

3 Aktivität von Protergurid an nicht-dopaminergen Monoaminrezeptoren

3.1 Einleitung

Für die Entwicklung einer transdermalen Darreichungsform für den Dopaminagonisten Protergurid sind neben den pflasterspezifischen Eigenschaften wie transdermalen Fluss, Hautadhäsion und Hautverträglichkeit auch die pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffs an bestimmten, nicht-dopaminergen Monoaminrezeptoren von besonderem Interesse. Insbesondere rezeptorvermittelte Wirkungen,

- die die lokale Durchblutung und somit die transdermale Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs beeinflussen,
- die die lokale Verträglichkeit des Pflasters beeinflussen und
- die schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen auslösen können,

standen im Fokus der folgenden Untersuchungen. Gerade die Stoffgruppe der Ergoline interagiert mit einer Vielzahl von Rezeptoren (Pertz und Eich, 1999), so dass diese Wirkstoffe auch als Hybridpharmaka bezeichnet werden.

Die transdermale Arzneistoffresorption kann durch die pharmakodynamischen Eigenschaften des Arzneistoffs beeinflusst werden, wenn der Wirkstoff die Durchblutung der dermalen Gefäße durch unspezifische Reizung oder durch eine spezifische, rezeptorvermittelte Reaktion im Sinne einer Kontraktion oder Relaxation beeinflusst. Da derartige Effekte bei in vitro Permeationsstudien mit exzidiertem Hautgewebe nicht erfasst werden, gab diese Überlegung Anlass zur Untersuchung der Aktivität von Protergurid an Rezeptoren, welche die Gefäßstellung steuern. Insbesondere waren in diesem Zusammenhang die α_1 -Adrenozeptoren und der 5-HT_{2A}-Rezeptor von Interesse.

Transdermale Arzneiformen, im Speziellen arzneistoffhaltige Pflaster, sind in vielen Fällen mit Hautirritationen an der Applikationsstelle als Nebenwirkung behaftet. Diese können durch die Okklusion oder aber durch eine Gewebereizung durch Bestandteile der Formulierung hervorgerufen werden. Der unter anderem in Mastzellen, basophilen und eosinophilen

Granulozyten gespeicherte, endogene Mediator Histamin vermittelt über Histamin H_1 -Rezeptoren klassische Entzündungssymptome wie Rubor, Calor und Juckreiz. Eine Stimulation dieses Rezeptors durch einen transdermal applizierten Arzneistoff ließe starke lokale Irritationen erwarten, auch wenn dieser kein klassisches Allergen darstellt. Umgekehrt würde ein Wirkstoff mit einer H_1 -antagonistischen Wirkkomponente durch Blockade der Bindung des Histamins an diesen Rezeptor lokalen Hautreaktionen entgegenwirken und somit die Verträglichkeit des Transdermalsystems verbessern. Um abzuschätzen, ob bei der Verabreichung eines transdermalen Proterguridpflasters mit verstärkter Hautirritation in vivo gerechnet werden muss, wurde der Histamin H_1 -Rezeptor als Zielstruktur in die pharmakologischen Untersuchungen einbezogen.

Bei einer schweren, unerwünschten Arzneimittelwirkung, welche bei der Therapie mit bestimmten Ergolinderivaten in der Vergangenheit beobachtet worden ist, handelt es sich um fibrotische Veränderungen der Herzklappen. Diese, als auch Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte Inzidenz pulmonaler Hypertonien, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Stimulation kardialer $5-HT_{2B}$ -Rezeptoren zurückzuführen (Horowski et al., 2004). Eine gründliche Evaluierung der Aktivität von Protergurid an $5-HT_{2B}$ -Rezeptoren war somit von ausgesprochener Wichtigkeit und wurde deshalb im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen ebenfalls durchgeführt.

Sämtliche Daten sind als Mittelwert (Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) von $n \geq 3$ Versuchen an Geweben von mindestens zwei, in den meisten Fällen jedoch drei oder mehr Tieren angegeben. Konzentrations-Wirkungskurven ($E/[A]$ -Kurven) des jeweiligen physiologischen Agonisten wurden zur Kontrolle an mindestens einer Gewebeprobe jedes Tieres durchgeführt. Die statistische Auswertung der pharmakologischen Ergebnisse erfolgte mittels Student's t-Test ($\alpha \leq 5\%$), um signifikante Unterschiede in den Mittelwerten von pA_2 -Werten (negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration eines Antagonisten, welche eine Verdoppelung der Agonistenkonzentration erfordert, um den gleichen agonistischen Effekt zu erzielen), Maximaleffekten (E_{max} (%)) oder Halbmaximaleffekten (pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der molaren Agonistenkonzentrationen, welche einen halbmaximalen Effekt bewirkt) aufzuzeigen.

3.2 Aktivität von Protergurid an α_1 -Adrenozeptoren

3.2.1 α_1 -Adrenozeptoren

Adrenozeptoren gehören zu den transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Rhodopsin-Familie (Frederiksson et al., 2003) und werden von den physiologischen Monoaminen Adrenalin und Noradrenalin aktiviert. Diese Adrenozeptoren werden in α -Adrenozeptoren und β -Adrenozeptoren unterteilt. Die Untergruppe der α -Adrenozeptoren besteht wiederum aus den vorwiegend präsynaptisch lokalisierten α_2 -Adrenozeptoren und den postsynaptischen α_1 -Adrenozeptoren. Die α_1 -Adrenozeptoren, welche die Zielstrukturen in den vorliegenden Studien darstellten, werden klassifiziert in α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren, wobei weiterhin die Existenz eines α_{1L} -Rezeptors, einer gewebespezifischen Konformationsvariante des α_{1A} -Adrenozeptors, diskutiert wird.

Eine Stimulation von $G_{q/11}$ -gekoppelten α_1 -Adrenozeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zur Bildung von Diacylglycerol, welches die Proteinkinase C stimuliert, und Inositoltrisphosphat, welches die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern bewirkt (Docherty, 1998). Im menschlichen Organismus sind die α -Adrenozeptoren weit verbreitet, jedoch erfüllen sie ihre Funktionen insbesondere im zentralen Nervensystem und im Herzkreislaufsystem (Zhong und Minnemann, 1999). Eine Aktivierung führt zu einer Vasokonstriktion auch von dezentralen, kleinen Venen und Arterien und ließe demnach eine verringerte transdermale Bioverfügbarkeit erwarten.

3.2.2 Aktivität von Protergurid an $\alpha_{1A/B/D}$ -Adrenozeptoren

3.2.2.1 Aktivität von Protergurid an α_{1A} -Adrenozeptoren

Die experimentelle Bestimmung der Aktivität von Protergurid an α_{1A} -Adrenozeptoren wurde analog der von Jähnichen et al. (2004) beschriebenen Methode an der isolierten, vom Endothel befreiten Rattenschwanzarterie durchgeführt, wobei der in diesem Gewebe ebenfalls exprimierte α_{1B} -Adrenozeptor mittels Chlorethylclonidin irreversibel blockiert und somit inaktiviert wurde. Die kumulativen E/[A]-Kurven des physiologischen Agonisten

Noradrenalin in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid sind in Abbildung 52 dargestellt.

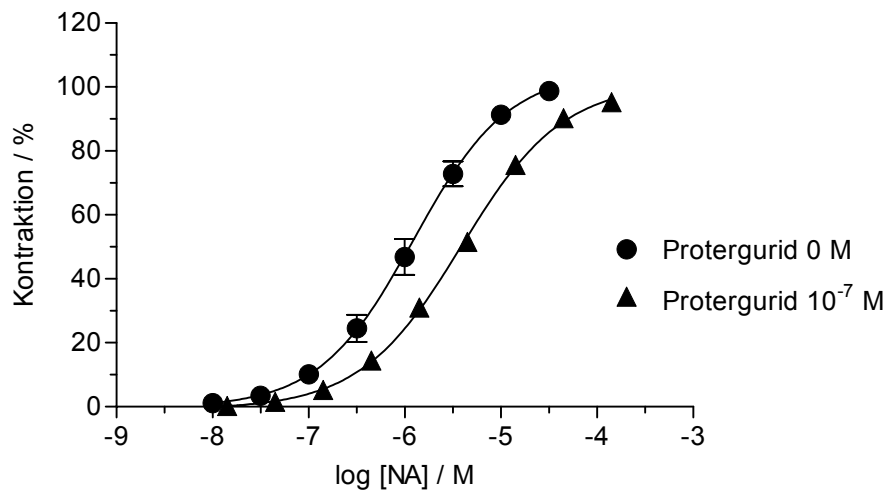


Abbildung 52: Kumulative E/[A]-Kurven von Noradrenalin (NA) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10^{-7} M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Noradrenalin an α_{1A} -Adrenozeptoren der isolierten Rattenschwanzarterie in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von $n = 6$ Versuchen von 3 Tieren).

Die Ergebnisse zeigen, dass Protergurid selbst, im Gegensatz zu Noradrenalin, keine Kontraktion der Rattenschwanzarterie induzierte. Eine Inkubation des Gewebes mit Protergurid (10^{-7} M) führte jedoch zu einer statistisch signifikanten, parallelen Rechtsverschiebung der kumulativen E/[A]-Kurve von Noradrenalin, ohne dass der maximale Effekt des Monoamins verringert wurde (pEC_{50} von Noradrenalin in Abwesenheit von Protergurid: 5,93 (0,10); pEC_{50} von Noradrenalin in Anwesenheit von Protergurid 10^{-7} M: 5,42 (0,05)). Dies lässt darauf schließen, dass Protergurid am α_{1A} -Adrenozeptor als voller Antagonist agierte. Der pA_2 -Wert wurde zu 7,31 (0,06) bestimmt.

3.2.2.2 Aktivität von Protergurid an α_{1B} -Adrenozeptoren

Eine Untersuchung des pharmakologischen Profils von Protergurid an α_{1B} -Adrenozeptoren erfolgte mit Hilfe eines von Eltze (1994) beschriebenen Modells der exzidierten

Meerschweinchenmilz. In Abbildung 53 sind die kumulativen E/[A]-Kurve von Noradrenalin in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid grafisch dargestellt.

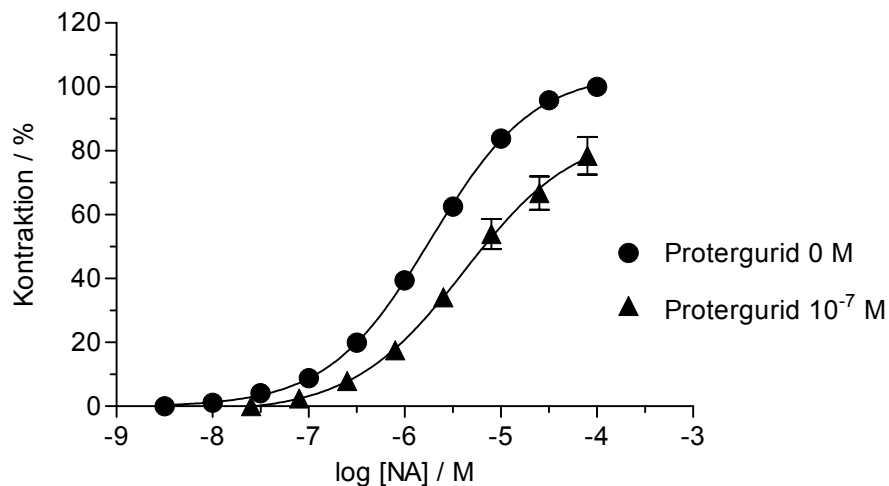


Abbildung 53: Kumulative E/[A]-Kurven von Noradrenalin (NA) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10^{-7} M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Noradrenalin an α_{1B} -Adrenozeptoren der isolierten Meerschweinchenmilz in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von $n = 6$ Versuchen von 3 Tieren).

Ähnlich wie am α_{1A} -Adrenozeptor der Rattenschwanzarterie zeigte Protergurid keinen agonistischen Effekt, bewirkte aber in der Testkonzentration von 10^{-7} M eine signifikante Rechtsverschiebung der E/[A]-Kurve von Noradrenalin (pEC_{50} von Noradrenalin in Abwesenheit von Protergurid: 5,73 (0,04); pEC_{50} von Noradrenalin in Anwesenheit von Protergurid 10^{-7} M: 5,38 (0,03)), welche mit einer geringfügigen, aber signifikanten Depression des Maximaleffektes einherging. Der maximale Effekt von Noradrenalin in Anwesenheit von Protergurid (10^{-7} M) betrug 78 (6)% des von Noradrenalin in Abwesenheit des Ergolinderivates induzierten, kontraktile Maximaleffektes. Protergurid konnte demnach auch am α_{1B} -Adrenozeptor der Meerschweinchenmilz als Antagonist charakterisiert werden. Der pA_2 -Wert von 7,37 (0,05) unterschied sich nicht signifikant von dem am α_{1A} -Adrenozeptor ermittelten Wert.

3.2.2.3 Aktivität von Protergurid an α_{1D} -Adrenozeptoren

Des weiteren wurde Protergurid auf sein pharmakologisches Profil an α_{1D} -Adrenozeptoren der isolierten Rattenaorta nach der Methode von Schöning et al. (2001) untersucht. Die kontraktile Effekte von Noradrenalin in Form kumulativer E/[A]-Kurven in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid sind in Abbildung 54 dargestellt.

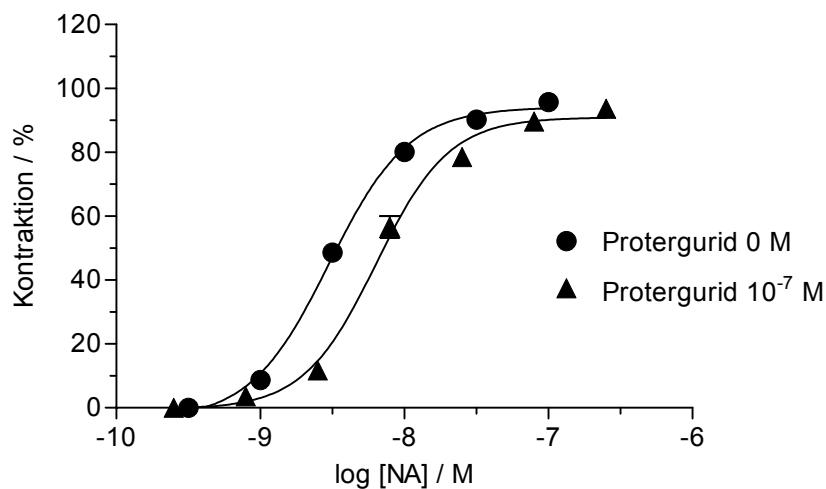


Abbildung 54: Kumulative E/[A]-Kurven von Noradrenalin (NA) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10^{-7} M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Noradrenalin an α_{1D} -Adrenozeptoren der isolierten Rattenaorta in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von mindestens $n = 3$ Versuchen von 2 Tieren).

Auch am α_{1D} -Adrenozeptor fungierte Protergurid als reiner Antagonist. Die kumulative E/[A]-Kurve von Noradrenalin wurde durch Inkubation des Gewebes mit dem Arzneistoff (10^{-7} M) signifikant nach rechts verschoben (pEC_{50} von Noradrenalin in Abwesenheit von Protergurid: 8,52 (0,03); pEC_{50} von Noradrenalin in Anwesenheit von Protergurid 10^{-7} M: 8,19 (0,03)). Der pA_2 -Wert von Protergurid betrug 7,35 (0,04).

3.2.2.4 Diskussion

Protergurid konnte an den α_1 -Adrenozeptorsubtypen (α_{1A} , α_{1B} und α_{1D}) als reiner Antagonist identifiziert werden. Die ermittelten pA_2 -Werte von Protergurid an den einzelnen

Subrezeptoren lagen alle im Bereich zwischen 7,3 und 7,4 und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dies deutet daraufhin, dass Protergurid zwar antagonistische Wirkungen zeigte, jedoch nicht in der Lage war, zwischen den einzelnen Subrezeptoren zu diskriminieren.

α_1 -Adrenozeptoren, welche unter anderem in arteriellen Hautgefäßen lokalisiert sind (Borbujo et al., 1989), induzieren nach Stimulation eine Vasokonstriktion. Die antagonistische Aktivität von Protergurid an α_1 -Adrenozeptoren würde in vivo einer durch Noradrenalin bzw. Adrenalin über α_1 -Adrenozeptoren vermittelten Gefäßengstellung entgegen wirken. Die pA_2 -Werte von 7,3 bis 7,4 wiesen zwar lediglich auf eine mittlere antagonistische Potenz von Protergurid an diesen Rezeptoren hin, jedoch ist zu beachten, dass nach Applikation einer transdermalen Arzneiform erhöhte lokale Konzentrationen des Arzneistoffs im Hautgewebe der Applikationsstelle auftreten können, so dass der antagonistische Effekt von Protergurid an α_1 -Adrenozeptoren durchaus zum Tragen kommen könnte. Dies würde die transdermale Bioverfügbarkeit von Protergurid positiv beeinflussen. Das Ausmaß der klinischen Relevanz ist anhand der hier dargestellten Ergebnisse jedoch nicht vorhersagbar.

3.3 Aktivität von Protergurid am Histamin H₁-Rezeptor

In diesem Experiment wurde die Wirkung von Protergurid an Histamin H₁-Rezeptoren an Segmenten des isolierten Dünndarms des Meerschweinchens unter Anwendung einer isotonischen Aufnahme der kontraktile Effekte des Kontrollagonisten Histamin untersucht. Die Methode wurde von Menghin et al. (2003) bereits beschrieben, jedoch wurden dem Medium zur Blockade von 5-HT_{2A}-Rezeptoren 10⁻⁷ M LY 53857 zugesetzt. Kumulative E/[A]-Kurven des physiologischen Agonisten Histamin wurden aufgezeichnet und der Einfluss einer Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Protergurid (10^{-7,5} M, 10⁻⁷ M) erfasst (Abbildung 55).

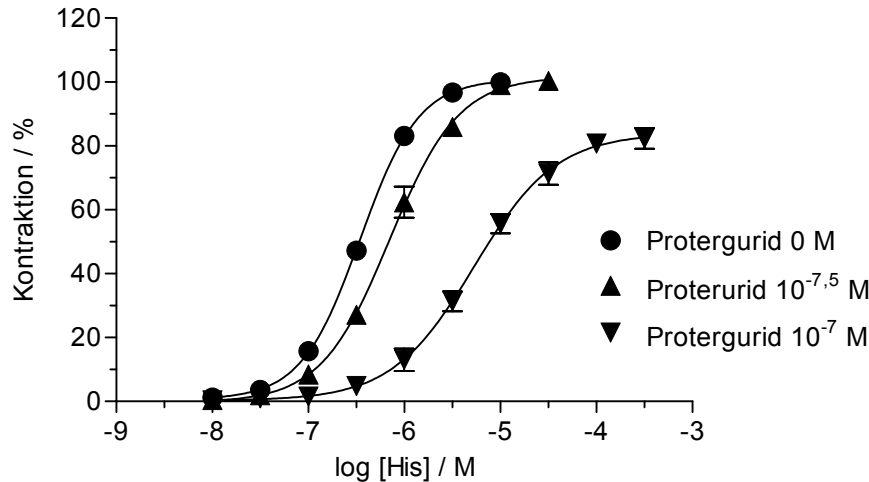


Abbildung 55: Kumulative E/[A]-Kurven von Histamin (His) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid ($10^{-7,5}$ M und 10^{-7} M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Histamin an H_1 -Rezeptoren des isolierten Meerschweinchenileums in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von $n = 4-12$ Versuchen von 2-3 Tieren).

Protergurid agierte als ein Antagonist des Histamins am H_1 -Rezeptor. Bereits eine Inkubation des Gewebes mit $10^{-7,5}$ M Protergurid führte zu einer signifikanten Verschiebung der kumulativen E/[A]-Kurve von Histamin nach rechts, ohne den Maximaleffekt des physiologischen Agonisten zu reduzieren (pEC_{50} von Histamin in Abwesenheit von Protergurid: 6,46 (0,02); pEC_{50} von Histamin in Anwesenheit von Protergurid $10^{-7,5}$ M: 6,16 (0,06)). Eine Erhöhung der Konzentration des 8α -Aminoergolins um eine halbe log-Einheit auf 10^{-7} M bewirkte eine weitere Verschiebung der Histamin-E/[A]-Kurve, welche in diesem Fall jedoch auch mit einer Depression des Maximaleffektes verknüpft war (E_{max} von Histamin in Gegenwart von Protergurid 10^{-7} M: 84 (5)%). Der Berechnung des pA_2 -Wertes wurden die E/[A]-Kurven zugrunde gelegt, bei welchen die erzielten histaminergen Effekte maximal waren. Der pA_2 -Wert konnte demnach mit 8,15 (0,03) angegeben werden.

Über den Histamin H_1 -Rezeptor, welcher auch durch Keratinozyten exprimiert wird, werden durch Stimulation entzündliche Reaktionen vermittelt (Giustizieri et al., 2004; Greaves et al., 1977). Eine agonistische Wirkkomponente eines transdermal zu applizierenden Arzneistoffs vermag demzufolge lokale Hautirritationen zu verstärken und wäre dementsprechend unerwünscht. Umgekehrt erklärt dies, dass dieser Rezeptor die Zielstruktur einer Vielzahl von dermalen und oralen Arzneistoffen ist, um die Symptomatik von Erythemen, Juckreiz oder

Rötung zu lindern. Protergurid zeigte in dem verwendeten Modell eine ausgeprägte antagonistische Wirkung am Histamin H₁-Rezeptor und lässt somit erwarten, dass, aufgrund hoher lokaler Arzneistoffkonzentrationen im Hautgewebe nach Applikation einer transdermalen Arzneiform, über den H₁-Rezeptor vermittelte, inflammatorische Reaktionen zumindest partiell antagonisiert werden.

3.4 Aktivität von Protergurid an 5-HT_{2A/2B}-Rezeptoren

3.4.1 Aktivität von Protergurid an 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Von den serotoninergeren 5-HT-Rezeptoren sind derzeit 14 Subtypen bei Säugetieren identifiziert worden, welche mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors G-Protein-gekoppelte Proteinstrukturen darstellen und in sieben Unterfamilien (5-HT₁ bis 5-HT₇) zusammengefasst werden. Der im zentralen Nervensystem weit verbreitete (Cornea-Herbert et al., 1999; Leysen, 2004), aber auch in nahezu allen Blutgefäßen lokalisierte 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt dort nach Stimulation eine Gefäßengstellung. Die Konstriktion kutaner Blutgefäße kann somit auch auf einer Aktivierung serotoninerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren beruhen, wie bei Kaninchen und Ratte bereits gezeigt worden ist (Blessing and Seaman, 2003).

Um agonistische und / oder antagonistische Effekte von Protergurid am 5-HT_{2A}-Rezeptor zu identifizieren, wurde das von Schöning et al. (2001) beschriebene Modell der isolierten Rattenschwanzarterie verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass Protergurid selbst agonistische Effekte an kontraktile 5-HT_{2A}-Rezeptoren aufwies (Abbildung 56). Der Maximaleffekt bezogen auf die maximale, durch Serotonin induzierte Kontraktion betrug 53 (2)%, jedoch war Protergurid etwa 20 mal potenter als der physiologische Agonist (pEC₅₀ von Protergurid: 8,34 (0,05); pEC₅₀ von Serotonin: 7,03 (0,14)). In einem Kontrollexperiment, bei welchem das Gewebe mit dem selektiven 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (10^{-8,5} M) präinkubiert wurde, resultierte eine signifikante Rechtsverschiebung der kumulativen E/[A]-Kurve von Protergurid (scheinbarer pA₂-Wert von Ketanserin: 9,17 (0,07)). Dies beweist, dass der durch Protergurid hervorgerufene kontraktile Effekt an Segmenten der isolierten Rattenschwanzarterie tatsächlich durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt wurde.

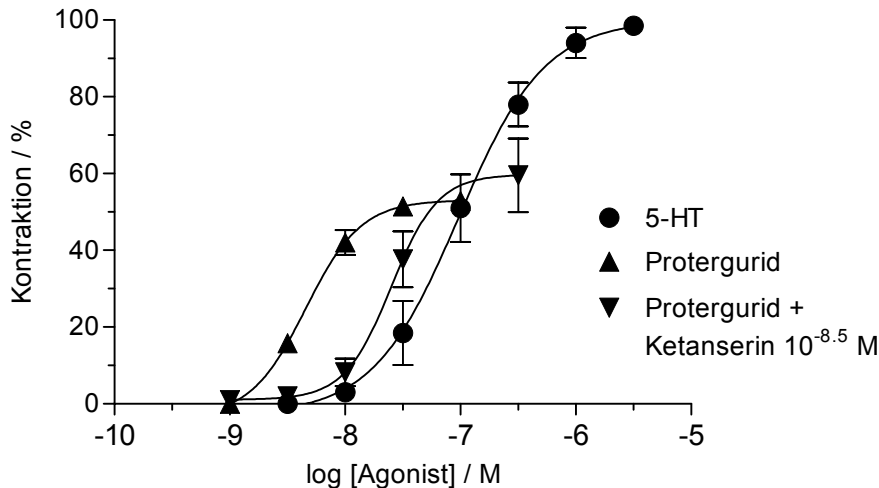


Abbildung 56: Kumulative E/[A]-Kurven von Serotonin (5-HT) und Protergurid in Abwesenheit und Anwesenheit des selektiven 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (10^{-8.5} M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte des Agonisten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der isolierten Rattenschwanzarterie in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von n = 3-4 Versuchen von 2-3 Tieren).

In einem weiteren Experiment galt es zu überprüfen, ob Protergurid den durch Serotonin induzierten kontraktile, über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelten Effekt antagonisiert. Die zu diesem Zweck generierten kumulativen E/[A]-Kurven von Serotonin in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10⁻⁸ M) sind in Abbildung 57 dargestellt.

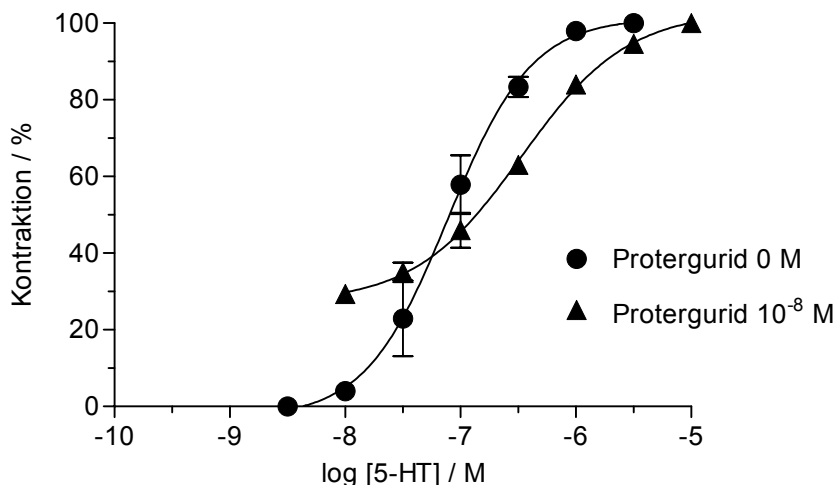


Abbildung 57: Kumulative E/[A]-Kurven von Serotonin (5-HT) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10⁻⁸ M). Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Serotonin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der isolierten Rattenschwanzarterie in %, bezogen auf eine erste E/[A]-Kurve (Mittelwert (SEM) von n = 3 Versuchen von 2 Tieren). Die E/[A]-Kurve von Serotonin in Gegenwart von Protergurid wurde mittels Strahlensatz zu 100% extrapoliert.

Die durch Protergurid induzierte Rechtsverschiebung der serotoninen E/[A]-Kurve veranschaulicht den antagonisierenden Effekt von Protergurid, welches somit als partieller Agonist / Antagonist charakterisiert werden konnte. Die Affinität des partiellen Agonisten Protergurid, ausgedrückt im pK_p -Wert, wurde nach der Methode von Marano und Kaumann (1976) zu 8,45 (0,14) bestimmt und war somit im Einklang mit dem ermittelten pEC_{50} -Wert (8,34 (0,05)). Vergleichsexperimente an kontraktilen 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie lieferten einen pK_p -Wert von 8,38 (0,13) (n = 5) und bestätigten die an der isolierten Rattenschwanzarterie abgeschätzte Gleichgewichtsdissoziationskonstante zwischen Protergurid und dem Rezeptor.

Wie gezeigt, vermochte Protergurid bereits in geringeren Konzentrationen als Serotonin die isolierte Rattenschwanzarterie über 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu kontrahieren. Dies könnte den α_1 -adrenolytischen Effekt auf die Gefäßstellung des dermalen Gewebes (vgl. Kapitel 3.2) antagonisieren und somit die transdermale Bioverfügbarkeit von Protergurid negativ beeinflussen. Zu beachten ist jedoch, dass der maximale Effekt, der durch Protergurid erzeugt werden konnte, nur der halb-maximalen, durch Serotonin induzierbaren Kontraktion entsprach. Eine Abschätzung der durch Protergurid über α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelten Beeinflussung der dermalen Gefäßstellung und damit der klinischen Relevanz bezüglich transdermaler Absorption ist anhand der hier präsentierten Daten nicht möglich. Aufschluss könnte jedoch die Bestimmung des Effektes von topisch in vivo applizierten Protergurid-haltigen Lösungen unterschiedlicher Konzentration auf die lokale Hautdurchblutung geben. Als Messverfahren wären die Plethysmographie, Infrarotmessungen, die Magnetresonanz-Angiographie mit z. B. Gadoliniumkomplexen oder die Messung des Venendurchmessers bzw. des Venendruckes der Handvene (Aellig, 1982) geeignet. Derartige Untersuchungen waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die durch Gabe von Lysergsäurediethylamid (LSD) hervorgerufenen halluzinogenen Wirkungen unter anderem auf einer Aktivierung zentraler 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Neocortex beruhen (Nichols, 2004). Möglicherweise auch aufgrund der ausgeprägten Affinität Protergurids zu dopaminergen Rezeptoren konnten nach Verabreichung des Arzneistoffs in therapeutischen Dosen, welche zu einer signifikanten Prolaktinsenkung führten, keine halluzinogenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen registriert werden (Hertzsch, 1984). Auch für die strukturverwandten Derivate Lisurid und Tergurid wurden keine LSD-typischen halluzinogenen Effekte beschrieben.

3.4.2 Aktivität von Protergurid an 5-HT_{2B}-Rezeptoren

Die pharmakologischen Eigenschaften von Protergurid am 5-HT_{2B}-Rezeptor waren, wie bereits erwähnt, von besonderem Interesse. Unter der dopaminergen Therapie mit Ergolinderivaten, insbesondere mit Cabergolin, Pergolid und Bromocriptin, wurden kardiale Valvulopathien als schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachtet (Agarwal et al., 2004; Horvath et al., 2004; Serratrice et al., 2002; van Camp et al., 2003 und 2004). Dass diese kardialen Valvulopathien als Folge von fibrotischen Veränderungen an Herzklappen, welche zu Insuffizienz und Stenosen führen können, über 5-HT_{2B}-Rezeptoren vermittelt werden, wird durch folgende Erkenntnisse gestützt:

- Die mit dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung in Verbindung gebrachten Ergolinderivate sind Agonisten am 5-HT_{2B}-Rezeptor (Newman-Tancredi et al., 2002; Rothman et al., 2000, Jähnichen et al., 2005), während für Lisurid, welches an diesem serotoninergen Rezeptor als Antagonist wirkt, kein einziger Fall von fibrotischen Gewebeeränderungen beschrieben wurde, der auf die Gabe des Arzneistoffs zurückzuführen war (Hofmann, 2005; Hofmann et al., eingereicht).
- Kardiale Valvulopathien sind eine bekannte Nebenwirkung der Appetitzügler Fenfluramin (bzw. dessen Metabolit Norfenfluramin) und Aminorex, aber auch des als Ecstasy bekannten Methylenedioxyamphetamins (MDMA). Diese Substanzen agieren ebenfalls als Agonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Fitzgerald et al., 2000; Rothman et al., 2000; Setola et al., 2003).
- Karzinoide Tumoren, welche hohe Mengen an Serotonin freisetzen, verursachen ebenfalls kardiale Valvulopathien (Simula et al., 2002).
- 5-HT_{2B}-Rezeptoren konnten an menschlichen Herzklappen und Pulmonalarterien gefunden werden (Launay et al., 2002).
- Stimulation von 5-HT_{2B}-Rezeptoren führt zu trophischen Effekten an humanen Fibroblasten (Setola et al., 2003).
- Chronische Stimulation von 5-HT_{2B}-Rezeptoren führt zu morphologisch-strukturellen Veränderungen (Launay et al., 2002).
- 5-HT_{2B}-Knock-out-Mäuse zeigen eine gestörte Herzfunktion (Nebigil et al., 2001).

Im folgenden galt es zu überprüfen, ob unter einer Therapie mit Protergurid mit über 5-HT_{2B}-Rezeptoren vermittelten kardialen Valvulopathien und / oder pulmonalen Hypertonien gerechnet werden muss. Unter diesem Aspekt wurde die Aktivität von Protergurid an relaxierenden 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie untersucht. Die ringförmigen Segmente der isolierten Schweinepulmonalarterie wurden mit Prostaglandin F_{2α} ($3 \cdot 10^{-6}$ M) kontrahiert, bevor kumulative E/[A]-Kurven von Serotonin generiert wurden. Da bestimmte Gewebe nur auf die erste zugeführte Konzentration eines Ergolins reagieren (Müller-Schweinitzer, 1990), konnten in Experimenten zur Untersuchung der agonistischen Aktivität von Protergurid keine kumulativen E/[A]-Kurven erzeugt werden. Außerdem können Ergoline aufgrund ihrer sehr langsamen Dissoziation vom Rezeptor nur schwer ausgewaschen werden und beeinflussen die rezeptorvermittelten Reaktionen dieses Gewebes nachhaltig. Aus diesen Gründen kam die „single point“-Technik zur Anwendung, bei welcher jeweils nur eine einzelne Konzentration von Protergurid pro Gewebeprobe getestet wurde. Die E/[A]-Kurven von Serotonin und Protergurid in Abwesenheit und Anwesenheit des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (10^{-6} M) sind in Abbildung 58 dargestellt.

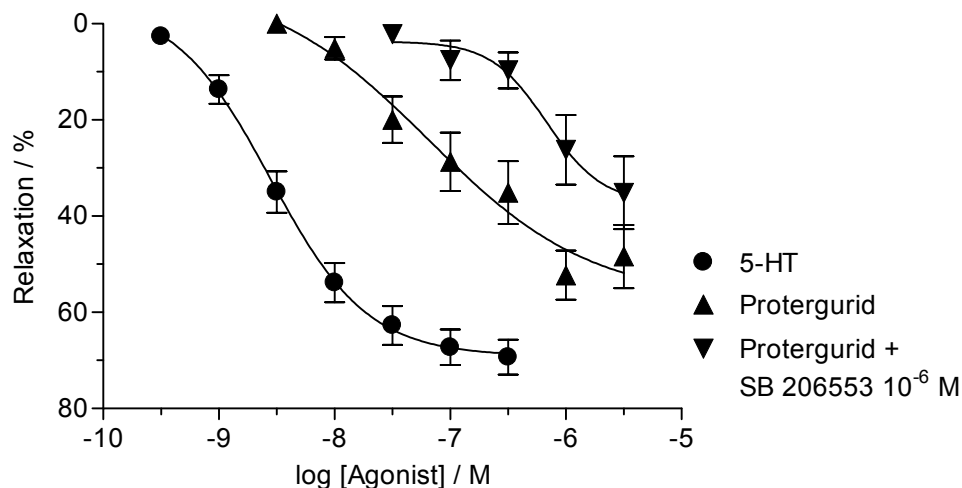


Abbildung 58: E/[A]-Kurven von Serotonin (5-HT) und Protergurid in Abwesenheit und Anwesenheit des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (10^{-6} M). Dargestellt sind die über 5-HT_{2B}-Rezeptoren vermittelten, relaxierenden Effekte des Agonisten an der mit Prostaglandin F_{2α} ($3 \cdot 10^{-6}$ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterie in %, bezogen auf die durch Prostaglandin F_{2α} ($3 \cdot 10^{-6}$ M) induzierte Kontraktion (Mittelwert (SEM) von n = 3-9 Versuchen von 2-6 Tieren).

Die durch Serotonin induzierte Relaxation der mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkontrahierten Schweinepulmonalarterie wurde zu 69 (3)% bestimmt. Protergurid zeigte ebenfalls einen agonistischen Effekt an diesem Gewebe, jedoch betrug der maximale relaxierende Effekt lediglich 49 (6)% und war somit signifikant geringer als die durch Serotonin hervorgerufene Relaxation. Der für Protergurid berechnete pEC_{50} -Wert betrug 7,13 (0,15) und veranschaulicht, dass Protergurid etwa um einen Faktor von 25 weniger potent war als Serotonin selbst (pEC_{50} von Serotonin: 8,52 (0,10)). Die durch Protergurid erzielte Relaxation des Gewebes konnte durch den selektiven 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (10^{-6} M) gehemmt werden, was in einer Rechtsverschiebung der E/[A]-Kurve von Protergurid resultierte. Der pA_2 -Wert von SB 206553 gegenüber Protergurid (pA_2 : 6,98 (0,19)) steht im Einklang mit dem gegenüber Serotonin (pA_2 : 7,23 (0,05); Glusa und Pertz, 2000) und bestätigt somit, dass die erfassten relaxierenden Effekte von Protergurid über den 5-HT_{2B}-Rezeptor vermittelt wurden.

In Anwesenheit von Protergurid (10^{-8} M) wurde die kumulative E/[A]-Kurve von Serotonin nach rechts verschoben (Abbildung 59). Dies war auf eine 5-HT_{2B}-antagonistische Wirkung des 8 α -Aminoergolinderivates zurückzuführen. Diese Rechtsverschiebung ging mit einer Depression des maximalen, durch Serotonin induzierbaren relaxierenden Effekts einher. Der pA_2 -Wert von Protergurid betrug 8,54 (0,25). Protergurid konnte somit als ein partieller Agonist / Antagonist am 5-HT_{2B}-Rezeptor klassifiziert werden.

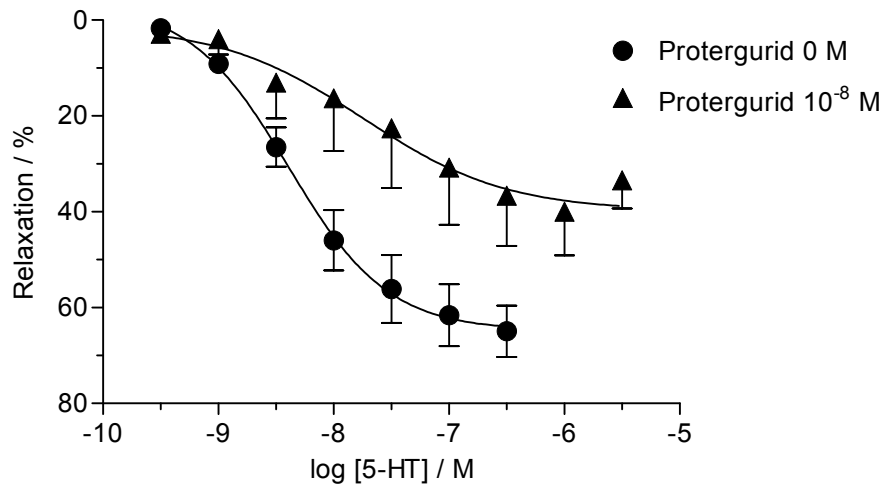


Abbildung 59: E/[A]-Kurven von Serotonin (5-HT) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (10^{-8} M). Dargestellt sind die über 5-HT_{2B} -Rezeptoren vermittelten, relaxierenden Effekte von Serotonin an der mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \cdot 10^{-6}$ M) vorkontrahierten Schweinepulmonalarterie in %, bezogen auf die durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \cdot 10^{-6}$ M) induzierte Kontraktion (Mittelwerte (SEM) von $n=4$ Versuchen von 2 Tieren).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Protergurid aufgrund einer agonistischen Wirkung die mittels Prostaglandin $F_{2\alpha}$ kontrahierte Schweinepulmonalarterie relaxierte. Interessant ist, dass bei Protergurid, im Gegensatz zu dem als reinen 5-HT_{2B} -Rezeptorantagonisten identifizierten Lisurid (Jähnichen et al., 2005), der Stickstoff in Position sechs des ErgolinGrundgerüsts mit einer Propylgruppe substituiert ist. Dies ist auch der Fall bei dem 5-HT_{2B} -Rezeptoragonisten Pergolid. Cabergolin, ebenfalls ein 5-HT_{2B} -Rezeptoragonist (Jähnichen et al., 2005), verfügt an dieser Position über eine Allylfunktion und weist somit einen der Propylgruppe in der räumlichen Struktur ähnlichen Rest auf. Diese Erkenntnisse geben Anlass zu der Annahme, dass die Substitution des ErgolinGrundgerüsts am N^6 die intrinsische Aktivität am 5-HT_{2B} -Rezeptor beeinflusst. Der partielle Dopaminagonist Tergurid (Transdihydrolisurid; Baronti et al., 1992; Wachtel und Dorow, 1983), welcher an dieser Position analog zu Lisurid eine Methylgruppe trägt, konnte von Jähnichen et al. (2005) ebenfalls als ein potenter Antagonist an pulmonalen 5-HT_{2B} -Rezeptoren des Schweins identifiziert werden. Tergurid unterscheidet sich von dem am 5-HT_{2B} -Rezeptor als schwachen Partialagonisten identifizierten Protergurid lediglich durch den Austausch der Propylgruppe durch eine Methylgruppe am N^6 , was den hier postulierten Zusammenhang zwischen Aktivität als Antagonist bzw. Agonist und N^6 -Substitution unterstützt. Die Strukturen wichtiger Ergoline in der dopaminergen Therapie des Morbus Parkinson bzw. der Hyperprolaktinämie

sind geordnet nach ihrer Aktivität an relaxierenden 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie in Abbildung 60 dargestellt.

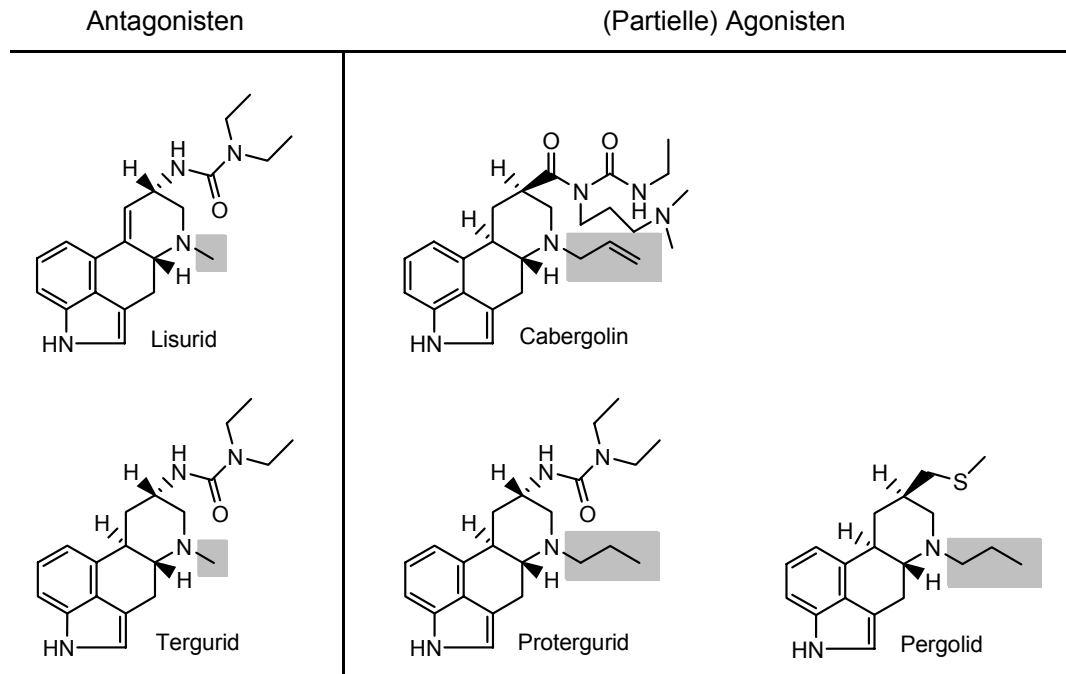


Abbildung 60: Strukturen von dopaminergen Ergolinpharmaka, eingeteilt nach Antagonisten und Agonisten an relaxierenden 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie. Grau unterlegt ist der Substituent am N⁶ des Ergolingrundgerüsts, welcher sehr wahrscheinlich entscheidend für das Vorliegen intrinsischer Aktivität ist. Cabergolin und Pergolid wurden als 5-HT_{2B}-Agonisten, Lisurid und Tergurid als reine 5-HT_{2B}-Antagonisten beschrieben (Jähnichen et al., 2005).

Von klinischem Interesse ist insbesondere, ob beim Menschen in vivo nach Verabreichung dopaminergischer Dosen von Protergurid Plasmakonzentrationen in ausreichender Höhe erzielt werden, um kardiale 5-HT_{2B}-Rezeptoren zu stimulieren und somit das Risiko von Wirkstoff-induzierten Valvulopathien prinzipiell gegeben ist. Wie von Hertzsch (1984) gezeigt, liegen dopaminerg wirksame Plasmakonzentrationen von Protergurid bei $< 50 \text{ pg/mL}$ ($< 1,35 \cdot 10^{-10} \text{ M}$). Die therapeutisch angestrebten Plasmakonzentrationen von Protergurid sind somit um einen Faktor von etwa 550 geringer als die Konzentration, welche an der Schweinepulmonalarterie den halbmaximalen relaxierenden Effekt hervorrief (pEC_{50} von Protergurid: 7,13 (0,15), entsprechend $\sim 7,4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$). Dennoch wäre bei einer klinischen Evaluierung von Protergurid eine gründliche echo-kardiographische Untersuchung der Herzklappen indiziert.

3.5 Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse

In Tabelle 29 sind die ermittelten pharmakologischen Parameter (E_{\max} -, pEC_{50} -, pA_2 - und pK_p -Werte) für Protergurid und die Kontrollagonisten abschließend zusammengefasst.

Tabelle 29: Übersicht über das pharmakologische Profil von Protergurid an nicht-dopaminergen Monoaminrezeptoren. Angegeben sind die Mittelwerte (SEM) von n Bestimmungen an mindestens zwei, in den meisten Fällen jedoch drei oder mehr Tieren.

	Agonistprofil		Antagonistprofil	
	n	pEC_{50}	n	pA_2
<i>α_{1A}-Rezeptor (Rattenschwanzarterie)</i>				
Noradrenalin	6	5.93 (0.10)	---	---
Protergurid	---	---	6	7.31 (0.06)
<i>α_{1B}-Rezeptor (Meerschweinchenmilz)</i>				
Noradrenalin	6	5.73 (0.04)	---	---
Protergurid	---	---	6	7.37 (0.05)
<i>α_{1D}-Rezeptor (Rattenaorta)</i>				
Noradrenalin	3	8.52 (0.03)	---	---
Protergurid	---	---	4	7.35 (0.04)
<i>H_1-Rezeptor (Meerschweinchenileum)</i>				
Histamin	12	6.46 (0.02)	---	---
Protergurid	---	---	6	8.15 (0.03)
<i>5-HT_{2A}-Rezeptor (Rattenschwanzarterie)</i>				
Serotonin	4	7.03 (0.14)	---	---
Protergurid	4	8.34 (0.05) 53 (2)% ^{b)}	3	8.45 (0.14) ^{a)}
<i>5-HT_{2B}-Rezeptor (Schweinepulmonalarterie)</i>				
Serotonin	9	8.52 (0.10) 69 (3)% ^{c)}	---	---
Protergurid	6 – 9 ^{d)}	7.13 (0.15) 49 (6)% ^{c)}	4	8.54 (0.25)

^a pK_p -Wert. ^b E_{\max} -Wert als %, bezogen auf den maximalen Effekt von Serotonin. ^c E_{\max} -Wert als %, bezogen auf die mit Prostaglandin F_{2 α} ($3 \cdot 10^{-6}$ M) induzierte Kontraktion. ^d Experimente wurden nach der „single point“-Technik durchgeführt.