

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Übertragbarkeit auf die Klinik

Was Rückschlüsse auf den lebenden Organismus anbelangt, sind die Ergebnisse von in vitro-Studien grundsätzlich mit Zurückhaltung zu betrachten.

Bei in vitro-Studien wird zwar versucht, die physiologischen Bedingungen möglichst genau zu imitieren, die Zustände und Stoffwechselfvorgänge im Organismus lassen sich jedoch nicht exakt reproduzieren. Daher bleiben in diesen Studien einige Wechselwirkungen aus, die im Körper ablaufen. Ebenso entfallen psychosomatische Einflussfaktoren, eventuelle Placeboeffekte und natürlich auch Nebenwirkungen. Ein gutes Beispiel sind in diesem Zusammenhang die Studien von Moya et al. (2000) und Facchinetti et al. (2002), in denen die Wirkung von GTN an Frauen mit Dysmenorrhoe getestet wurde. Obwohl GTN eine gute Effektivität zeigte, brachen zwischen 20-30% der Frauen die Therapie aufgrund von Kopfschmerzen ab. So lassen die vorliegenden Ergebnisse lediglich Hinweise auf die Wirkung einer Substanz in vivo zu, sie ersetzen jedoch keine in vivo-Studie.

Trotz dieser Tatsache wurden in den vorliegenden Versuchen die therapeutischen Plasmaspiegel von Atosiban, GTN und Nifedipin zur Berechnung der angewandten Organbadkonzentrationen herangezogen. Von diesem Spiegel ausgehend wurden jeweils höhere und niedrigere Medikamentenkonzentrationen getestet, so dass der Bereich der therapeutischen Plasmakonzentration eingeschlossen war. Dadurch ist auch eine Vergleichbarkeit der Wirksamkeitsunterschiede der verschiedenen Substanzen im therapeutischen Bereich gegeben. In der Einleitung wurde bereits auf in vivo-Studien zu den einzelnen Medikamenten und deren therapeutische Erfolge eingegangen. Im Anschluß werden hauptsächlich die Ergebnisse von in vitro-Studien berücksichtigt und mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen. Zusätzlich werden eventuelle Diskrepanzen zwischen der Klinik und den in vitro-Studien diskutiert.

### 4.2 Myometriumrelaxation durch Atosiban

Seitdem im Jahr 1953 von Du Vigneaud et al. die Oxytocinstruktur entschlüsselt wurde, sind einige agonistisch und antagonistisch wirkende Substanzen entwickelt worden.

Erst 1981 konnte eine Substanz entwickelt werden, die sowohl in vivo (bei Ratten) als auch in vitro (an humanem schwangeren und nicht-schwangeren Myometrium) vollständig antagonistisch zu Oxytocin wirkte (Melin et al., 1981). Zu dieser Zeit wurde in den USA Ritodrine als  $\beta_2$ -Sympathomimetikum in der Behandlung vorzeitiger Wehen zugelassen. In den damit verbundenen Studien wurde die Wirksamkeit von Ritodrine im Vergleich zu Alkohol getestet. Alkohol entfaltet in vivo eine oxytocinantagonistische Wirkung, da er zum einen die zentrale Oxytocin- und Vasopressinsekretion aus der Neurohypophyse hemmt und zum anderen die Effekte dieser Hormone auf das Myometrium blockiert (Husslein, 1984).

Bis 1985 wurde durch Änderungen an den Positionen 1,2,4 und 8 der Ausgangssubstanz schließlich eine verbesserte Rezeptoraffinität und eine zusätzliche Wirkung an den Vasopressinrezeptoren erreicht. Die beiden neu entwickelten Substanzen hemmten vasopressin-induzierte Kontraktionen im nicht-schwangeren Myometrium und unterschieden sich in ihrer Rezeptoraffinität (Akerlund et al., 1985), wobei die Substanz mit der höheren Affinität (Atosiban) für weitere Studien ausgewählt wurde.

Cys-	Tyr-	Ile-	Glu-	Asn-	Cys-	Pro-	Orn-	Gly-	NH <sub>2</sub>	Oxytocin
Cys-	OEthyl-	Ile-	Thr-	Asn-	Cys-	Pro-	Orn-	Gly-	NH <sub>2</sub>	Atosiban

**Abbildung 18: Formeln von Oxytocin und Atosiban**

Atosiban wirkt durch seine Bindung an Oxytocin-  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  und  $V_2$ -Rezeptoren auf dreifache Weise.

1. Hemmt es dosisabhängig die durch Oxytocin stimulierte Bildung von Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) mit einer daraus resultierenden Hemmung der Freisetzung von gespeichertem intrazellulären Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.
2. Blockiert es spannungsgesteuerte Calciumkanäle in der Zellmembran der Myozyten und hemmt damit den Calciumeinstrom in die Zelle.
3. Verhindert es die durch Oxytocin verursachte Freisetzung von Prostaglandinen aus der Dezidua und den fetalen Membranen.

Insgesamt konnte in den vorliegenden Versuchen mit Atosiban am nicht-schwangeren Myometrium nicht die in der Literatur beschriebene Relaxationswirkung an Gewebe von schwangeren Patientinnen erreicht werden.

Der erzielte Relaxationseffekt der Spontankontraktionen lag in den verschiedenen Atosiban-Konzentrationen zwischen 11,1% (bei 250 ng/ml Atosiban) und 27,2% (bei 3333 ng/ml Atosiban).

In anderen Studien unserer Arbeitsgruppe mit Gewebe von schwangeren Frauen konnte durch Atosiban dagegen eine Hemmung zwischen 54,1% (bei 100 ng/ml Atosiban) und 70,6% (bei 5000 ng/ml Atosiban) erreicht werden. In diesen Studien wurden die Kontraktionen allerdings durch Oxytocinzugabe verstärkt (E. Riesenkampff).

Versucht man, diese Ergebnisse auf die Klinik zu übertragen und betrachtet den therapeutischen Dosisbereich von Atosiban (500 ng/ml), so wurden in diesem Bereich in den vorliegenden Studien Relaxationswerte von etwa 15% erreicht. In den Studien an schwangerem Myometrium wurde in diesem Bereich hingegen eine Kontraktionshemmung von 60% verzeichnet (E. Riesenkampff).

Ein Grund für die sehr unterschiedliche Wirkung von Atosiban am schwangeren und nicht-schwangeren Gewebe könnte die abweichende Rezeptordichte sein. Im schwangeren Gewebe kann die Dichte der Oxytocinrezeptoren 300fach höher sein im Vergleich zu nicht-schwangerem Gewebe (Kimura et al., 1996). Die Konzentrationen der Vasopressin-V1a-Rezeptor-RNA sind dagegen in schwangerem wie auch in nicht-schwangerem Gewebe ähnlich (Helmer et al., 1998). Der inhibitorische Effekt von Atosiban korreliert mit der Oxytocin-Rezeptor-Dichte (Bossmar et al., 1994).

Eine Abhängigkeit der Atosibanwirkung von dem Alter der Gewebeprobe war in den vorliegenden Versuchen ebenfalls zu beobachten. Atosiban zeigte in fast allen Messungen eine stärkere Wirkung am ersten Versuchstag und damit an frischem Gewebe.

Zwischen den medianen Restaktivitäten an den beiden Versuchstagen bestand eine Diskrepanz von 24,5% (bei 250 ng/ml Atosiban); 8,1% (bei 1100 ng/ml), und 39,8% (bei 3333 ng/ml), d.h. am ersten Versuchstag hatte Atosiban eine 8,1% bis 39,8% bessere Relaxationswirkung. Lediglich in der Konzentration von 1500 ng/ml Atosiban war dieser Effekt nicht zu beobachten, hier war die Wirksamkeit am älteren Gewebe 8,8% stärker.

Geht man davon aus, dass mit dem Alter der Gewebeprobe die Dichte der Oxytocin- und Vasopressinrezeptoren abnimmt, wäre das eine Erklärung für diese Tatsache.

Da in den vorliegenden Versuchen jedoch keine Untersuchungen zu den Rezeptoren unternommen wurden, lassen sich diesbezüglich nur Vermutungen äußern. Man kann hier jedenfalls nicht von einer Toleranzentwicklung sprechen, da das Gewebe am zweiten Versuchstag neu zugeschnitten wurde und die Streifen vom ersten Tag, die bereits dem Medikament ausgesetzt wurden, nicht wiederverwendet wurden.

Um Aussagen über eine eventuelle Toleranzentwicklung oder auch Sensibilisierung der Myometriumstreifen gegenüber Atosiban treffen zu können, wurden die Messwerte nach der Anzahl der Substanzapplikationen bzw. Messphasen gefiltert. Hier war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den wiederholten Messungen zu verzeichnen. Es fiel jedoch auf, dass die medianen Restaktivitäten bei der zweiten Atosibangabe durchgehend niedriger lagen als bei der ersten Gabe, Atosiban dementsprechend eine bessere Relaxationswirkung hatte. Die Abweichungen lagen dabei zwischen 4,1% (bei 1500 ng/ml Atosiban) und 43,7% (bei 3333 ng/ml). Teilweise sind hier nur ein oder vier Messwerte pro Atosibankonzentration in die Auswertungen eingegangen (siehe Tabelle 5), so dass ein Vergleich der Zahlen nur bedingt möglich ist. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann man aber von einer Tendenz sprechen, nach der mit der zweiten Atosibangabe eine leicht verstärkte Wirksamkeit zu beobachten war.

Im Kontrast hierzu wurde in anderen Studien ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Am schwangeren Gewebe konnten oxytocininduzierte Kontraktionen bei der ersten Atosibangabe besser gehemmt werden als bei wiederholter Gabe, wobei der Wirksamkeitsunterschied durchschnittlich bei etwa 15% lag. Aufgrund dieser verminderten Relaxationswirkung nahm man eine mögliche Toleranzentwicklung des Gewebes gegenüber Atosiban, ähnlich der Nitrattoleranz, an. In der Literatur ist eine Downregulation der Oxytocinrezeptoren beschrieben worden, wobei die Rezeptordichte bei fortgeschrittenen Wehen und nach Oxytocininfusion deutlich abnimmt (Bossmar T., 1998 und Akerlund, 2004). Auch Plested et al. berichten von einer Desensitivierung von Oxytocinrezeptoren in humanem Myometrium (Plested et al., 2001).

Phaneuf S. et al. untersuchten bereits 1994 diesen Effekt genauer am schwangeren Myometrium, indem sie nach Oxytocin- bzw. Atosibanzugabe die Dichte der Oxytocinrezeptoren, die Calciummobilisation und das intrazelluläre IP<sub>3</sub> bestimmten. Eine Inkubation mit Oxytocin bewirkte einen Verlust an Oxytocinrezeptoren, wobei Atosiban keinerlei Einfluß auf die bestimmten Parameter hatte.

Diese Feststellung könnte eine Erklärung für die Versuche am schwangeren Myometrium liefern, besonders wenn man bedenkt, dass das Gewebe wiederholt mit Oxytocin stimuliert

wurde. Im Laufe des Versuchs nahm anscheinend die Dichte der Oxytocinrezeptoren so ab, dass Atosiban bei der zweiten Applikation eine schwächere Relaxationswirkung erzielte. Die Studie von Phaneuf et al. kann ebenso als Erklärungsmodell für die Ergebnisse der vorliegenden Versuche, die eher in die gegenteilige Richtung tendieren, herangezogen werden. Zunächst wurde hier Gewebe nicht-schwangerer Frauen verwendet, das ohnehin durch eine sehr viel niedrigere Oxytocinrezeptorkonzentration gekennzeichnet ist (ungefähr 300 fach). So hat eventuell eine Abnahme der von vornherein geringen Dichte der Rezeptoren auch nicht derlei Auswirkungen, die mit dem Gewebe schwangerer Frauen vergleichbar wären. Zum anderen wurde in den vorliegenden Versuchen nicht mit Oxytocin stimuliert, so dass nicht von einer Downregulation der Rezeptoren ausgegangen werden kann. Nach Phaneuf et al. wird diese oxytocininduzierte Desensitivierung vielmehr durch Atosiban verhindert (siehe S. 55).

Die in den vorliegenden Versuchen beobachtete Tendenz zur verstärkten Atosibanwirkung nach der zweiten Applikation könnte durch eine kumulative Wirkung erklärt werden, insbesondere wenn man bedenkt, dass an einem Myometriumpreparat im Versuchsverlauf nur eine Substanz in gleich hohen oder ansteigenden Konzentrationen getestet wurde. Zwischen den Messungen wurden zwar mehrere Organbadspülungen durchgeführt, dennoch kann die Wirkung nach der ersten Atosibanapplikation noch länger angedauert haben (die Halbwertszeit von Atosiban liegt bei 1,7 h) und durch nachfolgende Applikationen verstärkt worden sein. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Verteilung insbesondere der Oxytocinrezeptoren zyklischen Schwankungen unterworfen, die man sich durch den Einfluß von Sexualhormonen erklärt (Richter et al., 2003). Nach Stimulation mit 17- $\beta$ -Estradiol konnten Richter et al. eine signifikant verstärkte Expression des Oxytocinrezeptors im Myometrium nicht-schwangerer Frauen erreichen.

Andere Autoren beschreiben eine direkt stimulierende Wirkung von Östrogenen auf die Oxytocinausschüttung (Akerlund, 2004). Den Uterus nimmt Akerlund dabei als zusätzlichen Produktionsort für Oxytocin an, da er Oxytocin-mRNA im Endometrium nicht-schwangerer Frauen mit einem Höhepunkt um die Ovulation herum nachwies.

Übertragen auf die vorliegenden Versuche würde dies bedeuten, dass das Gewebe der nicht-schwangeren Probandinnen sehr variierende Verteilungen der Oxytocinrezeptoren aufweist, die bei jeder einzelnen Patientin den physiologischen hormonalen Zyklusschwankungen unterworfen ist (endogene Faktoren) und zusätzlich beeinflusst wird durch exogene Faktoren (z.B. Medikamente wie orale Kontrazeptiva). Diese Fülle an Einflussfaktoren konnte jedoch nicht in die Auswertung der Daten einbezogen werden.

### 4.3 Myometriumrelaxation durch GTN

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator parakriner Interaktionen, vor allem im Gefäßsystem. Es ist ein starker Inhibitor der Thrombozytenaggregation, ein potenter Vasodilatator, wirkt als Neurotransmitter und hat zusätzlich eine Bedeutung in der zellulär vermittelten Zytotoxizität. Im glandulären Epithel des humanen nicht-schwangeren Uterusgewebes wurden zwei Isoenzyme (iNOS = inducible nitric oxide synthase und eNOS = endothelial nitric oxide synthase), die NO synthetisieren, isoliert (Cameron et al., 1998). Andere Forscher zweifeln eine Produktion von endogenem NO im nicht-schwangeren Uterus allerdings an, da Versuche, in denen mittels Antikörpern gegen NO-Synthetase (NOS) dieses Enzym im humanen Uterus aufgesucht wurde, bisher erfolglos blieben (Bartlett et al., 1999). NO könnte bei nicht-schwangeren Frauen eine Bedeutung haben bei der Initiation und Kontrolle der Menstruationsblutung, wobei es die Thrombozytenaggregation im Endometrium hemmt (Cameron et al., 1998). Die Hämostase wird im Endometrium primär durch Vaso-konstriktion gewährleistet.

Einheitlichere Literaturangaben existieren dagegen zur endogenen NO-Produktion im schwangeren Gewebe. Erhöhte Aktivitäten der NOS konnten z.B. im villösen Trophoblasten im ersten Trimenon nachgewiesen werden, während die Aktivität zum Ende der Schwangerschaft abnimmt (Sanyal et al., 2000). NO wird zusätzlich in den Makrophagen der Dezidua synthetisiert (Vince et al., 1990). Das auf diese Weise produzierte NO aus nichtmuskulären Anteilen in Nachbarschaft des Myometriums könnte als parakriner Wirkstoff zur Aufrechterhaltung der uterinen Ruhe während der Schwangerschaft fungieren (Mirabile et al., 2000). Ebenso scheint die Cervixfunktion während der Schwangerschaft zumindest teilweise unter NO-Kontrolle zu stehen (Ekerhovd et al., 1998).

Die Relaxationspotenz von NO auf glatte Muskulatur lässt sich in Form von NO-Donatoren wie z.B. Glyceroltrinitrat in der Behandlung von vorzeitigen Wehen und primärer Dysmenorrhoe nutzen. NO-Donatoren bzw. Nitrate sind Prodrugs, die erst im Organismus zum aktiven Wirkstoff (NO) umgewandelt werden. Das wirksame Molekül NO hat eine kurze Halbwertszeit, d.h. die muskelrelaxierende Potenz hält sowohl in vivo als auch in vitro nicht lange an. In der Klinik haben sich daher Retardpräparate und transdermale Applikationsformen etabliert.

In der Literatur existieren sehr unterschiedliche Auffassungen zur Rolle von cGMP in der Regulation der Myometriumkontraktilität. Bis vor 10 Jahren erklärte man sich die Relaxationspotenz der NO-Donatoren sowohl auf das Myometrium als auch auf die glatte Muskulatur

anderer Organe und die Gefäßmuskulatur über eine Aktivierung der Guanylcyclase und damit eine Erhöhung von cGMP (Yallampalli et al., 1994; Buhimschi et al., 1995). Einige Autoren gehen bis heute von dieser Theorie aus, so haben z.B. Wetzka et al. durch in vitro-Studien mit Glyceroltrinitrat an schwangerem und nicht schwangerem Myometrium eine intrazelluläre Zunahme von cGMP festgestellt (2001). In anderen Studien wurde jedoch gezeigt, dass cGMP-aktivierende Substanzen (SNP, ANP, L-Arginin) zwar eine Relaxation glatter Muskulatur bewirken, das humane Myometrium jedoch eine Sonderrolle einzunehmen scheint, da die Substanzen hier zu keiner Tonusänderung führen (Hennan et al., 1998; Buxton et al., 2001; Tichenor et al., 2003).

Im Kontrast zur glatten Muskulatur in anderen Organen scheint die Relaxation durch NO-Donatoren im Uterus also nicht über eine Erhöhung von cGMP hervorgerufen zu werden, es müssen andere Mechanismen, wie z.B. die Regulation von Ionenkanälen oder -pumpen involviert sein. Einige Autoren vermuten eine cGMP-unabhängige S-Nitrosylation von Proteinen, die für die Wirkung von NO verantwortlich ist (Davis et al., 2001; Ahern et al., 2002). Diese S-Nitrosylation kann über eine Änderung von Membrankanalproteinen vor allem an  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanälen ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen) eine erhöhte Permeabilität bewirken.

Mazzone et al. denken z.B. an eine wichtige Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), deren Aktivierung durch NO zu einer Hyperpolarisierung und so zur Relaxation der Myofibrillen führt (2002).  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle tragen zur Entstehung eines niedrigeren Ruhepotentials im Myometrium den Hauptanteil bei, indem es durch ihre Öffnung zur Verschiebung von positiv geladenen Kaliumionen von intra- nach extrazellulär kommt. Letztendlich bewirkt die Öffnung dieser Kanäle eine verminderte Exzitabilität der Myozyten, indem das Ruhepotential negativer wird und so der Schwellenwert zur Auslösung eines Aktionspotentials weniger schnell erreicht werden kann.

Shimano et al. wiesen in ihren Versuchen ebenfalls eine Aktivierung von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen mit Hilfe von NO nach (2000). Die Bedeutung der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle für die Wirkung von NO wird zusätzlich unterstützt durch die Feststellung von Buxton et al., nach der ein Toxin vom Skorpion, das eine Blockade dieser Kanäle bewirkt, eine Relaxationswirkung von NO verhindert (2001).

Apamin, ein im Bienengift enthaltenes neurotoxisches Peptid aus 18 Aminosäureestern, das in spezifischer Weise  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle blockiert, kann ebenfalls als Marker für diesen Kanaltyp verwendet werden. In Versuchen konnte eine Vorbehandlung von nicht-schwangerem Myometrium mit Apamin ebenfalls eine Relaxationswirkung von NO verhindern, während es allein jedoch keine Beeinflussung der Spontankontraktionen verursachte (Modzelewska et al., 2003).

K<sub>Ca</sub>-Kanäle scheinen auch an der erhöhten Exzitabilität des Myometriums kurz vor der Geburt mitzuwirken, da ihre Expression bzw. elektrophysiologische Eigenschaft zu diesem Zeitpunkt downreguliert wird (Khan et al., 1993, 2001).

Ein weiteres Erklärungsmodell für die cGMP- unabhängige Myometriumrelaxation durch NO liefert die Regulation der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Dieses Enzym dephosphoryliert die Myosin-Leichten-Ketten und inaktiviert sie auf diese Weise. Eine erhöhte Aktivität der MLCP führt zu einer verminderten Kraftentwicklung bzw. zur Relaxation (Kitazawa et al., 1991).

Auf der anderen Seite führt eine Hemmung der MLCP zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Myosin-Leichten-Ketten, resultierend in einer Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung und verstärkten Kraftentwicklung der Muskulatur (Surks et al., 1999). Der wichtigste Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Mechanismus, der zur verstärkten Kraftentwicklung in der glatten Muskulatur führt, ist die Inaktivierung der MLCP.

Glyceroltrinitrat war in den vorliegenden Versuchen in sehr hohen Konzentrationen die wirksamste Substanz zur Hemmung der Spontankontraktionen in vitro. Diese Beobachtung ist auch damit zu begründen, dass GTN im Vergleich zu den anderen Substanzen in den größten Schritten in der Konzentration gesteigert wurde, also in der breitesten Konzentrationsspanne getestet wurde. Die Konzentration wurde x100, x10.000 und x33.760 erhöht, während bei Atosiban die Ausgangskonzentration x4,5; x6 und x13,3 und bei Nifedipin x10, x50, x100 und x1000 gesteigert wurde. Im Bereich therapeutischer Plasmakonzentrationen war Nifedipin GTN in der Wirksamkeit eindeutig überlegen.

GTN zeigte eine sofortige Wirkung und eine kurze Wirkdauer, eine für Nitrate typische Toleranzentwicklung bei wiederholter Applikation konnte in den vorliegenden Studien nicht beobachtet werden.

Die starke Relaxationswirkung auf die Spontankontraktionen des nicht-schwangeren Myometriums war konzentrationsabhängig (siehe Abbildung 5), die mediane Hemmung der Spontankontraktionen lag dabei zwischen 24,2% (bei einer GTN-Konzentration von 3,9 ng/ml) und 97,4% (131660 ng/ml). Die niedrigste angewandte GTN-Konzentration (3,9 ng/ml) liegt im Bereich der therapeutischen Plasmakonzentration (0,1-5 ng/ml). Versucht man, den in dieser Konzentration erreichten in vitro-Relaxationseffekt von 24,2% auf die Klinik zu übertragen, so wäre hier wahrscheinlich kein befriedigender therapeutischer Nutzen zu erzielen. Allerdings wurde auch in anderen Studien festgestellt, dass in vivo oft niedrigere Wirkstoffkonzentrationen nötig

sind, um den entsprechenden therapeutischen Effekt zu erzielen. C. Hamann benötigte in ihren Versuchen mit Fenoterol und GTN am schwangeren und nicht-schwangeren Myometrium in den Organbädern z.B. im Vergleich zu den bekannten tokolytisch wirksamen Plasmakonzentrationen in vivo bei beiden Substanzen 17-23fach höhere Wirkstoffkonzentrationen, um einen Relaxationseffekt zu erzielen. Gründe für diese Beobachtung könnten in einer stärkeren kontraktilen Aktivität von Myometriumpräparaten in vitro im Vergleich zum Uterus in vivo (Lye et al., 1988), der Rolle des Progesteronspiegels bei der Uterusrelaxation in vivo (Yallampalli et al., 1998) und psychischen Faktoren im Sinne eines Placeboeffektes liegen.

In Anbetracht des Alters der Gewebeprobe war bei den Messungen mit GTN in den beiden niedrigsten Konzentrationen am ersten Versuchstag eine bessere Relaxationswirkung zu verzeichnen. Bei einer GTN-Konzentration von 3,9 ng/ml lag die Abweichung in der Wirkung zwischen den beiden Versuchstagen bei 15%, in einer Konzentration von 386 ng/ml lag sie sogar bei 23,9%. In den beiden höchsten Konzentrationen war der Relaxationseffekt bereits so stark, dass zwischen den beiden Versuchstagen kein großer Unterschied mehr bestand (lediglich 0,6% und 4,7%).

Nach wiederholter Substanzapplikation von GTN konnte in den meisten Fällen bei der zweiten Substanzapplikation eine bessere Relaxationswirkung beobachtet werden (siehe Tabelle 7). Dieser Aspekt ist besonders interessant, da er im Kontrast steht zur klinischen Toleranzentwicklung, die bei Nitrattherapie typisch ist. Diese Nitratoleranz wurde schon kurze Zeit nach der Entdeckung von Nitroglycerin vor mehr als 150 Jahren bekannt und begründet die Einhaltung eines „nitratfreien Intervalls“ bei der Dauertherapie mit Nitraten. Als Ursache für die Toleranzentwicklung vermutet man heute in erster Linie die Beteiligung einer Oxygenase mit Bildung aktiver Sauerstoffradikale und konsekutiver beschleunigter NO-Inaktivierung (Münzel et al., 2004).

Auch die ältere „Biotransformationshypothese“, die von einer Erschöpfung der SH-Gruppen-Donatoren und damit einem Verlust der Biotransformationskapazität von Nitroglycerin in aktive Metaboliten ausgeht, ist bis heute nicht verlassen worden.

C. Hamann beobachtete in ihren in vitro-Versuchen nach wiederholter Applikation von GTN dagegen vor allem an Proben von nicht-schwangeren Patientinnen eine zunehmende Wirkungsabschwächung, d.h. eine zunehmende Kontraktilität der Myometriumstreifen, die durch eine Toleranzentwicklung des Gewebes begründet werden könnte.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden und der Versuche von C. Hamann kann zum einen im unterschiedlichen Versuchsaufbau liegen. C. Hamann applizierte

GTN in kürzeren Abständen, teilweise auch in der Spülphase. Zum anderen erfolgten auch mehrere Applikationen, die wahrscheinlich auch nötig sind, um eine adäquate Aussage über eine mögliche Toleranzentwicklung treffen zu können. In den vorliegenden Versuchen konnten nur zwei Messungen durchgeführt werden, da die Relaxationswirkung so ausgeprägt war, dass die Kontraktilität für weitere Messungen zu gering war.

Aufgrund der guten Relaxationswirkung von GTN kann anhand der Kontraktionskurven häufig die Wirkdauer abgeschätzt werden (siehe Abbildung 9 und 10). Auffällig ist die Zunahme der Wirkdauer mit Erhöhung der GTN-Konzentration, in den Abbildungen ersichtlich durch das Ausbleiben von Spontankontraktionen. In der niedrigsten Konzentration bleiben die Spontankontraktionen noch nicht aus, somit ist eine Aussage zur Wirkdauer nicht möglich (siehe Abbildung 9). In der zweiten Konzentration beträgt die Dauer des Ausbleibens der Kontraktionen ca. 600 s (siehe Abbildung 9), in der dritten Konzentration 1000 s und in der höchsten GTN-Konzentration 2000 s (siehe Abbildung 10). Diese Beobachtung zeigt, dass nicht nur die Kontraktilität der Myometriumstreifen konzentrationsabhängig von GTN beeinflusst wird, sondern auch die Wirkdauer. Insgesamt lag die Wirkdauer zwischen 600 und 2000 s (entspricht 10-33 min.), durchschnittlich lag sie bei etwa 1000 s (17 min.). Damit war sie kürzer als bei Nifedipin. In diesem Fall korrelieren die in vitro-Ergebnisse mit den klinischen Studien: Facchinetti et al. verglichen z.B. 2002 die Wirksamkeit von GTN und Diclofenac bei 24 Frauen mit primärer Dysmenorrhoe mit Hilfe einer Schmerzintensitätsskala. Nach 30 min erzielten beide Substanzen eine vergleichbare Wirkung, Diclofenac konnte den Schmerz allerdings über 2 h unterdrücken, während die Wirksamkeit von GTN nach 30 min deutlich nachließ. Die Wirkdauer von GTN liegt in vivo bei 30 min. nach sublingualer Gabe und bei 15 min. nach intravenöser Gabe, diese Werte passen exakt zu der in vitro gemessenen Wirkdauer zwischen 10 und 33 min.. Die kurze Halbwertszeit von GTN (2-3 min) begründet die vergleichsweise sehr kurz andauernde Relaxationswirkung sowohl in vitro als auch in vivo. Der Wirkungsbeginn von GTN in vivo ist mit einer Zeitspanne von 1-3 min. sowohl nach sublingualer als auch nach intravenöser Gabe im Vergleich zur sofortigen Wirkung in vitro verzögert. Der Grund dafür mag in dem längeren Weg in vivo bis zur Anflutung in die Muskulatur liegen, in den in vitro-Versuchen wurde GTN dagegen direkt zum Organbad hinzugefügt.

Eine andere Beobachtung ist das Absinken der Grundspannung der Myometriumstreifen im Versuchsverlauf insbesondere bei hohen Konzentrationen von GTN (S. 40) und Nifedipin (S. 44), in den Kontrollversuchen war dieses Phänomen selten (S.49). Daher ist von einer Tonusabnahme der Streifen bedingt durch die Relaxationspotenz der Substanzen auszugehen.

Bezüglich der bei den GTN-Messungen zusätzlich vorhandenen Alkoholkonzentrationen zwischen 0,00059‰ und 19,89‰ in den Organbädern (siehe S. 39) bleibt der Einfluß von Ethanol auf das Kontraktionsverhalten glatter Muskulatur zu diskutieren.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die relaxierende Potenz von Ethanol in vivo bekannt. Man erklärt sie sich über eine Hemmung der zentralen Oxytocinsekretion (Husslein et al., 1984). During et al. behandelten z.B. 10 schwangere Frauen während der Wehen unter der Geburt mit Infusionen mit Fructose und Ethanol (1990). Eine Reduktion der Wehenaktivität wurde bereits bei einer Alkohol-Blutkonzentration unter 0.5 mg/g (entspricht 0,5 ‰) beobachtet. Die errechneten Promillewerte in den Organbädern verleiten zu einem Übertragungsversuch der vorliegenden in vitro-Studien auf die Klinik. In den ersten beiden GTN-Konzentrationen wäre bei einer Alkohol-Blutkonzentration von 0,00059 ‰ bzw. 0,059 ‰ in vivo noch nicht einmal das Exzitationsstadium (1,0-2,0 ‰) erreicht. Bei 5,92 ‰ wäre dagegen schon das Rauschstadium (2,0-2,5 ‰) und das Narkosestadium (2,5-4 ‰) überschritten, das Asphyxiestadium (> 4 ‰) oder der Tod wäre mit diesem Wert vereinbar. In bezug auf die Versuche von During et al. wäre hier längst eine Alkoholkonzentration erreicht, die in vivo tokolytisch wirkt.

Mit diesen Übertragungsversuchen sollte man jedoch sehr vorsichtig sein, insbesondere in Anbetracht der vorherrschend zentral bedingten Muskelrelaxation durch Ethanol.

Shabani et al. testeten 2002 die Wirkung von Ethanol in vitro an der glatten Muskulatur der Trachea von Neugeborenen mit infant respiratory distress syndrome (IRDS) und konnten letztendlich keinen statistisch signifikanten Effekt von Ethanol auf den Tonus nachweisen. Aus diesen Ergebnissen zu folgern, ist eine relaxierende Wirkung von Ethanol auf die Myometriumstreifen bei den vorliegenden Versuchen mit GTN sehr unwahrscheinlich. Zumal die Forschungsergebnisse sehr konträr sind, liegen hier mögliche Inhalte zukünftiger Forschungsziele (siehe 4.6).

#### 4.4 Myometriumrelaxation durch Nifedipin

Änderungen der Verteilung von Calciumionen haben wichtige Auswirkungen auf die Kontraktilität von Myozyten. Die Entstehung uteriner Kontraktionen (Wehen und Dysmenorrhoe eingeschlossen) ist abhängig vom Calciumeinstrom durch spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle und vom Membranpotential. Die Hauptcalciumquelle für diesen Kanaltyp liegt im extrazellulären Raum; so enden Kontraktionen abrupt, sobald der Einstrom von extrazellulär verhindert wird oder im Extrazellulärraum keine Calciumionen vorhanden sind. Der wichtigste Faktor für das Ausmaß der Kraftentwicklung glatter Muskulatur ist die Konzentration an intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Wray, 1993 und 2003).

Das Ausmaß des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Myozyten kann wie bereits erwähnt auf verschiedenen Wegen modifiziert werden. Angriffspunkte bieten dabei verschiedene Untereinheiten des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (und deren Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung); biochemische Komponenten wie die MLCK, MLCP, Myosin, Aktin, Calponin, Calmodulin und Caldesmon und verschiedene second-messenger-Systeme wie die PKA, PKC und PKG.

Lee beschrieb im Jahr 1994 NAADP (= nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) als Nukleotid mit der Fähigkeit, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freizusetzen. 2002 wurde NAADP in humaner glatter Muskulatur identifiziert (Yusufi et al.). Besonderheiten bei der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch NAADP sind die Unabhängigkeit von pH-Wert (Chini et al., 1998),  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Ca}^{2+}$  selbst und eine vollständige Desensitivierung durch vorherige Exposition mit NAADP (Genazzani et al., 1996). Yusufi et al. entdeckten ADP-Ribosylcyclase (= CD38) als Enzym, welches die Synthese von NAADP katalysiert (2001). 2002 konnte eine Genexpression von CD38 im Rattenmyometrium nachgewiesen werden, die unter Östrogeneinfluß verstärkt werden konnte (Dogan et al.).

Die Rolle der Calcium- und Natriumkanäle bei Änderungen der zytosolischen Calciumkonzentration und phasischen Kontraktionen von Myometriumstreifen untersuchten Phillippe et al. 1997. Oxytocininduzierte Calciumschwankungen bzw. Kontraktionen konnten durch Blockade von Calciumkanälen mit Nifedipin komplett gehemmt werden, während eine Blockade der Natriumkanäle mit Tetrodotoxin keinen Effekt zeigte. Phillippe et al. schlossen mit ihren Ergebnissen eine Bedeutung der Natriumkanäle in der Entstehung myometrischer Kontraktionen aus.

Das sarkoplasmatische Retikulum fungiert als Speicher für die Calciumionen und als Modulator der Uterusexzitabilität, indem es als limitierende Instanz über einen negativen Feedbackmechanismus auf bisher ungeklärte Weise Kontraktionen zu inhibieren vermag.

Eine Ausschaltung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums z.B. mit Cyclopiazon-säure führt zu einer erhöhten Kontraktilität (Kupittayanant et al., 2002). Eine Erklärung für die kontraktionshemmende Wirkung des sarkoplasmatischen Retikulums könnte die Beobachtung sein, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die von ihm freigesetzt werden, über eine Aktivierung von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen zur Relaxation führen (siehe S. 58). Insbesondere an der glatten Muskulatur cerebraler Arterien konnte dieser Mechanismus nachgewiesen werden (Wellman et al., 2002). Die Aktivität der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase und die Phosphorylierung von Myosin ist ebenfalls eine wichtige Komponente für die Myozytenkontraktilität.

Calciumantagonisten wie Nifedipin blockieren spannungsgesteuerte L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und verhindern damit intrazelluläre Calciumschwankungen. Auf diesem Weg werden Kontraktionen vermieden. Forman et al. beschrieben nach ihren Studien bereits im Jahr 1986 die relaxierende Wirkung der Calciumantagonisten auf humanes Myometrium in vitro sowohl am schwangeren als auch am nicht-schwangeren Gewebe und postulierten vor allem Nifedipin als wirksames Therapeutikum zur Behandlung der Dysmenorrhoe und vorzeitiger Wehen.

Nifedipin bewirkt nach ihren Versuchen einen besonders guten Relaxationseffekt auf phasische Kontraktionsvorgänge (wie z.B. in der glatten Uterusmuskulatur), tonische Kontraktionen sind dagegen resistenter und bleiben von Nifedipin unbeeinflusst. Obwohl Forman et al. in ihren in vitro-Studien eine erhöhte Nifedipinsensitivität des Myometriums im Vergleich zu isolierter Gefäßmuskulatur nachwies, bleibt man bis heute bei der Anwendung von Calciumantagonisten zur Tokolyse in Deutschland im Gegensatz zu anderen Ländern zurückhaltend, da sie in vivo nicht selektiv auf die glatten Muskelzellen des Myometriums wirken, und über ihre Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur ebenfalls einen Blutdruckabfall verursachen. Sehr sinnvoll und therapeutisch nutzbar erweist sich dieser Nebeneffekt in der Therapie der schwangerschaftsassozierten Hypertonie (Papatsonis et al., 2001).

In der Literatur wurde berichtet von einigen Fällen einer symptomatischen Hypocalcämie nach Tokolyse mit Nifedipin in Kombination mit Magnesium (Koontz et al., 2004).

In den vorliegenden Versuchen konnte Nifedipin einen starken Relaxationseffekt auf die Spontankontraktionen des nicht-schwangeren Myometriums erzielen, der zudem konzentrationsabhängig war (siehe Abbildung 11). Die mediane Hemmung lag zwischen 23,4% in der niedrigsten (1 ng/ml Nifedipin) und 86,8% in der höchsten Nifedipinkonzentration (1000 ng/ml).

Im therapeutischen Dosisbereich (10 ng/ml) erwies sich Nifedipin als die wirksamste Substanz in den Versuchen, hier wurde eine Relaxation von ungefähr 48% erreicht, womit Nifedipin sowohl Atosiban als auch GTN in seiner in vitro-Wirkung eindeutig überlegen war.

Die Wirkung von Nifedipin setzte im Vergleich zu GTN zeitlich etwas verzögert ein und war durchschnittlich länger anhaltend. Diese Beobachtungen sind gut mit klinischen Erfahrungen vereinbar, nach denen Nifedipin eine Eliminationshalbwertszeit von 1-4 h sowie eine Wirkdauer von 20 min. bis 6 h hat. Der Wirkbeginn ist in vivo bei i.v.-Gabe nach wenigen Minuten, nach oraler Aufnahme nach 0,5-1,5 h zu erwarten. Die unterschiedliche Pharmakokinetik von GTN (schneller Wirkbeginn, kurze HWZ, kurze Wirkdauer) und Nifedipin (verzögerter Wirkbeginn, längere HWZ, längere Wirkdauer) begründet auch die vorliegenden Ergebnisse.

Betrachtet man die Messwerte nach wiederholter Applikation von Nifedipin (siehe Tabelle 9), so kann man von einer Tendenz sprechen, mit der die erzielte Hemmwirkung in der ersten Messphase (also nach der ersten Applikation von Nifedipin) etwas stärker ist als nach der zweiten Substanzapplikation. Diese Beobachtungen treffen jedoch nicht für die beiden höchsten Nifedipinkonzentrationen zu. In den drei niedrigen Konzentrationen liegen die Abweichungen zwischen erster und zweiter Messphase zwischen 6,2% (1 ng/ml) und 11% (50 ng/ml). Zu der dritten Messphase lassen sich keine Aussagen treffen, da hier die Anzahl der Messungen zu gering ist.

Von einer Toleranzentwicklung des Gewebes gegenüber Calciumantagonisten, z.B. durch Beeinträchtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, ist bisher in der Literatur in Zusammenhang mit der Schwangerschaft berichtet worden. Mit Hilfe von in vitro-Studien mit Nifedipin an schwangerem Myometrium wurde ein besserer Relaxationseffekt erzielt, wenn die Probandinnen noch keine Wehen hatten (Longo et al., 2003). Erfolgte Wehentätigkeit (sowohl vorzeitige als auch termingerechte) hatte eine Wirkungsabschwächung von Nifedipin zur Folge. Eine mögliche Erklärung sind die Änderungen der Ionenkanalexpression im dritten Trimenon, hier kommt es zu einer veränderten Expression von  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen – und so zu einer erhöhten Exzitabilität (Sanborn et al., 2000).

Durch in vitro-Studien am schwangeren und nicht-schwangeren Rattenmyometrium konnten Cetin et al. 1998 einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt von Isradipin auf Spontankontraktionen und oxytocin- und carbacholinduzierte Kontraktionen nachweisen. Isradipin gehört ebenso wie Nifedipin zu den Dihydropyridinen und unterscheidet sich lediglich in der Pharmakokinetik (langsames Anfluten, längere Wirkdauer) von Nifedipin. Isradipin hatte in den Versuchen einen signifikanten Effekt auf die Amplitude und die AUC, in höheren Konzentrationen zusätzlich auf die Frequenz und Dauer der Spontan- und carbacholinduzierten Kontraktionen. Interessanterweise konnte jedoch kein Effekt auf die Dauer und die Frequenz von oxytocininduzierten Kontraktionen festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Amplitude der Kontraktionen anscheinend einfacher medikamentös zu beeinflussen ist als die Frequenz und die Dauer.

Oxytocin bewirkt einen verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle durch Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle in der Zellmembran der Myozyten. Zusätzlich stimuliert es die Bildung von Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) mit einer daraus resultierenden Freisetzung von gespeichertem intrazellulären Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Verdeutlicht man sich diesen Wirkungsmechanismus von Oxytocin, so wird verständlich, warum die auf diesem Wege erzeugten Kontraktionen schwerer durch Calciumantagonisten beeinflusst werden können als Spontankontraktionen.

In den vorliegenden Versuchen war die relaxierende Wirkung von Nifedipin auf die Spontankontraktionen so ausgeprägt, dass alle Parameter, die die AUC beeinflussen, beeinträchtigt waren (Frequenz, Dauer und Amplitude der Kontraktionen). Allerdings wurde hier auch nicht mit Oxytocin stimuliert.

Zusätzlich scheint der pH-Wert die Funktion der  $Ca^{2+}$ -Kanäle und damit das Ausmaß des extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstroms zu beeinflussen (Naderali et al., 1997). Da  $Ca^{2+}$ -Ionen und  $H^+$ -Protonen einen gegenteiligen Effekt auf einige zelluläre Prozesse entfalten, liegt auch hier ein Zusammenhang nahe. In den vorliegenden Versuchen wurde der pH-Wert der Pufferlösung vor jedem einzelnen Versuch genau bestimmt, wenn er nicht im Bereich  $7,43 \pm 0,05$  lag, wurde eine neue Pufferlösung hergestellt. Die Wichtigkeit dieser Maßnahme wird im folgenden deutlich.

Steigende pH-Werte bewirken über eine Reduzierung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen eine Hemmung von Spontankontraktionen im schwangeren Rattenmyometrium (Taggart et al., 1997). Der  $Ca^{2+}$ -Kanal-Öffner Bay K8644 kann im alkalischen Bereich erloschene Spontankontraktionen wiederherstellen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass erhöhte pH-Werte eine Blockade von  $Ca^{2+}$ -Kanälen bewirken, die einen Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen verhindert und damit letztendlich zur Relaxation führen.

Diese Theorie würde außerdem eine sinnvolle Erklärung für den physiologischen Anstieg des Plasma-pH-Wertes während der Schwangerschaft liefern. Hier könnte die Blockade von  $Ca^{2+}$ -Kanälen einer Entstehung von vorzeitigen Wehen entgegenwirken.

In anderen Studien wirken allerdings auch erniedrigte pH-Werte in vitro relaxierend auf das Myometrium (Parratt et al., 1994).

#### 4.5 Besondere Beobachtungen

Von den 23 Myometriumstreifen, die wegen fehlenden Spontankontraktionen von den Versuchen ausgeschlossen wurden, stammten 82,6% (19 Streifen) interessanterweise aus Biopsaten von Probandinnen der jüngeren Altersgruppe (37-45 Jahre), nur 17,4% (4 Streifen) dagegen aus der älteren Gruppe (46-54). Ein Erklärungsmodell könnten die vaginosonographischen Untersuchungen von Brosens et al. von 1998 liefern, die zeigen, dass myometrische Kontraktionen im nicht-schwangeren Uterus lediglich von der Junktionszone des Uterus ihren Ausgang nehmen und die Frequenz und Amplitude abhängig ist von der Phase des Menstruationszyklus (siehe Einleitung, S. 13). Demnach ist beim Zuschneiden der Myometriumstreifen bei den älteren Patientinnen eventuell häufiger Gewebe aus der Junktionszone entnommen worden, so dass die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Spontankontraktionen bei diesem Gewebe höher war. Auch die Tatsache, dass die Myometriumstreifen im gesamten Versuchsverlauf nicht kontrahierten, wenn sie dies nicht innerhalb der ersten zwei Stunden taten, spricht in diesen Fällen für die Verwendung von ungeeignetem Gewebe.

Ein weiterer Punkt ist die zweifach erhöhte Kontraktilität der Myometriumstreifen aus der älteren Patientinnengruppe (bezogen auf die Fläche unter der Kurve, das Integral der Spontanaktivität vor Medikamentenzugabe). Es konnte also aus der älteren Patientinnengruppe nicht nur ein größerer Anteil an Streifen in die Studie eingeschlossen werden, sondern diese wiesen auch eine höhere Kraftentwicklung auf. Eventuell nimmt die Junktionszone auch mit dem Alter zu, was beide Beobachtungen erklären könnte. Diese These ließe sich mit Hilfe von T2-gewichteter MRT von Uteri verschiedener Altersgruppen erklären, in der die Junktionszone abgegrenzt werden kann (Brosens et al., 1998).

Nach Wray ist jedoch der wichtigste Faktor für das Ausmaß der Kraftentwicklung glatter Muskulatur die Konzentration an intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Wray, 1993). Progesteron verstärkt den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Myozyten (Rendt et al., 1992). Geht man davon aus, dass bei den Frauen mit überdurchschnittlicher Myometriumkontraktilität ein relatives Progesteronübergewicht besteht, wäre auch dies eine Erklärung. Sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronspiegel im Blut sinken zwar mit zunehmendem Alter, geht man jedoch von den unterschiedlichen Phasen des Menstruationszyklus aus, so steigt der Progesteronspiegel nach der Ovulation und erreicht einen Höhepunkt am 7. Zyklustag. Eventuell waren die Frauen, deren Myometrium in den in vitro-Untersuchungen eine hohe Kontraktilität zeigte, häufiger in dieser Zyklusphase. Dieser Faktor wurde jedoch nicht ausgewertet.

#### 4.6 Zukünftige Forschungsziele

In der Therapie der Dysmenorrhoe sind bei der Betrachtung neuerer Forschungsergebnisse zur Pathophysiologie einige Alternativen denkbar.

Signifikant erhöhte Leukotrienkonzentrationen konnten im Myometrium von Frauen mit primärer Dysmenorrhoe nachgewiesen werden, die nicht auf eine Behandlung mit Prostaglandinsyntheseinhibitoren ansprechen (Abu et al., 2000), was bei 10-30% der Frauen mit schmerzhafter Periode der Fall ist. Leukotriene sind weit verbreitet in der Lunge, im Darm, Uterus, Nieren, Haut, Herz und Leber. Ihre Rolle als Mediatoren der Entzündungsreaktion hat sie therapeutisch nutzbar gemacht. Leukotrienrezeptorantagonisten werden bereits erfolgreich in der Asthmatherapie eingesetzt und versprechen eine weitere erfolgreiche Einsatzmöglichkeit in der Therapie der Dysmenorrhö bei Frauen, die nicht auf Inhibitoren der Prostaglandinsynthese ansprechen. Zum Beispiel zeigt Lyprinol als Leukotrienrezeptorantagonist antiinflammatorische Aktivität, die im Gegensatz zu den meisten NSAR keine Wirkung auf akute, sondern auf chronische Entzündungen bzw. Schmerzen hat und nicht gastrotoxisch ist. Eine Vorbehandlung von Ratten mit Lyprinol konnte in Versuchen sowohl Spontankontraktionen als auch oxytocininduzierte Kontraktionen des Uterus reduzieren (Shiels et al., 2000).

Harel et al. testeten den Leukotrienrezeptorantagonisten Montelukast in einer für die Asthmatherapie bewährten Dosis (10mg/ die, vom 21. Zyklustag bis Ende der Menstruationsblutung) in einer doppelblinden, plazebokontrollierten Studie (25 Mädchen mit primärer Dysmenorrhoe) und konnten keine signifikante Wirksamkeit nachweisen (Harel et al., 2004). Zukünftigen Studien bleibt überlassen, ob eine höhere Dosierung und kontinuierliche Gabe einen Einfluß auf die Dysmenorrhoe hat.

Möglicherweise liegt in der Inaktivierung von Thrombin ein weiterer Ansatzpunkt zur Therapie der Dysmenorrhoe. Nachdem eine uterotonische Potenz von Thrombin sowohl in vivo als auch in vitro bei schwangeren und nicht-schwangeren Ratten nachgewiesen wurde (Elovitz et al., 2000), wird seine Bedeutung in der Ätiologie von verstärkten Kontraktionen in Gegenwart von intrauterinen Blutungen diskutiert. Durch die Koagulation des Blutes wird das uterotonische Thrombin gebildet. In vivo wirkten in den Studien von Elovitz et. al. sowohl Blut allein als auch Thrombin dosisabhängig positiv inotrop und chronotrop, während Heparinisierung diesen Effekt signifikant hemmte. In vitro konnte Thrombin in einer Konzentration von 1-100 U/ml phasische Myometriumkontraktionen hervorrufen, die vergleichbar waren mit den durch Oxytocin und PGF<sub>2</sub> $\alpha$  erzeugten Kontraktionen. Die während der Kontraktionen durch Thrombin verursachten zytosolischen Calciumschwankungen glichen eben-

falls den durch Oxytocin initiierten. Bei in vitro-Versuchen konnte eine Vorbehandlung des Myometriumgewebes mit Hirudin (Protein aus Blutegeln gewonnen, Thrombininaktivator) den uterotonischen Effekt von Thrombin abschwächen (Elovitz et al., 2000). Bisher liegen jedoch keine Studien vor, in denen die Thrombinbildung bei Frauen mit Dysmenorrhoe mit nicht Betroffenen verglichen wurde. Dies bleibt zukünftigen Forschungszielen überlassen.

Neue klinische Studien zu Atosiban bei Frauen mit spontaner und vasopressininduzierter Dysmenorrhoe lassen entgegen den vorliegenden in vitro-Ergebnissen auf eine gute Wirksamkeit in vivo schließen (Liedman et al., 2006 und Akerlund, 2006), so dass Atosiban durchaus als Alternativtherapie der Dysmenorrhoe in Betracht zu ziehen ist.

NO-Donatoren wie GTN und NO-Inhibitoren könnten nicht nur in der Therapie der Dysmenorrhoe eine mögliche Alternative darstellen, sie versprechen in der Gynäkologie auch vielfältige andere Einsatzmöglichkeiten. Sie könnten neue, effektive, sichere und billige Substanzen in der Regulation und Steuerung verschiedener Funktionen im weiblichen Reproduktionsleben darstellen (Maul et al., 2003). Die Einsatzgebiete reichen hier von der Kontrazeption bis zur Behandlung der Präeklampsie, vorzeitiger Wehen, Cervixreifung und primärer Dysmenorrhoe und versprechen in der Schwangerschaft eine Reduktion der fetalen und maternalen Morbidität und Mortalität. Physiologischerweise steigen die zirkulierenden NO-Produkte während der Follikelreifung an und fallen nach der Ovulation ab. Durch Inhibition der NOS kann in 50% der Fälle eine Suppression der Ovulation erreicht werden (Maul et al., 2003). Auf diese Weise versprechen NO-Inhibitoren die Eröffnung neuer Wege in der Kontrazeption, während NO-Donatoren zu einer verbesserten Fertilität durch Erleichterung der Implantation führen und erfolgsversprechend für die Reproduktionsmedizin sind.

Bezogen auf die vorliegende Arbeit wären Studien mit Ethanol nach dem bewährten Versuchsschema sicherlich von Interesse, zumal bisher die Ergebnisse von in vitro-Studien mit Ethanol an glatter Muskulatur sehr differieren. So konnte Ethanol in vitro einerseits Kontraktionen induzieren (an Magenfundus von Katzen: Sim et al., 2001 sowie an cerebralen Gefäßen von Nagetieren: Liu et al., 2004 und an Rattenileum in hohen Ethanolkonzentrationen: Wali et al., 1987), andererseits jedoch auch zur Relaxation führen (an Magenfundus von Katzen: Sim et al., 2002 und an Rattenileum in geringen Ethanolkonzentrationen: Wali et al., 1987).

Nach den vorliegenden in vitro-Ergebnissen zu urteilen, ist in erster Linie Nifedipin als Alternative zur Therapie der Dysmenorrhoe denkbar. Es war im Bereich der therapeutischen Plasmakonzentration die Substanz mit der besten Relaxationswirkung und könnte gerade bei Hypertonikerinnen günstige Nebeneffekte auf den Blutdruck erzielen.