

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Direktor Univ.- Prof. Dr. Michael Wendt)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Wirkung von Dopexamin an Herzkranzgefäßen des Schweines

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2009

vorgelegt von:
Ingrid Hackenberg,
geb. am 29.10.1967
in Freiberg

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo Kroemer

1. Gutachter: PD Dr. med. habil. Dragan Pavlovic

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Scheeren

Ort, Raum: Greifswald, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin, Friedrich- Löfflerstr. 23b, Seminarraum

Tag der Disputation: 06.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Entdeckung der Katecholamine	3
2.2	Physiologie adrenerger, noradrenerger und dopaminerger Systeme	4
2.2.1	Wirkungsweise von Katecholaminen	4
2.2.2	Katecholaminrezeptoren	6
2.2.3	Adrenorezeptoren in Koronararterien	8
2.3	Dopexamindihydrochlorid	10
2.3.1	Pharmakologische Eigenschaften von Dopexamin	11
2.3.2	Klinische Wirksamkeit von Dopexamin	12
2.4	Signaltransduktion in der glatten Muskulatur	15
2.4.1	Regulation der Kontraktion der glatten Muskelzelle	16
2.4.2	Kalziumhomöostase und Kontraktilität	16
3	HYPOTHESE	20
4	ZIEL DER STUDIE	20
5	MATERIAL UND METHODIK	21
5.1	Experimentelle Durchführung	21
5.1.1	Präparate	21
5.1.2	Versuchsaufbau	22
5.2	Verwendete Substanzen	24
5.3	Wahl des geeigneten Präkonstriktors	26
5.4	Planung	27
5.5	Datenanalyse	29
6.1	Vergleich der Wirkung von Dopexamin und Dopamin	30
6.2	Prüfung der Endothelabhängigkeit der Dopexaminwirkung	31
6.3	Einfluss von adrenergen und dopaminergeren Rezeptorantagonisten auf die Wirkung von Dopexamin	32
6.3.1	Blockade des α_1 -Rezeptors	32
6.3.2	Unspezifische β -Rezeptorblockade	32
6.3.3	Dopamin-1-Rezeptorblockade	33
6.4	Dopexamin unter Kaliumkanalblockade	34

6.5	Einfluss von Guanylatzyklase- und Proteinphosphataseinhibitoren auf die Dopexaminwirkung	35
6.5.1	Blockade mit Cantharidin	35
6.5.2	Blockade mit ODQ	36
6.6	Abhängigkeit der Dopexaminwirkung von der extrazellären Ca^{2+} -Konzentration	38
6.6.1	Einfluss von Ca^{2+} -Antagonisten	38
6.6.2	Wirkung von Dopexamin in Ca^{2+} -freiem extrazellulärem Milieu an vorkontrahierten und nicht vorkontrahierten Koronargefäßpräparaten ..	39
6.7	Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$	42
6.7.1	Vergleich der Vorkontraktion von $PGF_{2\alpha}$ und KCl	42
6.7.1.1	Dopexamin unter Vorkontraktion von $PGF_{2\alpha}$ bzw. KCl	42
6.7.1.2	Dopamin unter Vorkontraktion mit KCl bzw. $PGF_{2\alpha}$	43
6.7.2	Adrenerge und dopaminerge Rezeptorantagonisten	45
6.8	Vergleich frischer Arterienpräparate mit gekühlt gelagerten	46
7	DISKUSSION	48
8	ZUSAMMENFASSUNG	57
	LISTE DER ABKÜRZUNGEN	73
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	75
	LEBENS LAUF	
	DANKSAGUNG	

1 Einleitung

Zu Beginn der 90iger Jahre hielt das synthetische Katecholamin Dopexamin-dihydrochlorid (Dopexamin) Einzug in die therapeutischen Regimes zur Behandlung herzinsuffizienter Patienten auf Intensivstationen. Das Benefit bei Nutzung dieser Substanz lag in der geringeren Tachykardieneigung der mit Dopexamin behandelten Patienten im Vergleich mit anderen Katecholaminen. So löst zum Beispiel Dopamin bei gleichem positiv inotropen Effekt und gleicher peripherer Vasodilatation eine stärkere Steigerung der Herzfrequenz aus. Nachgewiesen wurde bei einer ausgeprägten beta-2-mimetischen und etwas schwächeren dopaminergen Wirkung nur eine geringe beta-1-mimetische Wirkung von Dopexamin, woraus sich der Vorteil für die geringere Herzfrequenzsteigerung ergeben könnte. Außerdem wird eine Noradrenalin-Reuptake-1-Hemmung als Wirkmechanismus beschrieben.

Die Vermutung, dass ebenfalls Vorteile bei der Durchblutung des Splanchnikusgebietes bei Patienten im septischen Schock gegenüber den bisher gebräuchlichen Katecholaminen zu verzeichnen sind, machte die Substanz zum Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte und Dopexamin fand auch routinemäßig Anwendung bei der Therapie der Sepsis. Bis heute stehen sich widersprüchliche Untersuchungsergebnisse bezüglich eines Vorteils der Dopexaminwirkung im Vergleich zu herkömmlichen Katecholaminen gegenüber, sodass dieses Medikament heute zurückhaltender eingesetzt wird. Insgesamt gehören Katecholamine bei der Behandlung der verschiedenen Formen des Kreislaufschokes zur Stabilisierung der Hämodynamik und Erhaltung der Organperfusion zur Standardtherapie. Jedoch können auch Nebenwirkungen nicht unbeachtet bleiben. Es gibt Studien, die über Angina pectoris, Tachykardien, ventrikuläre Arrhythmien und Übelkeit als Nebenwirkung der Dopexamintherapie berichten. Diese traten mit einer Häufigkeit von 2-5% auf (24).

Bisher existieren zahlreiche klinische und experimentelle Studien zur Wirkung von Dopexamin an unterschiedlichen Gefäßtypen des Herz-Kreislauf-Systems verschiedener Säugetierspezies und beim Menschen. Der direkte Wirkmechanismus an den Koronararterien war jedoch bisher nicht Gegenstand einer wissenschaftlichen Untersuchung.

So ist es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Dopexamindihydrochlorid an den Koronararterien zu untersuchen. Da die anatomischen Verhältnisse und physiologischen Regelmechanismen des Koronarsystemes des Schweins dem humanen im Vergleich zu anderen Säugetierspezies am ähnlichsten sind, wurden für die in vitro Experimente Koronararterien des juvenilen Schweins gewählt, um den Wirkmechanismus von Dopexamin zu demonstrieren (68; 88). Entsprechend der bisherigen Erkenntnisse über den für Koronararterien gefäßtypischen Katecholaminrezeptorbesatz und der aktuell nachgewiesenen spezifischen Rezeptorwirkung von Dopexamin an anderen Gefäßspezies wurden geeignete Rezeptorantagonisten für die in-vitro-Versuchsreihen ausgewählt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Entdeckung der Katecholamine

Katecholamine werden im Volksmund als „Stresshormone“ bezeichnet. Sie tragen die Verantwortung für eine erhöhte physiologische Leistungsbereitschaft des Individuums, um ungewohnte oder gefährliche Situationen bewältigen zu können. Sie steigern den Blutdruck, die Herzfrequenz, erhöhen die Muskelspannung, die Aufmerksamkeit wird geschärft, die Energiereserven werden mobilisiert.

Bereits Thomas Mann beschrieb die Wirkung dieser Hormone exzellent an der Romanfigur Hans Castorp im Zauberberg:

Er war totenbleich... Die Gefäßnervenleitung nach seinem Gesichte spielte mit dem Erfolg, das die entglutete Haut dieses jungen Gesichtes blaßkalt einfiel, die Nase spitz erschien und die Partie unter den Augen ganz so bleifarben wie bei einer Leiche aussah. Aber Hans Castorps Herz ließ der Sympathikus in einer Gangart trommeln, dass von geregelter Atmung überhaupt nicht mehr die Rede sein konnte und Schauer überliefen den jungen Menschen als Veranstaltung der Hautsalbendrüsen seines Körpers, die sich mitsamt ihren Haarbälgen aufrichteten (81).

1894 brachte der praktische Arzt G. Oliver dem Londoner Physiologieprofessor E.A. Schäfer ein Extrakt aus Nebennieren, der, so behauptete er, den Blutdruck steigerte. Schäfer war skeptisch. Er injizierte dem Versuchstier den Extrakt aber doch, „expecting a triumphant demonstration of nothing“, und das Quecksilber im Manometer stieg auf eine nie zuvor erreichte Höhe (77). Veröffentlicht wurde diese Entdeckung im Journal of Physiology 1895 (60). 1901, im Jahr der Veröffentlichung von Thomas Manns „Der Zauberberg“ isolierte der japanisch-amerikanische Chemiker Jokichi Takamine das Hormon Adrenalin (77).

Die Bezeichnung Katecholamin leitet sich von dem englischen Begriff „catechol“ für ortho-Dihydroxybenzol ab und ist Überbegriff für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Diese biogenen Amine sind Abkömmlinge der Aminosäure Tyrosin und wirken als Neurotransmitter bzw. Hormon. Bei der Biosynthese bildet Dopamin die Vorstufe für Noradrenalin und Adrenalin.

Im Wesentlichen bauen zwei Enzyme die Katecholamine ab, die Monoaminoxidase und die Katechol-O-Methyltransferase. Die Hauptendprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinmandelsäure (HVA) werden über den Harn ausgeschieden.

2.2 Physiologie adrenerger, noradrenerger und dopaminerger Systeme

2.2.1 Wirkungsweise von Katecholaminen

Über adrenerge, noradrenerge und dopaminerge Rezeptoren greifen die Katecholamine in feiner Balance in die dynamische Regulierung verschiedenster Steuerungssysteme ein, um den Organismus an die sich verändernde Außenwelt anzupassen. Neben zahlreichen zentralen Effekten wie z.B. Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Atmung und Regulierung des Triebverhaltens, entfalten sie an fast allen anderen Organen zumeist über Rezeptoren an der glatten Muskulatur bzw. durch Freisetzung verschiedener Hormone (z.B. Insulin, Glucagon) ihre Wirkung.

Eine wesentliche und heute bei den verschiedenen Schockformen therapeutisch genutzte Eigenschaft der Katecholamine und deren Rezeptorsysteme beinhaltet die Regulierung des Herzkreislaufsystems. Sie gehören neben weiteren endokrinologischen und autoreflektorischen Steuermechanismen zu den sehr komplexen Wirkungsmodulatoren bei der Balancierung der Herzkreislaufverhältnisse. Dies gelingt über eine feine Steuerung der Herzfrequenz, der Inotropie, der Vor- und Nachlastsenkung, durch Veränderung des Gefäßtonus und Konstanthaltung der Perfusion sensibler Organe wie Herz, Hirn und Niere.

2.2.2 Katecholaminrezeptoren

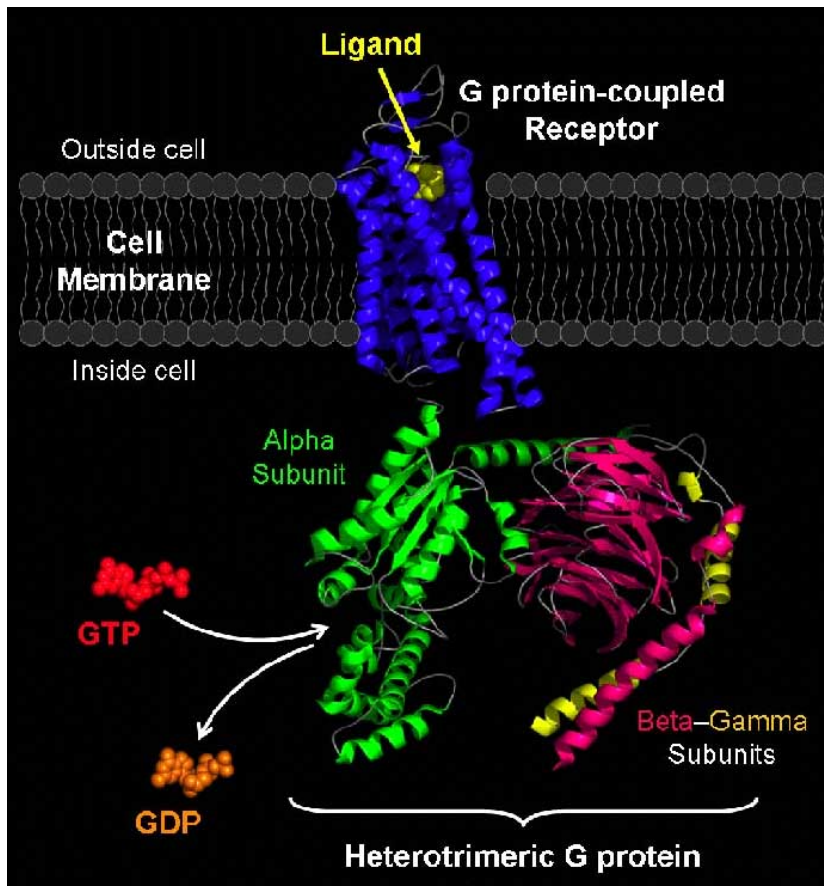


Abbildung 1: Röntgenstrukturanalyse eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR), mit freundlicher Genehmigung des Verlages (75)

Die Adrenorezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Architektur und Art der Signalübertragung in den vergangenen Jahrzehnten gut untersucht wurden.

Heute sind insgesamt 3 Familien von Adrenorezeptoren genetisch identifiziert:

- α_1 -Adrenorezeptoren (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} und α_{1L}) wurden vorwiegend an Blutgefäßen identifiziert,
- α_2 -Adrenorezeptoren (α_{2AD} , α_{2B} , α_{2C}) überwiegend an präsynaptischen Neuronen und

- β -Adrenorezeptoren (β_1 , β_2 , β_3 und β_4), in glatter Muskulatur und am Herzmuskel, β_3 - Rezeptoren in Fettzellen, Der pharmakologisch im Herz nachgewiesene " β_4 -Adrenorezeptor" wird derzeit nur als ein Affinitätszustand des β_1 -Subtyps angesehen.

Die Identifizierung und Lokalisierung von spezifischen Rezeptoren gelingt durch Hybridisierung und Bestimmung der mRNA, der Expressionsgrad wird durch Bindung von Radioliganden gemessen. Durch die Verfügbarkeit von transgenen Modellen ist schrittweise die Rolle der einzelnen Rezeptortypen bei der Regulierung des Blutdruckes und der Feineinstellung der Blutversorgung in den verschiedenen Organen verifiziert worden. Brodde und Michel gaben einen ausführlichen Überblick über die Regulierung von Kontraktilität, Chronotropie und Dromotropie mittels des differenzierten Katecholaminrezeptorbesatzes des Herzens (14). Bei den meisten Säugetieren ist die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur über α_1 -Adrenorezeptoren vermittelt, α_{2AD} -und α_{2C} -Rezeptoren regulieren die Transmitterfreisetzung (29).

1967 wurden erstmalig die β -Rezeptoren der peripheren Gefäße als Typ β_2 klassifiziert und damit eine Spezifizierung der Rezeptorsubtypen begonnen (42). Nach der Entwicklung von selektiveren Agonisten und Antagonisten zeigte sich, dass die Relaxierung der glatten Gefäßmuskelzellen entweder von β_1 - oder β_2 -Rezeptoren gesteuert wird, abhängig jedoch von Gefäßtyp und Säugetierspezies. Der überwiegend für die Gefäßdilataion verantwortliche Subtyp bleibt jedoch der β_2 -Rezeptor (59).

Dopamin wirkt überwiegend als Neurotransmitter im Zentralnervensystem an speziellen Dopaminrezeptoren D1 bis D5 im limbischen System im Bereich der Basalganglien. Bevorzugter Wirkort ist das Striatum. Gebildet wird Dopamin in der Substantia nigra und hat Anteil an der Steuerung der extrapyramidalen Motorik. Jedoch auch in der Peripherie, an der glatten Muskulatur von Nieren-, Herzkranz- und Darmblutgefäßen als auch Nierentubuli finden sich überwiegend D1-Rezeptoren, in geringerem Anteil auch D2-Rezeptoren (61; 86). An sympathischen Nervenendigungen, sympathischen Ganglien und der Nebenniere existieren ebenfalls D1- und D2-Rezeptoren.

Für alle Katecholamine ist eine agonistische Wirkung an den Adrenorezeptoren bewiesen, wobei Adrenalin der stärkste Agonist ist und in gleicher Intensität an α -

und β -Rezeptoren wirkt. Noradrenalin hat einen gleichstarken α -mimetischen Effekt bei schwächerer Wirkung an β_2 -Rezeptoren. Auch Dopamin besitzt neben der dopaminergen Aktivität zusätzlich einen agonistischen Effekt auf α - und β -Rezeptoren, der jedoch insgesamt schwächer ausgeprägt ist (Tabelle 1).

		Intrinsische Aktivität					
		β_1	β_2	α_1	α_2	DA ₁	DA ₂
Isoproterenol	reiner Agonist	+++	+++	0	0	0	0
Adrenalin	reiner Agonist	+++	+++	+++	+++	0	0
Noradrenalin	reiner Agonist	+++	+	+++	+++	0	0
Dopamin	partieller Agonist						
> 5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$		++	+	++	+	+++	+++
3-5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$		++	+	+	+	+++	+++
0,02-3 $\mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$		+	0	0	0	++	++
Dobutamin	partieller Agonist	++	++	+	0	0	0
Dopexamin	partieller Agonist	+	++	0	0	++	+

Tabelle1: Relative Wirkstärke einzelner Sympathikomimetika an Adrenorezeptoren (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) und Dopaminrezeptoren (DA₁, DA₂) (71)

2.2.3 Adrenorezeptoren in Koronararterien

In den bisher veröffentlichten Forschungsberichten sowohl tierexperimenteller Studien als auch bei Untersuchungen am Menschen wurden Unterschiede im koronaren Rezeptorbesatz der verschiedenen Säugetierspezies gefunden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, scheinen die Herzkranzgefäße des Hausschweins die größten Ähnlichkeiten mit denen des Menschen aufzuweisen (68; 88). In den Koronararterien scheinen α_1 -Adrenorezeptoren bei beiden Spezies nur in geringer Anzahl vorzuliegen (3). 1998 wurden von Yan et al. in der Koronararterie des Schweins α_{1A} -Rezeptoren funktional nachgewiesen, bei Koronararterien des Menschen gelang der Nachweis von mRNA von α_{1A} -

Rezeptoren, mit einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung in verschiedenen Abschnitten des Koronarsystems (66; 92). Die geringste Rezeptorzahl wurde in der rechten Koronararterie, die höchste Rezeptordichte im Ramus circumflexus gefunden. Die Dichte der α_1 -Rezeptoren erhöhte sich mit zunehmendem Alter.

Koronarangiographisch wiesen Baumgart et al. an sklerotischen Koronargefäßen des Menschen eine stärkere vasokonstringierende Reaktion nach α_1 -adrenerger Stimulation nach als an gesunden Gefäßen (8). In einer ähnlichen Arbeit reagierten gesunde epikardiale Koronargefäße des menschlichen Herzens nach Gabe eines Adrenergikums in der Koronarangiographie mit einer Lumenerweiterung als Hinweis auf vorhandene β_2 -Rezeptoren. Jedoch scheint bei atherosklerotischen Gefäßen eine Insuffizienz der β_2 -adrenergen Vasodilatation vorzuliegen, was zu einer erhöhten Inzidenz an Vasokonstriktion unter sympathikomimetischer Aktivierung führt (6). In Koronararterien des Kaninchens und des Schweins scheinen β_1 -Rezeptoren vorzuherrschen (32; 58; 89). Auch in den epikardialen Koronararterien des Menschen wurden β_1 -Adrenorezeptoren in vitro nachgewiesen. Sun et al. fanden in kleinen Herzkranzgefäßen und Arteriolen des menschlichen Herzens β_2 -Rezeptoren (79). Bockman et al. wiesen in epikardialen Koronararterien des Schweines α_{2A} - und α_{2C} - Rezeptoren im Bereich des Endothels nach (13).

1994 wurden Dopamin-1-Rezeptoren mittels der cAMP-Aktivität in Kaninchenkoronararterien nachgewiesen, allerdings war die Aktivität deutlich geringer als in den Nierenarterien derselben Spezies (86). Der immunhistochemische Nachweis von DA1-Rezeptoren im Gefäßsystem des Rattenherzens gelang zwei Jahre später (61).

2.3 Dopexamindihydrochlorid

Dopexamindihydrochlorid ist ein synthetisches Katecholamin mit struktureller Ähnlichkeit zu Dopamin, einem körpereigenen Transmitter mit vielfältigen Regulierungsfunktionen sowohl in neuronalen Synapsen des Zentralnervensystems als auch an glattmuskulärem Gewebe und am Herzen (Abb.3).

Die ersten tierexperimentellen Untersuchungen zu dieser Substanz wurden zu Beginn der 80iger Jahre durchgeführt. Im Mittelpunkt des Interesses stand eine therapeutische Wirkung bei der schweren Herzinsuffizienz.

Dopexamindihydrochlorid trägt die chemische Bezeichnung 4-{2-[6-(n-2-phenylethylamino)hexylamino]-ethyl}-1,2-benzendiol-dihydrochlorid und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit dem gebräuchlichen Begriff Dopexamin bezeichnet.

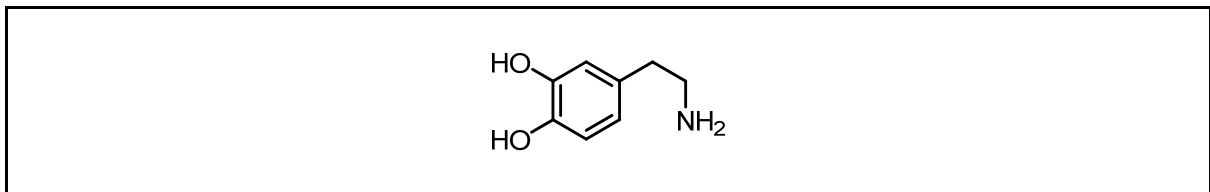


Abbildung 2: Strukturformel von Dopamin

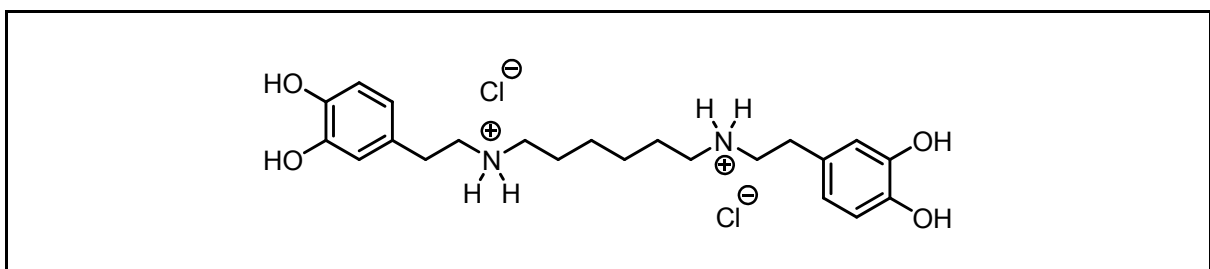


Abbildung 3: Strukturformel von Dopexamindihydrochlorid

2.3.1 Pharmakologische Eigenschaften von Dopexamin

Aufgrund seiner agonistischen Wirkung an β_2 - und DA_1 -Rezeptoren bewirkt Dopexamin eine systemische und regionale Vasodilatation. Nachgewiesen wurde diese Wirkung am arteriellen Gefäßbett des Hepato-Splanchnikusgebietes, der Niere und der pulmonalen Strombahn 1988 von Smith und O'Connor beim anästhesierten Hund (74).

Eine positive Wirkung auf die Nierendurchblutung und eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate wurde ebenfalls durch tierexperimentelle Studien belegt (47; 73). Bass konnte jedoch keine durch diese Substanz induzierte Vasodilatation der Nierenarterien nach Vasokonstriktion durch nervale Stimulation finden (7).

In autoradiographischen Studien an Ratten wurde nachgewiesen, dass Dopexamin hauptsächlich an DA_1 -Rezeptoren der proximalen Nierentubuli bindet, an β_2 -Rezeptoren im Glomerulum sowie an DA_1 -Rezeptoren in den kleinen und großen Blutgefäßen der Nieren (61; 85; 86; 91). In einer Untersuchung an Patienten nach Operation von koronaren Bypässen war die Steigerung des renalen Blutflusses hauptsächlich auf die β_2 -Aktivität von Dopexamin zurückzuführen (78).

Ebenfalls eine radiographische Studie bestätigte die Aktivierung von DA_1 - und β_2 -Rezeptoren der mesenterialen Gefäße durch einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration mit nachfolgender Vasodilatation (2). Biro et al. verwendeten eine Mikrosphärentechnik zur Beurteilung der Durchblutungsverteilung bei Hunden und stellten eine signifikante Durchblutungssteigerung in Magen, Jejunum und Ileum durch Dopexamin fest (12). Im Vergleich dazu bewirkt Dopamin eine frühe Vasokonstriktion in der Art. mesenterica superior, der Art. mesenterica inferior, der Milzarterie, der Art. hepatica communis und den beiden Nierenarterien infolge einer Stimulation der α_1 -Rezeptoren (39).

Weiterhin wird für Dopexamin eine indirekte Stimulation von α_1 -Rezeptoren über eine Hemmung der aktiven neuronalen Wiederaufnahme von Noradrenalin (Reuptake-1-Hemmer) beschrieben (29; 48). Sowohl Dopamin als auch Dopexamin sind schwache direkte Agonisten des atrialen β_1 -Rezeptors des

Herzens des Guinea-Schweins, jedoch besitzt Dopexamin nur eine intrinsische Aktivität von 0,16 im Vergleich zu Dopamin (15). Dopexamin hat außerdem eine schwach agonistische Wirkung auf präjunctionale DA₂-Rezeptoren (15). Im Vergleich zu Dopamin besitzt Dopexamin ungefähr ein Drittel der Wirkungsstärke an den vaskulären DA₁-Rezeptoren, zeigt jedoch eine zirka sechzigfach stärkere Wirkung an β_2 -Rezeptoren an der glatten Trachealmuskulatur des Guinea-Schweins. Keine stimulierende Aktivität besitzt Dopexamin an den postjunctionalen α_1 - und α_2 -Rezeptoren der isolierten Vena saphena des Kaninchens, Dopamin jedoch zeigt agonistische Wirkung, wenn auch 120fach geringer als Noradrenalin (15).

Es existiert eine Untersuchung, die darauf hinweist, dass Dopexamin ebenfalls eine direkte Wirkung an Ionenkanälen glattmuskulärer Zellen des arteriellen Gefäßsystems besitzt (45). So genannte Kaliumkanalaktivatoren öffnen die Kaliumkanäle der Zellmembran. Dadurch wird der Kaliumausstrom aus der Zelle initiiert, der dem Kaliumgradienten entgegengesetzt ist und eine Hyperpolarisation zur Folge hat. Eine Vasorelaxation tritt ein. Insgesamt sind in der Literatur vier verschiedene Typen von Kaliumkanälen an der arteriellen Gefäßmuskulatur beschrieben, spannungsabhängige, Ca²⁺-aktivierte, ATP-sensitive und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (55). Dopexamin öffnet die Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle und wirkt über diesen Mechanismus vasodilatierend (45). Die physiologische Rolle der unterschiedlichen Kaliumkanäle in verschiedensten neuroendokrinen und muskulären Geweben ist mannigfaltig. Im arteriellen als auch venösem Gefäßsystem tragen sie zur Regulierung des Gefäßwandtonus bei, wobei die besondere Bedeutung in der antiischämischen und hypotensiven Gefäßweitstellung durch zahlreiche endogene als Kaliumkanalöffner wirkende Substanzen liegt (19).

2.3.2 Klinische Wirksamkeit von Dopexamin

Über die Nachlastsenkung und eine leichte positive inotrope Stimulation des Herzens bewirkt Dopexamin einen Anstieg des Herzminutenvolumens und der Sauerstoffversorgung. Aufgrund der geringen β_1 -Wirkung sollte der chronotrope und arrhythmogene Effekt bei Dopexamin nur mäßig ausgeprägt sein. In

Dosierungen höher als $4 \mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$ führt aber auch Dopexamin zur Tachykardie, vermutlich reflektorisch als Folge der Vasodilatation. Aufgrund seiner primären β_2 -adrenergen Wirkung kann sein Einsatz auch bei den Formen der Herzinsuffizienz, die mit einer Down-Regulation von β_1 -Adrenorezeptoren einhergehen, noch günstige Effekte entfalten.

In einer neueren klinischen Untersuchung aus dem Jahr 2007 brachte Dopexamin jedoch gegenüber Dobutamin keine Vorteile bei der Behandlung des Cardiac Low Output Syndromes bezüglich der hämodynamischen Parameter, der Urinproduktion und des Outcomes (22).

Die möglichen durchblutungsfördernden Eigenschaften im Bereich des Splanchnikusgebietes ließen das Interesse an Dopexamin in Bezug auf neue therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung der gastrointestinalen Mikrozirkulationsstörung in der Sepsis steigen. Bei induzierter Endotoxämie beim Schwein wiesen Germann et al. eine durch Dopamin- und Dopexamininfusion verbesserte Mucosadurchblutung im Vergleich zu Dobutamin nach (28). In einer klinischen Studie an Patienten einer chirurgischen Intensivstation konnte ein verbesserter gastral Blutfluss durch Dopexamin/Noradrenalin gegenüber Adrenalin festgestellt werden (72).

Beim beatmeten Hund konnte Dopexamin, nicht jedoch Dopamin die Oxygenierung der gastralen Mucosa verbessern (70). Im septischen Schockmodell durch Lipopolysaccharidinfusion in Wistar-Ratten steigerte eine Dopexamininfusion von $0,5 \mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$ den intestinalen mikrovaskulären Blutfluss und die funktionelle Kapillardichte der zirkulären und der Längsmuskulatur des Intestinums. Gleichzeitig sank die Zahl der adhärenenten Leukozyten, welche einen Marker für Inflammation darstellen (11).

Ebenfalls einen positiven Effekt in der Behandlung septischer Patienten zeigten Birnbaum et al. in einer Steigerung der PDR unter kontinuierlicher Dopexamin-perfusion als Zeichen verbesserter Leberperfusion (10). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte eine klinische Studie an 34 Patienten nach Operation koronarer Bypässe (4).

Ebenfalls immunmodulatorische Effekte wie eine gesteigerte Apoptose von Splenozyten und eine Normalverteilung der zirkulierenden Lymphozyten wurden beobachtet, jedoch ohne Einfluss auf die Mortalität (56; 57).

In zahlreichen Arbeiten wurde jedoch auch dargestellt, dass die verbesserte Durchblutung nicht mit einer Erhöhung der Sauerstoffaufnahme begleitet war (25; 33; 37; 43). So sind die bisherigen Ergebnisse der Erforschung eines möglichen Benefits in Hinsicht auf die Sauerstoffaufnahme der Darmmucosa bei der Behandlung des septischen Schockes mit Dopexamin nicht eindeutig (37).

Als Nebenwirkung wurde eine reversible Abnahme der Zahl von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten beobachtet. Eine für β -Agonisten spezifische, temporäre Sequestration der Thrombozyten in die Milz wird dabei diskutiert (62).

In einer klinischen Studie an septischen Patienten konnte kein Vorteil unter Dopexamin bezüglich Nierenfunktion, Magen-Darm-Funktion und Überlebensrate eruiert werden (65).

In einer 2008 veröffentlichten Metaanalyse über den perioperativen Einsatz von Dopexamin bei großen chirurgischen Eingriffen konnte eine signifikante Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes der Patienten festgestellt werden aber insgesamt kein Überlebensbenefit. Lediglich bei niedriger Dopexamin dosierung von $\leq 1 \mu\text{g}/(\text{kg}\times\text{min})$ sank die 28-Tage-Mortalität (63).

Bei Patienten, die sich einer koronaren Bypass-Operation unterzogen, konnte unter niedrig dosiertem Dopexamin die Kreatinin-Clearance angehoben und ein Marker (IL6) für eine systemische Inflammation gesenkt, nicht aber die Sauerstoffaufnahme im Splanchnikusgebiet gesteigert werden (9). Unter der partiellen Herz-Lungenmaschine verabreichtes Dopexamin verhinderte eine Konstriktion der Arteriolen im Bereich des terminalen Ileum beim Landraceschwein (67).

Der zerebrale Blutfluss bei gesunden Probanden wurde weder durch Ephedrin noch durch Dobutamin oder Dopexamin geändert. Insgesamt scheint Dopexamin, wie auch die anderen Katecholamine keinen Einfluss auf die zerebrovaskuläre Homöostase zu nehmen (49).

Als Kontraindikation für die Therapie mit Dopexamin gelten bisher Thrombozytopenie, Phäochromozytom, chronisch obstruktive Kardiomyopathie und Aortenklappenstenose (36).

2.4 Signaltransduktion in der glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur ist für die Kontraktibilität von Hohlorganen wie Blutgefäßen, Darm, Blase oder Uterus verantwortlich. Die dabei ablaufenden Mechanismen unterscheiden sich deutlich von denen des Herz- und Skelettmuskels. Durch die glatte Muskulatur wird eine langsame, anhaltende tonische Kontraktion hervorgerufen, während der Herzmuskel schnell und kurzzeitig nur für wenige hundert Millisekunden kontrahiert. Die glatte Muskelzelle enthält Aktin und Myosin, jedoch nicht in typischer Streifung wie im Herzmuskel. Außerdem besitzt sie kein regulatorisches Troponin, dafür jedoch zwei Filamentproteine, Caldesmon und Calponin. Die Muskelfibrillen sind im Gegensatz zur Skelettmuskulatur (10-100 µm) mit 2-10 µm kleiner. Man unterscheidet single-unit und multi-unit Muskeln. Die single-unit Muskeln werden über autonome Schrittmacherregionen spontan, gleichzeitig und rhythmisch kontrahiert. Die multi-unit Muskelfibrillen werden durch das autonome Nervensystem sympathisch und parasympathisch kontrolliert (5; 34).

Insgesamt steht zur Steuerung des Tonus der glatten Muskulatur ein vielfach vernetzter Regelkreis von aktivierenden und inhibierenden intrazellulären Signalen zur Verfügung. Zahlreiche extrazelluläre Signale wirken auf diesen Regelkreis ein. Eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur kann durch mechanische, elektrische und chemische Stimuli hervorgerufen werden. Passive Dehnung generiert eine Kontraktion, die von der glatten Muskulatur selbst ausgelöst und myogene Reaktion genannt wird. Elektrische Depolarisation der Zellmembranen über die im Folgenden näher beschriebenen Kalziumkanäle erzeugt über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die glattmuskuläre Kontraktion. Ein weiterer Reaktionsweg, der eine Muskelkontraktion hervorruft, ist von einer Änderung des Membranpotentials unabhängig. Er wird durch eine Aktivierung von Membranrezeptoren durch Transmitter, Hormone oder Medikamente eingeleitet. Noradrenalin, Thromboxan A_2 , Vasopressin, Angiotensin II und Prostaglandine gehören zum Beispiel zu den körpereigenen Substanzen. Sie bewirken eine Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasmatischen

Retikulum (SR) und nehmen damit auf den Gefäßtonus Einfluss. Ein Teil dieser Substanzen wird vom gefäßeigenen Endothel synthetisiert (64).

2.4.1 Regulation der Kontraktion der glatten Muskelzelle

Eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Kontraktion spielen Phosphorylierung und Dephosphorylierung der regulatorischen Leichtketten des Myosin (rMLC). Katalysiert werden diese Reaktionen von der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) und der Typ-1-Myosinphosphatase (MLCP). Das Ausmaß der rMLC-Phosphorylierung und demzufolge die Kontraktionsstärke hängt von der Balance der Aktivität von MLCK und MLCP ab. Für die Aktivierung der MLCK ist ein Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex verantwortlich (5). Jedoch ist die Beziehung zwischen Kontraktionsstärke, rMLC und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht immer eindeutig, da sowohl an der MLCK und der MLCP verschiedene auch vom intrazellulären Kalziumspiegel unabhängige Signalkaskaden greifen (64).

2.4.2 Kalziumhomöostase und Kontraktilität

Der freie intrazelluläre Kalziumspiegel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist der Hauptfaktor für die Kontraktilität der glatten Muskelzelle und Initiator der Kontraktion. Er wird auch als Second Messenger bezeichnet. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration übersteigt die intrazelluläre um das Zehntausendfache. Bei einer Kontraktion wird der intrazelluläre Kalziumspiegel entweder über einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder über eine Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern wie dem Sarkoplasmatischen Retikulum erhöht.

In Gestalt eines ausgedehnten Netzwerkes innerhalb der Muskelzelle mit räumlicher Nähe zur Zellwand gilt das SR als der größte intrazelluläre Kalziumspeicher und verfügt über Mechanismen zur Aufnahme und gezielten Freisetzung des Ions. Spezielle Ca^{2+} -ATPasen, bekannt als SERCA-Pumpen erhalten den ungefähr 1000-fachen Ca^{2+} -Gradienten zwischen SR und dem Zytoplasma und somit den niedrigen intrazellulären Kalziumspiegel. Mitochondrien

verschiedener Zelltypen sollen bei der $[Ca^{2+}]_i$ -Homoöstase der glatten Muskelzelle eine Rolle spielen (69).

Die Freisetzung des Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum modulieren verschiedene Signaltransduktionsmechanismen. Von großer Bedeutung ist der Ryanodinrezeptor mit seinen drei Subtypen und der IP₃-Rezeptor mit so genannten kalziuminduzierten kalziumfreisetzenden Kanälen. So aktivieren Noradrenalin via α_1 -Rezeptoren, Angiotensin II via ATII-Rezeptoren und Endothelin-1 via ETA-Rezeptoren die Phospholipase C. Phospholipase C katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositol-2-phosphat zu Inositoltriphosphat (IP₃) (Abb.4). Diese Rezeptoren werden durch Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} aktiviert, bei zu hoher Konzentration jedoch wieder gehemmt.

Der Kalziumeinstrom über die Zellmembran wird über Ca^{2+} -sensitive Kanäle oder über nichtselektive Ionenkanäle geleitet, die spannungsabhängig oder -unabhängig sein können. In glatten Muskelzellen wurden bisher Ca^{2+} -sensitive spannungsabhängige L-Typ (long lasting) and T-Typ (transient) Kanäle gefunden. Eine Depolarisation der Zellmembran ruft eine Aktivierung des L-Typ-Kanals hervor.

Die Kalziumhomöostase in der Zelle wird durch ATP-abhängige Kalziumpumpen in der Plasmamembran (PMCA) und Na^+/Ca^{2+} Austauscher, die das Ca^{2+} zurück in das SR oder in den Extrazellularraum transportieren, aufrechterhalten (Abb.4).

In den Zellmembranen der Koronararterien des Schweins wurden überwiegend L-Typ Kalziumkanäle nachgewiesen (27).

Das Ca^{2+} bindet an das zytosolische Protein Calmodulin (CaM). Der Ca^{2+} -CaM-Komplex aktiviert die Myosinleichtkettenkinase, ein Enzym, das in Anwesenheit von ATP die Phosphorylierung der Myosinleichtketten katalysiert. 20 kD- Myosinleichtketten sind regulierende Untereinheiten an den Myosinköpfen. Auf diese Weise wird der Querbrückenzyklus in Gang gesetzt.

Valles-Rodriguez et al. zeigten, dass über Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle auch ohne extrazellulären Kalziumeinstrom in arteriellen Muskelzellen eine Ca^{2+} -Freisetzung erfolgen kann (84).

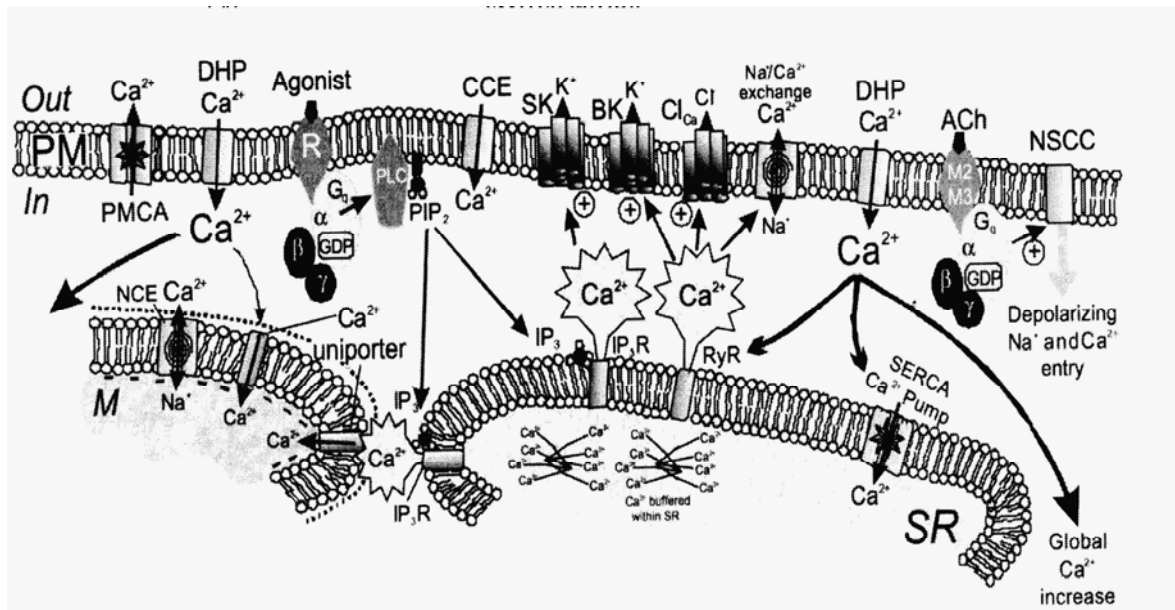


Abbildung 4: Hauptwege des Kalziumtransportes in der Zelle und der intrazellulären Freisetzung (69, mit freundlicher Genehmigung des Verlages),

5 Kompartimente, die für die Ca^{2+} -Signaltransduktion in der glatten Muskulatur relevant sind.

1) extrazelluläre Lösung, 2) Region zwischen sarkoplasmatischem Retikulum (SR) und Plasmamembran, 3) SR, 4) Mitochondrium und 5) allgemein Zytoplasma

DHP (Dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels), NSCC (agonist activated nonselective cation channels), CCE (capacitative Ca^{2+} entry channels), SERCA (sarcoendoplasmatic reticulum Ca^{2+} - ATPase), SR und Mitochondrien als Ca^{2+} - Zwischenspeicher, NCE ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher) halten die Kalziumhomöostase in den Mitochondrien aufrecht, R (G-Protein gekoppelter Rezeptor) als Bindungsstelle für zahlreiche Agonisten, Aktivierung von Inositol-triphosphate (IP_3) über Phospholipase C, IP_3 bindet an SR und setzt Ca^{2+} frei durch Aktivierung von IP_3R (IP_3 - Rezeptor) und RyR (Ryanodinrezeptor), das freigesetzte Kalzium kann in der subsarcolemmalen Region die kalziumsensitiven spannungsabhängigen L-Typ (BK) und T-Typ (SK) Kaliumkanäle und den Ca^{2+} sensitiven Cl^- Kanal (Cl_{Ca}) aktivieren.

Die Informationsübertragung zur Freisetzung von Kalzium aus dem SR beginnt über eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ein bestimmter Rezeptor bedient dabei überwiegend ein oder zwei bestimmte G-Proteine. Zum Beispiel aktivieren β -Rezeptoren Gs -, α_2 -Rezeptoren ein G-Protein der Gi -Familie.

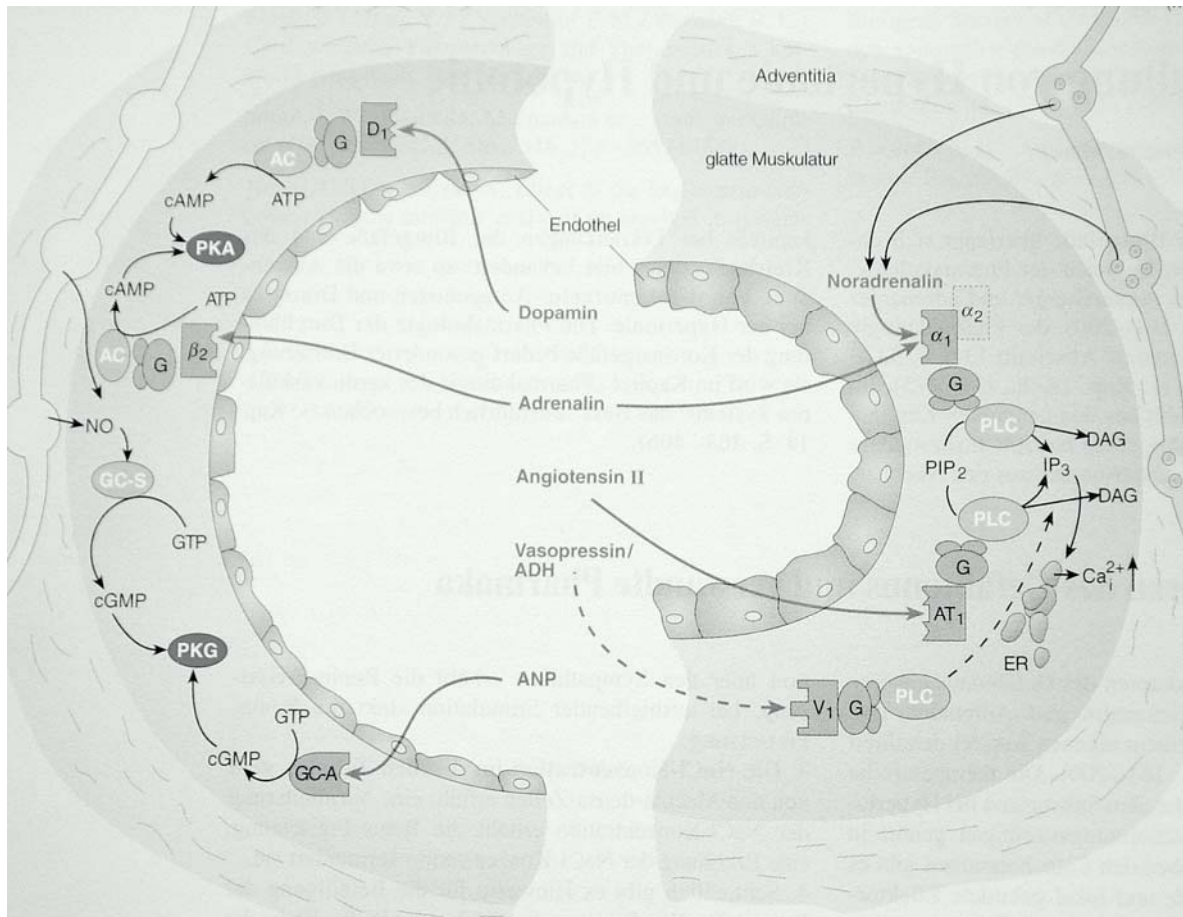


Abbildung 5: wichtige neuronale und humorale Effektorsysteme, die den peripheren Gefäßtonus regulieren (77, mit freundlicher Genehmigung des Verlages)

linke Bildseite: Vasodilatation

- 1) Dopamin, AC (Adenylatzyklase), ATP (Adenosintriphosphat), cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), PKA (Proteinkinase A), 2) Adrenalin, β_2 -Rezeptoren, AC, cAMP, PKA 3.) ANP (atrialess natriuretisches Peptid), PKG (Proteinkinase G), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat), GC-A (Guanylatzyklase A: membrangebundene Isoform),
- 4) NO (Stickstoffmonoxid), GC-S (lösliche Guanylatzyklase), GTP, cGMP, PKG

rechte Bildseite: Vasokonstriktion

- 1) Adrenalin, Noradrenalin, α_1 -Rezeptoren, PLC (Phospholipase C) aktiviert PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat), setzt Kalzium aus ER (endoplasmatisches Retikulum) frei, DAG (Diacylglycerol) 2) Konstriktion via AT₁ (Angiotensin1)-Rezeptor und via V₁ (Vasopressin 1)-Rezeptor

Abkürzungen (mit G sind allgemein die verschiedenen Rezeptorproteine bezeichnet ohne auf die besondere Spezifizierung näher einzugehen).

3 Hypothese

Nachgewiesen ist, dass Dopexamin als synthetisches Katecholamin über eine Vielzahl von Rezeptoren den Tonus der glatten Muskulatur beeinflusst. Folglich wirkt diese Substanz auch auf den Kontraktilitätszustand von Koronararterien des Schweineherzens.

4 Ziel der Studie

Einerseits sollte die Wirkung von Dopexamin auf den von Rezeptorantagonisten unbeeinflussten Basaltonus der Schweinekoronararterien untersucht werden und mit der Wirkung von Dopamin unter den gleichen Bedingungen verglichen werden. Um eventuelle Einflüsse des präkonstringierenden Agens auf die Versuchsergebnisse zu erkennen, wurden zwei verschiedene Präkonstriktoren miteinander verglichen. Eine endotheliale Beteiligung bei der Dopexaminwirkung sollte untersucht werden.

Andererseits war es Ziel der Studie, durch den Einsatz der spezifischen Katecholaminrezeptorantagonisten rezeptorspezifische Wirkungen von Dopexamin darzustellen.

Durch Veränderung der Kalziumhomöostase und dem Zusatz von Kalziumrezeptorantagonisten sollte eine mögliche Kalziumabhängigkeit der Dopexaminwirkung dargestellt werden. Unter Verwendung von Substanzen, die auf intrazellulärer Ebene den Kontraktilitätszustand glatter Muskulatur beeinflussen, wurden mögliche intrazelluläre Reaktionswege des Dopexamines untersucht.

5 Material und Methodik

5.1 Experimentelle Durchführung

Es existieren verschiedene Methoden, um die Wirkung von Pharmaka auf das Gefäßsystem zu untersuchen. Für quantitative Messungen von Substanz-Rezeptor-Interaktionen hat sich seit Jahrzehnten die Methode der in-vitro-Myographie durchgesetzt. Unter gut kontrollierbaren experimentellen Bedingungen und mit Gewebepräparaten, die einen Großteil ihrer funktionalen Integrität und ihre Vitalität bewahren, können gut validierte Ergebnisse erreicht werden.

Wir wählten für unser Experiment die Methode der in-vitro-Myographie, um über isometrische Spannungsänderung ringförmiger Gefäßpräparate von Schweinekoronararterien die Kontraktilitätsänderung der glatten Muskulatur mittels Transducer zu messen.

5.1.1 Präparate

Die Untersuchungen wurden an Koronararterien von Hausschweinen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Schlachttiere waren zirka 7-10 Monate alt und 110-120 kg schwer. Unmittelbar nach der Schlachtung wurde der Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Herzkranzarterie mit den Begleitvenen und dem periarteriellen Fett- und Bindegewebe grob freipräpariert und in gekühlter Krebs-Henseleit-Lösung ins Labor transportiert (Abb. 6). Dort erfolgte dann die vorsichtige Entfernung des begleitenden Fett- und Bindegewebes und der intravasalen Thromben unter mikroskopischer Sicht. Aus dem mittleren Anteil des Ramus interventricularis anterior wurden 8 Ringe von 2 mm Länge mit einem Durchmesser von 1-2 mm präpariert (Abb.7). Bei allen Vorbereitungen wurden die Blutgefäße in einer Petrischale ständig von Krebslösung umspült. Die präparierten Arterien wurden entweder sofort dem Experiment zugeführt oder für

24 Stunden gekühlt bei 6 °C in Krebs-Henseleit-Lösung aufbewahrt, da nicht an jedem Tag frische Schweineherzen vom Schlachthof zu Verfügung gestellt werden konnten.



Abbildung 6: Schweineherz

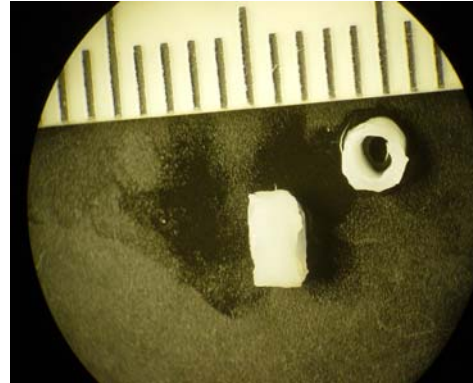


Abbildung 7: Arterienringe
des RIVA

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, Arterien als perfundierte Arterien oder als vorkontrahierte Arterienringe zu untersuchen. Der Unterschied in beiden Versuchsanordnungen besteht in der fehlenden myogenen Spontanaktivität bei nicht perfundierten Arterienringen in isometrischen Versuchsanordnungen. Bei der letzteren Methode werden bei einer eingestellten Vordehnung Veränderungen der Zugspannung auf unterschiedliche Stimuli gemessen. Die Arterienringe werden mit Kaliumchloridlösung (KCl) oder Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) vorkontrahiert um intravitale Bedingungen herzustellen (s. 5.2.1).

5.1.2 Versuchsaufbau

Um die Dosis-Wirkungsbeziehung von Dopexamin auf die Koronararterienringe festzustellen, wurden diese zwischen zwei dünnen Stahlbügeln des Messwertaufnehmers (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) eingehängt (Abb.8). Dieser Apparat ist mit einem Papieraufnehmer (GOULD AT 550, Cleveland, OH, USA) verbunden. Die Papiervorschubgeschwindigkeit beträgt 1mm/min. Die isometrische Spannungsänderung des Muskelgewebes wird über Transducer in einen mechanischen Ausschlag des Schreibers umgewandelt.

Anschließend wurden die Arterienringe in einem 20 ml fassenden Organbad aus Krebs-Henseleit-Lösung suspendiert. Diese Badlösung wurde auf 37 °C temperiert und von einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ durchströmt. Der pH-Wert der Lösung wurde 7,4 gehalten und durch intermittierende Messungen von pH-Wert, pCO₂ und pO₂ kontrolliert (Blut-Gas-Analysegerät ABL 330, Radiometer, Hamburg, Deutschland). In der einstündigen Äquilibrationsphase stellten wir durch häufiges Nachjustieren eine Ruhespannung von 19,6 mN (2g) ein. Aus Gründen der Vereinfachung wurde in den Protokollen die Spannungsänderung in Gramm (g) angegeben (Umrechnungsfaktor: 9,81). Die Badlösung wurde in Abständen von 20 Minuten erneuert. Jedem Organbad wurde am Ende der Äquilibrationsphase Ascorbinsäure in einer Konzentration von 0,1mM als Antioxidans zugesetzt.

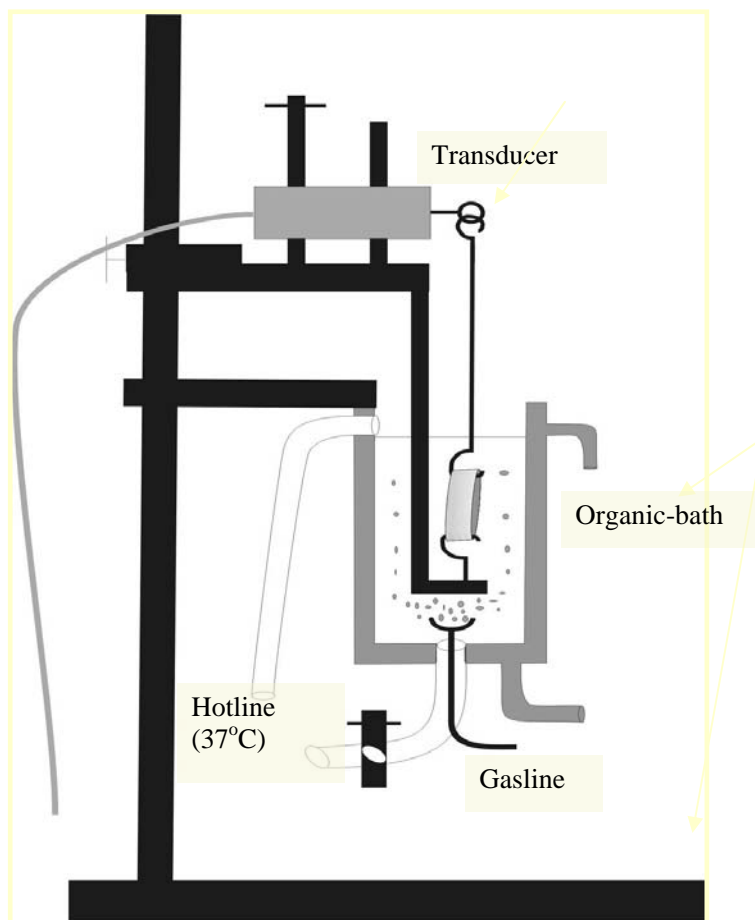


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prinzips der in-vitro-Myographie, eingespannter Gefäßring

Nach Erreichen der stabilen Ruhespannung wurden zum Organbad entsprechend KCl (20mM) beziehungsweise $\text{PGF}_{2\alpha}$ (5 μM) appliziert. Für die Versuchsreihe in kalziumfreiem Milieu wurden die Präparate bereits vom Schlachthof in kalziumfreier Krebs-Henseleit-Lösung transportiert und während des gesamten Vorbereitungs- und Untersuchungsprozesses wurde kalziumfreie Lösung verwendet.

Zur Entfernung des Endothels in einer Versuchsreihe wurden die Ringe über eine mit Baumwollfaden umwickelte Kanüle gezogen und auf glatter Unterlage, umspült von Krebs-Henseleit-Lösung vorsichtig mehrfach hin- und hergerollt. Durch diese vielfach in der Literatur beschriebene Methode wird das Endothel mechanisch von den Präparaten entfernt. Nachgewiesen wird die Endothelfreiheit durch Zugabe von 10 μM Carbachol. Bei intaktem Endothel führt dieser Agonist an muskarinergen Rezeptoren über eine endothelabhängige NO-Freisetzung zu einer Relaxation des Gefäßmuskels. Gefäße mit zerstörtem Endothel zeigen nach Zugabe von Carbachol keine Relaxation mehr.

Nachdem die Kontraktion der Arterienringe mit KCl beziehungsweise mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ein stabiles Plateau erreicht hatte, wurden die verschiedenen rezeptorblockierenden Substanzen den Organbädern zugesetzt. Die Dosierungen dieser Substanzen erfolgte in Anlehnung an zahlreiche in der Literatur beschriebene Experimente mit ähnlichen Fragestellungen (45; 52; 53; 54). Nach einer Ruhephase von 30 min wurden Dopexamin bzw. Dopamin kumulativ in steigender Dosierung in mindestens zehnminütigem Intervall zugegeben, bzw. wenn sich ein stabiles Wirkungsplateau eingestellt hatte. Die vorherige Ruhephase gestattete es, eine mögliche Eigenwirkung der Antagonisten auf das Präparat zu erkennen.

5.2 Verwendete Substanzen

Dopexamindihydrochlorid, Dopaminhydrochlorid, Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), Kaliumchlorid,

Katecholaminrezeptorantagonisten: DL-Propranololhydrochlorid, Prazosinhydrochlorid, 7-Chlor-3-methyl-1-phenyl-1,2,4,5-tetrahydro-3-benzazepin-8-ol (SCH23390),

Proteinphosphataseinhibitor: Cantharidin,
 Guanylatzyklaseinhibitor: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on (ODQ),
 Kalziumkanalblocker: (±)-Verapamilhydrochlorid,
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ascorbinsäure,
 Kaliumkanalblocker: Glibenclamid, Charybdotoxin, 4-Aminopyridin (4-AMP),
 Tetraethylammonium (TEA)

Alle Substanzen stammen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH München.

Die Pharmaka wurden überwiegend in Aqua dest. gelöst. Die Stammlösung von Prazosin wurde mit Methanol hergestellt, PGF_{2α} wurde in Ethanol gelöst, Glibenclamid in DMSO. Die weiteren Verdünnungen der Stammlösung erfolgten jeweils mit Aqua dest.

Substanz	Konzentration (mM)	Molare Masse	Konzentration (g/l)
NaCl	113,0	58,44	6,604
KCl	4,8	74,55	0,358
MgSO ₄	1,3	120,40	0,157
KH ₂ PO ₄	1,2	136,10	0,163
NaHCO ₃	25	84,10	2,100
CaCl ₂	2,5	111,01	0,278
Glucose	5,7	180,20	1,027

Tabelle 2: Modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung

Der kalziumfreien Variante der Krebs-Henseleit-Lösung wurde EDTA 0,5mM 30 min vor Versuchsbeginn zugegeben, um aus dem Intrazellularraum ausgetretene Kalziumionen zu binden.

5.3 Wahl des geeigneten Präkonstriktors

Um einen geeigneten Präkonstriktor zu finden, wurden vor Beginn der Versuchsreihen verschiedene Substanzen getestet, die im Zusammenhang mit in-vitro Experimenten an verschiedenen Gefäßtypen bisher Verwendung fanden.

Phenylephrin ist ein starker selektiver α_1 -Agonist und wurde bereits bei verschiedenen Gefäßtypen als Präkonstriktor eingesetzt. An den Schweinekoronararterien löste Phenylephrin in Konzentrationen bis 0,1mM keine Kontraktion aus. Dies ist möglicherweise auf den sehr geringen Rezeptorbesatz mit α_1 -Rezeptoren zurückzuführen.

Sowohl durch Histamin (1 μ M) als auch 5-Hydroxytryptamin (0,1 μ M) kontrahierten die Koronarpräparate initial nur kurzzeitig, um darauf wieder zu erschlaffen. Zurückzuführen sind diese Beobachtungsergebnisse wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Histamin- und 5HT-Rezeptorenbesatz der Muskelzellen und des Endothels mit differierender kontraktile oder dilatierende Wirkung (23).

KCl (20mM) und PGF_{2 α} (5 μ M) erwiesen sich als geeignete Präkonstruktoren mit stabiler kontraktile Plateauphase. Im weiteren Text werden die molaren Konzentrationen dieser Substanzen nur noch angegeben, wenn sie in einer veränderten Konzentration eingesetzt wurden.

Die Verwendung von Kaliumchloridlösung als Präkonstriktor bei in-vitro-Versuchen ist eine weit verbreitete Methode. Dabei wird über die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration und einer daraus folgender Änderung des Ionengradienten eine Depolarisation an der Zellmembran hervorgerufen. Aufgebaut wird das Ruhemembranpotential an der Zellmembran durch die ungleiche Ionenverteilung von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ zwischen Extra- und Intrazellularraum und liegt zwischen -40mV und -55mV. Im EZR beträgt die Kaliumkonzentration 4,5 mmol/l, im IZR 160 mmol/l. Das Gleichgewichtspotential

für K^+ liegt bei -85mV , das für Cl^- bei ca. 31mV . Durch Zugabe von K^+ -Ionen kommt es entlang des elektrischen Gradienten zu einem Kaliumtransport in die Zelle mit nachfolgender Depolarisation. Diese Depolarisation aktiviert die spannungsabhängigen Kalziumkanäle und führt zu einer Vasokonstriktion. Diese Vasokonstriktion wird als Vorspannung der glatten Muskulatur für weitere Messungen der Spannungsänderung nach Zusatz vasotonusverändernder Pharmaka genutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Wechselwirkungen mit spezifischen Rezeptoren vorliegen.

$PGF_{2\alpha}$ bewirkt eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur über verschiedene Reaktionswege. Zum Teil wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über rezeptorgesteuerte Ca^{2+} - Kanäle eine Kontraktion ausgelöst. Jedoch existiert auch ein von der intrazellulären Änderung der Kalziumionenkonzentration unabhängiger Mechanismus, der eine Kontraktion auslöst. Dieser führt über die Aktivierung und Translokation der Ca^{2+} -unabhängigen ϵ -Proteinkinase C (20; 38).

5.4 Planung

Für die Experimente wurden Koronararterienringe des Ramus interventricularis anterior benutzt wie unter 5.1.2 beschrieben. 6–8 Wiederholungen pro Experiment wurden durchgeführt. Die Änderung der Kontraktilität der vitalen Präparate unter Zugabe von Dopexamin allein oder mit vasoaktiven Rezeptoragonisten/ Antagonisten sollten geprüft werden.

Erste Versuchsreihe: (Präkontraktion mit 20mM KCl)

- 1 Dopexamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen
- 2 Dopexamin und α -Blocker (Prazosin)
- 3 Dopexamin und β -Blocker (Propranolol)
- 4 Dopexamin und Dopaminantagonist (SCH23390)
- 5 Dopexamin nach Entfernung des Gefäßendothels
- 6 Dopamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen

Zweite Versuchsreihe: Zusatz von Kaliumkanalblockern (Präkontraktion mit 20mM KCl)

- 1 Dopexamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen
- 2 Dopexamin und Glibenclamid
- 3 Dopexamin und Tetraethylammonium
- 4 Dopexamin und 4-Aminopyridin
- 5 Dopexamin und Charybdotoxin

Dritte Versuchsreihe: Veränderung des extrazellulären Kalziummilieus bzw. Zusatz von Guanylatzyklase- und Proteinphosphataseinhibitor

- 1 Dopexamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen
- 2 Dopexamin und Kalziumantagonist (Verapamil)
- 3 Dopexamin und kalziumfreie Extrazellularflüssigkeit
- 4 Dopexamin und kalziumfreie Extrazellularflüssigkeit (ohne Vorspannung mit 20mM KCl)
- 5 Dopexamin und Guanylatzyklaseinhibitor (Cantharidin)
- 6 Dopexamin und Proteinphosphataseinhibitor (ODQ)

Vierte Versuchsreihe: Katecholaminrezeptorantagonisten (Vorkontraktion mit 5 μ M PF_{2 α})

- 1 Dopexamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen
- 2 Dopexamin und α -Blocker (Prazosin)
- 3 Dopexamin und β -Blocker (Propranolol)
- 4 Dopexamin und Dopaminantagonist (SCH23390)
- 5 Dopamin ohne Zusatz vasoaktiver Substanzen

Um einen möglichen Vitalitätsverlust der für 24 Stunden gekühlten Präparate festzustellen, wurde das Experiment 1 der ersten Versuchsreihe zum Vergleich herangezogen. Dabei wurden die Ergebnisse von je 3 - 4 Untersuchungen an gelagerten Arterien (für 24 Stunden gekühlt bei Kühlschranktemperatur von 6°C)

mit den Ergebnissen an frisch verwendeten Gefäßpräparaten (innerhalb von 2 Stunden nach Herauslösen aus dem Schweineherzen) verglichen.

5.5 Datenanalyse

Die Messergebnisse werden als Absolutwerte in Gramm (g) oder als Prozentsatz zur Vorkontraktion dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der Gesamtzahl n der Messwerte \pm Standardabweichung (SEM) aufgezeigt. Die Konzentrationen, welche einen halbmaximalen Effekt erzielen (EC_{50}) wurden unter Nutzung nichtlinearer Regressionskurven mit Hilfe der Hill-Langmuir-Gleichung ermittelt. EC_{50} wird als Mittelwert des negativen dekadischen Logarithmus in Mol ($-\log M$) angegeben. Die statistischen Analysen erfolgten mit mittels der Varianzanalyse und dem students-t-Test für gepaarte beziehungsweise ungepaarte Daten, abgestimmt auf mehrfache Vergleiche (Bonfferoni). Für alle Untersuchungen wurde das Signifikanzniveau bei $P < 0,05$ festgelegt.

Für alle statistischen Untersuchungen wurde das Statistikpaket GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) verwendet.

6 Ergebnisse

6.1 Vergleich der Wirkung von Dopexamin und Dopamin

Wir verglichen die Wirkung von Dopexamin und Dopamin an mit KCl vorkontrahierten Präparaten. Aufsteigende Konzentrationen (1nM–1mM) von Dopamin führten zu einer Relaxation der Arterienringe, wogegen Dopexamin bei steigender Konzentration eine Kontraktion verursachte.

Im Bereich niedriger Konzentrationen (<1 μ M) zeigte sich sowohl bei Dopexamin als auch bei Dopamin keine Änderung der Wandspannung der Arterienringe. Die beiden Katecholamine riefen ab einer Konzentration von 0,1 μ M je eine entgegengesetzte Wirkung am in-vitro-Präparat der Schweinekoronararterie hervor

(Abb.9-1).

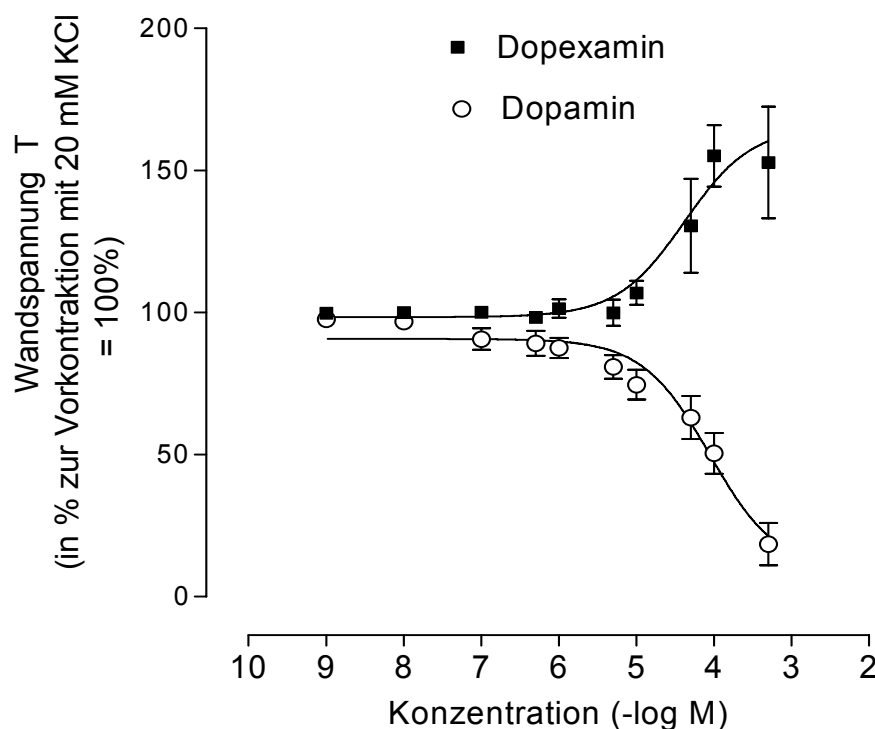


Abbildung 9-1: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von Dopexamin (■ n = 7) und Dopamin (○ n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

6.2 Prüfung der Endothelabhängigkeit der Dopexaminwirkung

Nach Entfernung des Endothels zeigte sich weiterhin eine dopexamininduzierte Kontraktion, mit einer geringen, wenn auch signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Das bedeutet, die kontraktilitätssteigernden Eigenschaften werden nicht über Wirkung am Endothel hervorgerufen. Eine Verstärkung derselben über endotheliale Mechanismen ist jedoch möglich (Abb. 9-2).

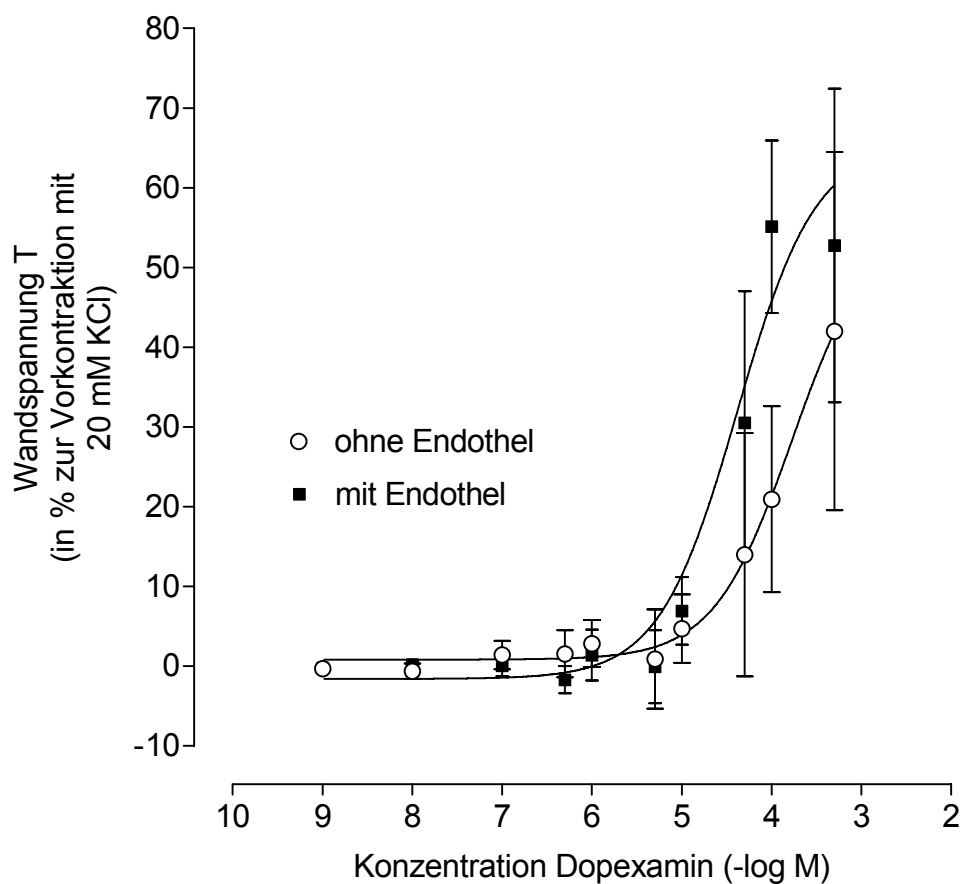


Abbildung 9-2: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5–7 Experimenten.

(■ mit Endothel, $n = 7$; $EC_{50} = 4,38 \pm 0,23$) (○ ohne Endothel, $n = 5$;

$EC_{50} = 3,78 \pm 0,38$) $P = 0,0002$

6.3 Einfluss von adrenergen und dopaminergen Rezeptorantagonisten auf die Wirkung von Dopexamin

6.3.1 Blockade des α_1 -Rezeptors

Nach Inkubation mit dem an α_1 -Rezeptoren wirkenden Antagonisten Prazosin (10 μ M) verzögerte sich die konzentrationsabhängige Dopexaminantwort des Arterienpräparates, sichtbar durch die Rechtsverschiebung der Dosis- Wirkungs-Kurve. Die EC_{50} ($4,07 \pm 0,40$) war im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz eines Antagonisten ($4,38 \pm 0,23$) signifikant erniedrigt mit $P < 0,0001$ (Abb.9-3). Durch die Blockade der α_1 -Rezeptoren wird die Empfindlichkeit für Dopexamin gering abgeschwächt, ohne jedoch eine Kontraktion vollständig zu verhindern. Die maximale Kontraktion (T_{max}) war unter α_1 -Blockade um 41,7% zur Ausgangsspannung gesteigert, in der Kontrollgruppe ohne Rezeptorblockade um 55,1%. Die Werte entsprechen den Mittelwerten der Versuchsreihen. Die maximale Kontraktion trat bei einer Dopexaminkonzentration von 0,1mM auf.

6.3.2 Unspezifische β -Rezeptorblockade

Ebenfalls nach Inkubation mit der unspezifisch an β_1 - und β_2 -Rezeptoren hemmend wirkenden Substanz Propranolol ist die Dosis-Wirkungs-Kurve gering nach rechts verschoben. Die EC_{50} ist auch für diese Reaktion nach Inkubation mit Propranolol signifikant niedriger. Die maximale Kontraktion (T_{max}) war unter β -Blockade um 34,7% zur Ausgangsspannung gesteigert, in der Kontrollgruppe um 55,1%. Die Werte entsprechen den Mittelwerten der Versuchsreihen (Abb.9-3). Das bedeutet, dass die kontrahierende Wirkung von Dopexamin durch Zugabe von niedrig dosiertem Propranolol abgeschwächt wird.

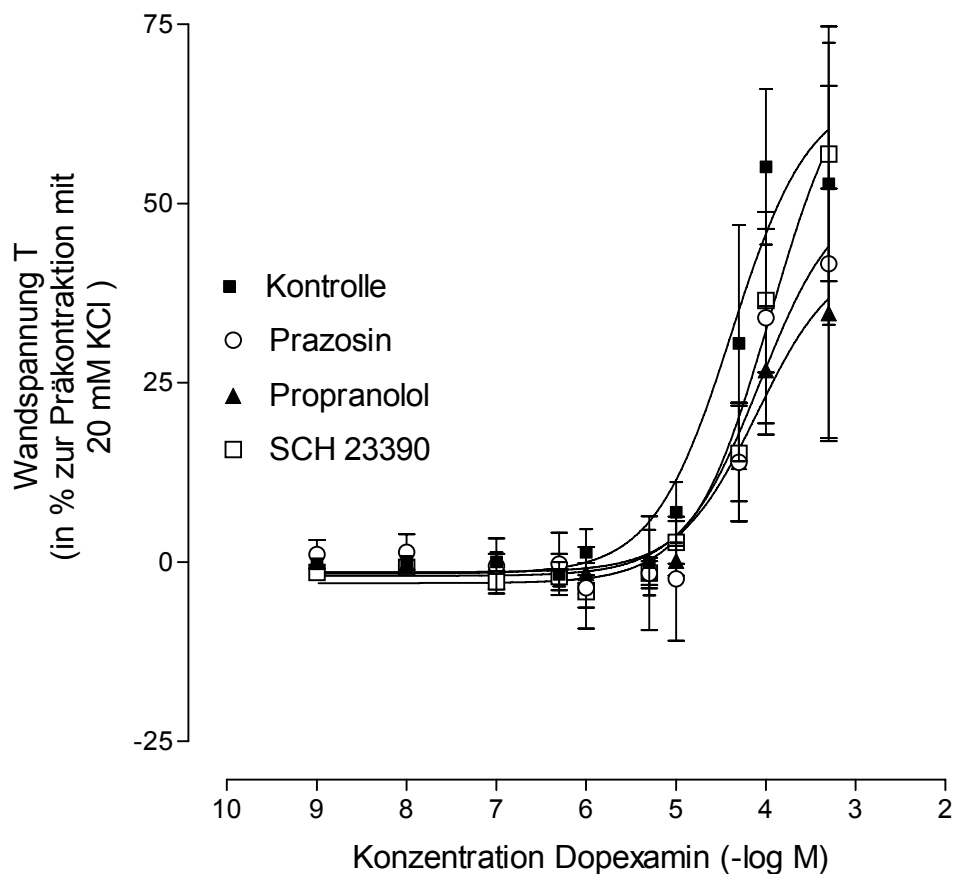


Abbildung 9-3: Dopexamin unter Zusatz von ○ Prazosin (10 μ M), n = 7; EC_{50} = 4,07 \pm 0,40; ▲ Propranolol (1 μ M), n = 7; EC_{50} = 4,10 \pm 0,27; □ SCH23390 (0,1 μ M), n = 8; EC_{50} = 3,95 \pm 0,20; ■ Kontrolle ohne Antagonist, n = 7; EC_{50} = 4,38 \pm 0,23; Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 7-8 Messreihen. $P < 0,0001$ für alle Antagonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

6.3.3 Dopamin-1-Rezeptorblockade

Auch nach Zusatz des DA₁-Rezeptors SCH23390 verschob sich die Dosis-Wirkungs-Kurve für Dopexamin nach rechts, auch diesmal mit einem signifikant erniedrigten Wert für EC_{50} : 3,95 versus 4,38 der Kontrollgruppe, $P = 0,0001$ (Abb.9-3).

Die Blockade des DA₁-Rezeptors durch SCH23390 verstärkte die durch Dopexamin ausgelöste Kontraktion nicht, eine dopaminerge kontraktionshemmende Wirkung von Dopexamin konnte nicht gefunden werden. Es kam zu

einer Abnahme der Empfindlichkeit der Arterienringe gegenüber Dopexamin unter Dopaminrezeptorblockade. Die maximale Kontraktionsstärke entsprach jedoch unter Blockade der DA1-Rezeptoren mit T_{max} 56,9% derjenigen der Kontrollgruppe mit T_{max} : 55,1%.

6.4 Dopexamin unter Kaliumkanalblockade

Dieses Experiment galt in der ursprünglichen Versuchsplanung der Untersuchung der Reaktion von Dopexamin an den verschiedenen Arten von Kaliumkanälen der Zellmembranen glattmuskulärer Koronargefäßzellen. Zur relativ selektiven Blockierung der verschiedenen K^+ -Kanäle wurden folgende Kaliumkanalblocker gewählt: 4-Aminopyridin als spannungsabhängiger K^+ -Kanalblocker, Charybdotoxin und Tetraethylammonium als Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanalblocker und Glibenclamid als selektiver ATP-sensitiver K^+ -Kanalblocker. Kaliumkanalblocker wirken vasokonstriktorisch am arteriellen Gefäßsystem. Infolge der unter 3.1 beschriebenen Beobachtung der dopexamininduzierten Vasokonstriktion wurde diese Messreihe nach nur 3 Messungen vorzeitig beendet, da keine Ergebnisse zu erwarten waren, die weitere Informationen über das zur Vasokonstriktion führende Wirkprinzip von Dopexamin bringen.

6.5 Einfluss von Guanylatzyklase- und Proteinphosphataseinhibitoren auf die Dopexaminwirkung

6.5.1 Blockade mit Cantharidin

Cantharidin ist ein Inhibitor der Proteinphosphatasen Typ1 und Typ2A. Die Phosphorylierung von Myosinleichtketten (MLC_{20}) bewirkt eine glattmuskuläre Kontraktion. Die Myosinleichtkettenkinase verstärkt die Phosphorylierung, wogegen diese Reaktion durch die Proteinphosphatasen gehemmt wird.

Nach Zugabe von Cantharidin ($5\mu\text{M}$) und mindestens 40-minütiger Ruhephase zeigte sich jedoch keine Veränderung des Kontraktilitätszustandes und keine Verstärkung der dopexamininduzierten Kontraktion. Im Gegenteil, eine diskrete Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve gegenüber der Kontrolle war zu verzeichnen, $EC_{50} = 3,65$ (Cantharidin), $EC_{50} = 4,38$ (Kontrolle). Es besteht kein synergistischer Effekt von Cantharidin und Dopexamin (Abb.9-4).

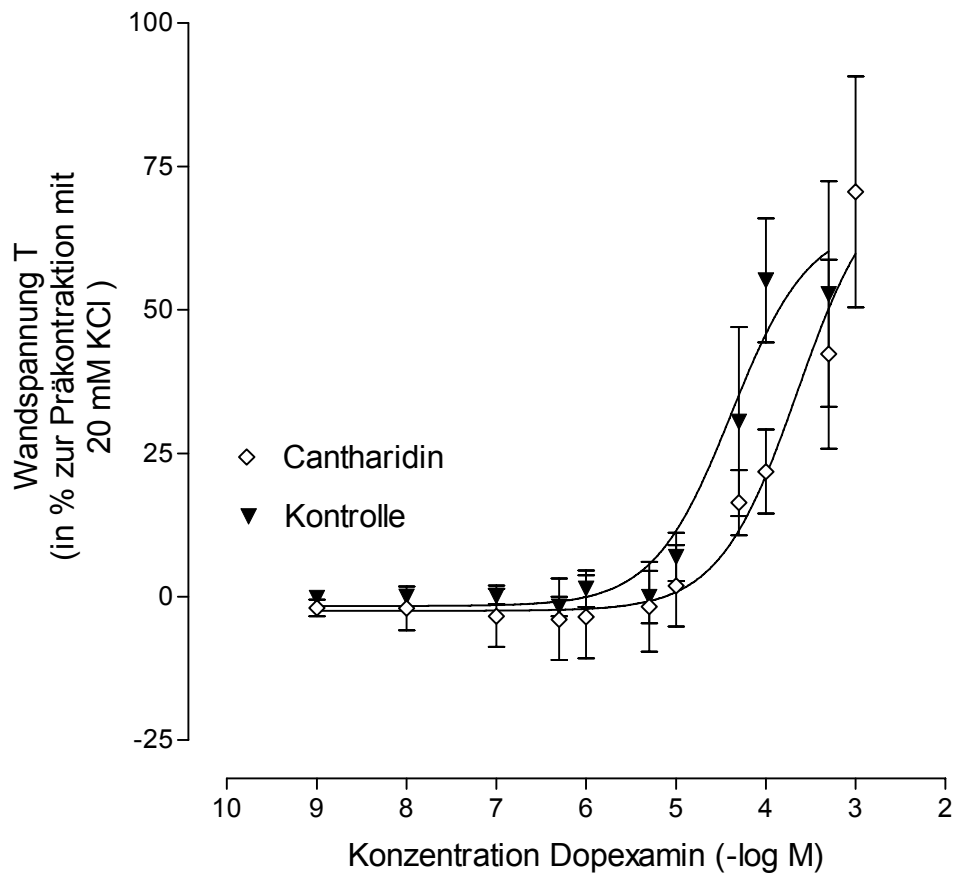


Abbildung 9-4: Wirkung von Cantharidin auf die dopexamininduzierte Kontraktion von Koronararterienringen, (◇ Cantharidin 5µM; n = 6; $EC_{50} = 3,65 \pm 0,28$); (▼ Kontrolle ohne Zusatz; n = 7; $EC_{50} = 4,38 \pm 0,23$); $P = 0,003$

6.5.2 Blockade mit ODQ

ODQ greift über eine spezifische Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (GC-S) in den intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus von arteriellen glatten Muskelzellen ein. Guanylatzyklase konvertiert Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), welches die Proteinkinase G aktiviert und zu einer Relaxierung der glatten Muskulatur führt. Um Effekte von Dopexamin auf den cGMP-PKG Reaktionsweg zu untersuchen, wurden die Arterienringe mit 0,1mM ODQ 30 min vor der Zugabe von Dopexamin inkubiert.

Nach Präinkubation von ODQ zeigte sich keine Veränderung des Kontraktionszustandes der Gefäßringe.

Die EC_{50} in der mit ODQ vorbehandelten Gruppe liegen bei höheren Dopexaminkonzentrationen als in der Kontrollgruppe, der negative dekadische Logarithmus ist also kleiner (ODQ: $EC_{50} = 3,87$; Kontrolle: $EC_{50} = 4,38$) (Abb.9-5). Bei einer Konzentration von 0,5mM Dopexamin beträgt die Kontraktion der Arterienringe im Mittel 72,8% der Vorkontraktion mit KCl nach ODQ-Zusatz, in der Kontrollgruppe ohne ODQ 52,8%. Die maximale Kontraktionsstärke unter Kombination von ODQ und Dopexamin ist höher, als unter alleiniger Dopexaminwirkung, die EC_{50} jedoch kleiner.

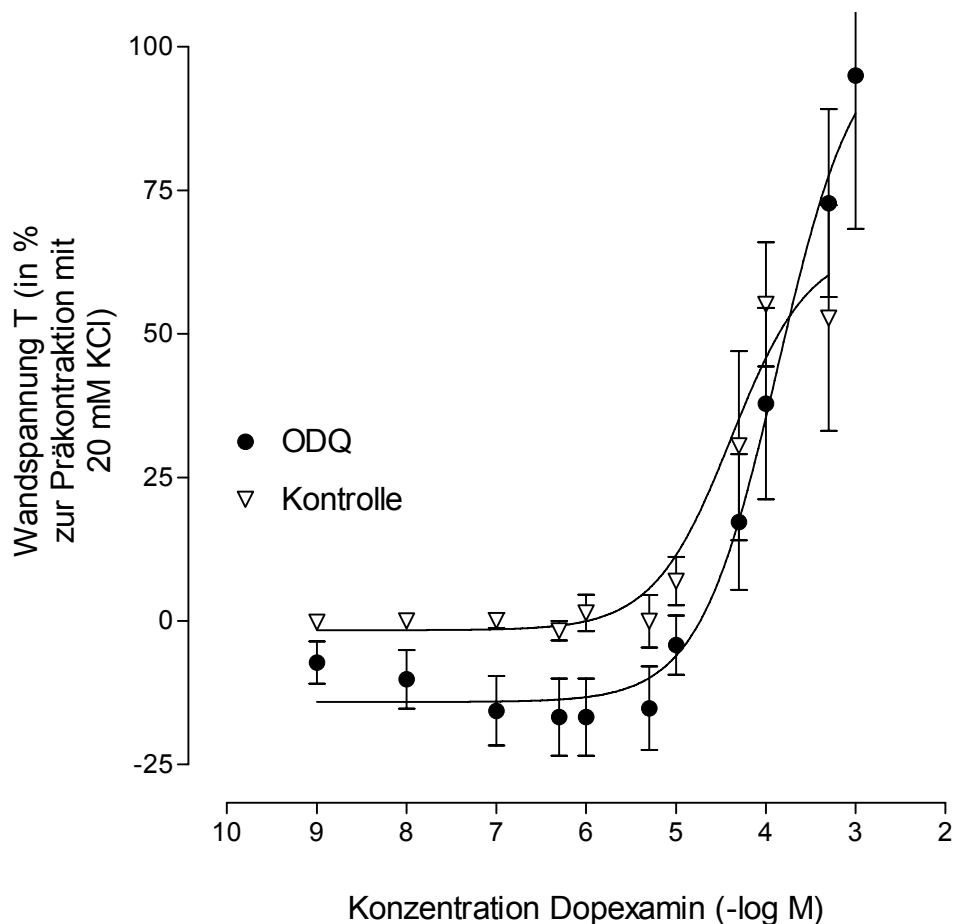


Abbildung 9-5: Wirkung von Dopexamin unter Blockierung des PKG-Signaltransduktionsweges: (● ODQ 0,1mM; n = 6; $EC_{50} = 3,87 \pm 0,18$); (▽ Kontrolle; n = 7; $EC_{50} = 4,38 \pm 0,23$); P= 0,0004; Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM.

6.6 Abhängigkeit der Dopexaminwirkung von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

6.6.1 Einfluss von Ca^{2+} -Antagonisten

Die Kontraktion von glatten Muskelzellen ist abhängig vom Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels entweder durch Einstrom von ionisiertem Kalzium aus dem Extrazellulärraum durch spannungsabhängige Kalziumkanäle oder Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Zelle. Getriggert durch eine Membrandepolarisation aktivieren diese Kalziumkanäle G-Protein-vermittelt den IP_3 -Signaltransduktionsweg. Das über InsP_3 -abhängige Kanäle aus dem SR freigesetzte Kalzium potenziert über Ryanodinrezeptoren das zytosolische Ca^{2+} -Signal.

Verapamil gehört zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockern. Nach Vorkontraktion der Arterienpräparate mit KCl wurde der Krebs-Henseleit-Lösung $1\mu\text{M}$ Verapamil zugesetzt. Die Gefäßringe reagierten unmittelbar mit einer Relaxation. Die Wandspannung betrug im Mittel 3,7% der Vorkontraktion, erreichte somit fast den Ausgangszustand nicht präkontrahter Gefäßpräparate. Nach Titration von Dopexamin in steigender Konzentration kontrahierten sich die Präparate erneut, jedoch waren die zur Auslösung der Kontraktion erforderlichen Dopexaminkonzentrationen höher als in der verapamilfreien Kontrollgruppe, die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung. Dopexamin entfaltet seine Wirkung trotz Blockade der L-Typ Kalziumkanäle der Zellmembran, dabei ist die EC_{50} signifikant erniedrigt (Verapamil: $\text{EC}_{50} = 2,54$; Kontrolle: $\text{EC}_{50} = 4,38$) (Abb.9-6).

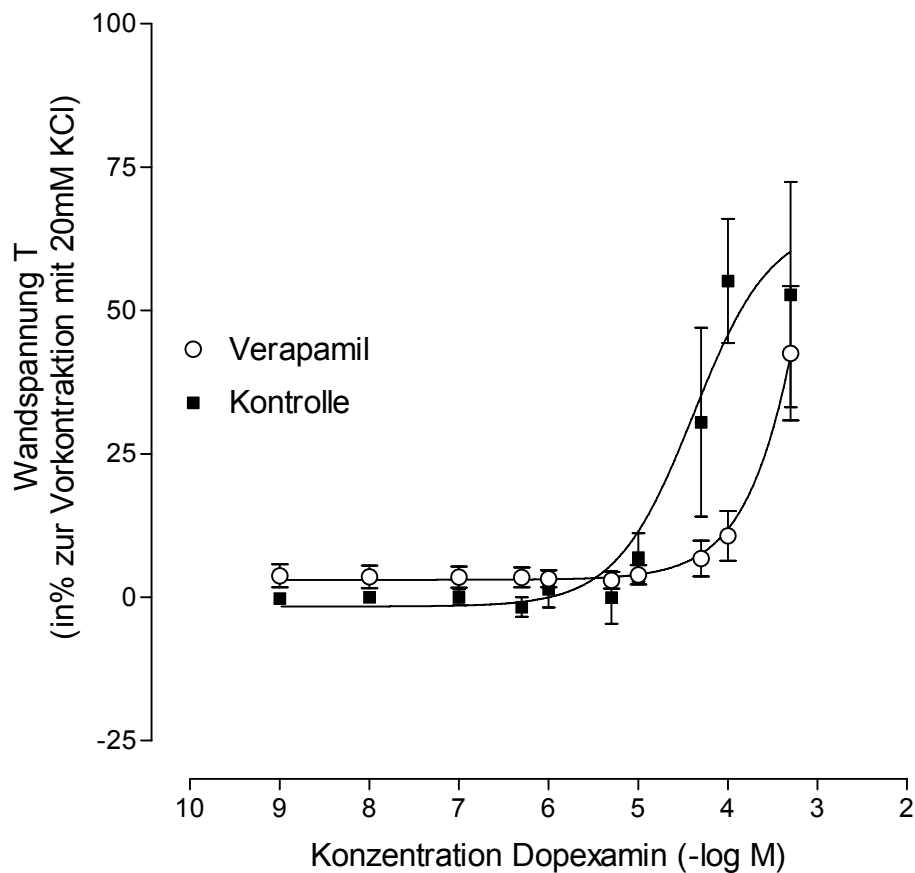


Abbildung 9-6: Effekt von Verapamil (1 μ M) auf die Dosis-Wirkungs-Kurve von Dopexamin (\circ Verapamil, n = 9; $EC_{50} = 2,54 \pm 1,68$) (\blacksquare Kontrolle; n = 7; $EC_{50} = 4,38 \pm 0,23$) P < 0,0001

6.6.2 Wirkung von Dopexamin in Ca^{2+} -freiem extrazellulärem Milieu an vorkontrahierten und nicht vorkontrahierten Koronargefäßpräparaten

Kalzium ist ein wesentlicher Second Messenger in glatten Muskelzellen. Der hauptsächliche Stimulus für eine Kontraktion sind ansteigende zytosmatische Kalziumkonzentrationen, Bindung an Calmodulin und Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase.

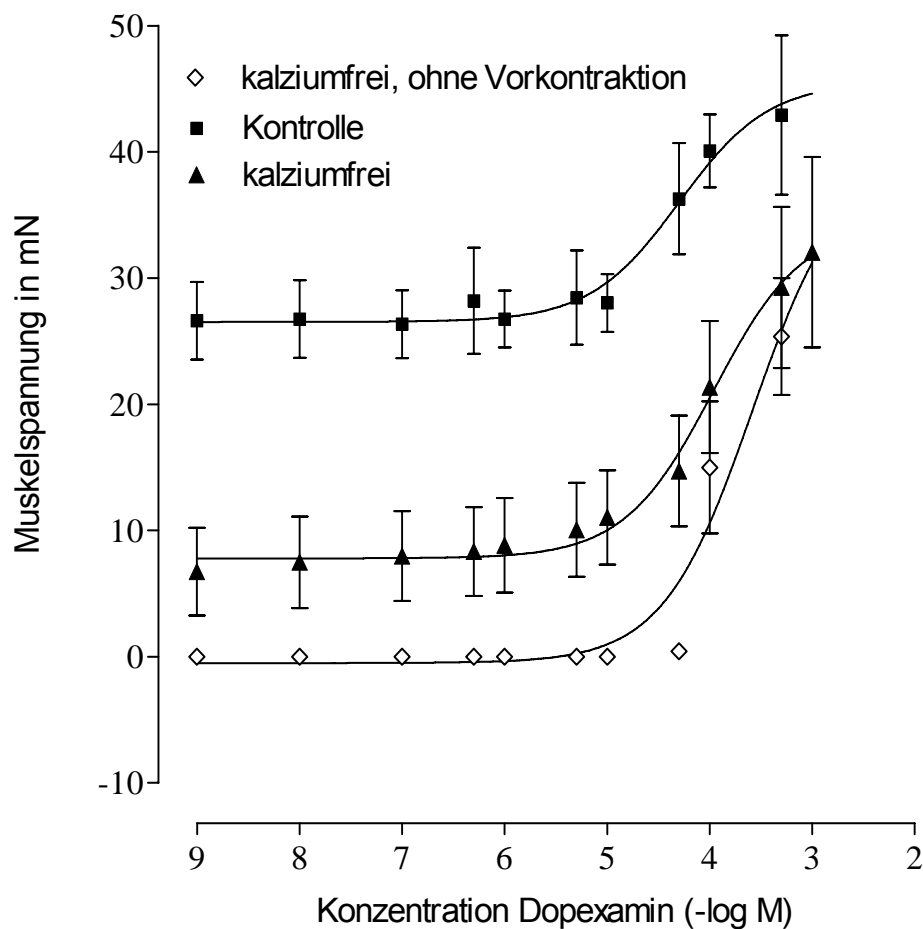


Abbildung 9-7: Wirkung von Dopexamin in kalziumfreiem Milieu an vorkontrahierten (KCl) und nicht vorkontrahierten Arterienringen. (◇ kalziumfrei ohne Vorspannung, $n = 7$; $EC_{50} = 3,58 \pm 0,21$); (▲ kalziumfrei, $n = 8$; $EC_{50} = 3,96 \pm 0,3$); (■ Kontrolle, $n = 7$; $EC_{50} = 4,30 \pm 0,36$); $P < 0,0001$; Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

In kalziumfreiem Milieu fiel die Vorspannung mit KCl um 60% geringer aus als in Extrazellulärflüssigkeit mit physiologischem Kalziumgehalt. Der Mittelwert der Vorspannung betrug in kalziumfreier Lösung 7,84 mN, in Krebslösung mit homöostatischem Kalziumgehalt 26,56 mN. Sowohl in der Versuchsreihe mit kalziumhaltiger Krebs-Henseleit-Lösung als auch in jener mit kalziumfreier Extrazellulärflüssigkeit konnte eine durch Dopexamin verursachte Kontraktion der Arterienpräparate beobachtet werden. In kalziumfreier Lösung trat die Kontraktion jedoch erst bei höherer Dopexaminkonzentration auf. Die Dosis-Wirkungs-Kurve

ist nach rechts verschoben. Der Unterschied ist signifikant (kalziumfrei: $EC_{50} = 3,97$; Kontrolle: $EC_{50} = 4,30$) (Abb.9-7).

Auch an nicht vorkontrahierten Präparaten in kalziumfreier Lösung bewirkte Dopexamin eine Kontraktion. Die EC_{50} war jedoch in diesem Versuch am niedrigsten ($EC_{50} = 3,58$), das heißt, die Wirkung von Dopexamin war signifikant abgeschwächt.

Rezeptorantagonisten	Konzentration	$\log EC_{50}$ $\pm SEM$	P- Wert	n
Kontrolle		4,38 (0,23)		7
Prazosin	10 μ M	4,07 (0,40)	<0,0001	7
Propranolol	1 μ M	4,10 (0,27)	<0,0001	7
SCH23390	0,1 μ M	3,95 (0,20)	<0,001	8
Prazosin + Propranolol SCH23390	10 μ M;1 μ M; 0,1 μ M	3,54 (0,36)	<0,001	6
Verapamil	1 μ M	2,54 (1,68)	<0,0001	9
ODQ	0,1mM	3,87 (0,18)	0,004	6
Cantharidin	5 μ M	3,65 (0,28)	0,003	6

Tabelle 3: Übersicht über die Rezeptorantagonisten und deren Beeinflussung der Dopexaminwirkung, Präkontraktion mit 20mM KCl-Lösung

6.7 Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$

6.7.1 Vergleich der Vorkontraktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und KCl

6.7.1.1 Dopexamin unter Vorkontraktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bzw. KCl

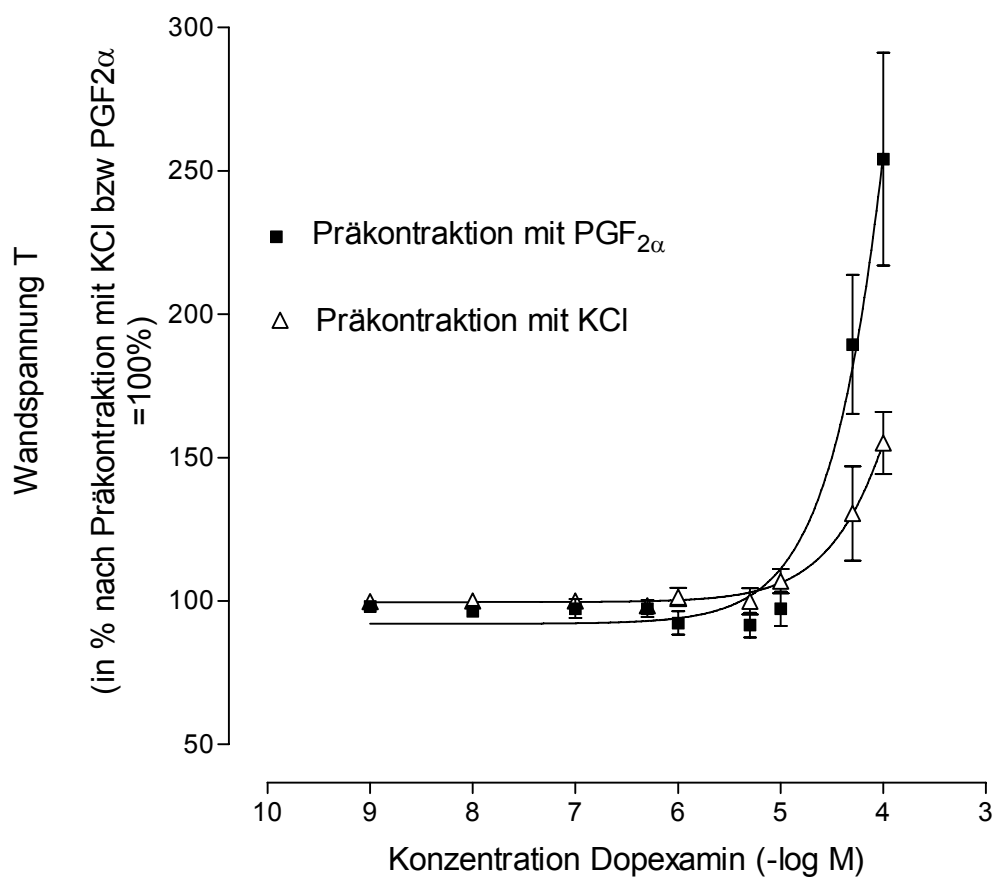


Abbildung 9-8: Vergleich der Dopexaminwirkung bei Vorkontraktion mit Δ KCl (20mM) $n = 7$; $EC_{50} = 3,28 \pm 1,08$ und \blacksquare $\text{PGF}_{2\alpha}$ (5 μ M), $n = 8$; $EC_{50} = 3,37 \pm 1,16$; alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; $P = 0,172$

Vergleicht man die beiden EC_{50} miteinander, so ergibt sich für die beiden Präkonstriktoren für die Versuche kein signifikanter Unterschied (Abb.9-8).

Jedoch die Absolutwerte der Kontraktion fallen unter der Präkontraktion mit dem Eicosanoid $\text{PGF}_{2\alpha}$ deutlich stärker aus als bei mit KCl vorkontrahierten Präparaten. Bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ Dopexamin wird unter $\text{PGF}_{2\alpha}$ 165% der Vorspannung erreicht, unter KCl jedoch nur 55% (Abb.9-9).

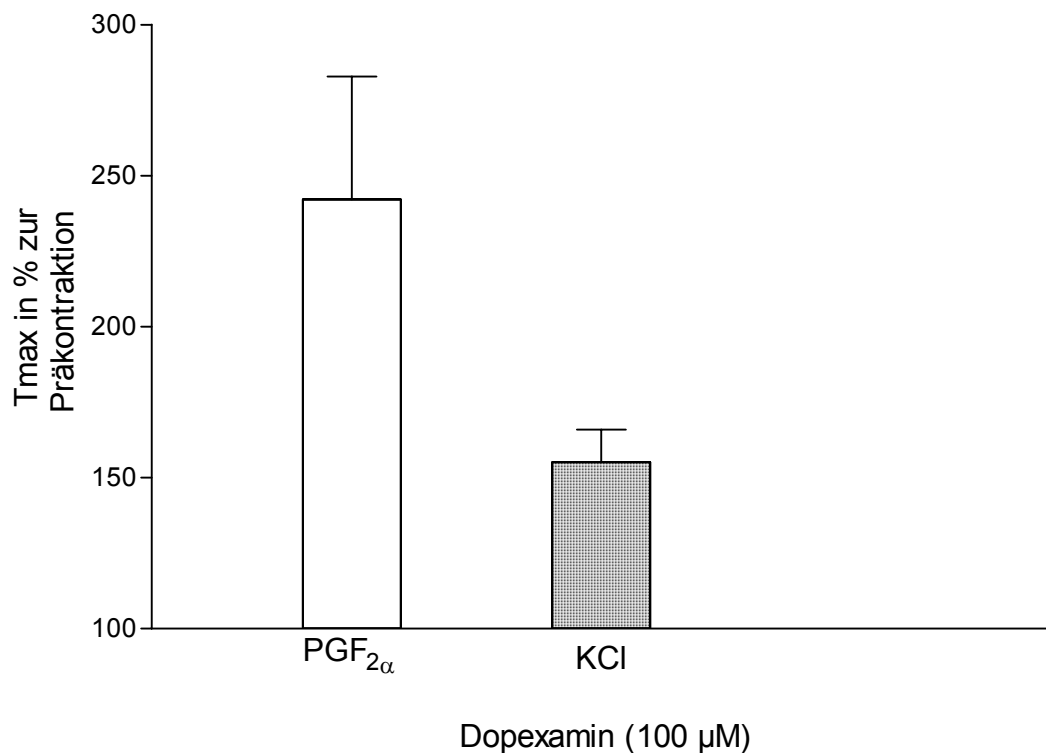


Abbildung 9-9: Kontraktion bei identischer Dopexaminkonzentration ($100\ \mu\text{M}$) unter Präkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($5\mu\text{M}$) und KCl (20mM)

6.7.1.2 Dopamin unter Vorkontraktion mit KCl bzw. $\text{PGF}_{2\alpha}$

Bei diesem Versuch wurde eine mögliche Auswirkung des Präkonstriktors auf die kontraktionsauslösende Wirkung von Dopamin untersucht.

Die Dilatation nach Vorbehandlung mit dem Prostaglandin trat bereits bei niedrigeren Konzentrationen von Dopamin auf als bei Vorkontraktion mit KCl.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve unter Präkonstriktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ war deutlich nach links verschoben, und die EC_{50} :signifikant größer als nach KCl- Präkonstriktion ($6,60 \pm 0,26$ versus $4,86 \pm 0,22$). Der Unterschied ist mit $P < 0,0001$ signifikant (Abb. 9-10).

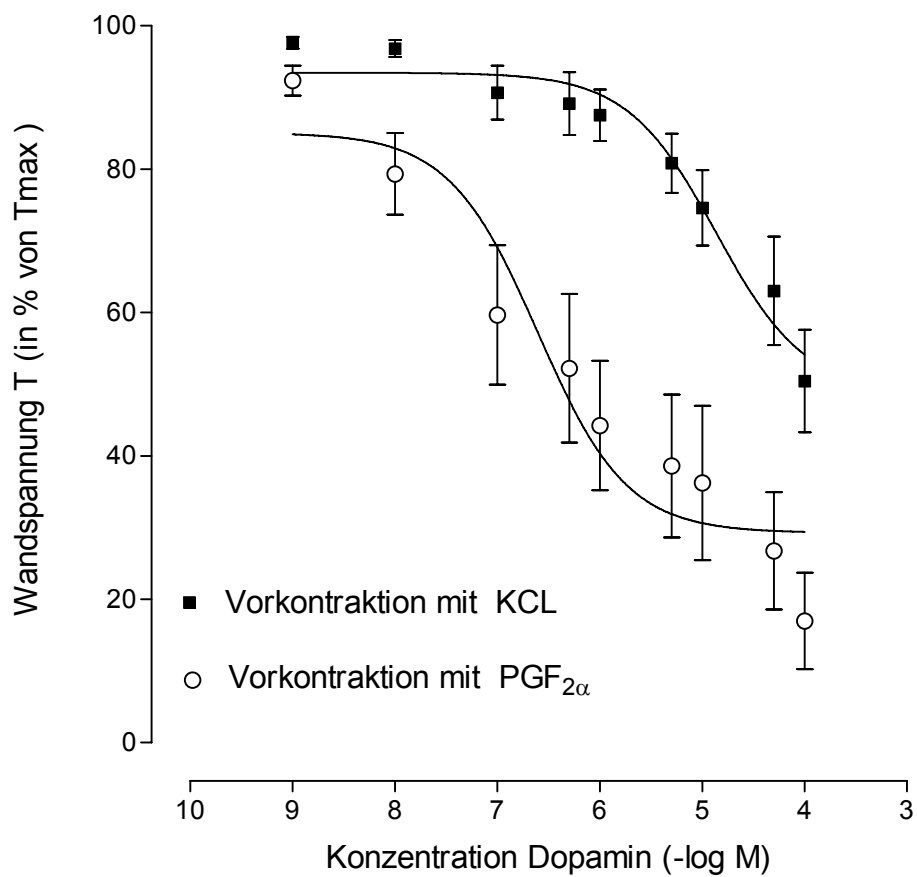


Abbildung 9-10: Vergleich der Dosis- Wirkungsbeziehung von Dopamin mit KCl- bzw. $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Vorkontraktion. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 5-6 Experimenten. (■ 20mM KCl; $n = 6$; $\text{EC}_{50} = 4,86 \pm 0,22$) (○ 5 μM $\text{PGF}_{2\alpha}$; $n = 5$; $\text{EC}_{50} = 6,60 \pm 0,26$), $P < 0,0001$

6.7.2 Adrenerge und dopaminerge Rezeptorantagonisten

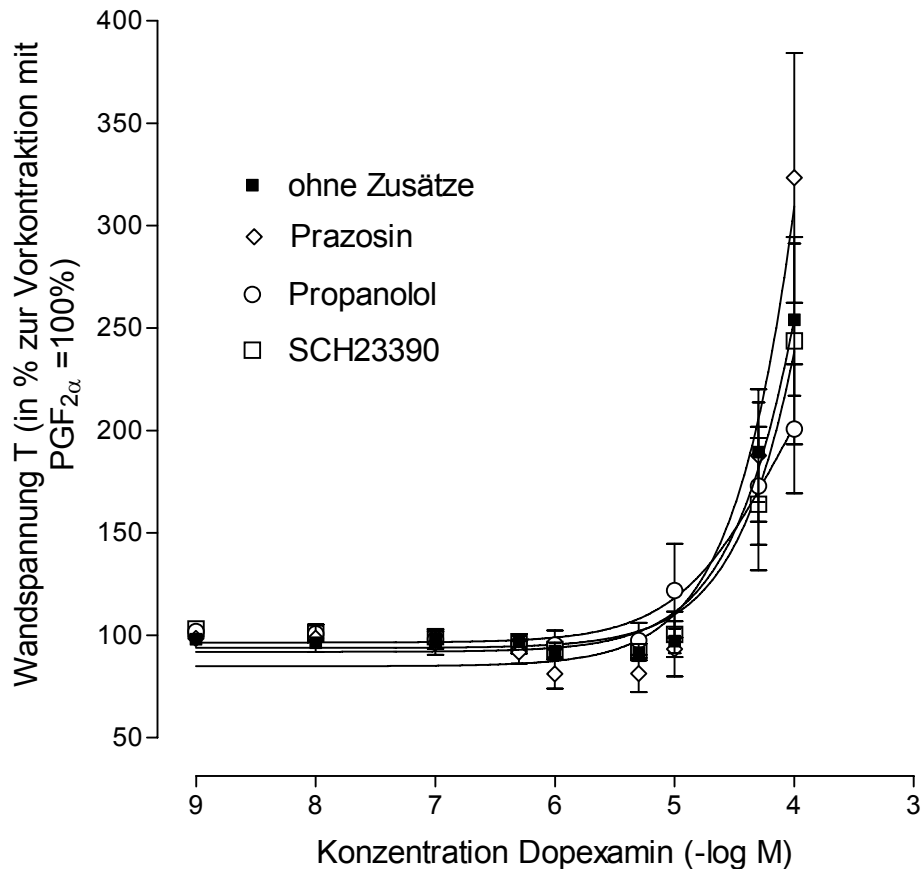


Abbildung 9-11: Vergleich von \diamond Prazosin (10 $\mu\text{mol/l}$), $n = 5$; $EC_{50} = 3,18 \pm 0,87$; \circ Propranolol (1 μM), $n = 5$; $EC_{50} = 4,2 \pm 0,45$; \square SCH23390 (0,1 μM), $n = 6$; $EC_{50} = 3,14 \pm 0,45$; \blacksquare Kontrolle ohne Antagonist, $n = 7$; $EC_{50} = 3,33 \pm 0,87$ unter Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$; Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 5-7 Messreihen, $P = 0,332$.

Bei der Untersuchung des Einflusses von α_1 -, unspezifischen β - und DA1-Rezeptorantagonisten auf die kontraktile Wirkung von Dopexamin unter Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Antagonisten und der Kontrollgruppe gefunden werden. Die Dopexamindosis, die zum Erreichen der halbmaximalen Kontraktion notwendig war, unterschied sich nicht signifikant nach jeweiliger Blockade der α_1 -, β - und

DA1- Rezeptoren von der Kontrolle (Abb.9-11). Dieses Resultat korreliert nicht mit den unter Abbildung 9.3 aufgezeigten Ergebnissen unter Vorkontraktion mit KCl. Dort zeigte sich jeweils eine niedrigere EC_{50} unter den verschiedenen Rezeptorblockaden (6.3).

6.8 Vergleich frischer Arterienpräparate mit gekühlt gelagerten

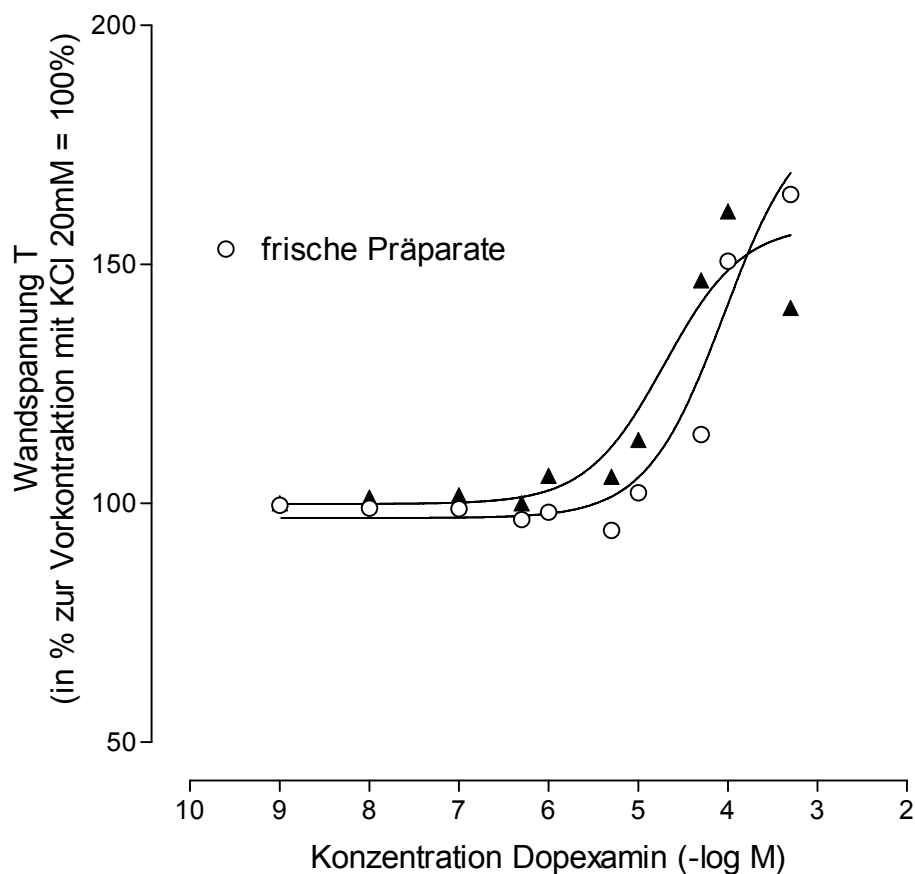


Abbildung 9-12: (○ frische Arterie, $EC_{50} = 4,04 \pm 0,25$) (▲ gelagerte Arterie, $EC_{50} = 4,70 \pm 0,36$) Die Werte sind Mittelwerte und SEM von je 3 bzw. 4 Messungen. $P = 0,60$

Um zu überprüfen, ob durch die vierundzwanzigstündige gekühlte Lagerung der Koronararterienpräparate in Krebs-Henseleit-Lösung ein Verlust der Vitalität des Muskelgewebes eingetreten ist, wurden die Ergebnisse der frischen Präparate mit denen der erst am Folgetag dem Versuch zugeführten verglichen. Die gelagerten Präparate zeigten eine ähnlich gute Kontraktilität ohne signifikanten Unterschied zu den frisch verwendeten mit $P = 0,6$. (Abb.9-12). Die Streuung der Messwerte ist dabei zeitabhängig ebenfalls nicht signifikant verschieden.

7 Diskussion

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse von sowohl tierexperimentellen als auch klinischen Studien an verschiedenen Gefäßen unterschiedlicher Säugetierspezies erwarteten wir in unserem in-vitro-Experimenten eine durch Dopexamin induzierte Gefäßdilatation am RIVA des Schweineherzens (6; 15; 16; 26; 45; 46; 53). In niedrigeren Konzentrationen blieb Dopexamin inaktiv und führte im Gegenteil ab einer Dosierung von $10\mu\text{M}$ zur Kontraktion sowohl nach Präkontraktion mit KCl-Lösung als auch nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dieses unerwartete Ergebnis lässt sich durch die bisher bekannte Rezeptoraktivität der Substanz im Zusammenhang mit den an Koronararterien nachgewiesenen Katecholaminrezeptoren nicht erklären. Andere Reaktionswege müssen für die kontrahierende Wirkung verantwortlich sein.

Dopamin hingegen verursachte den Vermutungen entsprechend eine Vasodilatation. Unter Zusatz der Katecholaminrezeptorantagonisten Prazosin, Propranolol und SCH23990 war die Dosis-Wirkungs-Kurve von Dopexamin gering, jedoch signifikant nach rechts verschoben. Dieses Resultat wurde nur nach Präkontraktion mit KCl-Lösung gefunden, nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ dagegen beeinflussten die jeweiligen Rezeptorantagonisten den Kurvenverlauf nicht. Der Guanylatzyklaseinhibitor ODQ und der Proteinphosphataseinhibitor Cantharidin bewirkten ebenfalls eine geringe, doch signifikante Hemmung der durch Dopexamin ausgelösten Kontraktion. In kalziumfreien extrazellularem Milieu war eine signifikante Kontraktionsabschwächung zu verzeichnen, ebenso nach Zusatz von Verapamil. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse diskutiert.

Hapke und Höll wiesen 1992 die Existenz von Dopaminrezeptoren am Ramus circumflexus der Arteria coronaria dextra des Schweineherzens nach (32). Ozono gelang die immunhistochemische Lokalisierung von DA_1 -Rezeptorproteinen u.a. in Koronararterien der Ratte (61). In unseren Experimenten am RIVA konnte die gefäßdilatierende Dopaminwirkung reproduziert werden.

Dopamin induziert eine Muskelrelaxation an den Koronarien des Schweins wahrscheinlich über eine Aktivierung durch DA_1 -Rezeptoren. Han et al. blockierten

β -Rezeptoren unspezifisch mit Propranolol und verhinderten damit eine Vasodilatation nicht (31). Toda et al. konnten nach DA_1 -Blockade mit SCH23390 an der Koronararterie des Affen eine Kontraktion hervorrufen, nicht jedoch nach Betablockade. Erstaunlicherweise wurde in demselben Versuch durch Dopamin eine Vasokonstriktion an der menschlichen Koronararterie beobachtet als Hinweis für eine Aktivierung von α_1 -Rezeptoren (82).

Entscheidender Mechanismus der DA_1 -Rezeptor gekoppelten Reaktion scheint die Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit der spannungs- und kalziumabhängigen Kaliumkanäle (BK_{Ca}) zu sein mit nachfolgendem K^+ -Ausstrom und Hyperpolarisation der Zellmembran. Das Membranpotential wird wesentlich über das transmembranäre Kaliumkonzentrationsgefälle reguliert. Die physiologische Kaliumionenkonzentration im Extrazellularraum beträgt 4.-.5mM, im Intrazellularraum 160 mM. Die Aktivierung führt über das Gs-Membranprotein mit Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Steigerung der Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Proteinkinase G wird durch cAMP stimuliert und triggert die Öffnung der BK_{Ca} -Kanäle (31; 55; Abb.5). Durch die Hyperpolarisation des Membranpotentials werden die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle inhibiert, der Kalziumeinstrom gehemmt. Diese Vasodilatation zeigte sich im Versuch 5.7.1.2.

Durch Inkubation mit Kaliumchlorid entsteht eine Veränderung des Ionengleichgewichtes und es folgt ein Einstrom der Kaliumionen in die Zelle. Es entsteht eine Imbalance zwischen elektrischem und chemischem Gleichgewicht.

Unterschreitet das Membranpotential einen kritischen Wert, wird durch Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} - Kanäle eine Depolarisation ausgelöst.

Diese Imbalance im Kaliumgleichgewicht könnte zu einer veränderten Reaktivität der transmembranären $BK_{Ca^{2+}}$ -Kanäle führen und die signifikant schwächer ausgeprägte durch Dopamin hervorgerufene Dilatation unter Vorkontraktion mit KCl (20mM) gegenüber der Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ erklären, da $PGF_{2\alpha}$ eine Kontraktion zusätzlich über intrazelluläre Signaltransduktionswege realisiert ohne das transmembranäre elektrochemische Gleichgewicht zu beeinflussen (s. 4.2.1). Die EC_{50} liegt bei Prostaglandinvorgabe annähernd 100-fach niedriger (Abb.9-10). Infolge der verschiedenen Ergebnisse mit Dopamin wiederholten wir die Versuche mit Dopexamin und $PGF_{2\alpha}$, um eine mögliche Beeinflussung des Präkonstriktors auf das Ergebnis zu untersuchen. Unter $PGF_{2\alpha}$ folgte ebenfalls eine

Vasokonstriktion. Die molaren Konzentrationen von Dopexamin, welche die halbmaximale Kontraktion an den Koronararterien hervorrufen, unterschieden sich nicht unter KCl- und $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Vorkontraktion, jedoch die absolute Kontraktionsstärke. Die deutlich stärkere Kontraktion unter $\text{PGF}_{2\alpha}$ könnte zurückzuführen sein auf einen additiven Effekt beider Substanzen, sodass ein ε -Proteinkinase-vermittelter Reaktionsweg für Dopexamin ausgeschlossen werden kann.

In pharmakologischen Studien der 80iger und frühen 90iger Jahre wurden α -Rezeptoren in Koronararterien bei fehlender Stimulation durch Norepinephrin und anderer Agonisten nicht nachgewiesen (32; 35). Ende der Neunziger Jahre gelang jedoch die Identifizierung von α_1 -Rezeptoren durch Hybridisierung und mRNA-Messung sowohl in Koronararterien des Menschen als auch des Schweins (66). Dass α_1 -Rezeptoren an Schweinekoronararterien existieren, zeigt auch das mit Caffedrin/Theoadrenalin (Akrinor®) durchgeführte Experiment, bei welchem Akrinor nach vorheriger Blockade der β -Rezeptoren eine Vasokonstriktion hervorruft (83).

In vorliegendem Versuch schwächte sich die durch Dopexamin ausgelöste Kontraktion unter Prazosinabgabe ab (Abb. 9-3). Das könnte auf eine α_1 -adrenerge Komponente bei der Vasokonstriktion schließen lassen. Bisher wurden in der Medikamentenevaluation von Dopexamin keine α -agonistische Eigenschaften beschrieben. Ebenfalls Smith et al. konnten keine Wirkung von Dopexamin auf α_1 -Rezeptoren nachweisen (24; 74). So ist eine indirekte sympathikomimetische Reaktion über eine Noradrenalinwiederaufnahmehemmung wahrscheinlicher. Dieser Wirkmechanismus wurde in Arbeiten von Mitchell, Goldberg und Nedergaard als Reuptake-1-Inhibition für Dopexamin beschrieben (30; 52; 53; 54). Dabei wird die Kontraktion über eine Konzentrationserhöhung des extrazellulären Noradrenalins mit nachfolgender mimetischer Wirkung an α_1 -Rezeptoren ausgelöst. Dieses Untersuchungsergebnis lässt sich allerdings im Experiment mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ als Präkonstriktor nicht reproduzieren.

Nedergaard beschreibt in seinen Arbeiten eine weitere Möglichkeit der kontraktilen Wirkung, ausgelöst durch den Metaboliten Methyldopexamin. Dopexamin wird intrazellulär von der Catechol-O-methyltransferase methyliert. Dieser Metabolit wirkt als α -Agonist (58).

Propranolol ist als Betablocker allgemein bekannt, jedoch greift diese Substanz noch über andere intrazelluläre Systeme in die Regulierung der Zellfunktion ein.

So hemmt Propranolol Proteinkinase C (PKC). Die PKC-abhängige Phosphorylierung von CPI-17, einem für glatte Muskelzellen spezifischen Proteininhibitor von MLCP führt über eben diese Hemmung der MLCP zu einer Gefäßmuskelkontraktion. So kann Propranolol über eine Inhibition von PKC einer Kontraktion entgegenwirken (18), andererseits über Antagonisierung von β -Rezeptoren eine Kontraktion auslösen. Propranolol greift jedoch erst bei hundertfach höherer Konzentration (50-300 μ M) hemmend in die Aktivierungskaskade der PKC ein als für eine Blockierung der β -Rezeptoren notwendig ist (76). Somit ist eine Inaktivierung von PKC in der in dieser Arbeit verwendeten Propranololdosierung (1 μ M) unwahrscheinlich.

Die Versuchsreihe mit PGF_{2 α} hat jedoch zu keiner abgeschwächten Kontraktion unter Betablockade geführt. PGF_{2 α} bewirkt jedoch partiell eine Vasokonstriktion über Translokation und somit Aktivierung der ϵ -PKC (20). Es besteht die Möglichkeit, dass sich diese gegensätzlichen Wirkungsansätze in der Versuchsreihe aufheben. Weiterführende Experimente mit steigender Propranololdosierung und dem Einsatz von Calphostin, einem PKC-Inhibitor könnten diese Zusammenhänge darstellen.

Als Ursache für eine abgeschwächte Kontraktion unter Betablockade ist eine antagonistische Wirkung des Dopexamin auf β_2 -Rezeptoren nach Studienlage und bei klinischer Anwendung eindeutig nachgewiesener betamimetischer Wirkung auf die globale Herz-Kreislauffunktion (14; 16; 27; 36; 45; 74) nicht wahrscheinlich.

In einer Arbeit von Fukumitsu wurde an isolierten Muskelzellen von Koronararterien des Schweins nach Gabe von Isoprenalin ein ansteigender transmembranärer Kalziumeinstrom über L-Typ-Ca²⁺-Kanäle gemessen, welcher durch Propranolol, jedoch nicht durch Phentolamin geblockt werden konnte. Diskutiert wurde eine durch Stimulation der β -Rezeptoren ausgelöste Signaltransduktion unter Einbeziehung von cAMP mit nachfolgender Aktivierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen. Über den gleichen Mechanismus rufen Katecholamine an der quergestreiften Muskulatur des Herzens eine Kontraktilitätssteigerung hervor (27). Diese elektrophysiologischen Ergebnisse zeigen ein mögliches Korrelat zu der in-vitro-Reaktion von Dopexamin und könnten die Rechtsverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve unter Betablockade begründen.

Eine Aktivierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen durch Dopexamin ist für eine Kontraktion am RIVA des Schweineherzens verantwortlich.

Nach Blockierung der Kalziumkanäle durch den selektiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Verapamil konnte eine Kontraktion jedoch nicht vollständig verhindert werden.

Neben dem direkten Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch die Zellmembran über Kalziumkanäle können aktivierte spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle die intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem SR triggern, ohne einen extrazellulären Kalziumeinstrom auszulösen (s. Kapitel 2.4.2).

Da Verapamil die Dosis-Wirkungs-Kurve signifikant nach rechts verschiebt, jedoch eine Kontraktion nicht komplett verhindert, kann von einer partiellen Dopexaminwirkung an spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen ausgegangen werden. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass auch in kalziumfreiem Milieu eine Kontraktion erst bei deutlich höherer Dosierung auftrat.

Als Ursache für diese durch Kalziumkanalblocker nicht hemmbare Kontraktion scheint ein von Änderungen des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unbeeinflusster Signalübertragungsweg in Betracht zu kommen. Eine Möglichkeit der kalziumunabhängigen glattmuskulären Gefäßkonstriktion durch Dopexamin besteht in einem PKC-vermittelten Reaktionsweg (17; 38). Zur Familie der Proteinkinasen C gehören sowohl kalziumabhängige als auch kalziumunabhängige Isoformen. $\text{PGF}_{2\alpha}$ und weitere Eicosanoide wirken durch eine Induktion der Translokation der ϵ -PKC vasokonstringierend (20). Endothelin-1 steigert eine koronare Vasokonstriktion über eine Phosphorylierung einer mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und erhöht die Sensitivität der Myofilamente für Kalzium (17). Weiterführende Untersuchungen zur Verifizierung dieses intrazellulären Transduktionsweges wären sehr interessant.

Nach unseren Untersuchungen wirkt Dopexamin nicht agonistisch am DA_1 -Rezeptor des RIVA des Schweineherzens. Vom hochsensitiven DA_1 -Rezeptor-antagonisten SCH23390 wurden auch antagonistische Eigenschaften an 5HT-Rezeptoren beschrieben, so an der Rattenschwanzarterie und der Aorta der Ratte (47). Eine mögliche Erklärung für die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Dopexamin unter SCH23390 könnte in einer agonistischen Wirkung an 5HT-Rezeptoren von Dopexamin zu finden sein, mit auslösender Vasokonstriktion, die durch SCH23390 abgeschwächt wird. Diese Vermutung würden die Ergebnisse an endothelfreien Präparaten (s. Abb. 9-2) bestätigen. Als tragender Reaktionsmechanismus ist dieser Effekt jedoch viel zu schwach.

Cantharidin ist ein Inhibitor der Myosin-Leichtketten-Protein-Phosphokinasen PP1 und PP2a, welche die MLC₂₀ dephosphorylieren, und somit als Gegenspieler zur Myosin-Leichtketten-Kinase wirken. Mit der Dephosphorylierung wirken die Proteinphosphatasen einer Kontraktion entgegen. Cantharidin ruft also eine Vasokonstriktion hervor (21; 40; 41). In Arbeiten von Knapp et al. konnte bei einer Konzentration von 5µg Cantharidin eine ca 75%ige Inaktivierung der Proteinphosphatase in Präparaten der Rattenaorta nachgewiesen werden (40). Diese Dosierung wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, jedoch ohne dass sich eine kontrahierende Wirkung entfaltete. Daraus ist zu vermuten, dass diese beiden Subtypen der Proteinphosphokinase in den glatten Muskelzellen der Koronararterien des Schweins nicht vorhanden sind.

Somit ist auch eine Dopexaminwirkung über diesen von der intrazellulären Kalziumkonzentration unabhängigen Reaktionsweg über die Dephosphorylierung der Myosinleichtketten unwahrscheinlich.

Die Versuchsreihe mit ODQ als selektivem Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase (GC-S) wurde unter der Hypothese der Vasodilatation durch Dopexamin durchgeführt. Aktivierte GC-S konvertiert GTP zu dem Second Messenger cGMP, welcher seinerseits die Proteinkinase G aktiviert. Dieses phosphorylierende Enzym wirkt über verschiedene weitere Angriffspunkte relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur. Nach Zusatz von 0,1mM ODQ und 30 min Ruhezeit hat sich am Kontraktilitätszustand nichts verändert. In der Literatur sind Dosierungen von 0,01mM bis 10mM als potent zur selektiven Hemmung der Konvertierung von GTP zu cGMP beschrieben (44). Bei intaktem Endothel und Vorhandensein von Stickstoffmonoxid (NO) als Vasodilatator wäre bei Inhibierung der GC-S eine Imbalance des Spannungszustandes des Koronargefäßes mit verstärkter Kontraktion zu erwarten.

Eine inhibierende Wirkung von Dopexamin auf die lösliche Guanylatzyklase ließe sich in einem weiteren Versuch mit NO als Aktivator der GC-S mit nachfolgender Gefäßdilataion untersuchen.

Teschemacher et al. haben bei Trachealringen des Kalbes einen antagonistischen Effekt von Katecholethylaminen (Dobutamin, Dopexamin) auf endotheliale muskarinerge Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen (80). An der Koronararterie des Schweins fanden Yamada et al. Muscarinrezeptoren Typ M1 und M2 (90). Eine antagonistische Reaktion von Dopexamin an diesen Rezeptoren ist nach

unseren Untersuchungen nicht wahrscheinlich, da nach Endothelentfernung keine Kontraktionsverstärkung auftrat. Bekannt ist, dass Epinephrin, Vasopressin, Dopamin und Angiotensin die Endothelinproduktion stimulieren und dadurch nach kurzzeitiger Vasodilatation eine lang anhaltende Konstriktion hervorrufen können (50).

Speziellere Untersuchungen zur Wirkung von Dopexamin am Gefäßendothel sind bisher nicht durchgeführt worden. In der Arbeit von Mazzuco über die Dopexaminaktivität an Pulmonalarterien des Guineaschweines konnte nach Entfernung des Endothels keine signifikante Wirkungsveränderung durch Dopexamin gefunden werden.

Die minimale, wenn auch signifikante Abschwächung der kontrahierenden Wirkung von Dopexamin an endothelfreien Präparaten wäre durch eine partielle Schädigung der Homöostase innerhalb der Tunica media der Gefäßwand durch mechanische Irritation bei Entfernung der Endothelschicht zu erklären. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung der endothelabhängigen Endothelin-1-Produktion nicht nur durch endogene Katecholamine, sondern auch durch Dopexamin und der daraus resultierenden geringen Kontraktionsverminderung nach Entfernung des Endothels in unseren Untersuchungen.

Das in Kapitel 6.8 aufgeführte Diagramm zeigt den Nachweis, dass keine signifikante Vitalitätsänderung der Gefäßmuskelzellen nach vierundzwanzigstündiger gekühlter Lagerung auftraten. Da im Schlachthof nicht täglich Schweine geschlachtet wurden und eine beträchtliche Entfernung dorthin zurückzulegen war, war es für den Versuchsablauf wichtig, auf diese Methode der Lagerung der Präparate zurückgreifen zu können.

Bereits 1990 wurden im Zusammenhang mit klinischen Studien an Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz und Patienten in der Rekonvaleszenz nach Herzoperationen unter kontinuierlicher Dopexaminperfusion von 0,5-10 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ Beschwerden im Sinne einer Angina pectoris Symptomatik festgestellt. Die Inzidenz betrug 2,1%. Zurückgeführt wurden diese Ereignisse auf die Tachykardien, welche unter der Behandlung auftraten (24). Es sind in der Literatur bisher keine weiteren Hinweise über eine Korrelation von myokardialen ischämischen Ereignissen unter Dopexamintherapie aufzufinden.

Pharmakokinetische Untersuchungen geben einen Spitzenspiegel von Dopexamin im Blut gesunder Probanden von 124 mg/l nach einer 60 minütigen Infusion von

1,0-4,0 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ mit einer Halbwertszeit von 7 min nach Beendigung der Infusion an.

Die Eliminationshalbwertszeit bei Patienten mit Low Cardiac Output Syndrom war mit 11 min leicht verlängert (24). In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir maximale Konzentrationen bis zu 214,5 mg/l entsprechend 0,1mM Dopexamin. Nach Summation der kumulativ titrierten Dosierungen ergibt sich eine maximale Konzentration von 267,6 mg/l in unseren Versuchsreihen. Eine 50%ige Kontraktion wird bei einer Dosierung von 17,89 mg/l Dopexamin in Krebs-Henseleit-Lösung hervorgerufen. Das bedeutet, dass die beim Menschen therapeutisch verwendeten Plasmakonzentrationen im in-vitro-Versuch an der juvenilen Schweinekoronararterie eine Vasokonstriktion verursachen würden.

Schlussfolgerung

Die hier vorliegenden Ergebnisse aus in-vitro-Experimenten an der Koronararterie des Schweins geben Anlass, die Auswirkung von Dopexamin auf die Koronarperfusion auch in klinischen Studien zu prüfen. Es wird erforderlich sein zu untersuchen, ob die durch Dopexamin hervorgerufene Vasokonstriktion in vitro am RIVA des Schweineherzens durch in-vivo-Experimente am Schweineherzen reproduzierbar ist. Darüber hinaus könnten Studien unter Zuhilfenahme der bildgebenden Diagnostik weitere Aufschlüsse über die klinische Wirksamkeit von Dopexamin an der menschlichen Koronararterie geben. Eine mögliche Methode wäre eine koronarangiographische Darstellung von Kaliberänderungen der Koronargefäße nach Dopexamingabe.

Unsere Untersuchungen weisen auf eine mögliche Nebenwirkung der Substanz Dopexamin im klinischen Einsatz hin. In der Literatur existieren einzelne Berichte über Angina pectoris Symptomatik im Zusammenhang mit einer Dopexamintherapie, welche jedoch mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels bei positiver Inotropie erklärt wird. Als weitere Ursache der Symptomatik ist auch eine durch Dopexamin ausgelöste Vasokonstriktion an Koronararterien in Betracht zu ziehen.

Zur weiteren Entschlüsselung des durch Dopexamin induzierten intrazellulären Reaktionsweges bieten sich Untersuchungen mit Ryanodinrezeptorantagonisten (z.B. Rutheniumrot) und Inositoltriphosphat-Antagonisten (z. B. Heparin) in vitro

an. Durch die Blockierung des Ryanodinrezeptors wird die Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Kalziumspeichern gehemmt.

8 Zusammenfassung

Vor zirka 15 Jahren hielt Dopexamin unter dem Medikamentennamen Dopacard® als Therapeutikum für das Kreislaufversagen unterschiedlicher Ursache auf zahlreichen Intensivstationen Deutschlands Einzug. Man erhoffte sich im Vergleich zu anderen Katecholaminen zusätzlich eine besonders günstige Auswirkung auf die Protektion der physiologischen Funktionen des Magen-Darm-Traktes und der Nieren während der Schockphase. Katecholamine verursachen entsprechend ihrer Rezeptoraffinität und dem spezifischen Rezeptorbesatz der verschiedenen organspezifischen Gefäßtypen unterschiedliche Wirkungen an den einzelnen Blutgefäßen. Die Wirkung von Dopexamin am Koronargefäßsystem wurde bisher weder in tierexperimentellen noch klinischen Studien untersucht. Dies setzten wir zum Ziel unserer Arbeit.

Mit Hilfe der Methode der in-vitro-Myographie wurde Dopexamin an frischen Präparaten des RIVA vom Schweineherzen getestet. Die isometrische Spannungsänderung der glatten Gefäßmuskulatur der Koronararterien nach Zugabe von Dopexamin mit und ohne Zusatz verschiedener vasoaktiver Substanzen wurde gemessen. Es folgte ein vergleichendes Experiment mit Dopamin. Als Präkonstriktoren wurden KCl (20mM) und zum Vergleich $\text{PGF}_{2\alpha}$ verwendet. Dopexamin bzw. Dopamin wurden in logarithmisch kumulativ steigender Dosierung von 1nM-1mM zugesetzt. Zuvor erfolgte die Inkubation mit einem entsprechenden Rezeptorenblocker. Die Ergebnisse wurden grafisch als nichtlineare Regressionskurven dargestellt. Die daraus ermittelten halbmaximalen Effekte (EC_{50}) werden in Form des negativen dekadischen Logarithmus miteinander verglichen.

Wir gingen von der Hypothese aus, durch Zugabe von Dopexamin eine Änderung der Kontraktilität hervorzurufen. Dabei vermuteten wir, eine Gefäßerweiterung auszulösen. Diese Vermutung stützte sich auf die in der Studienliteratur vielfach nachgewiesene agonistische Wirkung von Dopexamin an β_2 - und Dopamin(DA_1)-Rezeptoren sowie auf dessen Wirkung als Reuptake-1-Hemmer. Zusätzlich wurde ein agonistischer Effekt auf die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle der Muskelzell-

membran mit nachfolgender Hyperpolarisation beschrieben, die ebenfalls zu einer Vasodilatation führt.

Die vorliegende Arbeit erbrachte das unerwartete Resultat, dass Dopexamin an den Koronararterienpräparaten des Ramus interventricularis anterior (RIVA) des Schweineherzens eine Vasokonstriktion hervorruft. Nach Zugabe von Dopamin trat eine Dilatation der Gefäßringe auf.

In der Versuchsreihe mit KCl-Lösung als Präkonstriktor und α 1-Blockade (Prazosin) war die durch Dopexamin ausgelöste Kontraktion signifikant schwächer, als ohne vorherige Rezeptorblockade. Gleiche Ergebnisse wurden nach Blockade der β -Rezeptoren (Propranolol) und der Dopamin-1-Rezeptoren (SCH23390) erzielt. Eine mögliche Ursache für die abgeschwächte Reaktion unter α 1-Blockade könnte eine durch Dopexamin ausgelöste Noradrenalin-wiederaufnahmehemmung sein.

Die EC_{50} -Werte von Dopexamin unter Präkontraktion mit KCl und $PGF_{2\alpha}$ unterschieden sich nicht signifikant. Im Unterschied zur Vorkontraktion mit KCl hatten die verschiedenen Rezeptorantagonisten im Versuch an mit $PGF_{2\alpha}$ vorkontrahierten Präparaten keinen Einfluss auf die dopexamininduzierte Kontraktion.

Eindrucksvoll war die signifikante Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Dopexamin sowohl unter Zusatz des selektiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Verapamil als auch im kalziumfreien extrazellulären Milieu.

(Verapamil: $EC_{50} = 2,54 \pm 1,68$; Kontrolle: $EC_{50} = 4,38 \pm 0,23$; $P < 0,0001$),

(kalziumfrei: $EC_{50} = 3,97 \pm 0,3$; Kontrolle: $EC_{50} = 4,30 \pm 0,36$; $P < 0,0001$).

Vollständig konnte die Dopexamin-vermittelte Kontraktion jedoch weder durch Kalziumkanalblockade noch durch kalziumfreie extrazelluläre Bedingungen verhindert werden. Dies spricht für zusätzliche, vom extrazellulären Kalziumhaushalt unabhängige Steuerungsmechanismen, in denen Dopexamin kontrahierend wirkt. Eine Aktivierung der Proteinkinase C mit nachfolgender Aktivierung des IP_3 - und RyR-Rezeptors am Sarkoplasmatischen Retikulum wäre ein möglicher vom Kalziumeinstrom unabhängiger Reaktionsweg (Abb.4).

Im Versuch mit endothelfreien Präparaten stellte sich eine geringfügige, wenn auch signifikante Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Dopexamin dar. Dies zeigt, dass das Endothel nicht hauptsächlicher Wirkort des Dopexamins ist. Es ist jedoch über eine Aktivierung der endothelabhängigen Endothelin-1-

Produktion nicht nur durch endogene Katecholamine, sondern auch durch Dopexamin eine Verstärkung der kontraktilen Wirkung in Betracht zu ziehen.

Literaturverzeichnis

1. Adams HA. (2005) Zu Diagnostik und Therapie der Schockformen. Empfehlungen der interdisziplinären Arbeitsgruppe der DIVI-Teil 5. Anästh Intensivmed 48:285-295
2. Amenta F, Ricci A, Napoleone P, Vyas SJ, Lokhandwala MF. (1991) Anatomical localisation of the binding and functional characterisation of responsiveness to dopexaminehydrochloride in the rat mesenteric vasculature. Pharmacology 42:211-222
3. Angus JA, Cocks T. (1996). Pharmacology of human isolated large and small coronary arteries. In: Garland CJ, Angus JA (Hrsg.) Pharmacology of vascular smooth muscle. UK: Oxford University Press. ISBN 01926 2387 7, 276-305
4. Bach F, Silomon M, Grundmann U, Sturner J, Graeter T, Larsen R. (1999) Effects of dopexamine on splanchnic perfusion in cardiac surgery. Anaesthesist 48:713-7
5. Barany M. (1996) Biochemistry of smooth muscle contraction. Academic Press, Division of Harcourt Brace & Company San Diego, California
6. Barbato E, Piscione F, Bartunek J, Ganaro G, Cirillo P, De Luca G, Laccarino G, De Bruyne B, Chiariello M, Wijns W. (2005) Role of beta2 adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. Circulation 111:288-94
7. Bass AS. (1992) Presynaptic effects of dopexamine hydrochloride in the canine kidney. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 345:33-6

8. Baumgart D, Haude M, Gorge G, Liu F, Ge J, Groe-Eggebrecht C, Erbel R, Heusch G. (1999) Augmented α -adrenergic constriction of arteriosclerotic human coronary arteries. *Circulation* 99:2090-7
9. Berendes E, Mollhoff T, Van Aken H, Schmidt C, Erren M, Deng M C, Weyand M, Loick HM. (1997) Effects of dopexamine on creatinine clearance, systemic inflammation, and splanchnic oxygenation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Anesth Analg* 84:950-7
10. Birnbaum J, Lehmann C, Taymoorian K, Krausch D, Wauer H, Grundling M, Spies C, Kox WJ. (2003) The effect of dopexamine and iloprost on plasma disappearance rate of indocyanine green in patients in septic shock. *Anaesthesist* 52:1014-9
11. Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, Lorenz B, Stuebs P, Vargas Hein O, Grundling M, Pavlovic D, Usichenko T, Wendt M, Kox W, Lehmann C. (2006) Effects of dopexamine on the intestinal microvascular blood flow and leucocyte activation in a sepsis model in rats. *Crit Care* 10: R117
12. Biro GP, Douglas JR, Keon WJ, Taichman GC. (1988) Changes in regional blood flow distribution induced by infusions of dopexamine hydrochloride or dobutamine in anesthetized dogs. *Am J Cardiol* 62: 30C-36C
13. Bockman CS, Jeffries WB, Abel PW. (1993) Binding and functional characterisation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1126-33
14. Brodde OE, Michel MC. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol reviews* 51: 651-688
15. Brown RA, Dixon J, Farmer JB, Hall JC, Humphries RG, Ince F, O'Connor, Simpson WT, Smith GW. (1985) Dopexamine: a novel agonist at peripheral dopamine receptors and β_2 - receptors. *Br J Pharmacol* 85: 599-608

16. Brown RA, Farmer JB, Hall JC, Humphries RG, O'Connor SE, Smith GW. (1985) The effects of dopexamine on the cardiovascular system of the dog. *Br J Pharmacol* 85: 609-619
17. Cain A, Tanner DM, Khalil RA. (2002) Endothelin induced Enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent $[Ca^{2+}]_i$ sensitization pathways. *Hypertension* 39: 543-549
18. Carey EL, Robertson D, Wells JN, Robertson RM. (1995) Contraction of isolated porcine coronary arteries is inhibited by high concentrations of propranolol. *Angiology* 46 :453-60
19. Chutkow WA. (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of sur 2 K_{ATP} - channels. *J Clin Invest* 110: 203-208
20. Dallas A, Khalil RA. (2003) Ca^{2+} antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction involves activation of ϵ -protein kinase C dependent pathway. *Am J Physiol* 285: C1454-C1463
21. Eldridge R, Casida JE. (1995) Cantharidin Effects on Protein Phosphatase and the Phosphorylation State of phosphoproteins in mice. *Toxicology and applied Pharmacology* 130: 95-100
22. El Mokhtari NE, Arlt A, Meissner A, Lins M. (2007) Inotropic therapy for cardiac low output syndrome: comparison of hemodynamic effects of dopamine/dobutamine versus dopamine/dopexamine. *Eur J Med Res* 12: 563-7
23. Engel G. (1991) Pharmakologische Charakterisierung eines endothelialen relaxierenden 5-Hydroxytryptaminrezeptors in der Koronararterie des Schweines. Inauguraldissertation der Rheinischen Friedrich- Wilhelm- Universität Bonn: 31
24. Fitton A, Benfield P. (1990) Dopexamine hydrochloride A review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties and therapeutic potential in acute cardiac insufficiency. *Drugs* 39: 308-330

-
25. Fröse R, Lehtipalo S, Bergstrand U, Biber B, Winsö O, Johansson G, Arnerlov C. (2004) Local metabolic effects of dopexamine on the intestine during mesenteric hypoperfusion. *Shock* 21: 241-7
26. Fukuda S, Takashi TH, XU H, Kinoshita H, Nishimaki H, Kokubun S, Fujiwara N, Fujihara H, Shhimoji K. (1999) Enhanced β -receptor-mediated vasorelaxation in hypoxic pig coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: 1447-1452
27. Fukumitsu T, Hayashi H, Tokuno H, Tomita T. (1990) Increase in calcium channel current by β -adrenoceptor agonists in single smooth muscle cells isolated from porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 100: 593-599
28. Germann R, Haisjackl M, Schwarz B, Deusch E, Meusburger S, Gruber E, Pajk W, Hausdorfer H, Bonatti J, Furtner B, Ulmer H, Hasibeder W. (1997) Inotropic treatment and intestinal mucosal tissue oxygenation in a model of porcine endotoxemia. *Crit Care Med* 25 :1191-7
29. Guimaraes S, Moura D. (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53:319-356
30. Goldberg LI, Bass AS. (1988) Relative significance of dopamine receptors, beta adrenoceptors and norepinephrine uptake in the cardiovascular actions of dopexaminehydrochlorid. *Am J Cardiol* 62:37C-40C
31. Han G, Kryman JP, McMillin PJP, White RE, Carrier GO. (1999) A novel transductions mechanism mediating Dopamine-induced vascular relaxation: opening of BK_{Ca} channels by cyclic AMP-induced stimulation of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Cardiovasc Pharm* 34:619-627
32. Hapke von HJ, Höll C. (1988) Dopaminwirkung auf die Coronargefäße des Schweines. *Dtsch tierärztl Wschr* 99:66-69
33. Hildebrand LB, Krejci V, Sigurdsson GH. (2004) Effects of dopamine, dobutamine, and dopexamine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract during sepsis and anesthesia. *Anaesthesiology* 100:1188-97

-
34. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Rev* 76:967-1003
35. Horst MA, Robinson CP. (1985) Action of agonists and antagonists on adrenergic receptors in isolated porcine coronary arteries *Can J Physiol Pharmacol* 63:867-71
36. IPSEN PHARMA (1991) Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse. In: Dopacard® Produkt-Monographie:68-74
37. Jacob SM, Takala J.(2000) Gut perfusion in the critically ill. *Intensive Care Med* 26:813-815
38. Kanashiro CA, Altirkawi KA, Khalil RA. (2000) Preconditioning of coronary artery against vasoconstriction by endothelin-1 and prostaglandin F₂α during repeated downregulation of epsilon-protein kinase C. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:491-501
39. Kesteren van RG, Heethaar RM, Charbon GA, Heethaar J, Brouwer FAS.(1993) Comparison of effects of dopamine hydrochloride and dopexamine hydrochloride on abdominal and femoral hemodynamics in anaesthetized dogs. *Circ Shock* 40:227-233
40. Knapp J, Boknik P, Linck B, Luss H, Müller FU, Peteronjes L, Schmitz W, Neumann J. (2000) Cantharidin enhances Norepinephrin- induced vasoconstriction in endothel-depended fashion. *J Pharmacol Exp Ther* 294:620-626
41. Knapp J, Boknik P, Huke S, Luss H, Müller F U, Müller T, Nacke P, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J. (1998) The mechanism of action of cantharidin in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 123:911-919
42. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr. (1967a) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*. 214:597-8

-
43. Lehtipalo S, Biber B. (2002) Does dopexamine influence regional vascular tone and oxygenation during intestinal hypotension? *Acta Anaesthesiol Scand* 46:1217-1226
44. Li PL, Jin NM, Cambell WB (1998) Effect of selective inhibition of soluble guanylyl cyclase on K(Ca)channel activity in coronary artery smooth muscle. *Hypertension* 31:303-308
45. Mazzuco TL, Dias M A, Calixto JB. (1999) Characterisation of the mechanism involved in the relaxant response of dopexamine in guinea pig pulmonary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharm* 33:86-92
46. Martin SW, Broadley KJ. (1994) Effects of chronic intravenous infusions of dopexamine and isoprenaline to rats on D₁-, β_1 - and β_2 -receptor-mediated responses. *Br J Pharmacol* 112:595-603
47. Martin SW, Broadley KJ. (1995) Atypical antagonism of D₁-receptor-mediated vasodilator response in the perfused kidney by SCH23390. *Pharmacol Res* 31:289-97
48. Mitchell PD, Smith GW, Wells E, West PA. (1987) Inhibition of uptake-1 by dopexamine hydrochloride in vitro. *B J Pharmacol* 92:265-270
49. Moppett IK, Wild MJ, Sherman R W, Latter JA, Miller K, Mahajan RP. (2004) Effects of ephedrine, dobutamine and dopexamine on cerebral haemodynamics: transcranial Doppler studies in healthy volunteers. *Br J Anaesth* 92:39-44
50. Nakas-Ićindić E, Zaciragić A, Hadzović A, Avdagić N. (2004) Endothelin in health and disease. *Bosn J Basic Med Sci* 4:31-4
51. Nari Kim, Jin H, Euiyong K. (2003) Effects of Prostaglandin F_{2 α} in rabbit middle cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 248:H1018-H1027

52. Nedergaard OA. (1994): Effect of dopexamine hydrochloride on contractions of rabbit isolated aorta evoked by various agonists. *Pharmacology & Toxicology* 74:43-49
53. Nedergaard OA. (1989) Inhibition of ^3H -noradrenaline accumulation by dopexamine hydrochloride in isolated aorta of the rabbit. *Naunyn- Schmiedeberg`s Arch Pharmacol* 340:270-273
54. Nedergaard OA. (1996) Effect of dopexamine hydrochloride on sympathetic neuroeffector transmission in rabbit isolated pulmonary artery. *Pharmacology & Toxicology* 78:161-166
55. Nelson MT, Quayle JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 268:C799-C822
56. Oberbeck R. (2006) Catecholamines: Physiological immunomodulators during health and illness. *Curr Med Chem* 13:1979-1989
57. Oberbeck R, Schmitz D, Schüler M, Wilsenack K, Schedlowski M, Exton M. (2004) Dopexamine and cellular immune functions during systemic inflammation. *Immunbiol* 208:429-438
58. O'Donnell SR, Wanstall JC. (1984) The classification of beta-adrenoceptors in isolated ring preparations of canine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 81:637-44
59. Osswald W, Guimaraes S. (1983) Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 96:53-122
60. Oliver G, Schafer E A. (1895) The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *J Physiol* 18:230-276

61. Ozono R, O'Connell DP, Vaughan C, Botkin SJ, Walk SF, Felder RA, Carey RM. (1997) Localization of the Dopamine D₁ Receptor Protein in the Human Heart and Kidney. *Hypertension* 30:725-729
62. Park GR, Couzens S, Hoskins RD. (1992) The effects of inotropes on platelet numbers and function. *Clin Intensive Care* 3:160-165
63. Pearse RM, Belsey JD, Cole JN, Bennett ED. (2008) Effect of dopexamine infusion on mortality following major surgery: individual patient data meta-regression analysis of published clinical trials. *Crit Care Med* 36:1323-9
64. Pfitzer G. (2001) Signal transduction in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91:497-503
65. Ralph CJ, Tanser SJ, Macnaughton PD, Sinclair DG. (2002) A randomised controlled trial investigating the effects of dopexamine on gastrointestinal function and organ dysfunction in the critically ill. *Intensive Care Med* 28:884-890
66. Rudner XL, Berkowitz DE, Booth JV, Funk BL, Cozart KL, D'Amico EB, El-Moalem H, Page SO, Richardsen CD, Winters B, Marucci L, Schwinn DA. (1999) Subtype specific regulation of human vascular α_1 -adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* 100:2336-2343
67. Sack FU, Reidenbach B, Schledt A, Dollner R, Taylor S, Gebhard MM, Hagl S. (2002) Dopexamine attenuates microvascular perfusion injury of the small bowel in pigs induced by extracorporeal circulation. *Br J Anaesth* 88:841-7
68. Sahni D, Kaur GD, Jit H, Jit I. (2008) Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. *Indian J Med Res* 127:564-570
69. Sanders KM. (2001) Signal transduction in smooth muscle, invited review: Mechanism of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 91:1438-1449

-
70. Scheeren TW, Schwarte LA, Loer SA, Picker O, Fournell A. (2002) Dopexamine but not dopamine increases gastric mucosal oxygenation during mechanical ventilation in dogs. *Crit Care Med* 30:881-7
71. Schütz W, Anhäupel A, Gauss A. (2000) Grundsätze der Katecholamintherapie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 35:67-81
72. Seguin P, Laviolle B, Guinet P, Morel I, Mallédant Y, Bellissant E. (2006) Dopexamine and norepinephrine versus epinephrine on gastric perfusion in patients with septic shock: a randomized study. *Crit Care* 10:R32
73. Sherry E, Tooley MA, Bolsin SN, Monk CR, Willcox J. (1997) Effect of dopexamine hydrochloride on renal vascular resistance index and haemodynamic responses following coronary artery bypass graft surgery. *Eur J Anaesthesiol* 14:184-9
74. Smith GW, O'Connor SE. (1988) An introduction in pharmacologic properties of Dopacard (dopexamine hydrochloride). *Am J Cardiol* 62:9C-17C
75. Snyder B. (2005) Where are the new drugs? *Lens* Juli 2005
www.mc.vanderbilt.edu/lens
76. Sozzani S, Agwu DE, McCall CE, O'Flaherty JT, Schmitt JD, Kent JD, McPhail LC. (1992) Propranolol a Phosphatidase Phosphohydrolase inhibitor, also inhibits Protein Kinase. *J of Biological Chemistry* C 267: 20481-20488
77. Starke K, Palm D. (1996) Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K.(Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spectrum Akademischer Verlag, 7.Auflage, Heidelberg Oxford Berlin, 161-200
78. Stephan H, Sonntag H, Henning H, Yoshimine K. (1991) Cardiovascular and renal haemodynamic effects of dopexamine: comparison with dopamine. *Br J Anaesth* 166:528-9

79. Sun D, Huang A, Mital S, Kichuk MR, Marboe CC, Addonizo LJ, Michler RE, Koller A, Hintze TH, Kaley G. (2002) Norepinephrine elicits β_2 -receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation* 106:550-555
80. Teschemacher A, Reinhardt D, Lemoine H. (1998) Do parasympatholytic effects of long-acting beta 2-sympathomimetics contribute to their relaxant effects in airway smooth muscle cells? *Pulm Pharmacol Ther* 11:253-61
81. Mann T. *Der Zauberberg*. Fischer-Taschenbuchverlag Frankfurt 1991, ISBN 3-596-29433-9
82. Toda N, Enokibori M, Matsumoto T, Okamura T. (1993) Responsiveness to dopamine of isolated epicardial coronary arteries from humans, monkeys and dogs. *Anesth Analg* 77:526-32
83. Usichenko TI, Foellner S, Gruending M, Feyerherd F, Lehmann C, Wendt M, Pavlovic D. (2006) Akrinor-induced relaxation of pig coronary artery in vitro is transformed into alpha1-adrenoreceptor-mediated contraction by pretreatment with propranolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:450-5
84. Valle-Rodriguez A, Lopez-Barneo J. (2003) Ca^{2+} channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca^{++} influx. *EBMO Journal* 22:4337-4345
85. Vyas SJ, Apparsundaram S, Ricci A, Amenta F, Lokhandwala MF. (1991) Biochemical, autoradiographic and pharmacological evidence for the involvement of tubular DA-1 receptors in the natriuretic response to dopexamine hydrochloride. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 343:21-30
86. Vyas SJ, Lokhandwala MF. (1989) Role of tubular dopamine-1 receptors in the natriuretic response to dopexamine. *Pharmacologist* 31:188

87. Wang WZ, Zhao RR, Qin FZ. (1994) Comparison of the effects of dopamine₁- and dopamine₂-receptor agonists on the cAMP generating system in canine coronary and renal arteries. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:691-6
88. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. (1986) A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 20:907-17
89. Yamada S, Kashiwabara T, Yamazawa T, Harada Y, Nakayama K. (1988) Demonstration of β_1 - adrenoceptor mediating relaxation of porcine coronary artery by radioligand binding and pharmacological methods. *Life sciences* 43:1999-2006
90. Yamada S, Yamazawa T, Harada Y, Yamamura HI, Nakayama K. (1988) Muscarinic receptor subtype in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 150:373-6
91. Yamaguchi I, Jose PA, Mouradian M, Canessa LM, Monsma FJ, Sibley DR, Takeyasu K, Felder RA. (1993) Expression of dopamine D_{1A} receptor gene in proximal tubule of rat kidneys. *Am J Physiol* 264:F280-F285
92. Yan M, Zhang Y. (1998) Functional assessment of α_1 -adrenoceptor subtypes in porcine coronary artery. *Clin Pharmacol Exp Physiol* 25:682-685

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	G-Protein gekoppelter Rezeptor (75)5
Abbildung 2:	Strukturformel für Dopamin (36)9
Abbildung 3:	Strukturformel für Dopexamin Dihydrochlorid (36)9
Abbildung 4:	Hauptwege des Kalziumtransportes in der Zelle und der intrazellulären Freisetzung (69)17
Abbildung 5:	Wichtige neuronale und humorale Effektorsysteme, die den peripheren Gefäßtonus regulieren (77)18
Abbildung 6:	Schweineherz21
Abbildung 7:	Koronararterienring des RIVA, Schweineherz21
Abbildung 8:	In-vitro- Meßvorrichtung (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)22
Abbildung 9-1:	Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von Dopexamin und Dopamin.29
Abbildung 9-2:	Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von Dopexamin mit und ohne Endothel30
Abbildung 9-3:	Dopexamin unter Zusatz von Prazosin, Propranolol, SCH23990, Kontrolle ohne Antagonist32
Abbildung 9-4:	Wirkung von Cantharidin auf die Dosis-Wirkungs-Kurve von Dopexamin35
Abbildung 9-5:	Wirkung von Dopexamin unter Blockierung des PKG- Signaltransduktionsweges mit ODQ36
Abbildung 9-6:	Effekt von Verapamil auf die Dosis- Wirkungs-Kurve von Dopexamin38

Abbildung 9-7: Wirkung von Dopexamin in kalziumfreiem Milieu an vorkontrahierten (KCl) und nicht vorkontrahierten Arterienringen.39
Abbildung 9-8: Vergleich der Dopexaminwirkung bei Vorkontraktion mit KCl und PGF _{2α}41
Abbildung 9-9: Kontraktionskraft bei identischer Dopexaminkonzentration (100μM) unter Präkontraktion mit PGF _{2α} bzw. KCl42
Abbildung 9-10: Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung von Dopamin unter KCl- bzw. PGF _{2α} -Vorkontraktion43
Abbildung 9-11: Dopexamin unter Zusatz von Propranolol, Prazosin, SCH23390 nach Vorkontraktion mit PGF _{2α}44
Abbildung 9-12: Vergleich frischer Arterienpräparate mit gekühlt gelagerten (für 24 h)45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: relative Wirkstärke einzelner Sympathikomimetika an Adrenorezeptoren (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) und Dopaminrezeptoren (DA ₁ , DA ₂) (71)7
Tabelle 2: modifizierte Krebs-Henseleit- Pufferlösung24
Tabelle 3: Übersicht über die Rezeptorantagonisten und deren Beeinflussung der Dopexaminwirkung, Präkontraktion mit 20mM KCl-Lösung40

Liste der Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AT1	Angiotensin1
BK _{Ca} ²⁺ -Kanäle	spannungsabhängige, kalziuminduzierte Kaliumkanäle
Ca ²⁺	ionisiertes Kalzium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläres Kalzium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPI -17	Proteinkinase C-stimuliertes Inhibitorprotein
DA1- oder D1-Rezeptor	Dopamin-1-Rezeptor
DAG	1,2-Diacylglycerol
EC50	negativer Logarithmus der molaren Konzentration eines Agonisten/Antagonisten, die die halbmaximale Wirkung hervorruft
ETA- Rezeptor	Rezeptor für Endothelin1 in der glatten Muskulatur
EZR	Extrazellularraum
GC-A	Guanylatzyklase A
GC-S	lösliche Guanylatzyklase
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
IL6	Interleukin 6
InsP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IZR	Intrazellularraum
KCl	Kaliumchloridlösung
LAD	Left anterior descending artery
L-Typ- Ca ²⁺ -Kanal	spannungsabhängiger long lasting Kalziumkanal
MEGX-Test	Bestimmung von Monoethylglycinxylylidid (Leberfunktionstest)

MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
NO	Stickstoffmonoxid
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck des in Flüssigkeit gelösten Kohlendioxides
PDR	Plasma disappearance rate
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PKA/PKC	Proteinkinase A/ Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phosphoinositid –spezifische Phospholipase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck des in der Flüssigkeit gelösten Sauerstoffes
RIVA	Ramus interventricularis anterior
rMLC	regulatorische Myosinleichtketten
RyR-Rezeptor	Ryanodinrezeptor
SEM	Standartabweichung des Mittelwertes
SERCA	sarkoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Typ Ca ²⁺ Kanal	spannungsabhängiger transienter Kalziumkanal
TEA	Tetraethylammonium
4-AMP	4-Aminopyridin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Dresden, den 03.07.2009

Lebenslauf

Name:	Ingrid Hackenberg
Geburtsdatum:	29. 10. 1967
Geburtsort	Freiberg
Wohnort:	01187 Dresden Pestitzer Str.12
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder (17 Jahre)
Schulabschluß:	1986 Abitur
1986 - 1987	Praktisches Jahr in der Frauenklinik Freiberg
Studium	
1987 -.1994	Medizinstudium an der Friedrich -Schiller- Universität Jena
1993 - 1994	Praktisches Jahr anteilig je 4 Monate -in der psychiatrischen Tagesklinik der Medizinischen Akademie Dresden -in der Klinik für Innere Medizin und der Klinik für Kinderheilkunde des KH Dresden Neustadt - in der Chirurgischen Klinik des KH Dresden Friedrichstadt
Berufliche Tätigkeit	
1994 - 1998	Assistenzärztin in der Chirurgischen und Anästhesiologischen Klinik des KH Freital
1998 - 2007	Anästhesistin in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des KH Dresden Friedrichstadt, seit 2001 Fachärztin
2003	Subspezialisierung für Anästhesiologische Intensivmedizin
Oktober 2003-Januar 2004	Studienaufenthalt an der Klinik für Anästhesie der Universität Greifswald
seit 2007	Anästhesistin in der Anästhesiologischen Abteilung der Sächsischen-Schweiz-Klinik Sebnitz

Danksagung

Für die unkomplizierte fachliche Unterstützung und Betreuung danke ich Dr. med. habil. Dragan Pavlovic. Es ist ihm gelungen, in mir das Feuer des wissenschaftlichen Forscherdranges zu entfachen und auch meiner klinischen Tätigkeit neue Aspekte hinzuzufügen. Dem gesamten Team des wissenschaftlichen Labors möchte ich für die guten Arbeitsbedingungen danken.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. med. habil. Taras Usichenko, der maßgeblichen Anteil an der Ideenfindung zu diesem Dissertationsthema hatte und supervidierend gewirkt hat.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. Kerlikowsky und den Mitarbeitern des medizinischen Labors des Schlachthofes in Retzlow für die Hilfe bei der Beschaffung der Schweineherzen.

Nicht zuletzt möchte meine Familie und meine Freundin Katrin Knösel erwähnen. Mein Mann hat die Arbeit korrigierend durchgelesen, meine Freundin hat mich während meines Forschungsaufenthaltes in Greifswald beherbergt und meine Kinder haben die Zeiten der erhöhten Selbständigkeit mit Bravour überstanden.