,66 \pm 0,06, n = 4$), welche signifikant über der aller anderen Ergoline lag. Eine deutlich geringere

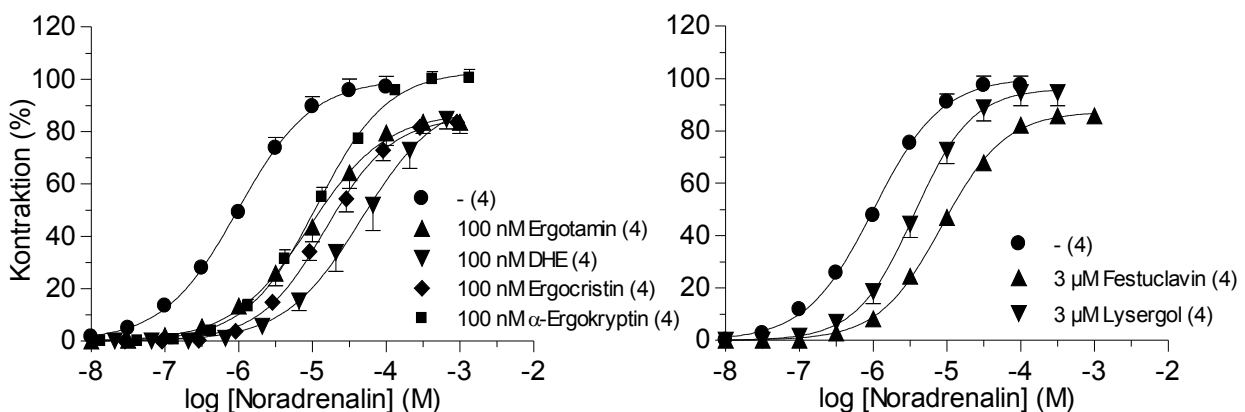


Abb. 49. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μ M) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit von Ergotamin (100 nM), Dihydroergotamin (DHE; 100 nM), Ergocristin (100 nM), α -Ergokryptin (100 nM), Festuclavin (3 μ M) oder Lysergol (3 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

antagonistische Potenz zeigten hingegen die Clavine Festuclavin (scheinbarer $pK_B = 6,26 \pm 0,09$, $n = 4$) und Lysergol (scheinbarer $pK_B = 5,70 \pm 0,09$, $n = 4$) (Tab. 14).

Tab. 14. Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
Ergotamin	4	0,1	$7,95 \pm 0,10$	87 ± 4
Dihydroergotamin	4	0,1	$8,66 \pm 0,06$	95 ± 5
Ergocristin	4	0,1	$8,15 \pm 0,13$	83 ± 4
α -Ergokryptin	4	0,1	$8,01 \pm 0,07$	103 ± 3
Festuclavin	4	3	$6,26 \pm 0,09$	88 ± 3
Lysergol	4	3	$5,70 \pm 0,09$	96 ± 4

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin).

Rattensamenleiter (α_{1A} -Adrenozeptoren): Zwecks Validierung der an der Rattenschwanzarterie ermittelten Affinitätsdaten wurden exemplarisch die Ergopeptine Ergotamin und Dihydroergotamin mit Hilfe des α_{1A} -Adrenozeptor-Standardassays am Rattensamenleiter untersucht. Wie auch an den α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie zeigten weder Ergotamin noch Dihydroergotamin eine agonistische Wirksamkeit. Beide Ergoline inhibierten die durch Noradrenalin induzierte phasische (und tonische) Kontraktion des Rattensamenleiters (Abb. 50). Die anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin ermittelte Affinitätskonstante lag im Fall von Ergotamin (scheinbarer $pK_B = 8,17 \pm 0,01$, $n = 3$) im gleichen Bereich wie der an der Rattenschwanzarterie ermittelte Wert, während der pK_B -Wert von Dihydroergotamin am Rattensamenleiter (scheinbarer $pK_B = 8,03 \pm 0,13$, $n = 3$) etwa um den Faktor 4 niedriger lag (Tab. 15). Beide Substanzen verursachten zusätzlich eine deutliche Depression des Maximaleffekts von Noradrenalin. Dies kann durch das Fehlen einer

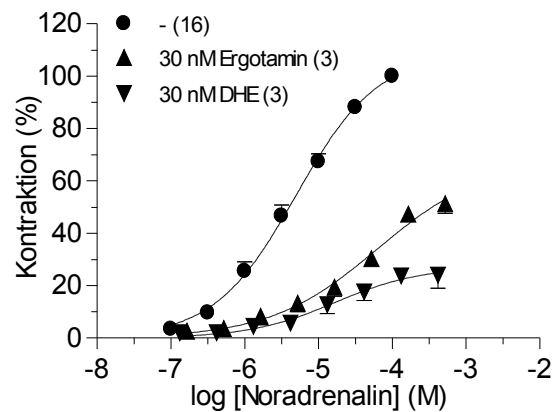


Abb. 50. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion des Rattensamenleiters durch Ergotamin (30 nM) und Dihydroergotamin (DHE; 30 nM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Rezeptorreserve für Noradrenalin erklärt werden, was durch einen niedrigeren pEC_{50} -Wert von Noradrenalin am Rattensamenleiter ($pEC_{50} = 5,12 \pm 0,02$, $n = 4$) im Vergleich zur Rattenschwanzarterie ($pEC_{50} = 6,14 \pm 0,02$, $n = 95$) bestätigt wurde.

Tab. 15. Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
Ergotamin	3	0,03	$8,17 \pm 0,01$	56 ± 5
Dihydroergotamin	3	0,03	$8,03 \pm 0,13$	27 ± 5

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin).

Rattenschwanzarterie (α_{1B} -Adrenozeptoren): Die pharmakologischen Eigenschaften von Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin an vaskulären α_{1B} -Adrenozeptoren wurden an der Rattenschwanzarterie untersucht. Um Effekte der in diesem Organ vorkommenden α_{1A} -Adrenozeptoren auszuschließen, wurden die Experimente in Gegenwart von B8805-033 ($3 \mu M$) durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.1.2.). Alle untersuchten Ergopeptide (Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin) konnten als sehr schwache Partialagonisten identifiziert werden (Tab. 16). Durch die unter den experimentellen Bedingungen anwesenden α_2 - und $5-HT_2$ -Antagonisten (Idazoxan und Methysergid, siehe Methoden) ist eine Beteiligung eines anderen Rezeptors als dem α_{1B} -Adrenozeptor an der beobachteten Vasokonstriktion unwahrscheinlich. Auf Grund der geringen Maximaleffekte ($E_{max} = 3 - 8\%$) wurde jedoch von einer weiteren Charakterisierung der agonistischen Wirkkomponente der Ergoline abgesehen.

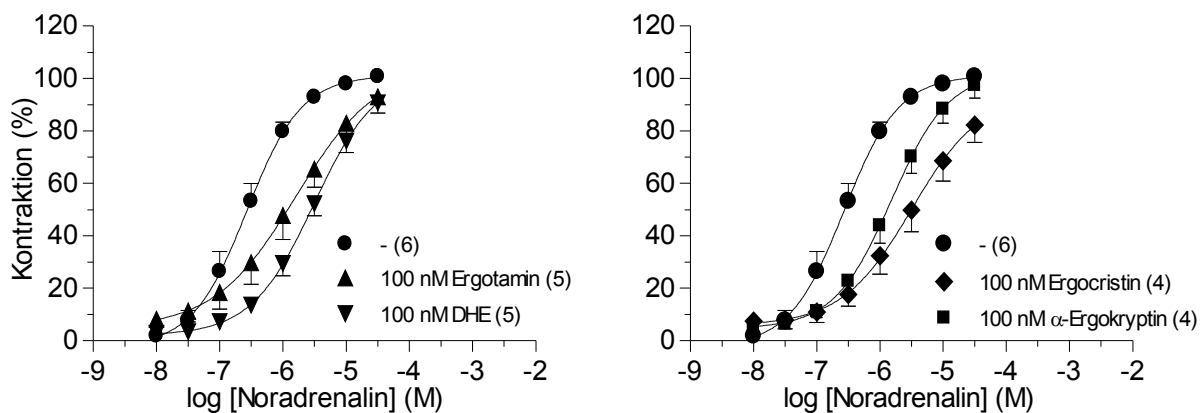


Abb. 51. Antagonisierung der Noradrenalin-vermittelten Kontraktion der Rattenschwanzarterie in Gegenwart von B8805-033 ($3 \mu M$) in Ab- bzw. Anwesenheit der Partialagonisten Ergotamin (100 nM), Dihydroergotamin (DHE; 100 nM), Ergocristin (100 nM) oder α -Ergokryptin (100 nM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte $\pm S.E.M.$ aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Die Rezeptoraffinität der untersuchten Ergopeptine wurde anhand ihrer antagonistischen Wirkkomponente mit Hilfe der Methode nach *Marano* und *Kaumann* bestimmt. Wie auch an α_{1A} -Adrenozeptoren führten die getesteten Ergopeptine in nanomolarer Konzentration (Testkonzentration 100 nM) zu einer parallelen Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin ohne Depression des Maximaleffekts (Abb. 51). Die ermittelten pK_P -Werte zeigten auch am α_{1B} -Adrenozeptor der Rattenschwanzarterie eine signifikant höhere Affinität von Dihydroergotamin ($pK_P = 8,02 \pm 0,07$, $n = 5$) zum Rezeptor im Vergleich zu Ergotamin ($pK_P = 7,61 \pm 0,08$, $n = 5$) (Tab. 16).

Tab. 16. Partialagonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_P</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
Ergotamin	5	n.e.	8 ± 2	n.e.	5	0,1	7,61 ± 0,08	99 ± 3
Dihydroergotamin	5	n.e.	3 ± 1	n.e.	5	0,1	8,02 ± 0,07	100 ± 3
Ergocristin	4	n.e.	8 ± 3	n.e.	4	0,1	7,90 ± 0,03	94 ± 5
α-Ergokryptin	4	n.e.	6 ± 2	n.e.	4	0,1	7,62 ± 0,05	103 ± 4

^a E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin). n.e. bedeutet nicht ermittelt.

Meerschweinchenmilz (α_{1B} -Adrenozeptoren): Im Gegensatz zur Rattenschwanzarterie konnten keine kontraktile Effekte am nichtvaskulären α_{1B} -Adrenozeptormodell der Meerschweinchenmilz nach Zugabe von Ergotamin und Dihydroergotamin beobachtet werden. Dies kann möglicherweise durch das deutlich ungünstigere Signal-Rausch-Verhältnis in diesem Testsystem erklärt werden, das eine Detektion von sehr kleinen Effekten unmöglich macht.

Alle getesteten Ergoline (Ergotamin, Dihydroergotamin, Festuclavin und Lysergol) inhibierten die durch Noradrenalin induzierte Kontraktion der Meerschweinchenmilz durch eine Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve. Ergotamin verursachte zusätzlich eine signifikante, moderate Depression des Maximaleffekts von Noradrenalin ($78 \pm 4\%$, $n = 4$). Die mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten waren im Fall von Ergotamin ($pK_B = 7,52 \pm 0,04$, $n = 16$) identisch mit dem an der Rattenschwanzarterie ermittelten pK_P -Wert, während für Dihydroergotamin an der Meerschweinchenmilz ($pK_B = 7,61 \pm 0,05$, $n = 16$) ein signifikant niedrigerer Wert ermittelt wurde (Abb. 52). Die Clavine Festuclavin und Lysergol waren auch an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz nur mäßig potente Antagonisten (Tab. 17).

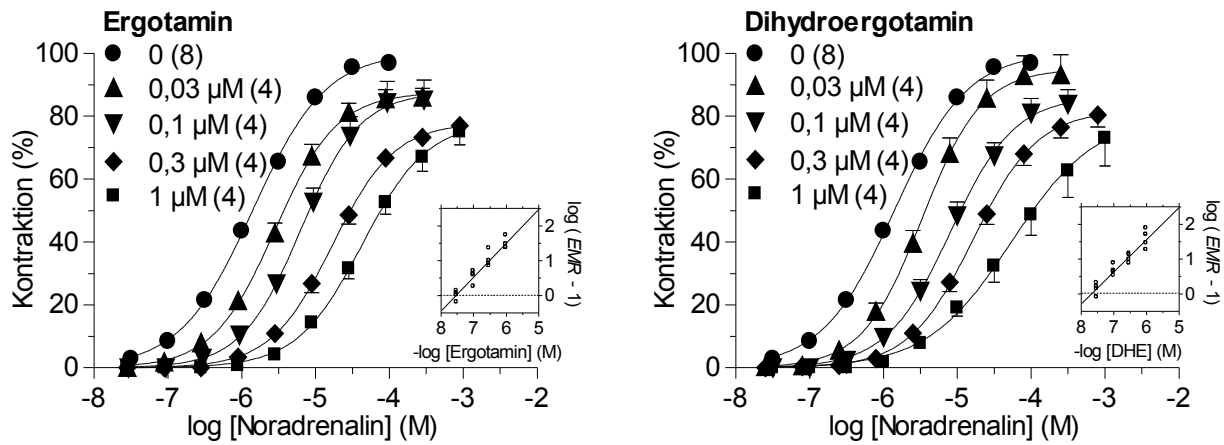


Abb. 52. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Meerschweinchenmilz durch Ergotamin (0,03 – 1 μM) und Dihydroergotamin (DHE; 0,03 – 1 μM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $7,52 \pm 0,04$ für Ergotamin und $7,61 \pm 0,05$ für Dihydroergotamin ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots waren mit $0,98 \pm 0,08$ und $0,92 \pm 0,08$ nicht signifikant von 1 verschieden.

Tab. 17. Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz.

	n	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
Ergotamin	16	0,03 – 1	$7,52 \pm 0,04$	78 ± 4
Dihydroergotamin	16	0,03 – 1	$7,61 \pm 0,05$	80 ± 10
Festuclavin	4	3	$6,10 \pm 0,08$	103 ± 3
Lysergol	3	3	$5,75 \pm 0,12$	91 ± 7

^aScheinbarer (Festuclavin und Lysergol) bzw. voller (Ergotamin und Dihydroergotamin) pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin).

Rattenaorta (α_{1D} -Adrenozeptoren): Ergotamin agiert an der Rattenaorta als ein schwacher Partialagonist ($pEC_{50} = 7,44 \pm 0,19$, $E_{max} = 14 \pm 5\%$, $n = 6$). Die durch Ergotamin induzierte Kontraktion der Rattenaorta konnte durch den α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 (0,1 μM) antagonisiert werden (Abb. 53). Der anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Ergotamin ermittelte scheinbare pK_B -Wert von $8,47 \pm 0,36$ ($n = 4$) stimmt mit Literaturdaten für BMY 7378 an rekombinanten und nativen $\alpha_{1D/D}$ -Adrenozeptoren überein (Goetz *et al.*, 1995; Saussy *et al.*, 1996) und ist identisch mit dem für BMY 7378 gegen Noradrenalin am gleichen Organ ermittelten Wert ($pK_B = 8,10 \pm 0,06$; $n = 18$). Damit konnte gezeigt werden, dass die Ergotamin-induzierte Kontraktion der Rattenaorta durch α_{1D} -Adrenozeptoren vermittelt wird. Auch

Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin kontrahierten die Rattenaorta. Da aber die durch diese Ergopeptine vermittelten kontraktile Effekte deutlich geringer ausgeprägt waren als die durch Ergotamin, wurde von einer Quantifizierung der agonistischen Wirkkomponente abgesehen.

Die anhand ihrer antagonistischen Wirkkomponente ermittelten Rezeptoraffinitäten lagen auch am α_{1D} -Adrenozeptor der Rattenaorta im nanomolaren Bereich. Der ermittelte pK_P -Wert von Dihydroergotamin ($pK_P = 7,87 \pm 0,15, n = 6$) lag in um Faktor 2,3 über dem von Ergotamin ($pK_P = 7,51 \pm 0,14, n = 6$) (Tab. 18).

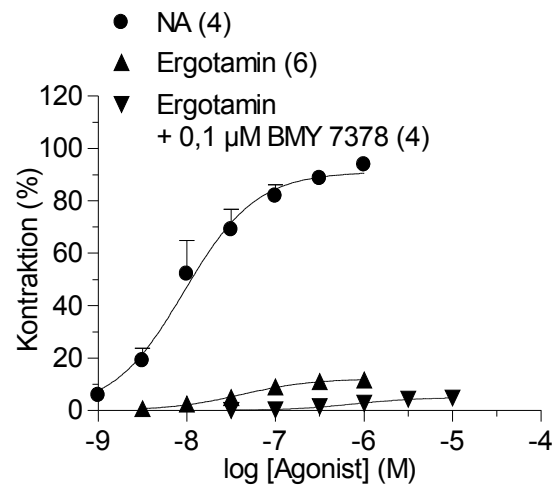


Abb. 53. Kontraktion der Rattenaorta durch Noradrenalin und durch Ergotamin in Ab- bzw. Anwesenheit des α_{1D} -Adrenozeptorantagonisten BMY 7378 (0,1 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Tab. 18. Partialagonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_P bzw. pK_B^b</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
Ergotamin	6	7,44 \pm 0,19	14 \pm 5	7,60 \pm 0,14	6	1	7,51 \pm 0,14	90 \pm 4
Dihydroergotamin	6	n.e.	4 \pm 2	n.e.	6	1	7,87 \pm 0,15	88 \pm 4
Ergocristin	5	n.e.	5 \pm 2	n.e.	5	0,1	7,55 \pm 0,05	100 \pm 3
α -Ergokryptin	4	n.e.	3 \pm 1	n.e.	4	0,1	7,68 \pm 0,04	100 \pm 3
Festuclavin ^c	4	-	0	-	4	1 – 30	6,85 \pm 0,04	99 \pm 2
Lysergol ^c	8	-	0	-	4	1 – 30	6,35 \pm 0,03	103 \pm 1

^a E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin). ^bScheinbarer pK_B . ^cDaten von Pertz, 1996.

Bewertung des pharmakologischen Profils natürlicher Ergoline und ihrer Dihydroderivate an α_1 -Adrenozeptoren: Ergoline sind in der Literatur als Partialagonisten und vor allem als Antagonisten an α_1 -Adrenozeptoren beschrieben worden (Roquebert & Demichel, 1987; Roquebert & Grenié, 1986,1987; Villalón *et al.*, 2004; Valdivia *et al.*, 2004). Ihre Wirkqualitäten (partialagonistisch oder antagonistisch) und ihre Wirkpotenzen variieren dabei in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes.

Die Ergopeptine Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin zeigten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen an vaskulären α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie bzw. der Rattenaorta eine schwache agonistische Wirksamkeit ($E_{\max} = 3 - 8\%$ bzw. $3 - 14\%$). Sowohl an der Rattenschwanzarterie (in Gegenwart eines α_{1A} -Adrenozeptorblockers) als auch an der Rattenaorta war Ergotamin gegenüber Dihydroergotamin hinsichtlich des beobachteten Maximal-effekts überlegen. Die Tendenz, dass hydrierte Ergoline im Vergleich zu ihren Muttersubstanzen keine oder zumindest eine geringere agonistische Wirksamkeit aufweisen, konnte aktuell an der *A. carotis* des Hundes gezeigt werden (Villalón *et al.*, 2004; Valdivia *et al.*, 2004). Keine agonistischen Effekte für Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin konnten hingegen an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie (nach Deaktivierung der α_{1B} -Adrenozeptoren) und des Rattensamenleiters beobachtet werden. Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen an den Samenblasen des Meerschweinchens und der Ratte, die zwar α_{1A} -Adrenozeptor-vermittelt durch Noradrenalin und Adrenalin kontrahiert werden (Silva *et al.*, 1999), nicht aber durch Ergoline, einschließlich Ergotamin, Ergocristin, α -Ergokryptin und ihrer hydrierten Abkömmlinge (Brügger, 1945; Rothlin, 1946; Rothlin & Brügger, 1945).

Ungeachtet der An- bzw. Abwesenheit einer partialagonistischen Wirkkomponente konnte für die untersuchten Ergopeptine in allen α_1 -Adrenozeptormodellen eine potente Antagonisierung der durch Noradrenalin induzierten kontraktile Effekte beobachtet werden. Die Fähigkeit der Ergopeptine zwischen den einzelnen α_1 -Adrenozeptorsubtypen zu diskriminieren ist sehr gering und konnte lediglich zwischen vaskulären α_{1A} -Adrenozeptoren einerseits und vaskulären α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren andererseits nachgewiesen werden (Faktor 1,8 – 6,2). Dihydroergotamin war gegenüber Ergotamin hinsichtlich der antagonistischen Potenz an vaskulären α_{1A} - (Rattenschwanzarterie), α_{1B} - (Rattenschwanzarterie) und α_{1D} -Adrenozeptoren (Rattenaorta) geringfügig überlegen (Faktor 2,3 – 5,1). Eine Überlegenheit der Dihydroergopeptine gegenüber nichthydrierten Ergopeptinen ist ebenfalls an der Samenblase des Meerschweinchens beschrieben worden. Die Reihenfolge der antagonistischen Potenz an diesem Organ (Dihydroergokryptin \approx Dihydroergocristin \approx Dihydroergocornin $>$ Dihydroergotamin $>$ Ergocristin \approx Ergokryptin $>$ Ergocornin \approx Ergotamin; Salzmann & Bucher, 1978) war vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie und der Rattenaorta.

Die Clavine Lysergol und Festuclavin fungierten in allen α_1 -Adrenozeptormodellen als stille Antagonisten. Da ihre antagonistische Potenz etwa um zwei logarithmische Einheiten geringer als die der Ergopeptine war, konnte ein deutlicher Einfluss der trizyklischen Peptidgruppe der Ergoline auf die Bindung an α_1 -Adrenozeptoren gezeigt werden. Die Fähigkeit von Lysergol und Festuclavin zwischen den α_1 -Adrenozeptorsubtypen A, B und D zu diskriminieren fällt mit Faktor 5 zugunsten von α_{1D} - gegenüber α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren ebenfalls sehr moderat aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten Ergopeptine und Clavine Antagonisten oder sehr schwache Partialagonisten an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren sind. Die Clavine Lysergol und Festuclavin zeigen eine um etwa Faktor 100 geringere Affinität zu α -Adrenozeptoren als die Ergopeptine Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin. Die Ergoline beider Stoffklassen konnten nicht oder nur geringfügig zwischen den einzelnen Subtypen diskriminieren. Auf Grund der geringen oder fehlenden agonistischen Wirksamkeit der Ergoline an vaskulären α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren und insbesondere auf Grund der fehlenden agonistischen Wirksamkeit an den in Widerstandsgefäßen dominierenden α_{1A} -Adrenozeptoren erscheint eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Pathogenese des *Ergotismus gangraenosus* unwahrscheinlich.

3.3.1.2. Effekte an 5-HT-Rezeptoren

Ergolinalkaloide, sowohl vom Ergopeptin- als auch vom Clavintyp, sind für ihre hohe Affinität zu fast allen 5-HT-Rezeptoren bekannt (Tfelt-Hansen *et al.*, 2000). Die Wirkungen von Ergotamin und Dihydroergotamin an vaskulären 5-HT_{1B}-, 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren sind auf funktioneller Ebene ebenfalls dokumentiert (siehe Kapitel 1.3.1.). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Erkenntnisse über die Interaktionen von Ergolinen mit vaskulären 5-HT-Rezeptoren ergänzt.

Meerschweinchenbeckenschlagader (5-HT_{1B}-Rezeptoren): Sowohl Ergotamin als auch Dihydroergotamin führten zu einer langsamen Kontraktion der moderat mit PGF_{2 α} (0,01 – 1 μ M) vorkontrahierten Meerschweinchenbeckenschlagader (Abb. 54). Die $E/[A]$ -Kurve von Ergotamin zeigte einen biphasischen Verlauf. Bezüglich der ersten Phase der Kontraktion (1 – 100 nM) war Ergotamin ein potenter Partialagonist ($pEC_{50} = 8,23 \pm 0,07$, $n = 6$), der jedoch nur einen moderaten Maximaleffekt ($E_{max} = 29 \pm 5\%$) im Vergleich zu 5-HT hervorrief. Diese Ergotamin-induzierten kontraktile Effekte der ersten Phase der $E/[A]$ -Kurve konnten durch den 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten SB 216641 (3 nM) inhibiert werden (Abb. 54). Bei dieser Testkonzentration hemmte SB 216641 selektiv die durch 5-HT_{1B}-Rezeptoren vermittelten Effekte (Price *et al.*, 1997; Schlicker *et al.*, 1997). Die zweite Phase der Kontraktion durch Ergotamin ($\geq 0,3 \mu$ M) wurde hingegen nicht durch SB 216641 beeinflusst. Da anhand publizierter Daten für andere Ergoline, wie z.B. Lysergol und Ergometrin, anzunehmen war, dass die zweite, gegenüber einem 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten insensitive Phase der Kontraktion trotz der Anwesenheit von Ketanserin durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt wird (Pertz, 1993), wurde von einer weiteren Untersuchung dieser Kontraktion abgesehen.

Die $E/[A]$ -Kurve von Dihydroergotamin zeigte im Gegensatz zu der von Ergotamin einen monophasischen Verlauf. Wie auch Ergotamin war Dihydroergotamin an der Meerschweinchen-

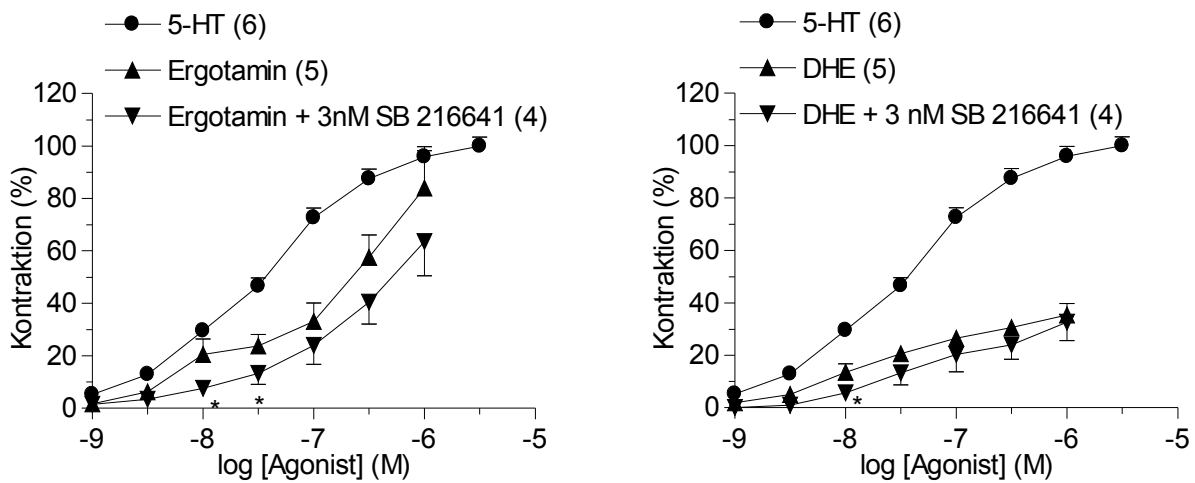


Abb. 54. Kontraktion der moderat mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierten Meerschweinchenbeckenschlagader durch 5-HT, Ergotamin und Dihydroergotamin (DHE) in Ab- bzw. Anwesenheit von SB 216641 (3 nM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. * $P < 0,05$.

beckenschlagader ein potenter Partialagonist ($\text{pEC}_{50} = 7,74 \pm 0,16$; $E_{\text{max}} = 33 \pm 4\%$, $n = 5$). SB 216641 (3 nM) führte zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Dihydroergotamin (Abb. 54). Der im Rahmen dieser Arbeit für SB 216641 gegen Dihydroergotamin ermittelte scheinbare pK_B -Wert von $8,6 \pm 0,3$ ($n = 4$) sprach für eine Beteiligung von 5-HT_{1B} -Rezeptoren an der durch Dihydroergotamin induzierten Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader (Price *et al.*, 1997).

In Experimenten, in denen die antagonistische Wirkkomponente von Ergotamin und Dihydroergotamin untersucht wurde, führten beide Ergoline zu einer Inhibition der 5-HT-induzierten Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader, die sich in einer Rechtsverschiebung und einer Depression der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT widerspiegelte (Tab. 19). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Gleichgewichtskonstanten (scheinbarer $\text{pK}_B = 8,97 \pm 0,06$, $n = 4$ für Ergotamin bzw. $8,61 \pm 0,09$, $n = 4$ für Dihydroergotamin) sind in Übereinstimmung mit den an rekombinanten 5-HT_{1B} -Rezeptoren von Meerschweinchen, Schwein und Mensch ermittelten

Tab. 19. Partialagonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{1B} -Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max} (%) ^a	<i>pK</i> _P	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pK</i> _P	<i>E</i> _{max} (%) ^a
Ergotamin	6	$8,23 \pm 0,07^b$	29 ± 5^b	n.e.	4	0,003	$8,97 \pm 0,06$	27 ± 3
Dihydroergotamin	5	$7,74 \pm 0,16$	33 ± 4	n.e.	4	0,003	$8,61 \pm 0,09$	45 ± 5
Lysergol ^c	9	$7,63 \pm 0,06^b$	71 ± 4^b	n.e.	-	-	-	-

^a E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bErste Phase der Kontraktion. ^cDaten von Pertz, 1993.

Radioligandbindungsdaten beider Liganden (Zgombick *et al.*, 1997; Pauwels *et al.*, 1998; Bhalla *et al.*, 2001).

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): Sowohl Ergocristin als auch α -Ergokryptin fungierten als potente partielle Agonisten an der Rattenschwanzarterie (Abb. 55), wie es auch zuvor für Ergotamin beschrieben wurde (Schöning *et al.*, 2001). Dihydroergotamin vermochte ebenfalls die Rattenschwanzarterie zu kontrahieren (Abb. 55). Im Gegensatz dazu berichteten Kalkman und Schneider (1996), dass Dihydroergotamin ein stiller Antagonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenaorta ist. Das Fehlen eines agonistischen Effekts von Dihydroergotamin an der Rattenaorta kann möglicherweise durch die vergleichsweise geringere Rezeptordichte an der Rattenaorta gegenüber der Rattenschwanzarterie erklärt werden (Doggrell, 1995; Doggrell & Chen, 2001). Die von Dihydroergotamin, Ergocristin und α -Ergokryptin hervorgerufenen maximalen Kontraktionen ($E_{\max} = 38 \pm 6\%$, $39 \pm 5\%$ und $38 \pm 3\%$) sind geringfügig niedriger als die von Ergotamin ($E_{\max} = 52 \pm 4\%$; $P < 0,05$; Tab. 20). Die kontraktile Effekte dieser Ergopeptide konnten durch den 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (3 nM) gehemmt werden (ohne Abbildung). Die anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve

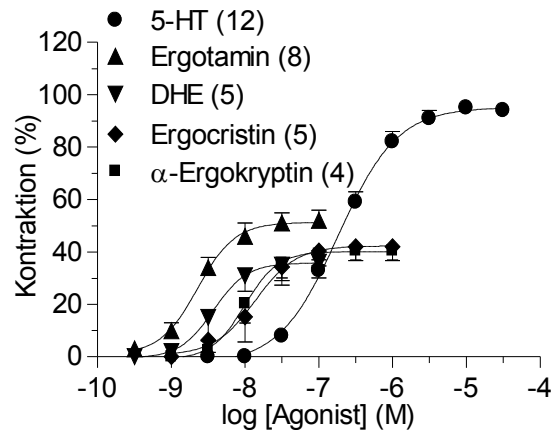


Abb. 55. Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 5-HT, Ergotamin, Dihydroergotamin (DHE), Ergocristin und α -Ergokryptin. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Tab. 20. Partialagonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max} (%) ^a	<i>pK</i> _P	<i>n</i>	Konz. (μ M)	<i>pK</i> _P bzw. <i>pK</i> _B ^b	<i>E</i> _{max} (%) ^a
Ergotamin ^c	8	8,69 \pm 0,07	52 \pm 4	8,36 \pm 0,11	-	-	-	-
Dihydroergotamin	5	8,37 \pm 0,13	38 \pm 6	8,23 \pm 0,13	-	-	-	-
Ergocristin	5	7,75 \pm 0,15	39 \pm 5	7,87 \pm 0,23	-	-	-	-
α -Ergokryptin	4	7,85 \pm 0,08	38 \pm 3	7,83 \pm 0,18	-	-	-	-
Festuclavin ^d	4	-	0	-	4	1	6,83 \pm 0,06	95 \pm 2
Lysergol ^d	11	6,63 \pm 0,04	18 \pm 3	6,88 \pm 0,07	8	1	7,66 \pm 0,02	97 \pm 1

^a E_{\max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bScheinbarer pK_B -Wert. ^cDaten von Schöning *et al.*, 2001. ^dDaten von Pertz, 1993.

ermittelten scheinbaren pK_B -Werte für Ketanserin ($9,07 \pm 0,12$ gegen Dihydroergotamin, $9,11 \pm 0,22$ gegen Ergocristin und $9,26 \pm 0,13$ gegen α -Ergokryptin) sind im Einklang mit publizierten Bindungsaffinitäten für Ketanserin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Hoyer *et al.*, 1994).

Während die agonistische Komponente dieser Partialagonisten ausgiebig untersucht wurde, gelang eine Quantifizierung der antagonistischen Wirkkomponente nicht. Dies ist auf die durch die Ergopeptine verursachte ausgeprägte und stark schwankende Depression des Maximaleffekts zurückzuführen (unüberwindbarer Antagonismus; ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu ist die antagonistische Wirkkomponente der Clavine Festuclavin und Lysergol als überwindbar beschrieben worden (Pertz, 1996).

Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): An der Schweinekoronararterie führten sowohl Ergotamin als auch Dihydroergotamin zu einer partiellen Kontraktionen des Gefäßmuskels ($pEC_{50} = 8,27 \pm 0,14$, $n = 5$ bzw. $8,02 \pm 0,03$, $n = 5$) (Abb.

56). Die durch Ergotamin erzielte maximale Kontraktion lag signifikant über der von Dihydroergotamin ($E_{max} = 46 \pm 6\%$ bzw. $15 \pm 3\%$; $P < 0,05$). Die kontraktile Effekte von Ergotamin und Dihydroergotamin konnten durch Ketanserin (10 nM) antagonisiert werden (ohne Abbildung). Die gegen Ergotamin und Dihydroergotamin ermittelten scheinbaren pK_B -Werte für Ketanserin von $8,95 \pm 0,05$ bzw. $8,78 \pm 0,03$ lagen im gleichen Bereich wie der gegen 5-HT ermittelte Wert ($8,88 \pm 0,03$; Kapitel 2.3.1.8.) und sind im Einklang mit einer Beteiligung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Hoyer *et al.*, 1994). Neben Ergotamin und Dihydroergotamin führten auch die Clavine Festuclavin und Lysergol zu einer signifikanten, wenn auch nur sehr schwachen Kontraktion der Schweinekoronararterie ($E_{max} = 2 \pm 1\%$ bzw. $6 \pm 1\%$). Die durch Lysergol induzierten kontraktile Effekte konnten durch Ketanserin gehemmt werden (scheinbarer pK_B -Wert $8,5 \pm 0,1$, $n = 4$; ohne Abbildung). Im Falle von Festuclavin wurde auf Grund des geringen maximalen agonistischen Effekts auf eine weitere Charakterisierung der agonistischen Wirksamkeit verzichtet.

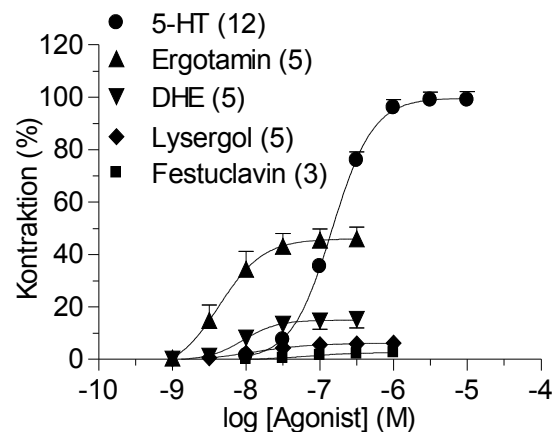


Abb. 56. Kontraktion der Schweinekoronararterie durch 5-HT, Ergotamin, Dihydroergotamin (DHE), Lysergol und Festuclavin. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

In Experimenten, in denen die antagonistische Wirkkomponente der Ergoline untersucht wurde, inhibierten beide Clavine ($0,1 \mu\text{M}$) die durch 5-HT induzierte Kontraktion der Schweinekoronar-

arterie. Die dabei ermittelten Affinitätskonstanten für Lysergol und Festuclavin lagen um eine halbe bzw. um fast eine logarithmische Einheit über den an der Rattenschwanzarterie ermittelten Werten (Tab. 21). Auf eine Quantifizierung der antagonistischen Wirkkomponente von Ergotamin und Dihydroergotamin wurde auf Grund der durch beide Ergopeptine verursachten starken und schlecht reproduzierbaren Depression des Maximaleffekts verzichtet (unüberwindbarer Antagonismus; ohne Abbildung).

Tab. 21. Partialagonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_P</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
Ergotamin	5	8,27 ± 0,14	47 ± 6	8,05 ± 0,13	-	-	-	-
Dihydroergotamin	5	8,02 ± 0,03	15 ± 3	7,96 ± 0,07	-	-	-	-
Festuclavin	4	n.e.	2 ± 1	n.e.	6	1	7,73 ± 0,06	87 ± 6
Lysergol	5	7,79 ± 0,09	6 ± 1	n.e.	4	1	8,22 ± 0,05	95 ± 10

^a*E_{max}* relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. n.e. bedeutet nicht ermittelt.

Schweinepulmonalarterien (5-HT_{2B}): Ergotamin und Dihydroergotamin wurden in der Literatur als potente Agonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien beschrieben, die eine mit 5-HT vergleichbare Relaxation vermitteln (Glusa & Roos, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Clavine Festuclavin und Lyserol keine relaxierenden Effekte an den

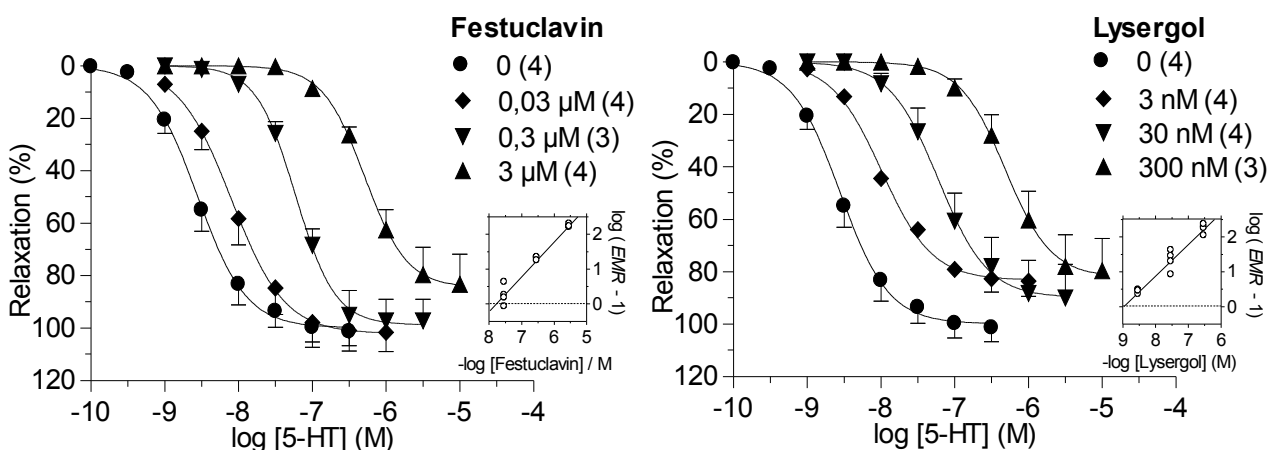


Abb. 57. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Relaxation der Schweinepulmonalarterien durch Festuclavin (0,03 – 3 μM) und durch Lysergol (3 – 300 nM). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte ± *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden *pA₂*-Werte von 7,77 ± 0,05 bzw. 8,82 ± 0,06 ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden im *Schild*-Plot waren mit 1,00 ± 0,06 bzw. 0,90 ± 0,06 nicht signifikant von 1 verschieden.

Schweinepulmonalarterien hervorriefen. Die durch 5-HT vermittelte Relaxation dieser Blutgefäße konnte sowohl durch Festuclavin als auch durch Lysergol kompetitiv inhibiert werden (Abb. 57). Die antagonistischen Potenzen (pA_2 -Werte) beider Clavine lagen in der gleichen Größenordnung wie die jeweiligen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie ermittelten Werte (Tab. 22).

Tab. 22. (Partial-)Agonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{2B}-Rezeptoren den Schweinepulmonalarterien.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max} (%) ^a	<i>pK</i> _P	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pK</i> _B	<i>E</i> _{max} (%) ^a
Ergotamin ^b	18	8,17 ± 0,07	82 ± 8	-	-	-	-	-
Dihydroergotamin ^b	9	7,70 ± 0,11	79 ± 9	-	-	-	-	-
Festuclavin	2	-	0	-	11	0,03 – 3	7,77 ± 0,05	84 ± 11
Lysergol	2	-	0	-	11	3 – 300	8,82 ± 0,06	82 ± 12

^a*E*_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bDaten von Glusa & Roos, 1996.

Pulmonalarterien des Läufer Schweins (5-HT₇): An den mit PGF_{2α} (1 μM) vorkontrahierten und vom Endothel befreiten Läufer Schweinpulmonalarterien führte Ergotamin (1 – 1000 nM) zu einer moderaten Kontraktion (*E*_{max} = 21 ± 9%; *n* = 3; ohne Abbildung). Dieser kontraktile Effekt lässt sich theoretisch einerseits durch einen inversen Agonismus am 5-HT₇-Rezeptor und andererseits durch eine Aktivierung kontraktiler Rezeptoren (z.B. 5-HT_{2A}-Rezeptoren, α₁- oder α₂-Adrenozeptoren) erklären. Da die beobachtete Vasokonstriktion nicht durch den 5-HT₇-Rezeptorantagonisten SB 269970 (30 nM) beeinflusst werden konnte, ist ein inverser Agonismus von Ergotamin an 5-HT₇-Rezeptoren der Pulmonalarterien des Läufer Schweins unwahrscheinlich. Die durch Ergotamin

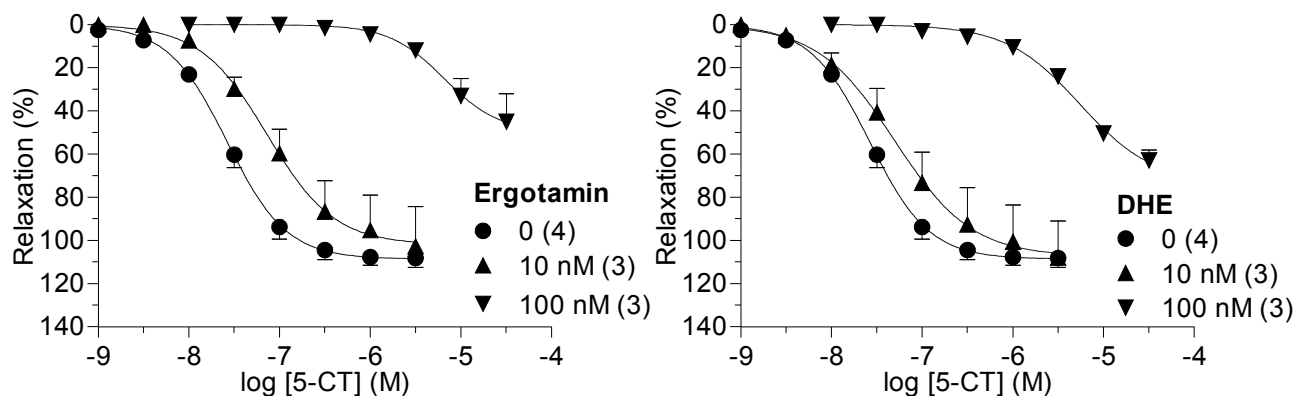


Abb. 58. Inhibition der durch 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) induzierten Relaxation der Läufer Schweinpulmonalarterien durch Ergotamin und durch Dihydroergotamin (DHE). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte ± *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-Carboxamidotryptamin.

hervorgerufene Vasokonstriktion konnte jedoch durch Yohimbin (1 μM) unterdrückt werden (ohne Abbildung), womit gezeigt werden konnte, dass α_2 -Adrenozeptoren für die Ergotamin-induzierte Kontraktion der Läufer Schweinpulmonalarterien verantwortlich sind.

In Gegenwart von Ketanserin (0,1 μM) und Yohimbin (1 μM) beeinflussten weder Ergotamin noch Dihydroergotamin (jeweils 1 – 1000 nM) den Tonus der mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierten Läufer Schweinpulmonalarterien. Beide Ergoline (jeweils 10 nM) führten als stille Antagonisten zu einer Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-Carboxamidotryptamin (Abb. 58, Tab. 23). Höhere Testkonzentrationen von Ergotamin und Dihydroergotamin (jeweils 100 nM) verursachten zusätzlich eine starke Depression des Maximaleffekts von 5-Carboxamidotryptamin (Abb. 58).

Tab. 23. (Partial-)Agonistische und antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT₇-Rezeptoren der Läufer Schweinpulmonalarterien.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_B^b</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
Ergotamin	3	-	0	-	3	0,01	8,21 ± 0,15	98 ± 14
Dihydroergotamin	3	-	0	-	3	0,01	7,93 ± 0,15	106 ± 20

^a E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-Carboxamidotryptamin. ^bScheinbarer pK_B -Wert.

Bewertung des pharmakologischen Profils von natürlichen Ergolinen und ihrer Dihydroderivate an 5-HT-Rezeptoren: An 5-HT_{1B}-Rezeptoren der Meerschweinchenbecken-schlagader, an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie und der Schweinekoronararterie sowie an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien fungierten die Ergopeptide Ergotamin und Dihydroergotamin als Agonisten oder als Partialagonisten. Die beobachteten maximalen agonistischen Effekte von Ergotamin waren in allen Fällen, größer oder gleich denen von Dihydroergotamin. An der Meerschweinchenbeckenschlagader, an der Rattenschwanzarterie, an der Schweinekoronararterie und an den Schweinepulmonalarterien wurden zudem geringfügig, aber signifikant höhere pEC_{50} -Werte für Ergotamin gegenüber Dihydroergotamin ermittelt ($\Delta pEC_{50} = 0,25 - 0,49$). Dieser Unterschied könnte theoretisch einerseits durch eine vergleichsweise höhere Affinität von Ergotamin zu 5-HT-Rezeptoren und andererseits durch die höhere intrinsische Aktivität von Ergotamin anhand des „Operational Model“ nach Black (Black & Leff, 1983; Black *et al.*, 1985) erklärt werden. Experimentell konnten unter Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des nach Bonferroni modifizierten *t*-Tests jedoch keine signifikant höheren Affinitätskonstanten für Ergotamin im Vergleich zu Dihydroergotamin ermittelt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine Hydrierung der Doppelbindung in $\Delta^{9,10}$ -Position des Ergotamins an vaskulären 5-HT-Rezeptoren einen Verlust an agonistischer Wirksamkeit verursachen kann, nicht

aber eine Beeinflussung der Affinität zum Rezeptor zur Folge hat.

An 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie wurde zusätzlich untersucht, ob eine Modifikation der Substituenten an der trizyklischen Peptidgruppe das pharmakologische Verhalten der Ergopeptine beeinflusst. Keine Veränderung der agonistischen Potenz ist durch den Austausch der Benzylgruppe des Ergotamins durch eine Isopropylgruppe (→ Ergovalin) am C-5'-Atom beschrieben worden (Schöning *et al.*, 2001). Ebenso konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bezüglich pEC₅₀- und E_{max}-Werten zwischen α-Ergokryptin (2-Methylpropylsubstituent) und Ergocristin (Benzylsubstituent) gefunden werden, woraus geschlussfolgert werden kann, dass eine Modifikation des Substituenten an C-5'-Position von keiner oder nur von untergeordneter Bedeutung für die pharmakologische Wirksamkeit von Ergopeptinen ist. Dem gegenüber zeigten α-Ergokryptin und Ergocristin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie eine etwa 6fach niedrigere agonistische Potenz, einen um über 10% geringeren Maximaleffekt und eine etwa um Faktor 3 niedrigere Rezeptoraffinität als Ergotamin. Sowohl α-Ergokryptin als auch Ergocristin sind am C-2' mit einer Isopropylgruppe substituiert, während Ergotamin an dieser Stelle eine deutlich kleinere Methylgruppe trägt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die trizyklische Peptidgruppe, insbesondere der Substituent in C-2'-Position, mittelbar oder unmittelbar an der Bindung und Aktivierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors der Ratte beteiligt ist.

Exemplarisch wurden die Clavine Festuclavin und Lysergol an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie und der Schweinekoronararterie sowie an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien untersucht. Lysergol verhielt sich sowohl an der Rattenschwanzarterie als auch an der Schweinekoronararterie als schwacher Partialagonist (E_{max} = 18 bzw. 6%). Ein minimaler Partialagonismus konnte ebenfalls für Festuclavin an der Schweinekoronararterie beobachtet werden (E_{max} = 2%), während eine (partial-)agonistische Wirksamkeit an der Rattenschwanzarterie nicht dokumentiert wurde (Pertz, 1996). Clavine zeigen tendenziell eine höhere Affinität zu vaskulären 5-HT₂-Rezeptoren im Vergleich zu vaskulären α₁-Adrenozeptoren, wobei insbesondere Lysergol für seine starke rezeptordiskriminierende Wirkung bekannt ist (Pertz, 1996). Auffällig ist ebenfalls die um Faktor 3,6 (Lysergol) und Faktor 8 (Festuclavin) geringere Affinität der Clavine zum 5-HT_{2A}-Rezeptor der Ratte im Vergleich zum 5-HT_{2A}-Rezeptor des Schweins. Eine Diskriminierung zwischen 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Ratte und 5-HT_{2A}-Rezeptoren von Nicht-Nagetieren ist insbesondere für Clavinderivate und einfache Ergoline, wie z.B. Pergolid, Lysergsäure und Ergonovin beschrieben worden (Pazos *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993; Hagen *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu konnten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ergopeptine Ergotamin und Dihydroergotamin nicht zwischen 5-HT_{2A} Rezeptoren der Ratte und 5-HT_{2A}-Rezeptoren des Schweins diskriminieren. Dieses Verhalten wird ausführlicher in

Kapitel 3.3.3.4. diskutiert.

3.3.1.3. Auswaschexperimente

Grundlegende qualitative Unterschiede des Antagonismus von Ergotamin und Dihydroergotamin an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie einerseits und an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie andererseits wurden bereits in den Kapiteln 3.3.1.1. und 3.3.1.2. beschrieben. Während der Antagonismus beider Ergoline an α_{1A} -Adrenozeptoren durch hohe Noradrenalkonzentrationen überwindbar war, konnte die antagonistische Wirkkomponente der an 5-HT_{2A}-Rezeptoren partialagonistisch wirkenden Ergoline als scheinbar irreversibel (unüberwindbarer Antagonismus) identifiziert werden.

Diese Unüberwindbarkeit antagonistischer Effekte, wie sie für Ergotamin und Dihydroergotamin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren beobachtet wurde, lässt sich möglicherweise durch einen (pseudo-)irreversiblen Antagonismus erklären. Ein pseudoirreversibler Antagonismus kann beobachtet werden, wenn ein Ligand eine sehr langsame Rezeptordissoziationsgeschwindigkeit zeigt oder nur langsam aus dem Gewebe diffundiert (Martin *et al.*, 1995). Eine pseudoirreversible Hemmung konnte bereits für andere Ergoline, wie z.B. Metergolin, an der perfundierten Rattenniere bestätigt werden (Bond *et al.*, 1989). Ein alternativer Erklärungsversuch ist die durch Kaumann und Mitarbeiter beschriebene allosterische Modulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors (Kaumann & Frenken, 1985, 1988; Lemoine & Kaumann, 1986; Frenken & Kaumann, 1987, 1989).

Die an α_{1A} -Adrenozeptoren beobachtete Überwindbarkeit des Ergolin-induzierten Antagonismus durch Noradrenalin könnte einerseits durch einen rein kompetitiven Mechanismus und andererseits durch einen (pseudo-)irreversiblen Mechanismus unter Vorliegen einer Rezeptorreserve für Noradrenalin erklärt werden (Kenakin, 1993; Vauquelin *et al.*, 2002a,b). Es wurde daher an einer einheitlichen Organpräparation (Rattenschwanzarterie) untersucht, ob die beobachteten qualitativen Unterschiede der antagonistischen Wirkung auf unterschiedliches Assoziations- und Dissoziationsverhalten vom Rezeptor oder von der Biophase zurückzuführen sind. Beurteilt wurde dies durch den spülzeitabhängigen Hemmeffekt $E_H(t)$ von Ergotamin bzw. Dihydroergotamin auf die durch Noradrenalin bzw. durch 5-HT induzierte Vasokonstriktion:

$$E_H(t) = \left(1 - \frac{E(t)}{E(0)}\right) \cdot 100\% \quad , \quad [20]$$

wobei $E(0)$ und $E(t)$ die durch Noradrenalin (10 μ M) oder 5-HT (10 μ M) induzierten Effekte vor bzw. nach Inkubation des Antagonisten (60 min) und einer anschließenden Spülzeit t sind.

Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren): An α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie

fürte Ergotamin ($1 \mu\text{M}$) zu einer $76 \pm 3\%$ igen ($n = 3$) und Dihydroergotamin ($1 \mu\text{M}$) zu einer $95 \pm 3\%$ igen Hemmung ($n = 3$) der durch Noradrenalin ($10 \mu\text{M}$) induzierten Kontraktion. Im Verlauf der 60-minütigen Spülphase ließ die Hemmwirkung von Ergotamin und Dihydroergotamin zwar kontinuierlich nach, konnte aber nicht vollständig aufgehoben werden. Nach Beendigung der 60-minütigen Spülphase betrug die Hemmwirkung von Ergotamin noch $47 \pm 5\%$ ($P < 0,001$) und die von Dihydroergotamin $82 \pm 7\%$ ($P < 0,05$) (Abb. 59). Im Vergleich dazu ließ sich der kompetitive α_{1A} -Adrenozeptorantagonist B8805-033 ($3 \mu\text{M}$) innerhalb von 15 min nahezu vollständig auswaschen (ohne Abbildung).

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): Ergotamin ($0,03 \mu\text{M}$) und Dihydroergotamin ($0,1 \mu\text{M}$) führten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie einerseits zu einer etwa äquieffektiven Hemmung der 5-HT-induzierten Vasokonstriktion, und andererseits vermochten sie selbst die Rattenschwanzarterie zu kontrahieren ($E = 69 \pm 5\%$, $n = 4$ bzw. $E = 30 \pm 7\%$, $n = 4$). Diese direkte Vasokonstriktion nahm im Fall von Ergotamin, nicht aber im Fall von Dihydroergotamin signifikant während der 60-minütigen Spülung ab ($E = 49 \pm 2\%$ bzw. $E = 26 \pm 8\%$; ohne Abbildung). Da eine Ermüdung der Organe oder eine Rezeptordesensibilisierung durch Dauerstimulation nicht ausgeschlossen werden konnte (Bond *et al.*, 1989; Watts *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1995; Hanley & Hensler, 2002), wurde zusätzlich die antagonistische Wirkkomponente untersucht. Beide Ergoline führten zu einer Hemmung der durch 5-HT induzierten Kontraktion (Ergotamin: $E_H = 98 \pm 1\%$, $n = 4$ bzw. Dihydroergotamin: $E_H = 93 \pm 1\%$, $n = 4$). Im Gegensatz zu dem an α_{1A} -Adrenozeptoren durchgeführten Experiment konnte nach 60-minütiger Spülung für Ergotamin keine Abnahme der Hemmwirkung bzw. für Dihydroergotamin nur eine geringfügige Abnahme der Hemmwirkung beobachtet werden ($E_H = 98 \pm 1\%$ bzw. $E_H = 83 \pm 4\%$; Abb. 60). Im Vergleich dazu konnte die

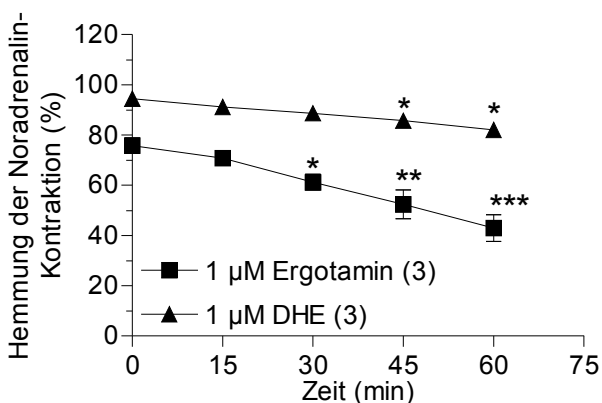


Abb. 59. Hemmung der durch Noradrenalin ($10 \mu\text{M}$) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch Ergotamin ($1 \mu\text{M}$) bzw. Dihydroergotamin (DHE; $1 \mu\text{M}$) nach 0 – 60-minütiger Spülung. Dargestellt sind die Hemmeffekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

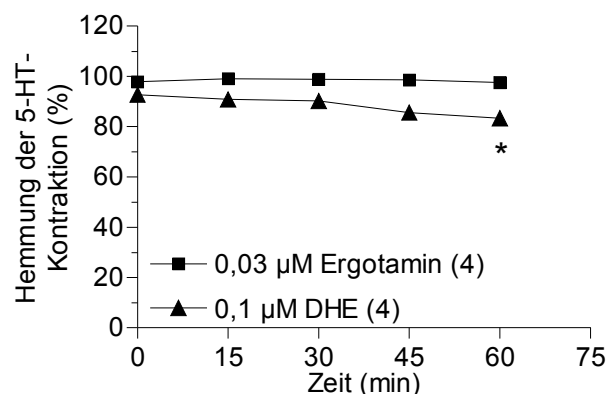


Abb. 60. Hemmung der durch 5-HT ($10 \mu\text{M}$) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch Ergotamin ($0,03 \mu\text{M}$) bzw. Dihydroergotamin (DHE; $0,1 \mu\text{M}$) nach 0 – 60-minütiger Spülung. Dargestellt sind die Hemmeffekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten. * $P < 0,05$.

durch den kompetitiven 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (0,1 µM) verursachte Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion durch eine 30-minütige Spülphase nahezu vollständig aufgehoben werden (ohne Abbildung).

Vergleichende Beurteilung: Sowohl an α_{1A} -Adrenozeptoren als auch an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie ist eine Resistenz der mit Ergotamin bzw. Dihydroergotamin behandelten Organe gegenüber einer 60-minütigen Spülung zu beobachten (Abb. 59, 60). Es lag somit für beide Ergopeptide unter den experimentellen Bedingungen ein irreversibler bzw. nicht vollständig reversibler Mechanismus der Antagonisierung der durch Noradrenalin bzw. 5-HT vermittelten Kontraktionen vor.

Bei einem Vergleich der Befunde an der Rattenschwanzarterie fällt die deutlich verlangsamte Abnahme der Hemmeffekte von Ergotamin und Dihydroergotamin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Vergleich zu α_{1A} -Adrenozeptoren mit zunehmender Spülzeit auf. Ebenfalls konnte eine weitgehende Auswaschresistenz der durch beide Ergoline induzierten agonistischen Effekte an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie beobachtet werden. Diese irreversible Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren durch Ergotamin und Dihydroergotamin ist im Einklang mit publizierten Befunden an der *V. saphena* und den *Vv. mesenteriales* des Menschen (Ergotamin; Mikkelsen *et al.*, 1981) sowie an der Kaninchensaphenavene (Dihydroergotamin; Martin *et al.*, 1995). Da die vorliegenden Untersuchungen an α_{1A} -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren im gleichen Gewebe durchgeführt wurden, kann das unterschiedliche Verhalten beider Ergoline auf die Noradrenalin- bzw. 5-HT-induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie nicht auf einen gewebespezifischen Effekt (z.B. Anreicherung in der Biophase), sondern auf einen rezeptorspezifischen Mechanismus zurückgeführt werden.

Als rezeptorspezifische Mechanismen kommen theoretisch u.a. eine allosterische Modulation, eine Rezeptordimerisierung und eine Translokation des Rezeptors ins Cytoplasma in Frage (Kaumann & Frenken, 1985, 1988; Lemoine & Kaumann, 1986; Frenken & Kaumann, 1987, 1989; Berry *et al.*, 1996; Hanley & Hensler, 2002). Entsprechend der Theorie der allosterischen Modulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors führen allosterische Deaktivatoren zu einer Stabilisierung eines geringer aktiven Zustands des Rezeptors, während Aktivatoren den Rezeptor in einen aktiveren Zustand überführen können. Einige Ergoline, wie z.B. Methysergid, LY 53857 und LSD, sind als allosterische Deaktivatoren an 5-HT_{2A}-Rezeptoren beschrieben worden, andere hingegen, wie z.B. Lysergyl-2-methylbutyrat, sind allosterische Aktivatoren (Frenken & Kaumann, 1987; Kaumann, 1989; Pertz, 1996). Die Theorie der allosterischen Modulation kann jedoch nicht allein die beobachtete Auswaschresistenz Ergotamin- und Dihydroergotamin-behandelter Organe erklären, da diese Auswaschresistenz nicht für andere allosterische Deaktivatoren an der Rattenschwanzarterie

beobachtet werden konnte (z.B. Methysergid; Frenken & Kaumann, 1987).

Neuere Untersuchungen zeigten sowohl eine durch 5-HT_{2A}-Rezeptoragonisten als auch eine durch 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten induzierte Rezeptorinternalisierung auf (Berry *et al.*, 1996; Willins *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus erklärt jedoch nicht allein die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Depression des Maximaleffekt von 5-HT in Anwesenheit von Ergotamin bzw. Dihydroergotamin, da 5-HT in Anwesenheit dieser Ergopeptine deutlich länger zur Erreichung eines Plateaueffekts benötigte (38 ± 8 s in Abwesenheit eines Ergopeptins, 165 ± 29 s in Anwesenheit von Ergotamin und 255 ± 45 s in Anwesenheit von Dihydroergotamin; jeweils $n = 4$; ohne Abbildung).

Die einfachste Erklärung für die unüberwindbare Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch Ergotamin und Dihydroergotamin ist jedoch eine (pseudo-)irreversible Hemmung des 5-HT_{2A}-Rezeptors durch eine unter experimentellen Bedingungen zu langsame Dissoziation des Rezeptor-Ergolin-Komplexes (Vauquelin *et al.*, 2002a,b).

3.3.2. 8 α -Aminoergoline

Lisurid und Tergurid, zwei Ergoline mit 8 α -Aminoergolinstruktur, werden als potente Agonisten (bzw. Partialagonisten) an Dopaminrezeptoren in der Therapie des *Morbus Parkinson* eingesetzt (Flückiger *et al.*, 1985). Neben einer hohen Affinität zu allen Dopaminrezeptorsubtypen ist in der Literatur auch eine starke Interaktion mit 5-HT-Rezeptoren sowie mit α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren beschrieben (Millan *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals eine subtypspezifische Charakterisierung beider 8 α -Aminoergoline an nativen α_1 -Adrenorezeptoren. Zusätzlich wurden Lisurid und Tergurid an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie und der Schweinekoronararterie, sowie an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien untersucht.

3.3.2.1. Effekte an α_1 -Adrenorezeptoren

Sowohl Lisurid als auch Tergurid fungierten als Antagonisten an α_{1A} -Adrenorezeptoren der Rattenschwanzarterie, an α_{1B} -Adrenorezeptoren der Meerschweinchenmilz und an α_{1D} -Adrenorezeptoren der Rattenaorta ohne zu einer Kontraktion dieser Organe zu führen (Abb. 61). Nach einer selektiven Adrenorezeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μ M) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μ M) hemmten sowohl Lisurid als auch Tergurid in submikromolarer Konzentration (Testkonzentration je 0,1 μ M) äquipotent die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Rattenschwanz-

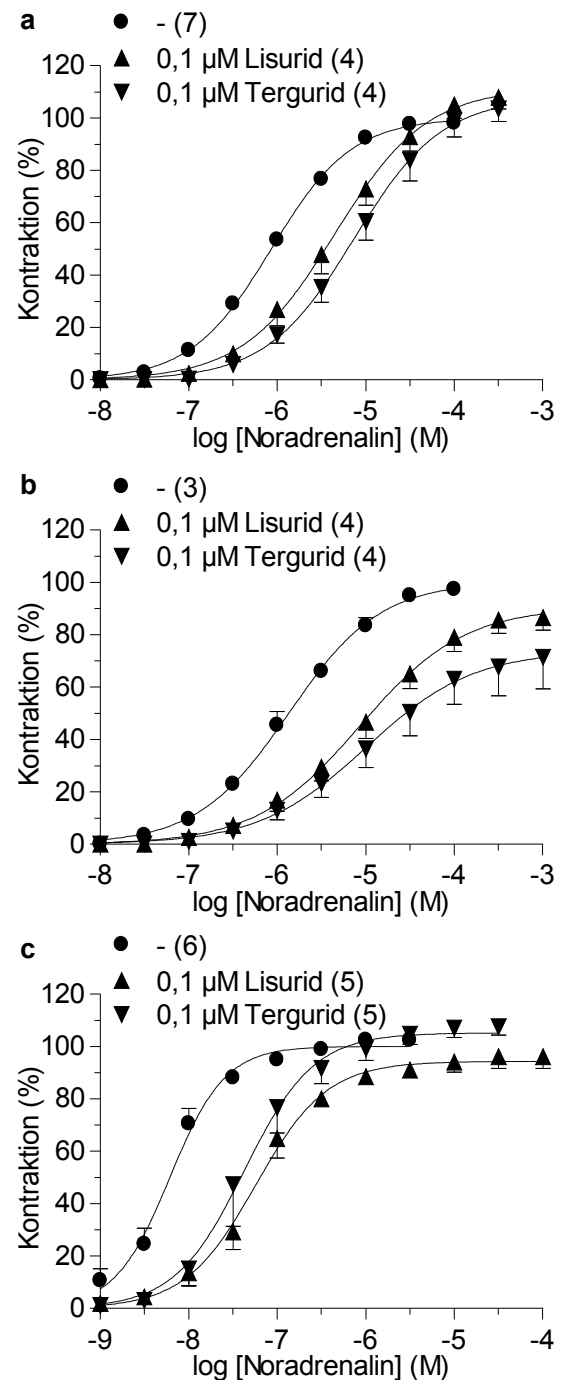


Abb. 61. Antagonistische Effekte von Lisurid und Tergurid auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie nach Adrenorezeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin (100 μ M) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μ M) (a), auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Meerschweinchenmilz (b) und auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Rattenaorta (c). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

arterie. Die an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie ermittelten pK_B -Werte für Lisurid und Tergurid unterschieden sich nicht von denen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz und an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta bestimmten Werten ($P > 0,05$; Tab. 24). Während Lisurid und Tergurid (je 0,1 μM) an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie und an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta zu keiner signifikanten Beeinflussung des Maximaleffekts von Noradrenalin führten, verursachte Tergurid, nicht aber Lisurid, an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz eine moderate, aber signifikante Depression der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin.

Tab. 24. Antagonistische Effekte von 8 α -Aminoergolinen an α_1 -Adrenozeptor-subtypen.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	E_{max} (%) ^b
Rattenschwanzarterie (α_{1A}-Adrenozeptoren)				
Lisurid	4	0,1	7,89 \pm 0,05	111 \pm 4
Tergurid	4	0,1	7,81 \pm 0,07	108 \pm 4
Meerschweinchenmilz (α_{1B}-Adrenozeptoren)				
Lisurid	4	0,1	7,86 \pm 0,05	90 \pm 5
Tergurid	4	0,1	7,73 \pm 0,04	74 \pm 12
Rattenaorta (α_{1D}-Adrenozeptoren)				
Lisurid	5	0,1	7,94 \pm 0,14	100 \pm 3
Tergurid	5	0,1	7,90 \pm 0,06	105 \pm 3

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Bewertung des pharmakologischen Profils von Lisurid und Tergurid an vaskulären α_1 -Adrenozeptoren: Die an rekombinanten humanen α_1 -Adrenozeptor-subtypen ermittelten Radio-ligandbindungsdaten (Millan *et al.*, 2002) konnten durch die an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie, α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz und α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta ermittelten pK_B -Werte (Tab. 24) bestätigt werden. Funktionell ermittelte Daten für Lisurid und Tergurid an α_1 -Adrenozeptor-subtypen sind bisher nur an rekombinanten humanen α_{1A} -Adrenozeptoren in CHO-Zellen veröffentlicht worden. Demnach führten Lisurid und Tergurid zu einer stillen Antagonisierung des Noradrenalin-induzierten [³H]-Phosphatidylinositolumsatzes (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a). Die auf Grund dieser Antagonisierung für beide 8 α -

Aminoergoline ermittelten pK_B -Werte (jeweils 8,0) sind identisch mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit an nativen, vaskulären α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie ermittelten Werten. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide 8α -Aminoergoline nicht zwischen den einzelnen α_1 -Adrenozeptorsubtypen diskriminieren können. Ebenso wurde festgestellt, dass eine Hydrierung der Doppelbindung in $\Delta^{9,10}$ -Position der 8α -Aminoergoline, im Gegensatz zu einer Hydrierung der 8β -Ergoline (siehe Kapitel 3.3.1.1.), keine Zunahme an antagonistischer Potenz an vaskulären α_1 -Adrenozeptoren zur Folge hat.

3.3.2.2. Effekte an 5-HT-Rezeptoren

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren):

An der Rattenschwanzarterie führten sowohl Lisurid (10 nM) als auch Tergurid (300 nM) zu einer Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion des Gefäßmuskels. Dieser Antagonismus war scheinbar nichtkompetitiv, was durch eine Depression des Maximaleffekts deutlich wurde (Abb. 62a). Trotz unterschiedlicher Testkonzentrationen erwiesen sich beide Substanzen, basierend auf den ermittelten scheinbaren pK_B -Werten, als etwa äquipotent (Tab. 25). Die an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie ermittelten antagonistischen Affinitäten von Lisurid und Tergurid waren zudem vergleichbar mit Radioligandbindungsaffinitäten zu rekombinanten 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Millan *et al.*, 2002).

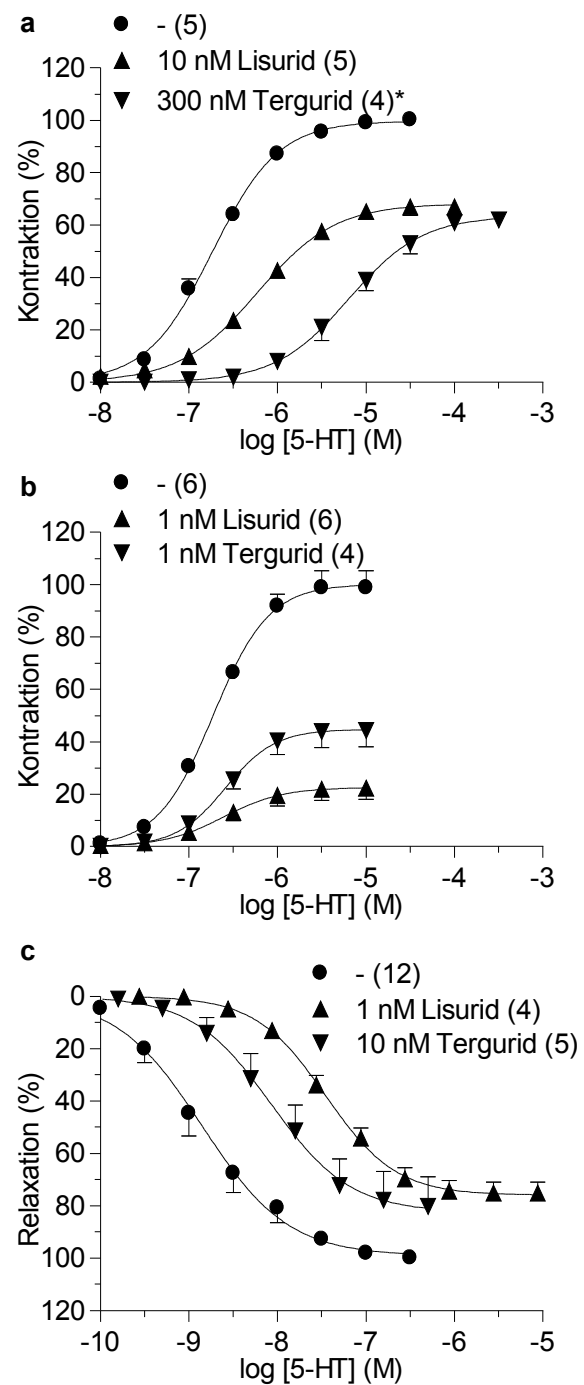


Abb. 62. Antagonistische Effekte von Lisurid und Tergurid auf die 5-HT-induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie (**a**), auf die 5-HT-induzierte Kontraktion der Schweinekoronararterie (**b**) und auf die 5-HT-induzierte Relaxation der mit PGF_{2 α} (3 μ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterien (**c**). Dargestellt sind die kontraktiven bzw. relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. *Daten für Tergurid an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie von Křen *et al.* (2004).

Höhere Konzentrationen Lisurid (≥ 100 nM) führten zu einer moderaten Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($pEC_{50} = 6,86 \pm 0,10$; $E_{max} = 16 \pm 4\%$, $n = 3$). Dieser kontraktile Effekt von Lisurid steht jedoch nicht im Einklang mit einer Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Einerseits konnte der halbmaximale agonistische Effekt von Lisurid an der Rattenschwanzarterie erst bei einer deutlich höheren, fast zwei logarithmische Einheiten über der halbmaximalen Rezeptorbesetzung liegenden Konzentration beobachtet werden, andererseits konnte die Lisurid-induzierte Kontraktion nicht durch den 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (3 nM) antagonisiert werden ($n = 3$, ohne Abbildung). Da die beobachtete, durch Lisurid induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie somit nicht im Einklang mit einer Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren stand, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Im Gegensatz zur Rattenschwanzarterie verhielt sich Lisurid im [³H]-Phosphatidylinositolassay in CHO-Zellen als 5-HT_{2A}-Rezeptoragonist (Newman-Tancredi *et al.*, 2002b). Eine agonistische Wirksamkeit von Tergurid, wie sie ebenfalls im [³H]-Phosphatidylinositolassay in CHO-Zellen beschrieben wurde (Newman-Tancredi *et al.*, 2002b), konnte im Rahmen dieser Arbeit an der Rattenschwanzarterie nicht beobachtet werden.

Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): Lisurid und Tergurid (je 1 nM) führten zu einer scheinbar nichtkompetitiven Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Schweinekoronararterie durch eine Depression des Maximaleffekts ohne signifikante Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve (Abb. 62b). Wie auch an der Rattenschwanzarterie führten höhere Lisurid-Konzentrationen (≥ 10 nM), nicht aber höhere Tergurid-Konzentrationen, zu einer moderaten Kontraktion ($pEC_{50} = 7,79 \pm 0,03$; $E_{max} = 15 \pm 4\%$; $n = 6$), die nicht durch den 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (10 nM) antagonisiert werden konnte (ohne Abbildung). Da diese durch Lisurid vermittelte Kontraktion der Schweinekoronararterie nicht im Einklang mit einer Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren stand, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Schweinepulmonalarterien (5-HT_{2B}-Rezeptoren): An den mit PGF_{2 α} (3 μ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterien verhielten sich sowohl Lisurid als auch Tergurid als Antagonisten (Abb. 62c) ohne diese Gefäße selbst zu relaxieren (Testkonzentrationen: 1 – 100 nM, nichtkumulatives Versuchsdesign). Insbesondere Lisurid fiel durch seine subnanomolare antagonistische Potenz auf. Auch an rekombinanten humanen 5-HT_{2B}-Rezeptoren sind Tergurid und insbesondere Lisurid als potente Antagonisten beschrieben worden (Millan *et al.*, 2002; Newman-Tancredi *et al.*, 2002b).

Bewertung des pharmakologischen Profils von Lisurid und Tergurid an vaskulären 5-HT-Rezeptoren: Lisurid und Tergurid erwiesen sich als annähernd äquipotente Antagonisten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie und der Schweinekoronararterie. Obwohl pD'_2 - und pK_B -Werte nicht direkt miteinander verglichen werden können, ist eine stärkere, bereits bei einer Testkonzentration von 1 nM zu beobachtende Hemmung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren des Schweins im

Vergleich zur Ratte auffällig. Eine derartige, speciesabhängige Diskrepanz der antagonistischen Wirksamkeit zwischen rodenten und nichtrodenten 5-HT_{2A}-Rezeptoren konnte bereits zuvor für Lisurid und für einige weitere, nicht am Indolstickstoff substituierte Ergoline gezeigt werden (Pazos *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993; Hagen *et al.*, 1994) und wird ausführlicher im Kapitel 3.3.3.4. diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte Lisurid als ein hochpotenter 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonist identifiziert werden, der eine mindestens 8,3fache Selektivität für 5-HT_{2B}-Rezeptoren gegenüber 5-HT_{2A}-Rezeptoren zeigt. Eine Hydrierung der Doppelbindung in $\Delta^{9,10}$ -Position des Lisurids zum Tergurid bedingt hingegen den Verlust der 5-HT_{2B}-Rezeptorselektivität. Einen Hinweis auf eine hohe 5-HT_{2B}-Rezeptor-antagonistische Potenz von Lisurid lieferten bereits frühere Experimente am Magenfundus der Ratte (Podvalová & Dlabac, 1970). Diese am Vormagen beobachtete, mit den Migräneprophylaktika Methysergid und Pizotifen vergleichbare antiserotoninerge Wirkung wurde daher mit der Antimigränewirksamkeit von Lisurid assoziiert (Podvalová & Dlabac, 1970; Schmuck *et al.*, 1996). Indirekt ist möglicherweise auch in der Parkinsontherapie die antagonistische Wirkung von Lisurid und Tergurid an 5-HT_{2B}-Rezeptoren vorteilhaft, da eine agonistische Wirksamkeit am 5-HT_{2B}-Rezeptor, wie sie für Pergolid, Cabergolin und Bromocriptin an der Schweinepulmonalarterien beobachtet wurde (Jähnichen *et al.*, 2005), mit einem gehäuften Auftreten fibrotischer Herzklappenschäden nach chronischer Anwendung assoziiert wird (Launay *et al.*, 2002; Serratice *et al.*, 2002; Setola *et al.*, 2003; VanCamp *et al.*, 2003, 2004; Horvath *et al.*, 2004).

Tab. 25. Antagonistische Effekte von 8 α -Aminoergolinen an 5-HT-Rezeptorsubtypen.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pK_B^a	E_{max} (%) ^b
Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren)				
Lisurid	5	0,01	8,60 \pm 0,07	67 \pm 3
Tergurid ^c	4	0,3	8,38 \pm 0,13	63 \pm 3
Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren)				
Lisurid	6	0,001	9,40 \pm 0,05 ^d	29 \pm 3
Tergurid	4	0,001	9,02 \pm 0,10 ^d	49 \pm 5
Schweinepulmonalarterien (5-HT_{2B}-Rezeptoren)				
Lisurid	4	0,001	10,32 \pm 0,10	76 \pm 4
Tergurid	5	0,01	8,49 \pm 0,11	81 \pm 12

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

^cDaten von Křen *et al.* (2004). ^d pD'_2 -Wert berechnet aus der Depression des Maximaleffekts von 5-HT.

3.3.3. 1-Allyl-substituierte Ergoline

Da Ergoline eine hohe Affinität zu α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren sowie zu Dopamin- und 5-HT-Rezeptoren zeigen (Tfelt-Hansen *et al.*, 2002), war und ist diese Naturstoffklasse für partialsynthetische Modifikationen interessant (siehe Kapitel 1.1.2.). Eine Alkylierung des Indolstickstoffs hat in der Regel eine Zunahme der antagonistischen Potenz an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Ratte zur Folge (Marzoni *et al.*, 1987; Garbrecht *et al.*, 1988; Misner *et al.*, 1990; Pertz *et al.*, 1999b). Quantitative Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung an (Dihydro-)Lyergsäureamiden und (Dihydro-)Lyergsäureestern ergaben, dass 1-methyl-, 1-ethyl- und 1-isopropyl-substituierte Derivate die an rodenten 5-HT_{2A}-Rezeptoren potentesten Ergoline sind (Marzoni *et al.*, 1987; Misner *et al.*, 1990). Darüber hinaus zeigen 1-alkylierte Ergoline in der Regel eine deutlich geringere Affinität zu α_1 -Adrenozeptoren (Cohen *et al.*, 1985a,b, 1988; Foreman *et al.*, 1992; Pertz *et al.*, 1999a,b; Yoshio *et al.*, 2001). Der Einfluss eines Allylsubstituenten an der N-1-Position des Ergolingrundgerüsts ist hingegen noch nicht systematisch an 5-HT-Rezeptorsubtypen verschiedener *Species* untersucht worden. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurden daher 1-allylsubstituierte Derivate von Clavinen (1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol), 8 α -Aminoergolinen (1-Allyllisurid, 1-Allyltergurid), Ergopeptinen (1-Allylergotamin, 1-Allyldihydroergotamin) und sonstigen Ergolinen (1-Allyldihydrolyergsäure, 1-Allylluol) an vaskulären und nichtvaskulären Modellen zur Charakterisierung α_1 -Adrenoceptor- und 5-HT-Rezeptor-vermittelter Effekte untersucht.

3.3.3.1. Effekte an α_1 -Adrenozeptoren

Die oben genannten 1-Allylergoline wurden an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie, an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz und an α_{1D} -Adrenozeptoren der thorakalen Rattenaorta charakterisiert. Darüber hinaus wurden 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters und an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie untersucht. Alle getesteten 1-Allylergoline erwiesen sich in den verwendeten Modellen als stille Antagonisten ohne eigene intrinsische Aktivität.

Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren): Nach einer Inaktivierung von α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren durch eine Vorbehandlung mit B8805-033 (3 μ M) und Chloroethylclonidin (100 μ M) antagonisierten alle untersuchten 1-Allylergoline die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie. $E/[A]$ -Kurven von Noradrenalin in An- bzw. Abwesenheit von 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin wurden exemplarisch in Abbildung 63 dargestellt. Bis auf 1-Allyllisurid (3 μ M) und 1-Allyltergurid (3 μ M), die zu einer signifikanten Reduktion des Maximaleffekts von Noradrenalin führten ($E_{\max} = 63 \pm 9\%$, $n = 4$ bzw. $E_{\max} = 76 \pm 7\%$, $n = 4$), erwiesen sich alle untersuchten 1-Allylergoline als überwindbare Antagonisten, deren inhibitorische

Effekte durch höhere Noradrenalkonzentrationen aufgehoben wurden. Die antagonistische Potenz (angegeben als pK_B -Wert) nahm in der Reihenfolge 1-Allyltergurid \geq 1-Allyldihydroergotamin \geq 1-Allyllisurid \geq 1-Allylerygotamin \geq 1-Allylfestuclavin $>$ 1-Allyldihydrolysersäure $>$ 1-Allylluol \geq 1-Allyllysergol ab (Tab. 26).

Tab. 26. Antagonistische Effekte von 1-Allylerygotaminen an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	E_{max} (%) ^b
1-Allylfestuclavin	4	3	6,63 \pm 0,08	90 \pm 4
1-Allyllysergol	4	3	5,68 \pm 0,17	92 \pm 4
1-Allyldihydrolysersäure	4	3	6,28 \pm 0,03	102 \pm 4
1-Allylluol	4	3	5,97 \pm 0,02	107 \pm 4
1-Allyllisurid	4	3	6,91 \pm 0,06	63 \pm 9
1-Allyltergurid	4	3	7,37 \pm 0,06	76 \pm 7
1-Allylerygotamin	4	1	6,80 \pm 0,12	92 \pm 8
1-Allyldihydroergotamin	4	1	7,10 \pm 0,14	98 \pm 7

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Rattensamenleiter (α_{1A} -Adrenozeptoren): Die an den α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie ermittelten pharmakologischen Daten für 1-Allylerygotamin und 1-Allyldihydroergotamin wurden am Samenleiter der Ratte überprüft. Während in Anwesenheit von 1-Allylerygotamin (1 μM) eine Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin beobachtet wurde, führte eine Inkubation von 1-Allyldihydroergotamin (1 μM) zusätzlich zu einer Depression des Maximal-effektes von Noradrenalin (Abb. 64, Tab. 27). Ungeachtet dessen konnte eine Übereinstimmung der

Tab. 27. Antagonistische Effekte von 1-Allylerygotaminen an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	E_{max} (%) ^b
1-Allylerygotamin	4	1	6,90 \pm 0,09	91 \pm 7
1-Allyldihydroergotamin	4	1	7,22 \pm 0,08	62 \pm 3

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

gefundenen pK_B -Werte an α_{1A} -Adrenozeptoren des Rattensamenleiters mit denen an α_{1A} -Adrenozeptoren an der Rattenschwanzarterie gezeigt werden (1-Allylerygotamin: $6,90 \pm 0,09$ vs. $6,80 \pm 0,12$; 1-Allyldihydroerygotamin: $7,22 \pm 0,08$ vs. $7,10 \pm 0,14$).

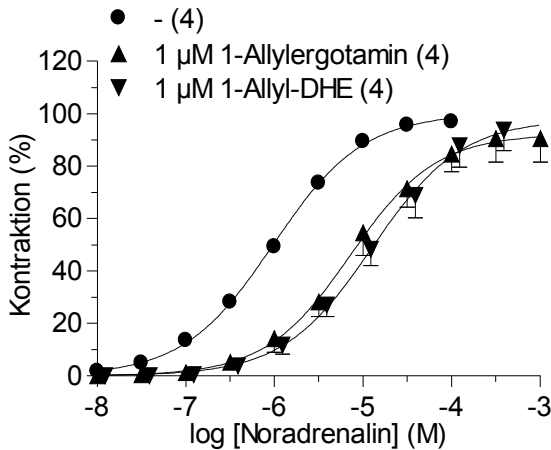


Abb. 63. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie nach Adrenozeptorinaktivierung mit Chloroethylclonidin ($100 \mu\text{M}$) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 ($3 \mu\text{M}$) in Ab- bzw. Anwesenheit von 1-Allylerygotamin ($1 \mu\text{M}$) und 1-Allyldihydroerygotamin (1-Allyl-DHE; $1 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

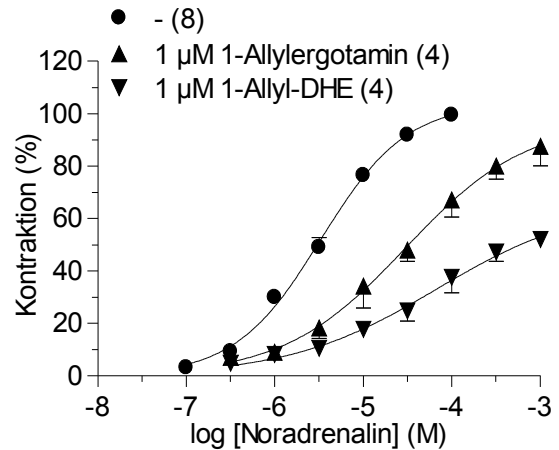


Abb. 64. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion des Rattensamenleiters durch 1-Allylerygotamin ($1 \mu\text{M}$) und 1-Allyldihydroerygotamin (1-Allyl-DHE; $1 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Meerschweinchenmilz (α_{1B} -Adrenozeptoren): In Anwesenheit der untersuchten 1-Allylerygoline konnte eine Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin beobachtet werden. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse konnte exemplarisch gezeigt werden, dass 1-Allylerygotamin und 1-Allyldihydroerygotamin kompetitive Antagonisten am α_{1B} -Adrenozeptor der Meerschweinchenmilz sind (Abb. 65). Im Gegensatz zu allen anderen 1-Allylerygolinen reduzierten 1-Allyllisurid und 1-Allyltergurid den Maximaleffekt von Noradrenalin ($E_{\text{max}} = 83 \pm 6\%$, $n = 4$ bzw. $E_{\text{max}} = 75 \pm 6\%$, $n = 4$; ohne Abbildung). Die anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve ermittelte antagonistische Potenz (quantifiziert als pK_B -Wert) nahm in der Reihenfolge 1-Allyllisurid \geq 1-Allyltergurid \geq 1-Allylerygotamin $>$ 1-Allyldihydroerygotamin \geq 1-Allylfestuclavin $>$ 1-Allyllysergol \geq 1-Allyldihydrolysergsäure \geq 1-Allylluol ab (Tab. 28).

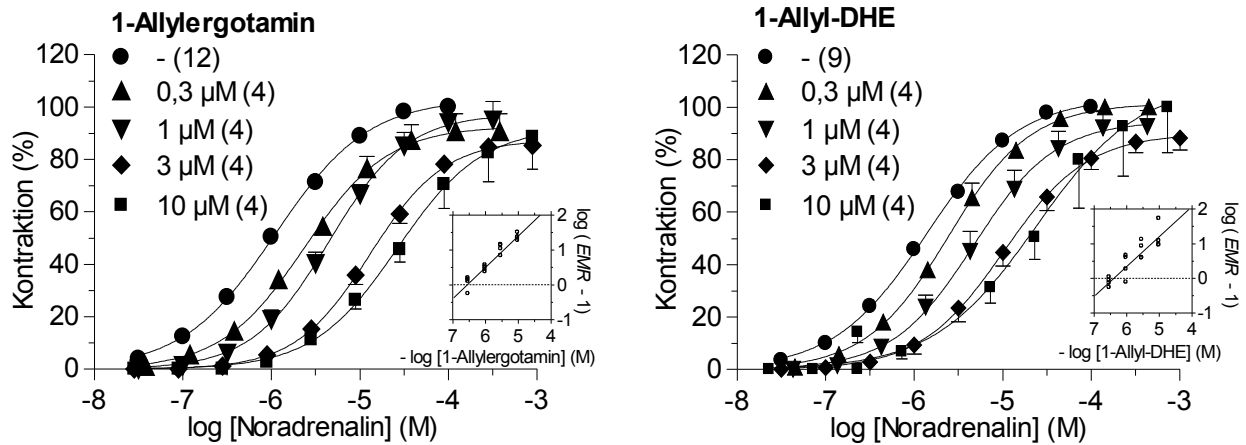


Abb. 65. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Meerschweinchenmilz durch 1-Allyl-ergotamin (0,3 – 10 μM) bzw. 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 0,3 – 10 μM). Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $6,48 \pm 0,04$ für 1-Allyl-ergotamin und $6,31 \pm 0,07$ für 1-Allyldihydroergotamin ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots sind mit $0,90 \pm 0,06$ und $0,86 \pm 0,12$ nicht signifikant von 1 verschieden. Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Tab. 28. Antagonistische Effekte von 1-Allyl-ergolinen an α_B -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
1-Allylfestuclavin	4	3	$6,03 \pm 0,07$	103 ± 6
1-Allyllysergol	4	3	$5,69 \pm 0,05$	102 ± 2
1-Allyldihydrolysergsäure	4	3	$5,54 \pm 0,05$	102 ± 3
1-Allylluol	4	3	$5,39 \pm 0,15$	102 ± 3
1-Allyllisurid	4	3	$6,94 \pm 0,14$	83 ± 6
1-Allyltergurid	4	3	$6,88 \pm 0,15$	75 ± 6
1-Allyl-ergotamin	16	0,3 - 10	$6,48 \pm 0,04$	90 ± 13
1-Allyldihydroergotamin	16	0,3 - 10	$6,31 \pm 0,07$	107 ± 18

^aScheinbarer bzw. voller pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Rattenschwanzarterie (α_{1B} -Adrenozeptoren): Die an den α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz ermittelten Affinitätsdaten für 1-Allyl-ergotamin und 1-Allyldihydroergotamin wurden an vaskulären α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie nach Blockade der an diesem Organ ebenfalls vorkommenden α_{1A} -Adrenozeptoren mittels B8805-033 (3 μM) überprüft. Unter diesen

experimentellen Bedingungen führten beide 1-Allylergopeptine zu einer reversiblen Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie (Abb. 66). Die ermittelten pK_B -Werte an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie lagen im gleichen Bereich wie die an α_{1B} -Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz ermittelten Daten (1-Allylergotamin: $6,62 \pm 0,05$ vs. $6,48 \pm 0,04$; 1-Allyldihydroergotamin: $6,42 \pm 0,09$ vs. $6,31 \pm 0,07$) (Tab. 29).

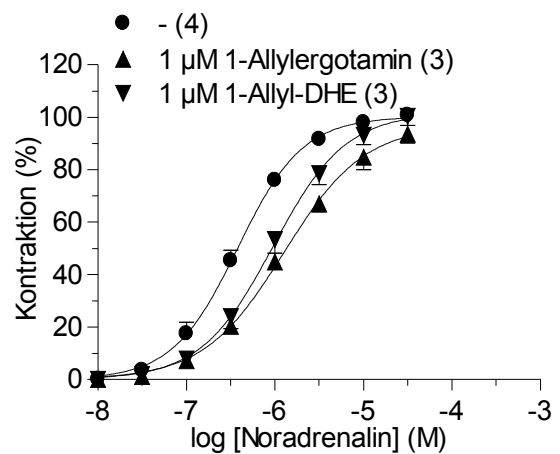


Abb. 66. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie in Gegenwart von B8805-033 (3 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit von 1-Allylergotamin (1 μ M) und 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 1 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Tab. 29. Antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
1-Allylergotamin	3	1	$6,62 \pm 0,05$	97 ± 3
1-Allyldihydroergotamin	3	1	$6,42 \pm 0,09$	101 ± 3

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Rattenaorta (α_{1D} -Adrenozeptoren): An der thorakalen Rattenaorta führten alle getesteten 1-Allyl-ergoline zu einer Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin ohne bzw. mit einer moderaten Depression des Maximaleffekts (im Falle von 1-Allylergotamin). Die anhand der Rechtsverschiebung ermittelte antagonistische Potenz (pK_B -Wert) nahm in der Reihenfolge 1-Allyl-lisurid \geq 1-Allyldihydroergotamin \geq 1-Allylfestoclavin \geq 1-Allylergotamin \geq 1-Allyltergurid $>$ 1-Allyllysergol $>$ 1-Allyldihydrolysergsäure $>$ 1-Allylluol ab (Tab. 30). Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse konnte exemplarisch gezeigt werden, dass sich 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin unter diesen experimentellen Bedingungen als kompetitive Antagonisten verhielten (Abb. 67).

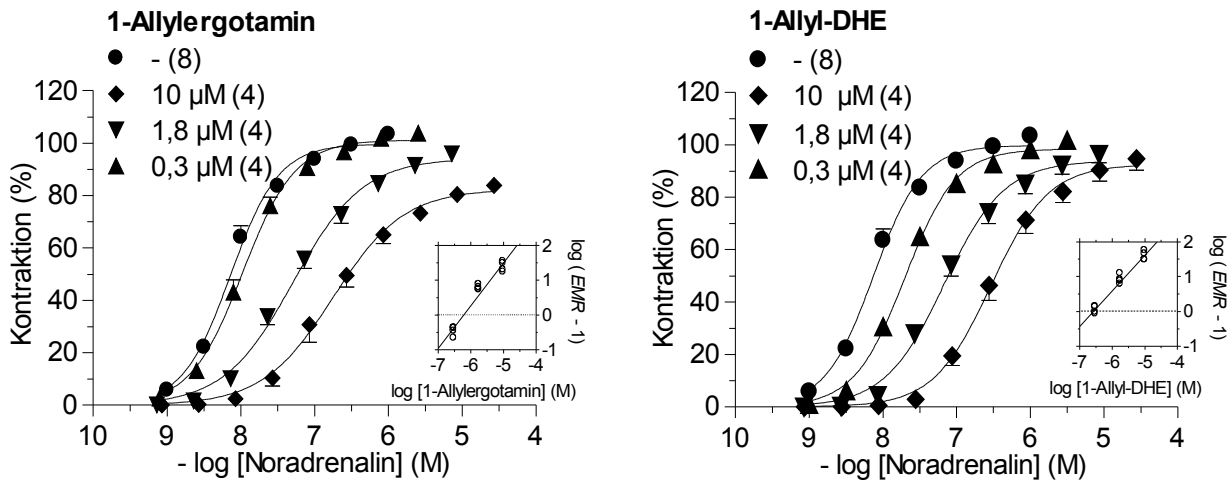


Abb. 67. Antagonisierung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Rattenaorta durch 1-Allylergotamin (0,3 – 10 μM) bzw. 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 0,3 – 10 μM). Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $6,36 \pm 0,06$ für 1-Allylergotamin und $6,60 \pm 0,04$ für 1-Allyldihydroergotamin ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots sind mit $1,13 \pm 0,06$ und $1,02 \pm 0,05$ nicht signifikant von 1 verschieden. Dargestellt sind die kontraktile Effekte $\pm S.E.M.$ aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Tab. 30. Antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta.

	n	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
1-Allylfestuclavin	6	10	$6,47 \pm 0,06$	99 ± 5
1-Allyllysergol	6	10	$5,83 \pm 0,07$	97 ± 3
1-Allyldihydrolysergsäure	6	10	$5,62 \pm 0,06$	102 ± 3
1-Allylluol	6	10	$5,09 \pm 0,10$	104 ± 2
1-Allyllisurid	6	10	$6,62 \pm 0,09$	93 ± 5
1-Allyltergurid	6	10	$6,36 \pm 0,12$	104 ± 5
1-Allylergotamin	12	0,3 – 10	$6,36 \pm 0,06$	82 ± 3
1-Allyldihydroergotamin	12	0,3 – 10	$6,60 \pm 0,04$	92 ± 4

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

3.3.3.2. Effekte an 5-HT-Rezeptoren

Zur Charakterisierung ihrer pharmakologischen Eigenschaften wurden die 1-Allylergoline 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyllisurid, 1-Allyltergurid, 1-Allylergotamin, 1-Allyldihydroergotamin, 1-Allyldihydrolysergsäure und 1-Allylluol an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanz-

arterie und der Schweinekoronararterie sowie an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien untersucht. Zusätzlich wurden 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin an 5-HT_{1B}-Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader und an 5-HT₇-Rezeptoren der Läuferpulmonalarterien charakterisiert. In diesen Testsystemen verhielten sich die 1-Allylergoline als Antagonisten oder als Partialagonisten.

Meerschweinchenbeckenschlagader (5-HT_{1B}-

Rezeptoren): Im Gegensatz zu Ergotamin und Dihydroergotamin führten weder 1-Allylergotamin noch 1-Allyldihydroergotamin in submikromolarer Konzentration zu einer Kontraktion der moderat mit PGF_{2α} (0,1 bis 1 μM) vorkontrahierten Meerschweinchenbeckenschlagader (ohne Abbildung). Beide 1-Allylergopeptine fungierten hingegen als Antagonisten des Serotonins an 5-HT_{1B}-Rezeptoren dieses Organs und führten zu einer Rechtsverschiebung und zu einer Depression der *E/[A]*-Kurve von 5-HT (Abb. 68). Die 1-Allylergolin-induzierte Depression des Maximaleffekts von 5-HT nahm konzentrationsabhängig zu (ohne Abbildung). Die anhand der Rechtsverschiebung der *E/[A]*-Kurve von 5-HT berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin sind in Tabelle 31 dargestellt.

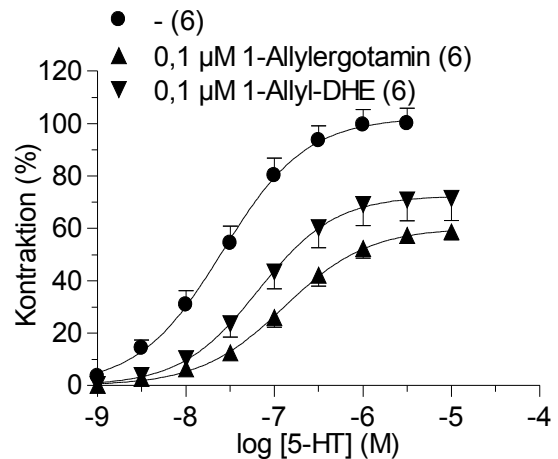


Abb. 68. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Meerschweinchenbeckenschlagader nach moderater Vorkontraktion mit PGF_{2α} durch 1-Allylergotamin (0,1 μM) und 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 0,1 μM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte ± *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Tab. 31. Antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an 5-HT_{1B}-Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pK_B</i> ^a	<i>E_{max}</i> (%) ^b
1-Allylergotamin	6	0,1	7,55 ± 0,25	64 ± 3
1-Allyldihydroergotamin	6	0,1	7,13 ± 0,16	78 ± 10

^aScheinbarer *pK_B*-Wert. ^b*E_{max}* relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): Die kontraktile Effekte von 5-HT ließen sich durch 1-Allylergoline in submikromolaren Konzentrationen antagonisieren. Ihre antagonistische Potenz

(quantifiziert als pK_B -Wert) nahm dabei in der Reihenfolge 1-Allylluol < 1-Allyldihydroergotamin < 1-Allylfestuclavin \leq 1-Allyldihydrolysergsäure < 1-Allyltergurid \leq 1-Allyllysergol < 1-Allyllisurid zu (Tab. 32).

Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass sich 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyldihydrolysergsäure und 1-Allylluol an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie als kompetitive Antagonisten verhielten (Abb. 69). Zunehmende Konzentrationen von 1-Allyllisurid und 1-Allyltergurid verursachten ebenfalls eine Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT. Im Gegensatz zu den 1-Allylderivaten von Festuclavin, Lysergol, Dihydrolysergsäure und Luol führten beide 1-Allyl-8 α -aminoergoline zusätzlich zu einer signifikanten Verringerung des Maximaleffekts von 5-HT (Abb. 70). Die Depression des Maximaleffekts zeigte keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Ähnliche Beobachtungen

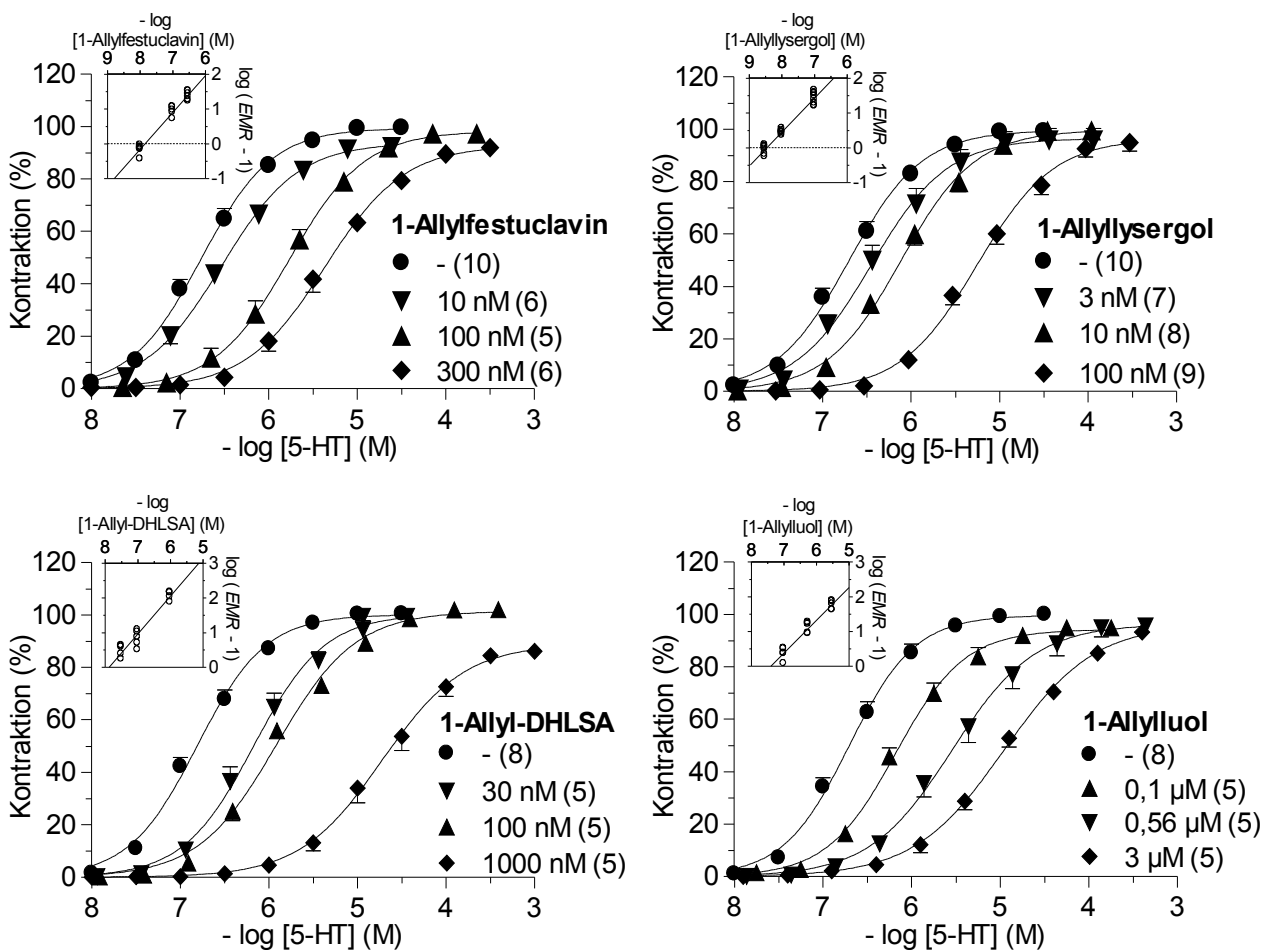


Abb. 69. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 1-Allylfestuclavin (10 – 300 nM), 1-Allyllysergol (3 – 100 nM), 1-Allyldihydrolysergsäure (1-Allyl-DHLSA; 30 – 1000 nM) und 1-Allylluol (0,1 – 3 μ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $7,89 \pm 0,03$ für 1-Allylfestuclavin, $7,45 \pm 0,03$ für 1-Allyllysergol, $7,97 \pm 0,05$ für 1-Allyldihydrolysergsäure und $7,33 \pm 0,04$ für 1-Allylluol ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots sind mit $1,06 \pm 0,04$, $0,97 \pm 0,03$, $1,09 \pm 0,07$ und $0,94 \pm 0,06$ nicht signifikant von 1 verschieden.

wurden für Methysergid, (*S*)-Methylketanserin, Altanserin, Setoperon und LY 53857 an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie sowie für Ketanserin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Meerschweinchen trachea dokumentiert (Lemoine & Kaumann, 1986; Frenken & Kaumann, 1987; Elz, 1995; Pertz, 1996). Für dieses Phänomen wurde eine Aktivierung einer heterogenen Rezeptorpopulation, ein pseudoirreversibler Antagonismus und eine allosterische Rezeptormodulation als Ursache diskutiert (Bond *et al.*, 1989; Elz, 1995). Unter den gewählten experimentellen Bedingungen, also in Abwesenheit eines Co-Stimulanzes, aktiviert 5-HT an der Rattenschwanzarterie selektiv 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Froldi *et al.*, 2003). Ein pseudoirreversibler Antagonismus kann zwar eine konzentrationsabhängige, jedoch nicht die beobachtete konzentrationsunabhängige Depression des Maximaleffekts erklären. Am besten im Einklang mit der beobachteten konzentrationsunabhängigen Depression des Maximaleffekts steht die Theorie der allosterischen Hemmung nach Kaumann, die bereits im Kapitel 3.3.1.3. diskutiert wurde (Kaumann & Frenken, 1985, 1988; Lemoine & Kaumann, 1986; Frenken & Kaumann, 1987, 1989; Vauquelin *et al.*, 2002a,b). Dieser Theorie entsprechend kann ein Ligand sowohl an der orthosterischen als auch an einer allosterischen Bindungsstelle im oder (wie von den Autoren postuliert) am Rezeptor binden. Durch Anbindung eines allosterischen Inhibitors an eine allosterische Bindungsstelle kann der Rezeptor in einen weniger aktiven Zustand überführt werden. Das Ausmaß der Überführung in den weniger aktiven Zustand ist von der Identität des allosterischen Inhibitors abhängig, was durch eine unterschiedlich starke Depression des Maximaleffekts durch Ketanserin, Methysergid und Ritanserin gezeigt werden konnte (Frenken & Kaumann, 1987).

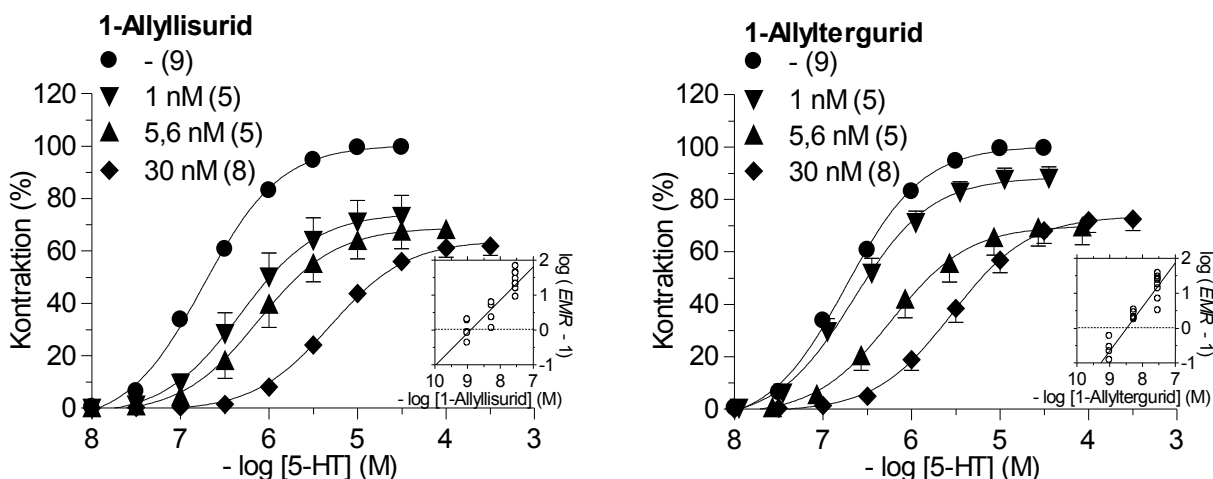


Abb. 70. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 1-Allyllisurid (1 – 30 nM) und 1-Allyltergurid (1 – 30 nM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $8,84 \pm 0,09$ für 1-Allyllisurid und $8,57 \pm 0,08$ für 1-Allyltergurid ermittelt. Der Anstieg der Ausgleichsgeraden im *Schild*-Plot von 1-Allyllisurid ist mit $0,98 \pm 0,06$ nicht signifikant von 1,00 verschieden, während der von 1-Allyltergurid ($1,26 \pm 0,05$) eine signifikante Abweichung von 1,00 zeigt.

Obwohl beide 1-Allyl-8 α -aminoergoline keine rein-kompetitiven Antagonisten sind, wurde eine Bestimmung des pK_B -Wertes mit Hilfe des Verfahrens nach *Schild* durchgeführt. Während der Anstieg der Regressionsgeraden von 1-Allyllisurid mit $0,98 \pm 0,06$ nicht signifikant von 1 verschieden war, konnte für 1-Allyltergurid mit $1,26 \pm 0,05$ eine signifikante Abweichung gefunden werden. Diese erhöhte Steigung der Regressionsgeraden im *Schild*-Plot von 1-Allyltergurid kann möglicherweise durch eine nicht ausreichende Äquilibration zwischen Antagonist und Rezeptor unter den gewählten Versuchsbedingungen erklärt werden (Kenakin, 1993). Ebenso sollte berücksichtigt werden, dass die Methode der *Schild*-Regressionsanalyse nur für Antagonisten, die nicht zu einer Reduktion des Maximaleffekts eines Agonisten führen (überwindbare Antagonisten), eine valide Schätzung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten liefert.

Das pharmakologische Verhalten der untersuchten 1-Allylergopeptide an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie ist uneinheitlich. Während sich 1-Allyldihydroergotamin als stiller, nichtkompetitiver Antagonist verhielt ($pK_B = 7,65 \pm 0,05$, $n = 5$, ohne Abbildung), führte 1-Allylergotamin zu einer moderaten Kontraktion dieses Organs (Abb. 71). Diese 1-Allylergotamin-induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie konnte mittels Ketanserin (3 nM) gehemmt werden. Der für Ketanserin gegen 1-Allylergotamin ermittelte scheinbare pA_2 -Wert von $9,00 \pm 0,11$ ($n = 4$) stimmt mit Literaturdaten für Ketanserin an rekombinanten und nativen 5-HT_{2A}-Rezeptoren überein (Hoyer *et al.*, 1994). Die 1-Allylergotamin-induzierte partielle Kontraktion der Rattenschwanzarterie steht somit im Einklang mit einer Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Die antagonistische Wirkkomponente des Partialagonisten 1-Allylergotamin wurde mit Hilfe des Verfahrens nach *Kaumann* und *Marano* charakterisiert. 1-Allylergotamin (10 nM) führte zu einer Rechtsverschiebung und zu einer Depression der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT. Höhere Testkonzentrationen führten im Gegensatz zu 1-Allyllisurid und 1-Allyltergurid zu einer stärkeren und konzentrationsabhängigen Depression des Maximaleffekts von 5-HT, so dass eine Quantifizierung der antagonistischen Effekte von 1-Allylergotamin bei höheren Testkonzentrationen nicht mehr möglich war (ohne Abbildung).

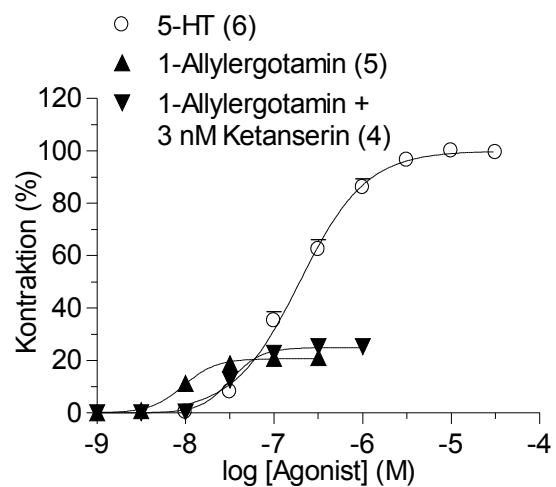


Abb. 71. 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 5-HT und durch 1-Allylergotamin. Die durch 1-Allylergotamin induzierte Kontraktion der Rattenschwanzarterie konnte mittels Ketanserin (3 nM) inhibiert werden (scheinbarer $pA_2 = 9,00 \pm 0,11$). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Tab. 32. Partialagonistische und antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max} (%) ^a	<i>pK</i> _P	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pK</i> _P bzw. <i>pK</i> _B	<i>E</i> _{max} (%) ^a
1-Allylfestuclavin	6	-	0	-	17	0,01 – 0,3	7,89 ± 0,03	96 ± 4
1-Allyllysergol	8	-	0	-	24	0,003 – 0,1	8,45 ± 0,03	98 ± 7
1-Allyldihydrolysergsäure	5	-	0	-	15	0,03 – 1	7,97 ± 0,05	88 ± 5
1-Allylluol	5	-	0	-	15	0,1 – 3	7,33 ± 0,04	93 ± 2
1-Allyllisurid	5	-	0	-	18	0,001 – 0,03	8,84 ± 0,09	62 ± 3
1-Allyltergurid	5	-	0	-	18	0,001 – 0,03	8,44 ± 0,08	72 ± 4
1-Allylergotamin	5	8,00 ± 0,05	21 ± 3	7,85 ± 0,05	5	0,01	7,85 ± 0,12	66 ± 6
1-Allyldihydroergotamin	5	-	0	-	5	0,03	7,65 ± 0,05 ^b	50 ± 3

^a*E*_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bScheinbarer *pK*_B-Wert.

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

An der Schweinekoronararterie verhielten sich alle untersuchten 1-Allylergoline, einschließlich 1-Allylergotamin, als stille Antagonisten. Sie führten zu einer Rechtsverschiebung der *E*/*[A]*-Kurve von 5-HT, während 1-Allyllisurid, 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin zusätzlich eine Depression des Maximaleffekts von 5-HT verursachten. Die *E*/*[A]*-Kurven von 5-HT in An- bzw. Abwesenheit von 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin sind exemplarisch in Abb. 72 dargestellt. Die antagonistische Potenz der 1-Allylergoline, berechnet anhand der Rechtsverschiebung der *E*/*[A]*-Kurve von 5-HT, war an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie generell geringer als an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie. Sie nahm in der Reihenfolge 1-Allylluol ≤ 1-Allyldihydrolysergsäure ≤ 1-Allyldihydroergotamin ≤ 1-Allylfestuclavin < 1-Allylergotamin < 1-Allyllysergol < 1-Allyltergurid < 1-Allyllisurid zu (Tab. 33).

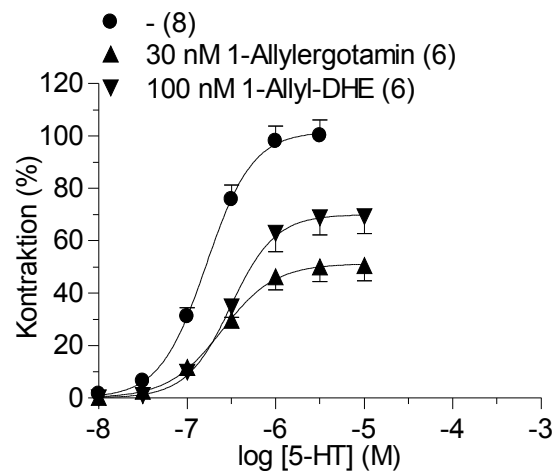


Abb. 72. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Schweinekoronararterie durch 1-Allylergotamin (30 nM) und durch 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 100 nM). Dargestellt sind die kontraktile Effekte ± *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Tab. 33. Antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
1-Allylfestuclavin	5	0,3	6,98 \pm 0,07	94 \pm 8
1-Allyllysergol	6	0,3	7,70 \pm 0,04	132 \pm 24
1-Allyldihydrolysergsäure	4	0,3	6,75 \pm 0,06	97 \pm 6
1-Allylluol	5	0,3	6,67 \pm 0,05	96 \pm 8
1-Allyllisurid	6	0,03	8,61 \pm 0,02	78 \pm 7
1-Allyltergurid	6	0,03	7,94 \pm 0,04	107 \pm 9
1-Allylergotamin	6	0,03	7,31 \pm 0,07	51 \pm 6
1-Allyldihydroergotamin	6	0,1	6,86 \pm 0,12	69 \pm 6

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Schweinepulmonalarterien (5-HT_{2B}-Rezeptoren): An den mit PGF_{2 α} (3 μ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterien führten 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin zu einer moderaten Relaxation ($pEC_{50} = 7,5 \pm 0,4$, $E_{max} = 26 \pm 3\%$, $n = 4$ bzw. $pEC_{50} = 7,2 \pm 0,3$, $E_{max} = 24 \pm$

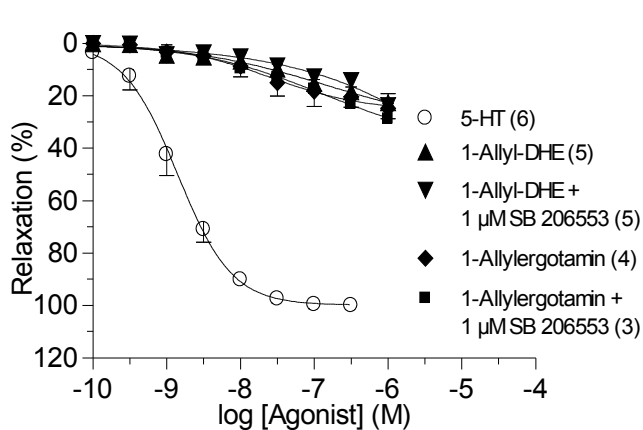


Abb. 73. Relaxation der Schweinepulmonalarterien nach Vorkontraktion mit PGF_{2 α} (3 μ M) durch 5-HT, 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE). Die 1-Allylergotamin- und 1-Allyldihydroergotamin-induzierten Relaxationen konnten nicht durch den 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB 206553 inhibiert werden. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

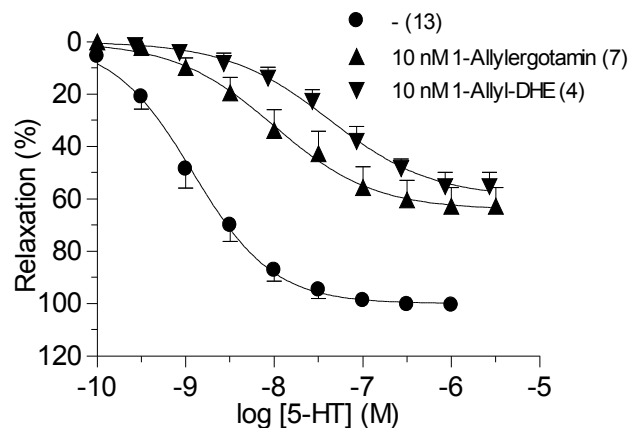


Abb. 74. Inhibition der 5-HT-induzierten Relaxation der mit PGF_{2 α} (3 μ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterien durch 1-Allylergotamin (10 nM) und durch 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 10 nM). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

3%, $n = 5$). Diese durch beide 1-Allylergopeptine induzierte Relaxation der Schweinepulmonalarterien wurde nicht durch den 5-HT_{2B}-Rezeptor vermittelt, da sie sich nicht durch den 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (1 μ M) inhibieren ließ (Abb. 73). Das Phänomen wurde nicht weiter untersucht.

Andererseits führen sowohl 1-Allylerygotamin als auch 1-Allyldihydroerygotamin zu einer Rechtsverschiebung und einer Depression der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT (Abb. 74). Beide Substanzen sind somit nichtkompetitive Antagonisten. Basierend auf der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT wurden sowohl für 1-Allylerygotamin ($pK_B = 9,11 \pm 0,18$, $n = 7$) als auch für 1-Allyldihydroerygotamin ($pK_B = 9,54 \pm 0,12$, $n = 4$) subnanomolare Affinitäten zu 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien ermittelt (Tab. 34).

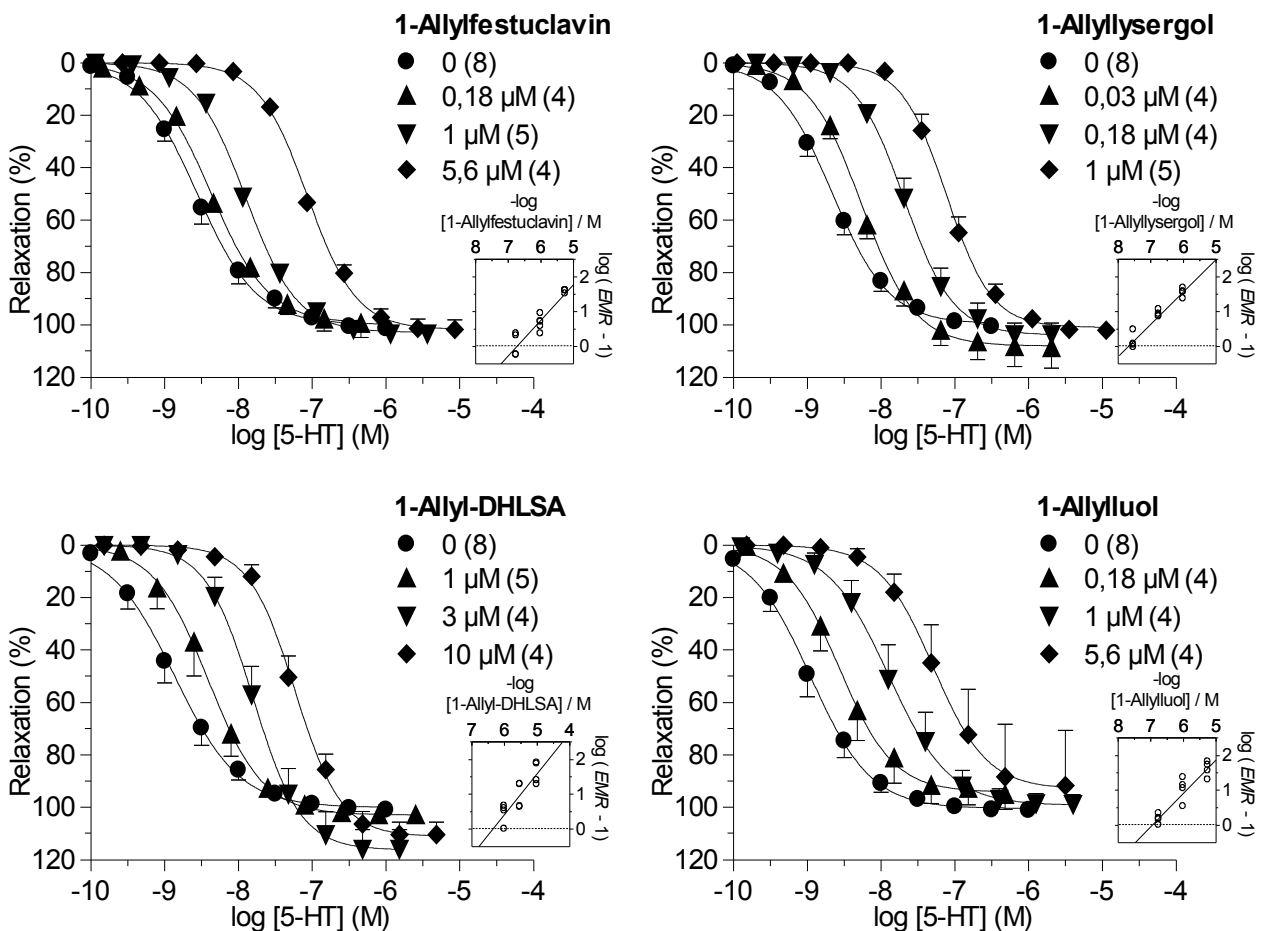


Abb. 75. Antagonisierung der 5-HT-induzierten Relaxation der Schweinepulmonalarterien durch 1-Allylfestuclavin (0,18 – 5,6 μ M), 1-Allyllysergol (0,03 – 1 μ M), 1-Allyldihydrolysergsäure (1-Allyl-DHLASA; 1 – 10 μ M) und 1-Allylluol (0,18 – 5,6 μ M). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm *S.E.M.* aus (n) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. Mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse (eingebettete Abbildungen) wurden pA_2 -Werte von $6,74 \pm 0,07$ für 1-Allylfestuclavin, $7,61 \pm 0,04$ für 1-Allyllysergol, $6,51 \pm 0,09$ für 1-Allyldihydrolysergsäure und $6,92 \pm 0,07$ für 1-Allylluol ermittelt. Die Anstiege der Ausgleichsgeraden in den *Schild*-Plots sind mit $1,03 \pm 0,10$, $0,92 \pm 0,07$, $1,17 \pm 0,22$ und $0,95 \pm 0,11$ nicht signifikant von 1 verschieden.

Auch 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyldihydrolysergsäure, 1-Allylluol, 1-Allyllisurid und 1-Allyltergurid antagonisierten nach einer Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ die 5-HT-induzierte Relaxation der Schweinepulmonalarterien. 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyldihydrolysergsäure und 1-Allylluol verhielten sich als kompetitive Antagonisten, was mit Hilfe der *Schild*-Regressionsanalyse gezeigt werden konnte (Abb. 75), während 1-Allyllisurid, nicht aber 1-Allyltergurid, zu einer signifikanten Depression des Maximaleffektes von 5-HT führte (ohne Abbildung).

Die an $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien ermittelten submikromolaren Affinitätsdaten von 1-Allylfestuclavin, 1-Allyllysergol, 1-Allyltergurid und 1-Allyllisurid sind in Tabelle 34 dargestellt und lagen im gleichen Bereich wie die entsprechenden pK_B -Werte an $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren der Schweinekoronararterie.

Tab. 34. Partialagonistische und antagonistische Effekte von 1-Allylergolinen an $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_B</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
1-Allylfestuclavin	2	-	0	-	13	0,18 – 5,6	6,74 ± 0,07	102 ± 3
1-Allyllysergol	2	-	0	-	13	0,03 – 1	7,61 ± 0,04	108 ± 7
1-Allyldihydrolysergsäure	2	-	0	-	12	1 – 10	6,51 ± 0,09	111 ± 5
1-Allylluol	2	-	0	-	12	0,18 – 5,6	6,92 ± 0,07	89 ± 20
1-Allyllisurid	2	-	0	-	6	1	8,17 ± 0,16 ^b	48 ± 5
1-Allyltergurid	2	-	0	-	6	1	7,67 ± 0,14 ^b	106 ± 3
1-Allylergotamin	4	-	26 ± 3 ^c	-	7	0,01	9,11 ± 0,18 ^b	64 ± 7
1-Allyldihydroergotamin	5	-	24 ± 3 ^c	-	4	0,01	9,54 ± 0,12 ^b	61 ± 7

^a E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bScheinbarer pK_B -Wert. ^cRelaxierender Effekt nicht durch $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ -Rezeptoren vermittelt (siehe Text).

Läuferschweinepulmonalarterien (5-HT_7 -Rezeptoren): Sowohl 1-Allylergotamin als auch 1-Allyldihydroergotamin antagonisierten die 5-Carboxamidotryptamin-induzierte Relaxation der mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM) vorkontrahierten Läuferschweinepulmonalarterien ohne selbst eine intrinsische Aktivität zu besitzen (Abb. 76). Anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-Carboxamidotryptamin wurden scheinbare pK_B -Werte von $7,91 \pm 0,03$ ($n = 4$) für 1-Allylergotamin und $6,85 \pm 0,22$ ($n = 3$) für 1-Allyldihydroergotamin ermittelt (Tab. 35).

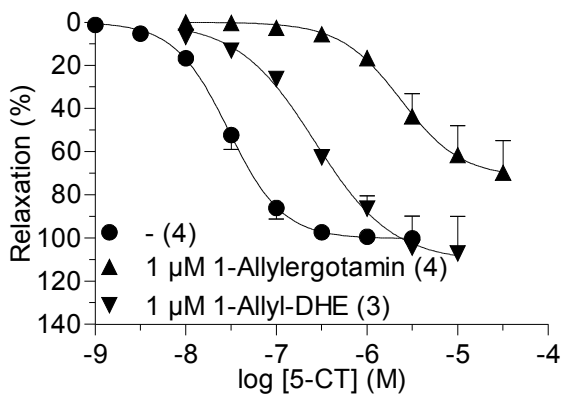


Abb. 76. Inhibition der durch 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) induzierten Relaxation der Läufer Schweinpulmonalarterien nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1 \mu\text{M}$) durch 1-Allyl-ergotamin ($1 \mu\text{M}$) und durch 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; $1 \mu\text{M}$). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte \pm *S.E.M.* aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-CT.

Tab. 35. Antagonistische Effekte von 1-Allyl-ergolinen an 5-HT_7 -Rezeptoren der Läufer Schweinpulmonalarterien.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
1-Allyl-ergotamin	4	1	$7,91 \pm 0,03$	72 ± 14
1-Allyldihydroergotamin	3	1	$6,85 \pm 0,22$	114 ± 21

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-Carboxamidotryptamin.

3.3.3.3. Auswaschexperimente

Wie Ergotamin und Dihydroergotamin verhielten sich auch 1-Allyl-ergotamin und 1-Allyldihydroergotamin an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie als scheinbar reversible Antagonisten und führten zu einer Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin ohne signifikante Beeinflussung des Maximaleffekts (siehe Kapitel 3.3.3.1.). An 5-HT_{2A} -Rezeptoren der Rattenschwanzarterie hingegen führte die Inkubation des Partialagonisten 1-Allyl-ergotamin bzw. des Antagonisten 1-Allyldihydroergotamin zu einer deutlichen Depression des Maximaleffekts von 5-HT (unüberwindbarer Antagonismus, siehe Kapitel 3.3.3.2.). Daher wurde für 1-Allyl-ergotamin und 1-Allyldihydroergotamin ebenfalls untersucht, ob diese qualitativen pharmakologischen Unterschiede auf unterschiedliche Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten vom Rezeptor oder von der Biophasse zurückzuführen sind. Die Beurteilung erfolgte wie bei Ergotamin und Dihydroergotamin (siehe Kapitel 3.3.1.3.) anhand des spülzeitabhängigen Hemmeffekts $E_H(t)$ (siehe Gleichung 20).

Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren): An α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie führte 1-Allyl-ergotamin ($10 \mu\text{M}$) zu einer $76 \pm 4\%$ igen ($n = 3$) und 1-Allyldihydroergotamin ($10 \mu\text{M}$) zu einer $87 \pm 2\%$ igen Hemmung ($n = 3$) der durch Noradrenalin ($10 \mu\text{M}$) induzierten Kontraktion. Im Verlauf der 60-minütigen Spülphase blieben die Hemmwirkungen beider 1-Allyl-

ergoline im Gegensatz zu denen von Ergotamin und Dihydroergotamin unverändert und betragen nach Beendigung der 60-minütigen Spülphase $83 \pm 4\%$ (1-Allylergotamin) bzw. $89 \pm 3\%$ (1-Allyldihydroergotamin) (Abb. 77).

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): 1-Allylergotamin (0,1 μM) führte an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie einerseits zu einer moderaten Vasokonstriktion ($24 \pm 6\%$, $n = 4$; ohne Abbildung) und andererseits, wie auch 1-Allyldihydroergotamin (0,1 μM), zu einer Hemmung der durch 5-HT (10 μM) induzierten Kontraktion ($87 \pm 5\%$, $n = 4$ bzw. $75 \pm 2\%$, $n = 4$). Die anschließende 60-minütige Spülphase führte weder zu einer Verringerung der durch 1-Allylergotamin induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie ($28 \pm 9\%$), noch zu einer Verringerung der Hemmwirkung von 1-Allylergotamin ($87 \pm 2\%$) bzw. 1-Allyldihydroergotamin ($73 \pm 2\%$) auf die 5-HT-induzierte Kontraktion (Abb. 78).

Vergleichende Beurteilung: Ergotamin und Dihydroergotamin konnten bereits in Kapitel 3.3.1.3. als pseudoirreversible Antagonisten an α_{1A} -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie identifiziert werden. Im Gegensatz zu Ergotamin und Dihydroergotamin konnte für ihre 1-allylsubstituierten Derivate unter den experimentellen Bedingungen innerhalb einer 60-minütigen Spülphase keine partielle Wiederherstellung der Noradrenalin- bzw. 5-HT-vermittelten Effekte beobachtet werden. Eine allosterische Modulation, die für die 1-Allyl- $\delta\alpha$ -aminoergoline 1-Allyllisurid und 1-Allyltergurid als möglich erachtet wurde (Kapitel 3.3.3.2.), kann somit nicht allein den für 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin beobachteten unüberwindbaren Antagonismus erklären. Aufgrund der vorliegenden experimentellen Befunde sind beide 1-Allylergopeptine an α_{1A} -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren als irreversible oder

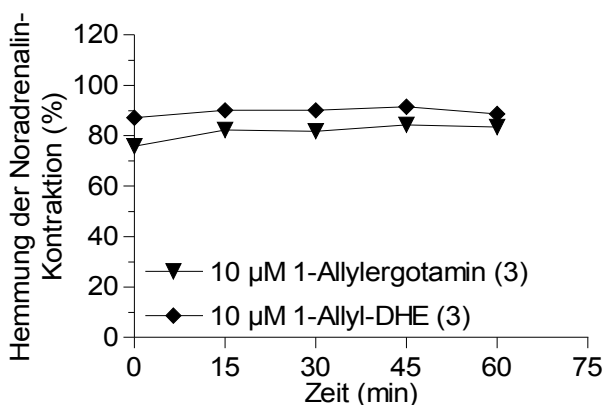


Abb. 77. Hemmung der durch Noradrenalin (10 μM) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 1-Allylergotamin (10 μM) oder 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 10 μM) nach 0 – 60-minütiger Spülung. Dargestellt sind die Hemmeffekte $E_H \pm S.E.M.$ aus (n) Experimenten. $*P < 0,05$.

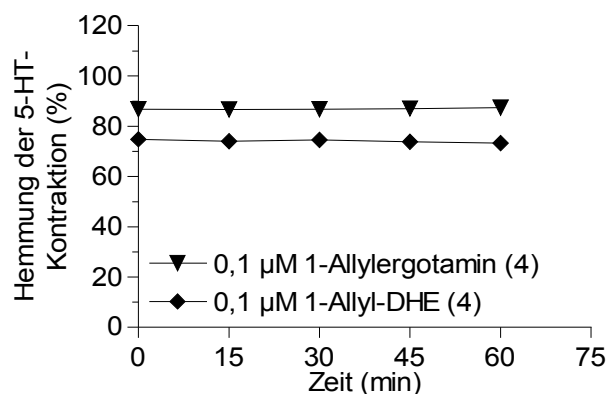


Abb. 78. Hemmung der durch 5-HT (10 μM) induzierten Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 1-Allylergotamin (0,1 μM) oder 1-Allyldihydroergotamin (1-Allyl-DHE; 0,1 μM) nach 0 – 60-minütiger Spülung. Dargestellt sind die Hemmeffekte $E_H \pm S.E.M.$ aus (n) Experimenten. $*P < 0,05$.

pseudoirreversible Antagonisten mit einer sehr langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit vom Rezeptor oder von der Biophase einzustufen.

3.3.3.4. *Bewertung des pharmakologischen Profils*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Allylsubstitution an der *N*-1-Position des Ergolinsystems Auswirkungen auf das pharmakologische Profil dieser Substanzklasse hat.

1-Allylclavine: Eine 1-Allylsubstitution am Ergolingrundgerüst der Clavine bedingt keine (α_{1A} und α_{1B}) oder nur eine geringe Abnahme der antagonistischen Potenz an α_1 -Adrenozeptoren (α_{1D} : Faktor 2,4 – 3,3). Eine deutlich größere Reduktion der antagonistischen Potenz an α_1 -Adrenozeptoren ist für die meisten 1-methyl- und 1-isopropylsubstituierten Nicht-Peptid-Ergoline beschrieben worden (z.B. 1-Isopropylelymoclavin, 1-Isopropylagroclavin, Methysergid, Sergolexol und LY 53857; Cohen *et al.*, 1985a,b, 1988; Pertz *et al.*, 1999b; Yoshio *et al.*, 2001).

An 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Ratte konnte durch 1-Allylsubstitution eine deutliche Zunahme der antagonistischen Potenz um etwa eine logarithmische Einheit (Faktor 6,1 – 10,7) gegenüber den Ausgangssubstanzen Festuclavin und Lysergol bei gleichzeitigem Verlust der agonistischen Wirksamkeit (Lysergol) erzielt werden. Eine Zunahme der Rezeptoraffinität unter gleichzeitigem Verlust der agonistischen Wirksamkeit an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie ist auch für 1-isopropylsubstituierte Derivate von Lysergol und einige alizyklische Lysergolester beschrieben worden (Pertz *et al.*, 1999b). Dieser Gewinn an antagonistischer Potenz an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Ratte ist jedoch nur ein speciesbedingtes Phänomen und konnte nicht an 5-HT_{2A}-Rezeptoren des Schweins beobachtet werden. An der Schweinekoronararterie verhielten sich die untersuchten 1-Allylclavine als stille Antagonisten mit einer um etwa eine halbe logarithmische Einheit geringeren antagonistischen Potenz (Faktor 3,3 – 5,6) als ihre nicht am Indolstickstoff modifizierten Muttersubstanzen. Derartige speciesbedingte Unterschiede sind auch für 1-methyl- und 1-isopropylsubstituierte Ergoline beschrieben worden, die eine höhere Affinität zu rodenten als zu nichtrodenten 5-HT_{2A}-Rezeptoren besitzen, während für die nicht am Indolstickstoff substituierten Ergoline vorwiegend der umgekehrte Fall zu beobachten ist (Pazos *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993; Hagen *et al.*, 1994). Auf molekularer Ebene wurde als Ursache eine zusätzlich mögliche Van-der-Waals-Wechselwirkung des Alkylsubstituenten in *N*-1-Position des Ergolinsystems mit dem Alaninrest A242 der transmembranären Domäne TMD 5 des 5-HT_{2A}-Rezeptors der Ratte als möglich erachtet, welche nicht mit dem Serinrest S242 des Menschen und des Schweins eingegangen werden kann. In Punktmutationsstudien konnte an humanen 5-HT_{2A}-Rezeptoren durch Austausch der Seringruppe S242 gegen Alanin tatsächlich nachgewiesen werden, dass allein diese Aminosäure für das unterschiedliche Bindungsverhalten 1-alkylierter Ergoline an

5-HT_{2A}-Rezeptoren verschiedener *Species* verantwortlich ist (Kao *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte mit Hilfe einfacher *N*-1-alkylierter Tryptamine gezeigt werden, dass die Substitution des Protons in *N*-1-Position einen weitgehenden Verlust der agonistischen Wirksamkeit am humanen Wildtyprezeptor und einen partiellen Verlust an der „rodentifizierten“ A242-Mutanten des humanen 5-HT_{2A}-Rezeptors zur Folge hat (Ebersole *et al.*, 2003). Da diese ausgeprägten pharmakologischen und molekularen Unterschiede zwischen 5-HT_{2A}-Rezeptoren des Menschen und des Schweins nicht zu beobachten sind (Johnson *et al.*, 1995), kann die Schweinekoronararterie als das zuverlässigere Modell zur Vorhersage vaskulärer Effekte an 5-HT_{2A}-Rezeptoren des Menschen angesehen werden.

Interessanterweise findet sich die Aminosäure Alanin A242 des 5-HT_{2A}-Rezeptors der Ratte auch in analoger Position *Species* übergreifend im 5-HT_{2B}-Rezeptor (A225; Manivet *et al.*, 2002) und im 5-HT_{2C}-Rezeptor wieder (A222; Almaula *et al.*, 1996a). Umso überraschender war der beobachtete Verlust der antagonistischen Potenz durch 1-Allylsubstitution auch an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien (Faktor 11 – 16; Abb. 79a).

1-Allyl-8 α -aminoergoline: An allen α_1 -Adrenozeptorsubtypen führte eine 1-Allylsubstitution der 8 α -Aminoergoline Lisurid und Tergurid zu einer Reduktion der antagonistischen Potenz um etwa eine logarithmische Einheit (α_{1A} : Faktor 2,8 – 9,5; α_{1B} : Faktor 7,1 – 8,3; α_{1D} : Faktor 21 – 35).

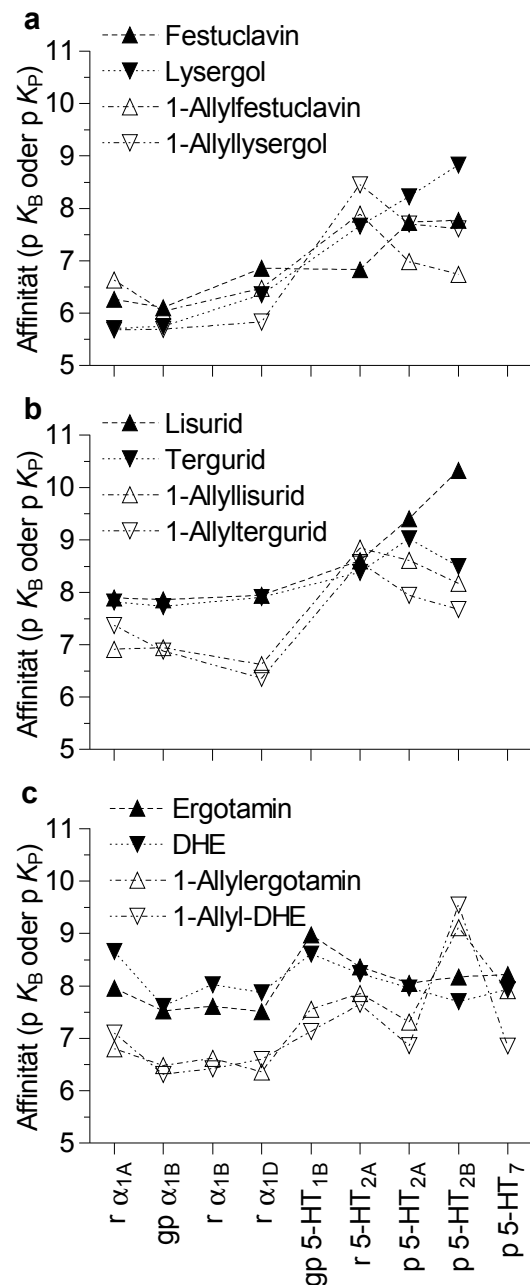


Abb. 79. Vergleich der ermittelten Affinitäten unsubstituierter und 1-allylsubstituierter Ergoline an α_1 -Adrenozeptor- und 5-HT-Rezeptorsubtypen der Ratte (r), des Meerschweinchens (gp) und des Schweins (p). Abgebildet sind die Mittelwerte der an der Rattenschwanzarterie ($r\alpha_{1A}$, $r\alpha_{1B}$ bzw. $r5\text{-HT}_{2A}$), der Meerschweinchenmilz ($gp\alpha_{1B}$), der Rattenaorta ($r\alpha_{1D}$), der Meerschweinchenbeckenschlagader ($gp5\text{-HT}_{1B}$), der Schweinekoronararterie ($p5\text{-HT}_{2A}$), der Schweinepulmonalarterien ($p5\text{-HT}_{2B}$) und der Läuferpulmonalarterien ($p5\text{-HT}_7$) ermittelten pK_P - oder pK_B -Werte.

Die bei den Clavinen beobachtete Zunahme der Affinität zu 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Ratte durch Einführung eines Allylsubstituenten in *N*-1-Position des Ergolingrundgerüsts konnte bei den 8 α -Aminoergolinen nicht beobachtet werden. Hingegen konnte, wie bei den Clavinen, ein deutlicher Verlust der antagonistischen Potenz an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren des Schweins bestätigt werden (5-HT_{2A}: Faktor 6,2 – 12; 5-HT_{2B}: Faktor 6,9 – 141).

1-Allylergopeptine: Die Einführung eines Allylsubstituenten in *N*-1-Position des Ergolingrundgerüsts der Ergopeptine Ergotamin und Dihydroergotamin führte zu einem markanten Rückgang der Affinität zu allen drei α_1 -Adrenozeptorsubtypen (α_{1A} : Faktor 14 – 35; α_{1B} : Faktor 10 – 40; α_{1D} : Faktor 14 – 19). Gleichzeitig konnte ein Verlust der agonistischen Wirksamkeit von Ergotamin und Dihydroergotamin an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie und an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta nach einer 1-Allylsubstitution beobachtet werden.

Auch an den untersuchten Subtypen vaskulärer 5-HT-Rezeptoren reduzierte die Einführung eines Allylsubstituenten in *N*-1-Position des Ergolingrundgerüsts der Ergopeptine deren agonistische Wirksamkeit oder hob diese vollständig auf. Die hohe Affinität von Ergotamin und Dihydroergotamin zu 5-HT_{1B}-Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader und zu 5-HT₇-Rezeptoren der Läufer Schweinpulmonalarterien wurde durch 1-Allylsubstitution um den Faktor 26 – 30 bzw. um den Faktor 3 – 10 reduziert. Im Gegensatz zu den Clavinen konnte bei beiden untersuchten Ergopeptinen eine geringfügige Abnahme der antagonistischen Potenz an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie durch 1-Allylsubstitution beobachtet werden (Faktor 3,2 – 5,2). Dieses unterschiedliche Verhalten kann möglicherweise durch die zumindest partiell unterschiedlichen Bindungsstellen von Clavinen und Ergopeptinen am 5-HT_{2A}-Rezeptor erklärt werden. Clavine sind im Gegensatz zu Ergopeptinen in der Lage, eine zusätzliche aromatische Wechselwirkung mit dem Phenylalaninrest F340 des 5-HT_{2A}-Rezeptors einzugehen (Choudhary *et al.*, 1995). An 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie konnte für die 1-allylsubstituierten Ergopeptine 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin im Vergleich zu ihren nicht am Indolstickstoff substituierten Muttersubstanzen eine um etwa eine logarithmische Einheit reduzierte Affinität ermittelt werden (Faktor 5,5 – 17).

Von besonderem Interesse war das pharmakologische Verhalten der 1-Allylergopeptine an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien. Neben einem Verlust der agonistischen Wirksamkeit durch 1-Allylsubstitution des Ergolingrundgerüsts konnte eine deutliche Zunahme der Affinität zum Rezeptor beobachtet werden (Faktor 8,3 – 69).

Selektivität: Die 1-Allylsubstitution brachte bei den untersuchten Clavinen und 8 α -Aminoergolinen nicht den erhofften Gewinn an Selektivität für 5-HT₂-Rezeptoren gegenüber α_1 -Adrenozeptoren. Die auch in früheren Untersuchungen mit Lysergsäureestern an Ratten gefundene Zunahme der 5-HT₂-

Rezeptorselektivität durch 1-Allylsubstitution (Marzoni *et al.*, 1987) konnte als ein speciesabhängiges Phänomen identifiziert werden. Auch zwischen den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptorsubtypen einer *Species* (Schwein) konnten die hier untersuchten 1-Allylclavine und 1-Allyl-8 α -aminoergoline nicht unterscheiden. Dem gegenüber stellten die 1-Allylergopeptine 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin selektive, wenn auch nichtkompetitive Antagonisten am 5-HT_{2B}-Rezeptor des Schweins dar. Ihre Selektivität gegenüber anderen vaskulären 5-HT-Rezeptoren betrug mindestens Faktor 16 (1-Allylergotamin) bzw. Faktor 78 (1-Allyldihydroergotamin) und gegenüber α_1 -Adrenozeptoren mindestens Faktor 160 bzw. 210. Da ein Zusammenhang zwischen 5-HT_{2B}-Rezeptor-antagonistischer Potenz und migräneprophylaktischer klinischer Wirksamkeit besteht, was u.a. mit Hilfe der 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten Lisurid, Methysergid und Pizotifen gezeigt werden konnte (Schmuck *et al.*, 1996), stellen 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin potenzielle neue Migräneprophylaktika dar.

3.3.4. 6'-Desoxoergoline

In den Kapiteln 3.3.1.1. und 3.3.1.2. konnte demonstriert werden, dass nicht nur das Ergolingrundgerüst, sondern auch der trizyklische Peptidrest für die hohe Affinität von Ergopeptinen zu α_1 -Adrenozeptoren verantwortlich ist. Veranlasst durch diese Erkenntnis wurden durch Reduktion der in der 6'-Position des Peptidsubstituenten befindlichen Amidgruppe der Ergopeptide α -Ergokryptin, α -Dihydroergokryptin, Bromocriptin, Ergocristin, Dihydroergocristin und Dihydroergotamin die korrespondierenden 6'-Desoxoergoline von Dr. M. Flieger (Akademie věd České republiky, Prag) synthetisiert. Anhand dieser Verbindungen wurde untersucht, ob die in der 6'-Position des trizyklischen Peptidsubstituenten befindliche Carbonylfunktion mittelbar (dreidimensionale Struktur des Piperazinrings) oder unmittelbar (direkte Interaktion des Sauerstoffatoms mit dem Rezeptormolekül) an der Bindung und Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren beteiligt ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich durch diese Modifikation eine erhöhte Rezeptorselektivität zu Gunsten vaskulärer α_1 -Adrenozeptoren erzielen lässt.

3.3.4.1. Effekte an vaskulären α_1 -Adrenozeptoren

Die 6'-Desoxoergoline 6'-Desoxo- α -ergokryptin, 6'-Desoxo- α -dihydroergokryptin, 6'-Desoxobromocriptin, 6'-Desoxoergocristin, 6'-Desoxodihydroergocristin und 6'-Desoxodihydroergotamin wurden an α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie sowie an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta untersucht. In den verwendeten Modellen verhielten sich alle getesteten Verbindungen in submikromolaren Konzentrationen als stille Antagonisten.

Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren): Nach Inaktivierung der ebenfalls an der Rattenschwanzarterie vorkommenden α_{1B} -Adrenozeptoren mittels Chloroethylclonidin (100 μ M) und vorausgegangener Protektion mit B8805-033 (3 μ M) führten alle untersuchten 6'-Desoxoergoline zu einer Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin bei keiner oder nur einer geringfügigen Depression des Maximaleffekts (ohne Abbildung). Die ermittelten Affinitäten zum α_{1A} -Adrenozeptor (dargestellt als scheinbare pK_B -Werte) lagen zwischen 6,56 und 7,49 (Tab. 36), wobei für die in $\Delta^{9,10}$ -Position gesättigten 6'-Desoxoergoline 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin und 6'-Desoxodihydroergocristin im Vergleich zu den in $\Delta^{9,10}$ -Position ungesättigten Verbindungen 6'-Desoxo- α -ergokryptin und 6'-Desoxoergocristin eine ca. 2fach (1,8 – 2,9fach) höhere Rezeptoraffinität ermittelt wurde. Im Vergleich zu ihren nicht am C-6' reduzierten Ausgangsverbindungen zeigten 6'-Desoxo- α -ergokryptin, 6'-Desoxoergocristin und 6'-Desoxodihydroergotamin eine um Faktor 15 – 41 geringere Affinität zum Rezeptor.

Tab. 36. Antagonistische Effekte von 6'-Desoxoergolinen an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
6'-Desoxo- α -ergokryptin	4	3	6,78 \pm 0,05	87 \pm 9
6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin	4	3	7,04 \pm 0,10	91 \pm 9
6'-Desoxobromocriptin	4	3	6,56 \pm 0,10	93 \pm 5
6'-Desoxoergocristin	4	3	6,56 \pm 0,11	82 \pm 7
6'-Desoxodihydroergocristin	4	3	7,02 \pm 0,10	87 \pm 4
6'-Desoxodihydroergotamin	4	3	7,49 \pm 0,06	88 \pm 5

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

Rattenschwanzarterie (α_{1B} -Adrenozeptoren): Unter Blockade der an der Rattenschwanzarterie ebenfalls vorkommenden α_{1A} -Adrenozeptoren mittels B8805-033 (3 μM) führten alle untersuchten 6'-Desoxoergoline an den α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie zu einer Rechtsverschiebung und mit Ausnahme von 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin zusätzlich zu einer moderaten Depression der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin (ohne Abbildung). Anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin wurden für alle untersuchten 6'-Desoxoergoline submikromolare Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (scheinbare pK_B -Werte 6,64 – 7,21) ermittelt (Tab. 37). Für die in $\Delta^{9,10}$ -Position gesättigten 6'-Desoxoergoline (6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin und 6'-Desoxodihydroergocristin) konnte im Vergleich zu ihren in $\Delta^{9,10}$ -Position ungesättigten Analoga (6'-Desoxo- α -ergokryptin und 6'-Desoxoergocristin) eine geringfügig, aber signifikant höhere

Tab. 37. Antagonistische Effekte von 6'-Desoxoergolinen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	$E_{max} (\%)^b$
6'-Desoxo- α -ergokryptin	4	1	6,64 \pm 0,04	74 \pm 5
6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin	4	1	6,79 \pm 0,04	99 \pm 7
6'-Desoxobromocriptin	5	1	6,87 \pm 0,12	85 \pm 5
6'-Desoxoergocristin	5	1	6,66 \pm 0,14	67 \pm 4
6'-Desoxodihydroergocristin	4	1	7,01 \pm 0,10	75 \pm 7
6'-Desoxodihydroergotamin	5	1	7,21 \pm 0,07	73 \pm 5

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

antagonistische Potenz (berechnet als scheinbarer pK_B -Wert) am α_{1B} -Adrenozeptor der Rattenschwanzarterie ermittelt werden (Tab. 37). Die Reduktion des Amid-Kohlenstoffs in C-6'-Position zum Amin-Kohlenstoff führte im Fall von α -Ergokryptin, Ergocristin und Dihydroergotamin zu einem Verlust der agonistischen Wirksamkeit und zu einer Reduktion der Affinität zum Rezeptor um Faktor 6,5 – 17.

Rattenaorta (α_{1D} -Adrenozeptoren): Im Gegensatz zu ihren partialagonistisch wirksamen, nicht in C-6'-Position reduzierten Muttersubstanzen, verhielten sich alle untersuchten 6'-Desoxoergoline als stille Antagonisten und inhibierten die Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Rattenaorta durch eine Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve ohne bzw. mit nur einer geringfügigen Depression des Maximaleffekts (ohne Abbildung). Anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Noradrenalin wurden für alle untersuchten 6'-Desoxoergoline submikromolare scheinbare pK_B -Werte (6,25 – 7,98) ermittelt (Tab. 38). Die in $\Delta^{9,10}$ -Position gesättigten 6'-Desoxoergoline (6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin und 6'-Desoxodihydroergocristin) waren am α_{1D} -Adrenozeptor ihren in $\Delta^{9,10}$ -Position ungesättigten Analoga (6'-Desoxo- α -ergokryptin und 6'-Desoxoergocristin) nicht überlegen. Die Reduktion des Amid-Kohlenstoffs in 6'-Position zum Amin-Kohlenstoff führte im Fall von α -Ergokryptin, Ergocristin und Dihydroergotamin zu einer Reduktion der Affinität zum Rezeptor um Faktor 7,8 – 17.

Tab. 38. Antagonistische Effekte von 6'-Desoxoergolinen an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pK_B^a	E_{max} (%) ^b
6'-Desoxo- α -ergokryptin	6	3	6,46 \pm 0,13	91 \pm 6
6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin	4	3	6,25 \pm 0,05	100 \pm 1
6'-Desoxobromocriptin	4	3	6,97 \pm 0,07	82 \pm 5
6'-Desoxoergocristin	4	3	6,61 \pm 0,04	81 \pm 7
6'-Desoxodihydroergocristin	4	3	6,37 \pm 0,10	96 \pm 4
6'-Desoxodihydroergotamin	5	3	6,98 \pm 0,10	96 \pm 3

^aScheinbarer pK_B -Wert. ^b E_{max} relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin.

3.3.4.2. Effekte an vaskulären 5-HT-Rezeptoren

Zur Überprüfung der α_1 -Adrenozeptorselektivität der 6'-Desoxoergoline wurden Untersuchungen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie durchgeführt.

Rattenschwanzarterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren): An den 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie verhielten sich 6'-Desoxo- α -ergokryptin, 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin, 6'-Desoxoergocristin und 6'-Desoxodihydroergotamin als Partialagonisten (Abb. 80). Ihre kontraktile Effekte konnten mit Hilfe des 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (3 nM) inhibiert werden (ohne Abbildung). Die für Ketanserin gegen 6'-Desoxo- α -ergokryptin, 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin, 6'-Desoxoergocristin und 6'-Desoxodihydroergotamin ermittelten pK_B-Werte ($8,82 \pm 0,21$; $9,22 \pm 0,07$; $9,06 \pm 0,26$ bzw. $9,15 \pm 0,33$) entsprachen Literaturdaten für Ketanserin am 5-HT_{2A}-Rezeptor (Hoyer *et al.*, 1994). Die 6'-Desoxoergoline 6'-Desoxobromocriptin und 6'-Desoxodihydroergocristin verhielten sich im Gegensatz zu allen anderen untersuchten 6'-Desoxoergolinen als stille Antagonisten an der Rattenschwanzarterie.

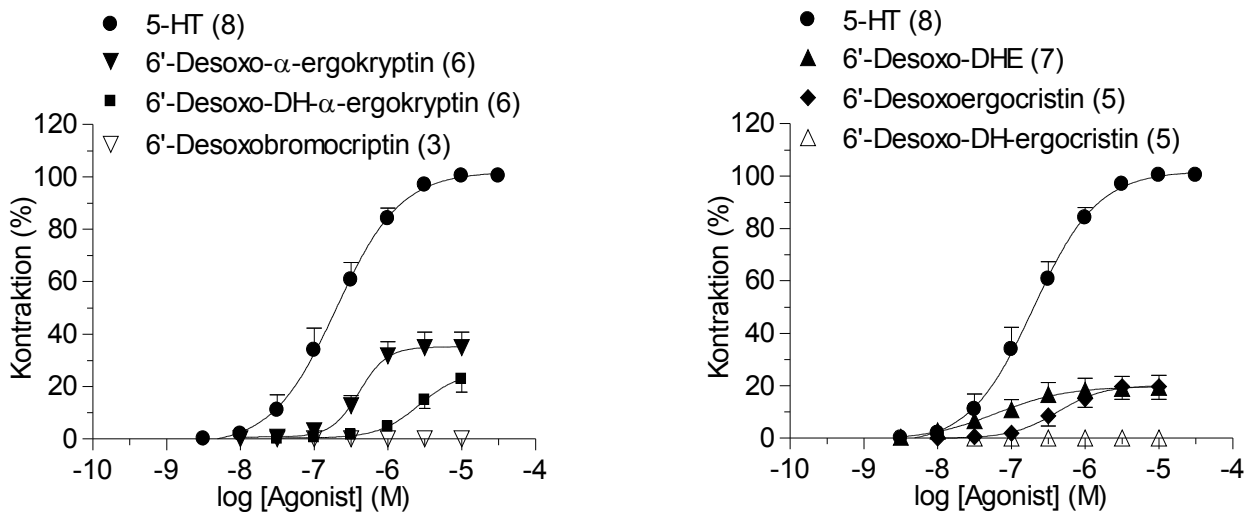


Abb. 80. 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte Kontraktion der Rattenschwanzarterie durch 6'-Desoxo- α -Ergokryptin, 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin (6'-Desoxo-DH- α -ergokryptin), 6'-Desoxobromocriptin, 6'-Desoxoergocristin, 6'-Desoxodihydroergocristin (6'-Desoxo-DH-ergocristin) und 6'-Desoxodihydroergotamin (6'-Desoxo-DHE). Dargestellt sind die kontraktile Effekte \pm S.E.M. aus (*n*) Experimenten relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT.

Die antagonistische Potenz dieser Partialagonisten und Antagonisten wurde anhand der Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von 5-HT bestimmt. Es wurden scheinbare pK_B- bzw. pK_P-Werte zwischen 5,70 und 7,58 ermittelt (Tab. 39). Die Reduktion des Amid-Kohlenstoffs in 6'-Position zum Amin-Kohlenstoff führte im Fall von α -Ergokryptin, Ergocristin und Dihydroergotamin zu einer Reduktion der Affinität zum Rezeptor um Faktor 4,5 – 30 verbunden mit einer tendenziellen, wenn auch nur moderaten Verringerung der agonistischen Wirksamkeit.

Tab. 39. (Partial-)Agonistische und antagonistische Effekte von 6'-Desoxoergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>Agonismus</i>				<i>Antagonismus</i>			
	<i>n</i>	<i>pEC₅₀</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>	<i>pK_P</i>	<i>n</i>	<i>Konz. (μM)</i>	<i>pK_P bzw. pK_B^b</i>	<i>E_{max} (%)^a</i>
6'-Desoxo- α -ergokryptin	6	6,43 \pm 0,03	35 \pm 5	6,35 \pm 0,06	3	10	6,34 \pm 0,02	65 \pm 11
6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin	5	5,53 \pm 0,12	23 \pm 5	5,56 \pm 0,08	-	-	n.e.	n.e.
6'-Desoxobromocriptin	3	-	0	-	3	3	5,70 \pm 0,08	91 \pm 1
6'-Desoxoergocristin	5	6,37 \pm 0,08	19 \pm 5	6,13 \pm 0,20	5	10	6,26 \pm 0,16	38 \pm 9
6'-Desoxodihydroergocristin	5	-	0	-	5	3	6,54 \pm 0,11	75 \pm 4
6'-Desoxodihydroergotamin	7	7,15 \pm 0,17	19 \pm 4	6,87 \pm 0,19	4	10	7,58 \pm 0,07	54 \pm 9

^a*E_{max}* relativ zum Maximaleffekt des Kontrollagonisten 5-HT. ^bScheinbarer *pK_B*-Wert. n.e. bedeutet nicht ermittelt.

3.3.4.3. Bewertung des pharmakologischen Profils

Das Ziel, selektive α_1 -Adrenozeptorliganden durch Reduktion der Amidgruppe in C-6'-Position des trizyklischen Peptidsubstituenten der Ergopeptine zum Amin zu erhalten, konnte nicht erreicht werden. Einzig für die α -Ergokryptinderivate 6'-Desoxodihydro- α -ergokryptin und 6'-Desoxobromocriptin konnte eine moderate Selektivität zugunsten vaskulärer α_1 -Adrenozeptoren gegenüber vaskulären 5-HT_{2A}-Rezeptoren beobachtet werden (Faktor 4,9 bzw. 7,2). Da jedoch ihre Ausgangssubstanzen Dihydro- α -ergokryptin und Bromocriptin im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, konnte nicht sichergestellt werden, dass eine Reduktion der Carboxylfunktion in C-6'-Position für einen Gewinn der α_1 -Adrenozeptorselektivität beider Substanzen verantwortlich ist.

Alle untersuchten 6'-Desoxoergopeptine wiesen an Subtypen vaskulärer α_1 -Adrenozeptoren eine um etwa eine logarithmische Einheit reduzierte antagonistische Potenz auf. Gleichzeitig konnte für Ergocristin und α -Ergokryptin nach Reduktion der Carbonylfunktion in C-6'-Position ein Verlust der agonistischen Wirksamkeit an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie und an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta beobachtet werden. An 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Rattenschwanzarterie wurde für alle untersuchten 6'-Desoxoergopeptine eine um etwa Faktor 10 verringerte antagonistische Potenz ermittelt. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass in der Klasse der Ergopeptine nicht nur das Ergolingrundgerüst, sondern auch die trizyklische Peptidgruppe die Bindung des Liganden an α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren beeinflusst. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung an einfachen „reversen“ Ergolinestern (Ester des Lysergols, Dihydrolysergols-I und des Elymoclavins), bei denen eine Modifikation des in Position 8

befindlichen Substituenten zu keiner wesentlichen Änderung des Bindungsverhaltens an α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren führte (Pertz *et al.*, 1999b). Eine mögliche Erklärung dafür liefern Punktmutationsuntersuchungen am 5-HT_{2A}-Rezeptor, mit denen gezeigt wurde, dass Ergopeptine (z.B. Bromocriptin, α -Ergokryptin, Ergocornin und Ergotamin) gegenüber einfachen Ergolinen (z.B. LSD) zumindest partiell unterschiedliche Bindungsstellen im Rezeptor besetzen (Choudhary *et al.*, 1995).

Neben einem indirekten Mechanismus durch Konformationsänderung des Liganden und damit veränderter Lage des Liganden in der Bindungstasche des Rezeptors ist eine unmittelbare Interaktion der trizyklischen Peptidgruppe mit dem Rezeptor durch eine spezifische Wechselwirkung denkbar. Der für Ergocristin und α -Ergokryptin gegenüber ihren 6'-Desoxoderivaten ermittelte Gewinn der Bindungsenergie von etwa 10 kJ/mol (berechnet als $\Delta\Delta G = R \cdot T \cdot \ln 10^{\Delta pK_B}$) lässt eine direkte Wechselwirkung der Carbonylfunktion mit dem Rezeptor (z.B. über eine Wasserstoffbrückenbindung oder eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung) möglich erscheinen. Der Mechanismus wie eine Reduktion der Carboxylfunktion in C-6'-Position die Affinität zu α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren beeinflusst, kann jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht abschließend geklärt werden.