

## 4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Identität der kontraktiven  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie, der kontraktiven 5-HT<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader und der relaxierenden 5-HT-Rezeptoren der Läufer Schweinpulmonalarterien ermittelt. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen der Etablierung neuer funktioneller Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften natürlicher und partialsynthetischer Ergoline.

An der Rattenschwanzarterie führte Noradrenalin zu einer Kontraktion, die sich in einer monophasischen  $E/[A]$ -Kurve widerspiegelte. In Gegenwart des selektiven  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptorantagonisten B8805-033 (0,03 – 3  $\mu$ M) zeigte die  $E/[A]$ -Kurve einen biphasischen Verlauf, was für eine Noradrenalin-vermittelte Aktivierung mehrerer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren sprach. Die B8805-033-insensitive Phase der Noradrenalin-induzierten Kontraktion wurde in Gegenwart von B8805-033 (3  $\mu$ M) näher untersucht, während die B8805-033-sensitive Phase nach einer protektiven Vorbehandlung mit B8805-055 (3  $\mu$ M) gefolgt von einer irreversiblen Rezeptorinaktivierung mit Hilfe des Alkylanzes Chloroethylclonidin (100  $\mu$ M) charakterisiert wurde. Die B8805-033-insensitive Phase der Noradrenalin-induzierten Kontraktion wurde kompetitiv von Prazosin, Tamsulosin, WB 4101, Spiperon, L-765314, 5-Methylurapidil, BMY 7378 und MDL 73005EF und nichtkompetitiv von RS-17053 gehemmt. Die Reihenfolge der ermittelten antagonistischen Potenz betrug Prazosin > Tamsulosin > WB 4101 > Spiperon > L-765314 > 5-Methylurapidil  $\geq$  RS-17053  $\geq$  BMY 7378 > MDL 73005EF. Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse der ermittelten  $pK_B$ -Werte zu nativen und rekombinanten  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin in Gegenwart von B8805-033 die Rattenschwanzarterie selektiv über eine Aktivierung von  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptoren kontrahiert. Die B8805-033-sensitive Phase der Kontraktion konnte durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten, gemessen an ihrer antagonistischen Potenz, in der Reihenfolge Tamsulosin > 5-Methylurapidil > RS-17053 > B8805-033 > BMY 7378 > L-765314 inhibiert werden. Die für die B8805-033-sensitive Phase der Kontraktion ermittelten  $pK_B$ -Werte stimmten am besten mit publizierten Affinitäten dieser Liganden zu nativen und rekombinanten  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren überein.

Die 5-HT<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren der Meerschweinchenbeckenschlagader wurden mit Hilfe molekularbiologischer und pharmakologischer Methoden näher charakterisiert. Mit Hilfe der RT-PCR konnte in diesem Organ die mRNA des 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptors, nicht aber die des 5-HT<sub>1D</sub>- oder des 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden. In Organbadexperimenten führten nach moderater Vorkontraktion mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (0,1 – 1  $\mu$ M) 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin, Frovatriptan, Zolmitriptan, Rizatriptan, Naratriptan, Sumatriptan und Almotriptan zu einer monophasischen sowie Eletriptan zu einer biphasischen Kontraktion. Die Reihenfolge der agonistischen Potenz betrug 5-Carbox-

amidotryptamin  $\geq$  5-HT  $\geq$  Frovatriptan > Zolmitriptan  $\geq$  Eletriptan (erste Phase der Kontraktion) > Rizatriptan  $\geq$  Naratriptan > Sumatriptan > Almotriptan und ist im Einklang mit Daten an der isolierten humanen Koronararterie, einem Modell zur Vorhersage kardiovaskulärer Nebenwirkungen von Triptanen. Diese durch 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin und die Triptane induzierten Kontraktionen konnten durch den nichtselektiven 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptorantagonisten GR 127935 (10 nM) und durch den selektiven 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptorantagonisten SB 216641 (10 nM) gehemmt werden. Zu keiner Inhibition der kontraktile Effekte führte der selektive 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptorantagonist BRL 15572 (100 nM). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Meerschweinchenbeckenschlagader ein geeignetes Modell zur Vorhersage 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor-vermittelter kardiovaskulärer Nebenwirkungen potenzieller Migränetherapeutika ist.

Die Pulmonalarterien des Läufer Schweins wurden nach einer Vorkontraktion mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (1  $\mu$ M) durch 5-HT über einen endothelabhängigen und einen endothelunabhängigen Mechanismus relaxiert. Die endothelabhängige Komponente der Relaxation wurde über eine Aktivierung von 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren vermittelt. Nach mechanischer Entfernung des Endothels führten 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin, 5-Methoxytryptamin und Frovatriptan zu einer Relaxation dieser Blutgefäße, welche durch den selektiven 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorantagonisten SB 269970 inhibiert wurde. Die relaxierenden Effekte des 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoragonisten 5-Carboxamidotryptamin, welche über einen intrazellulären Anstieg an cAMP vermittelt wurden, konnten in submikromolaren Konzentrationen auch durch Methiothepin, Pimozid, Mesulergin, Methysergid, Clozapin und Spiperon gehemmt werden. Die ermittelten pK<sub>B</sub>-Werte für diese Antagonisten korrelierten mit publizierten Radioligandbindungsdaten an rekombinanten 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren. Die Läufer Schweinpulmonalarterien konnten somit als ein vaskulärer 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorassay etabliert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die pharmakologischen Eigenschaften natürlich vorkommender Ergoline, Dihydroergoline, 8 $\alpha$ -Aminoergoline und der von ihnen abgeleiteten 6'-Desoxo- und 1-Allylderivate an Subtypen vaskulärer und nichtvaskulärer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren und an Subtypen vaskulärer 5-HT-Rezeptoren charakterisiert. Als Modelle wurden neben den neu entwickelten Methoden an der Rattenschwanzarterie ( $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1B}$ ), der Meerschweinchenbeckenschlagader (5-HT<sub>1B</sub>) und den Läufer Schweinpulmonalarterien (5-HT<sub>7</sub>) auch der Rattensamenleiter ( $\alpha_{1A}$ ), die Meerschweinchenmilz ( $\alpha_{1B}$ ), die Rattenaorta ( $\alpha_{1D}$ ), die Rattenschwanzarterie (5-HT<sub>2A</sub>), die Schweinekoronararterie (5-HT<sub>2A</sub>) und die Schweinepulmonalarterien (5-HT<sub>2B</sub>) genutzt.

Die natürlich vorkommenden Ergopeptine Ergotamin, Ergocristin und  $\alpha$ -Ergokryptin verhielten sich als potente Antagonisten an vaskulären  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren sowie als potente Partialagonisten an vaskulären  $\alpha_{1B}$ - und  $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptoren und an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Sie besaßen jedoch nicht die Fähigkeit, zwischen Subtypen von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren nennenswert zu

diskriminieren. Eine Hydrierung der Doppelbindung in  $\Delta^{9,10}$ -Position des Ergotamins ( $\rightarrow$  Dihydroergotamin) führte zu einer moderaten Erhöhung der Affinität zu vaskulären  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren, während ein Austausch der Methylgruppe in C-2'-Position gegen eine Isopropylgruppe (Ergotamin  $\rightarrow$  Ergocristin) zu einer Verringerung der Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren um Faktor 6 führte. Die natürlich vorkommenden Clavine Lysergol und Festuclavin zeigten eine niedrigere Affinität zu  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen als zu vaskulären 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die trizyklische Peptidgruppe der Ergopeptine für deren erhöhte Affinität zu  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren verantwortlich ist.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde untersucht, ob sich durch Reduktion der Amidgruppe in C-6'-Position der trizyklischen Peptidgruppe der Ergopeptine die Selektivität dieser Substanzen zu Gunsten von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren beeinflussen lässt. Eine derartige Reduktion führte zu einer Verringerung der Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der Ratte um etwa 1 bis 1,5 logarithmische Einheiten unter einem partiellen Verlust der agonistischen Wirksamkeit. Um etwa den gleichen Betrag sank auch die Affinität zu allen  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen unter einem vollständigen Verlust der agonistischen Wirksamkeit. Eine generelle Erhöhung der  $\alpha_1$ -Adrenozeptorselektivität konnte durch Reduktion der Amidgruppe in C-6'-Position somit nicht erzielt werden.

Da bereits 1-methylierte und 1-isopropylsubstituierte Ergoline als selektive Antagonisten an rodenten 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren beschrieben waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung einer Allylsubstitution in N-1-Position des Ergolingrundgerüsts untersucht. Die 1-Allylsubstitution bedingte einen vollständigen oder partiellen Verlust der agonistischen Wirksamkeit an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren. Ebenso zeigten alle untersuchten 1-Allylergoline gegenüber ihren unsubstituierten Muttersubstanzen eine erniedrigte Affinität zu 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren des Meer-schweinchens sowie zu 5-HT<sub>7</sub>- und 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren des Schweins. Übereinstimmend konnte beobachtet werden, dass 1-Allylergoline eine höhere Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der Ratte als zu denen des Schweins zeigten. Dieses Phänomen konnte durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der Ratte und des Schweins erklärt werden. Die Affinität von Ergotamin und Dihydroergotamin zu 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren nahm im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Ergolinen durch 1-Allylsubstitution deutlich zu. 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin konnten als selektive Antagonisten an 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterien identifiziert werden. Ihre Selektivität gegenüber anderen vaskulären 5-HT-Rezeptoren betrug mindestens Faktor 16 (1-Allylergotamin) bzw. Faktor 78 (1-Allyldihydroergotamin) und gegenüber  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren mindestens Faktor 160 bzw. 210. Da die 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptorselektivität von 1-Allylergotamin und 1-Allyldihydroergotamin der von Lisurid, das ursprünglich auf Grund seines 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptor-Antagonismus als Migräneprophylaktikum entwickelt wurde, mindestens ebenbürtig war, ist eine Wirksamkeit beider 1-Allylergopeptine in der Migräneprophylaxe denkbar.