

## EINLEITUNG

$\alpha$ -Rezeptoren gehören neben den  $\beta$ -Rezeptoren als wesentliche Elemente des peripheren vegetativen Nervensystems zu den Vermittlern der Wirkung der adrenergen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin.

Der in dieser Arbeit untersuchte Subtyp der  $\alpha$ -Rezeptoren ist der  $\alpha_1$ -Rezeptor von Ratten- und Meerschweinchenherzen.

Biochemisch betrachtet ist der  $\alpha_1$ -Rezeptor ein integrales Membranprotein, das aus sieben Transmembranhelices besteht und durch pertussistoxinsensitive als auch -insensitive guanylnucleotidbindene Proteine (g-Proteine) seine Wirkungen vermittelt (Guarino et al. 1996). Zusammen mit dem Endothelin- und dem Angiotensin-Rezeptor gehört der  $\alpha_1$ -Rezeptor zu einer Gruppe von Rezeptoren, deren Aktivierung mit einer beschleunigten Hydrolyse von Phosphoinositid einhergeht (Endoh 1996): Vereinfacht dargestellt kommt es bei  $\alpha_1$ -Stimulation zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat aus der Zellmembran in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3). IP3 bindet an intrazelluläre Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums und führt dort zu einer Kalziumfreisetzung, wobei das freigesetzte Kalzium z.T. selbst als weiterer Botenstoff fungiert. DAG hingegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche schließlich verschiedene Ionenkanäle, u.a. Kalzium- und Kaliumkanäle, sowie andere zelluläre Substrate phosphoryliert und außerdem die Transkription vieler Gene aktiviert (siehe Abbildung 1).

$\alpha_1$ -Rezeptoren finden sich im menschlichen und tierischem Organismus in verschiedenen Organsystemen. In der Leber führt die Stimulation von  $\alpha_1$ -Rezeptoren z.B. zu Glykogenolyse und Kaliumfreisetzung. Die bedeutendste Wirkung jedoch, die der  $\alpha_1$ -Rezeptor vermittelt und die speziell auch klinisch-therapeutisch eine Rolle spielt, liegt in der Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien, Gefäßen (Therapie von hypotonen Krisen insbesondere in der Anästhesie / Antihypertensive Therapie durch Blockade von  $\alpha_1$ -Rezeptoren, Kincaid-Smith 1987) und der Prostata (Therapieprinzip bei Behandlung der benignen Prostathypertrophie: Blockade von konstriktorisch wirkenden  $\alpha_1$ -Rezeptoren, Hieble et al. 1996).

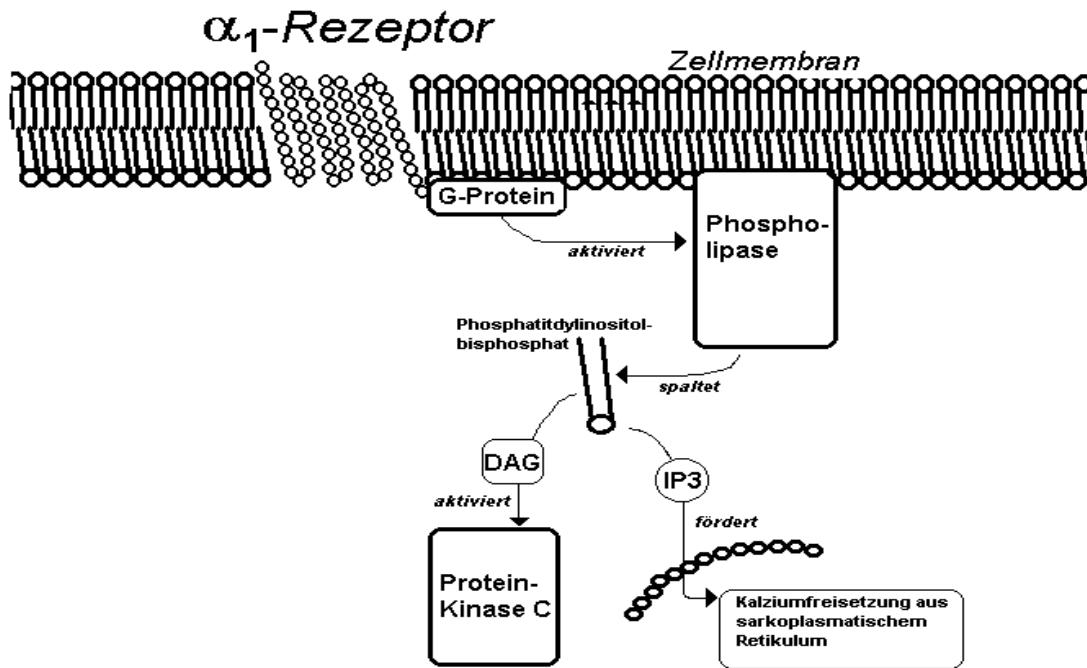


Abb. 1: Schematische Darstellung des  $\alpha_1$ -Signaltransduktionsweges

Auch am Herzen hat der  $\alpha_1$ -Rezeptor modulierende Wirkung, wobei unter normalen physiologischen Bedingungen der Effekt der adrenergen Agonisten primär von den  $\beta$ -Rezeptoren übermittelt wird. Unter pathophysiologischen Umständen wie z.B. Schilddrüsendysfunktion (Ishac et al. 1982, Simpson et al. 1980), Ischämie (Corr et al. 1981) oder Hypertension (Yamada et al. 1984) jedoch scheint der  $\alpha_1$ -Rezeptor an Bedeutung zu gewinnen.

Die kardiale Wirkung der  $\alpha_1$ -Stimulation läßt sich in Langzeit- und Kurzeiteffekte unterteilen. Zu den Langzeitwirkungen zählt die Expression bestimmter Gene, die für das Zellwachstum verantwortlich sind und welche eine Herzhypertrophie verursachen können (Waspel et al. 1990, Iwaki et al. 1990).

Die Kurzeiteffekte sind vielfältig und werden im Diskussionsteil erörtert. So gehören u.a. Inotropie, Chronotropie und Koronarfluß zu den durch  $\alpha_1$ -Stimulation beeinflussbaren Parametern.

Insbesondere der positiv inotrope Effekt ist von wissenschaftlichem Interesse bei der Erforschung der kardialen  $\alpha_1$ -Wirkung und ist auch ein Thema dieser Arbeit. Deshalb sei der Aufbau eines Myocyten und der Kontraktionsprozeß hier einleitend erläutert: Der

Ventrikelmyozyt enthält kontraktile Myofibrillen, die dicht umwoben werden von sarkoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Die Myofibrillen bestehen aus mehreren ineinander verzahnten Actin- und Myosinfilamenten, welche über Querbrücken miteinander in Verbindung stehen. Bei der Kontraktion gleiten die Actin- und Myosinfilamente ineinander, ohne sich dabei selbst zu verkürzen (Gleitfilamenttheorie): In einer Art Ruderbewegung schieben sich die Myosinfilamente in die Actinfilamente, indem die Querbrücken eine Kippbewegung ausführen. Unter Verbrauch von ATP löst sich die Bindung und die Querbrücken setzen neu an. Dabei spielt Kalzium die Schlüsselrolle bei der Regulation dieses Kontraktionsprozesses: Es löst die zuvor durch Tropomyosin sterisch gesperrte Actin-Myosinverbindung, indem es sich an das Regulatorprotein Troponin C anlagert und über eine Kette von Konformationsänderungen (über Troponin I und Troponin T) das Tropomyosin so verschiebt, daß die Bindungsstelle für Myosin am Aktinfilament frei wird.

Eine Herzmuskelzelle in kalziumfreier Lösung kontrahiert sich nicht. Die Kontraktionsstärke nimmt bis zu einem Schwellenwert zu, wenn Kalzium hinzugefügt wird. Die zwei prinzipiellen Möglichkeiten zur Erhöhung der Inotropie sind demnach 1. eine erhöhtes Kalziumangebot an die kontraktile Proteine oder 2. komplementär hierzu eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung (Opie 1991). So ist die der positiv inotrope Effekt durch Steigern der Herzfrequenz („Treppe“) einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zuzuschreiben, der positiv inotrope Effekt bei steigendem enddiastolischen Volumen bzw. zunehmender Dehnung der Herzmuskelfasern (Frank-Starling-Mechanismus) einer effektiveren Kalziumverwertung (Endoh 1998). Mit „effektiverer myofibrillärer Verwertung“ des Kalziums ist ein Ansteigen der Rate von Aktin-Myosin-Kontraktionszyklen (der „Ruderbewegungen“ (s.o.)) gemeint.

Zum Nachweis einer effektiveren myofibrillären Kalziumverwertung wird an gehäuteten Muskelzellen (Muskelzellen, deren Membran chemisch entfernt wurde zur Ausschaltung membrangebundener Prozesse) die Kraft-Kalzium-Beziehung untersucht (z.B. Huang et al. 1997, Rüegg 1993 / 1998). Dabei ist eine Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve bzw. eine Verringerung der zur halbmaximalen Aktivierung notwendigen Kalziumionen-Konzentration Zeichen einer effektiveren myofibrillären Kalziumverwertung. Eine andere Methode ist die gleichzeitige Messung von Inotropie und Kalziumströmen an intakten Muskelzellen (z.B. Satoh et al. 1998): Wirkt eine Substanz positiv inotrop, ohne dabei

Kalziumströme oder die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration zu erhöhen, so liegt dem inotropen Effekt wahrscheinlich eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung zugrunde.

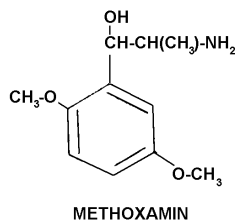
Substanzen, die eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung bewirken, sind z.B. Levosimendan, MCI-154 (Abe et al. 1996), Pimobendan oder Sulmazol (Rüegg 1993). Der therapeutische Einsatz solcher Pharmaka bei Herzkrankheiten im Endstadium ist ein aktuelles Thema (z.B. Zimmermann et al. 1998, Mathew et al. 1998), da sog. „Kalzium-Sensitizer“ die myokardiale Kontraktilität erhöhen ohne Ansteigen des myozellulären Energieverbrauchs (Endoh 1998) und weil ihre Anwendung nicht zu einer Kalziumüberladung mit der Gefahr kritischer Arrhythmien führt. Trotzdem wird die Anwendung von „Kalzium-Sensitizern“ kritisch diskutiert, weil sie neben den genannten positiven Wirkungen den Relaxationsprozeß des Herzens negativ beeinflussen.

Der Begriff „Kalzium-Sensitizer“ umfaßt alle Substanzen, die die Kontraktilität steigern ohne die intrazelluläre Kalziumionen-Konzentration im Myokard zu erhöhen (vgl. Rüegg 1998), die also, um es treffender zu bezeichnen, eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung bewirken. Auf subzellulärer Ebene bedeutet eine eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung eine Zunahme von Ruderbewegungen pro Kalziumbindung am Troponin C. Dies kann theoretisch über zwei Mechanismen geschehen: einmal durch eine höhere Kalziumaffinität des Troponin C, andererseits durch eine Optimierung der Querbrückendynamik (vgl. Watanabe et al. 1996, Solaro et al. 1993).

Auch durch Stimulation von  $\alpha_1$ -Rezeptoren soll die Effektivität der myofibrillären Kalziumverwertung gesteigert werden. So konnten Terzic et al. (1992) sowie Satoh et al. (1999) an gehäuteten Herzmuskelzellen von Ratten zeigen, daß es durch  $\alpha_1$ -Stimulation zu einer Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve kommt, im Vergleich zur Kontrolle wirkt Kalzium also nach  $\alpha_1$ -Stimulation bereits bei niedrigeren Konzentrationen positiv inotrop. An Vorhofpräparaten von Rattenherzen kam es durch  $\alpha_1$ -Stimulation zu einer Verschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve nach links und oben (Terzic et al. 1992). Die Verschiebung nach oben bedeutet, daß es durch  $\alpha_1$ -Stimulation zu einem Überschreiten der maximal durch Kalzium erreichbaren Kontraktionsstärke kommt.

Als Ursache der  $\alpha_1$ -vermittelten effektiveren myofibrillären Kalziumverwertung werden eine Erhöhung der Kalziumsensitivität des Troponin C durch Phosphorylierung kontraktiler

Proteine (Puceat et al. 1990) sowie eine Alkalisierung des Zytoplasmas (Otani et al. 1990) oder eine direkte Beeinflussung der Aktin-Myosin-Querbrücken-Dynamik diskutiert (Rüegg 1998/Endoh 1995).



**Abb. 2: Methoxamin-Strukturformel**

Um zu überprüfen, ob auch beim intakten Rattenherz Hinweise für eine effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung durch  $\alpha_1$ -Rezeptorwirkung feststellbar sind, wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Methoxamin an arbeitenden Rattenherzen bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen untersucht. So läßt sich feststellen, ob eine Kalziumabhängigkeit besteht und ob bei hoher Kalziumkonzentrationen (10 mmol/l) noch eine inotrope Wirkung vorhanden ist.

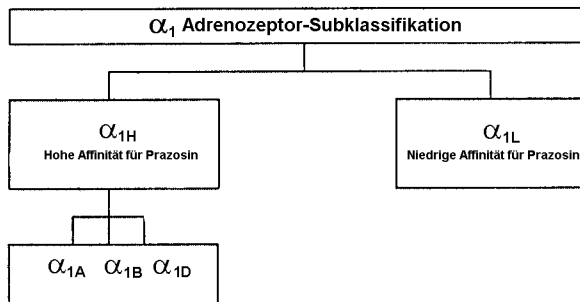
Kommt es durch Methoxamin zu einer effektiveren myofibrillären Kalziumverwertung, so ist zu erwarten, daß es auch bei maximal inotroper Kalziumkonzentration noch positiv inotrop wirkt, da sich die inotrope Wirkung durch effektivere myofibrilläre Kalziumverwertung additiv verhalten sollte zur inotropen Wirkung des Kalziums. Darüber hinaus ist zu mutmaßen, daß das Ausmaß der inotropen Wirkung durch eine effektivere Kalziumverwertung unabhängig ist vom inotropen Ausgangsstatus, der in den verschiedenen Versuchsgruppen durch unterschiedliche Kalziumkonzentrationen bestimmt wird.

Zweites Ziel der Arbeit ist die Klärung der Frage, ob die  $\alpha_1$ -Stimulation mit Methoxamin das Relaxationsverhalten beeinflusst. Diese Frage wurde bisher in der Literatur vernachlässigt. Das Relaxationsverhalten wird anhand zweier Parameter,  $LVdP/dt_{min}$  und  $t$ , bei Normaltemperatur (37 °C) sowie leichter Hypothermie (31 °C) untersucht.

Methoxamin wurde als Versuchssubstanz gewählt, da es anders als das häufiger zur Untersuchung von  $\alpha_1$ -Rezeptoren verwandte Phenylephrin selektiv auf  $\alpha_1$ -Rezeptoren wirkt (Endoh et al. 1975; Rabinowitz et al. 1975). Ratten eignen sich zur Untersuchung von

kardialen  $\alpha_1$ -Rezeptoren besonders gut, da bei ihnen im Vergleich mit anderen Spezies (Meerschweinchen, Maus, Schwein, Kalb, Mensch) die  $\alpha_1$ -Rezeptordichte im Herz bis zu achtfach so hoch ist (Steinfath et al. 1992).

Hier sei auch erwähnt, daß nach neueren Untersuchungen der  $\alpha_1$ -Rezeptor in weitere Subtypen aufgeteilt werden kann. Studien mit radioaktiv markierten Liganden und funktionelle Untersuchungen führten zur Identifizierung von drei  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren mit hoher Affinität für Prazosin:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  (Langer 1998), siehe Abbildung 3:



**Abb. 3: Unterteilung des  $\alpha_1$ -Rezeptors**

Es ist anzunehmen, daß die  $\alpha_1$ -vermittelte Wirkung vom speziesspezifischen Verteilungsmuster der Subtypen beeinflusst wird. Im Herzen einer Ratte gibt es hauptsächlich  $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1B}$ -Rezeptoren im Verhältnis 1:4 (Hanft & Gross 1989). Methoxamin hat für  $\alpha_{1A}$ -Rezeptoren eine höhere Affinität als für  $\alpha_{1B}$ -Rezeptoren (Langer 1998).