

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Wendt)
der Universitätsmedizin Greifswald

**Effekte von Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin auf die glatte
Muskulatur der Rattenaorta – *in vitro***

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
Greifswald
2011

Vorgelegt von: Silvia Ribback
geboren am 25.11.1983 in Forst (Lausitz)

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

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

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Helge Frieling

Ort, Raum: Hörsaal des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Disputation: 04. November 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
1. Einleitung	7
1.1 Antidepressiva: Wirkmechanismen und Einfluss auf den Blutdruck	8
1.1.1 Amitriptylin	8
1.1.2 Fluoxetin	8
1.1.3 Tranylcypromin	8
1.1.4 Venlafaxin	9
1.2 Struktureller Aufbau arterieller Gefäße	9
1.3 Aufbau des Kontraktionsapparates der glatten Muskelzelle	10
1.4 Kontraktionsablauf	10
1.5 K ⁺ -Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur	11
1.6 Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration: pharmakomechanische und elektromechanische Kopplung	11
1.7 Blutdruckregulation	13
1.8 Endothelabhängige Vasodilatation	13
1.8.1 Freisetzung von Stickoxid aus dem Endothel	13
1.8.2 Stickoxidabhängige Relaxation der Gefäßmuskulatur	14
1.8.3 Weitere vasoaktive Funktionen des Endothels	15
1.9 Isotonische Myotonometrie an isolierten Aortenringsegmenten	15
1.10 Prinzipien des verwendeten experimentellen Protokolls	15
2. Zielsetzung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Tiere	19
3.2 Präparation	19
3.3 Versuchsmethoden	20
3.3.1 Versuchsaufbau der isometrischen Myotonometrie	20
3.3.2 Chemikalien	21
3.3.3 Geräte und Zubehör	23
3.3.4 Versuchsprotokoll	23
3.3.5 Versuchsreihen	25
3.3.5.1 Relaxationsexperimente nach Vorkontraktion (Kontrollexperimente)	25
3.3.5.2 Relaxationsexperimente nach Inkubation und Vorkontraktion	25
3.3.5.2.1 Vorkontraktion mit Phenylephrin	25

3.3.5.2.2	Vorkontraktion mit Kaliumchlorid	25
3.3.5.3	Kontraktionsexperimente	26
3.4	Auswertung	27
3.5	Statistik	28
3.6	Bewertung der Ergebnisse	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Relaxationsexperimente nach Vorkontraktion (Kontrollexperimente)	30
4.1.1	Amitriptylin	30
4.1.2	Fluoxetin	30
4.1.3	Tranlycypromin	31
4.1.4	Venlafaxin	31
4.2.	Relaxationsexperimente nach Inkubation und Vorkontraktion	34
4.2.1	Vorkontraktion mit Phenylephrin	34
4.2.1.1	Amitriptylin	34
4.2.1.2	Fluoxetin	34
4.2.1.3	Tranlycypromin	35
4.2.1.4	Venlafaxin	35
4.2.2	Vorkontraktion mit Kaliumchlorid	39
4.2.2.1	Amitriptylin	39
4.2.2.2	Fluoxetin	39
4.2.2.3	Tranlycypromin	39
4.2.2.4	Venlafaxin	39
4.3	Kontraktionsexperimente	41
4.3.1	Amitriptylin	41
4.3.2	Fluoxetin	41
4.3.3	Tranlycypromin	41
4.3.4	Venlafaxin	41
5.	Diskussion	44
5.1	Zusammenfassung der vasoaktiven Effekte der Antidepressiva	44
5.1.1	Amitriptylin	44
5.1.2	Fluoxetin	47
5.1.3	Tranlycypromin	51
5.1.4	Venlafaxin	54
5.2	Diskussion der Methoden	58

5.2.1	Verwendung der Rattenaorten als Modell für endothelhaltige arterielle Gefäße	58
5.2.2	Gruppengröße n	59
5.2.3	Verwendete Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$	59
5.2.4	Nebeneffekte der verwendeten blockierenden Substanzen	59
5.2.5	Fehlende pharmakodynamische Bindungsstudien	59
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Anhang	73
8.1	Abkürzungsverzeichnis	73
8.2	Einheiten	75
8.3	Veröffentlichungen	76
8.4	Eidesstattliche Erklärung	77
8.5	Lebenslauf	78
8.6	Danksagung	79

1. Einleitung

In der Behandlung affektiver Störungen wurden trizyklische Antidepressiva immer mehr durch neuere Substanzen ersetzt, um das bei dieser Gruppe von Medikamenten häufige Auftreten kardiovaskulärer Nebenwirkungen wie Hypotension, Orthostasesstörungen, Tachykardie und Arrhythmien zu reduzieren [Glassmann *et al.*, 1993; Brahmi *et al.*, 2007]. Vor allem scheinen von der Wahl neuerer antidepressiv wirksamer Substanzen ältere Patienten zu profitieren. Aber auch die neuen Medikamente beeinflussen den Blutdruck: ihre Nebenwirkungen sind Hypotensionen, sie können eine Hypertension induzieren oder sogar verschlechtern [Pacher *et al.*, 1998]. Dies kann in Kombination mit anderen Medikamenten, z.B. Narkotika (Propofol, Ketamin, Opioide), von hoher Relevanz sein. Nach längerfristiger Einnahme von Antidepressiva können bei der Durchführung einer Narkose schwere Komplikationen wie eine schwere therapieresistente Hypotension [Sprung *et al.*, 1997] und kardiale Arrhythmien auftreten [Edwards *et al.*, 1979].

Um die Wirkungen auf den Blutdruck zu vergleichen, stellten wir Amitriptylin als Vertreter der trizyklischen Antidepressiva drei Substanzen gegenüber: Tranylcypromin, einen Monoaminoxidaseinhibitor (MAOI), Fluoxetin, einen Selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitor (SSRI), und Venlafaxin, einen Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor (SNRI).

Die meisten Untersuchungen mit diesen Medikamenten konzentrierten sich bisher auf ihre Wirkungen auf die synaptischen Übertragungen und die Rezeptorbeeinflussung im zentralen Nervensystem und im peripheren Gewebe, sowie deren Wirkungen auf die glatte Muskulatur [Huang *et al.*, 1996, Velasco *et al.*, 1999]. Direkte Effekte von Amitriptylin, Fluoxetin und Venlafaxin auf Rattenarterien bzw. das vaskuläre Endothel und die glatte Gefäßmuskulatur wurden von anderen Autoren bereits berichtet (Huang *et al.*, 1996; Pacher *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 1999). Die zugrunde liegenden vasoaktiven Mechanismen sind bislang unzureichend charakterisiert.

1.1 Antidepressiva: Bekannte Wirkmechanismen und Einfluss auf den Blutdruck

1.1.1 Amitriptylin

Amitriptylin gehört zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva [Mutschler *et al.*, 2001]. Es ist ein Derivat der trizyklischen Diphenylmethane mit einer molaren Masse von 277,4 g/mol.

Im zentralen Nervensystem hemmt es unselektiv die Wiederaufnahme von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin durch den *uptake1*-Mechanismus [Trendelenburg *et al.*, 1988].

Außerdem hat es antagonistische Eigenschaften an diversen anderen Rezeptoren: serotonergen (5-HT₂), α₁-adrenergen, histaminergen (H₁) und cholinergen Rezeptoren an post-synaptischen Nervenendigungen [Gillmann, 2007]. Zusätzlich unterdrückt es die Öffnung spannungsgesteuerter Natriumkanäle am Kaninchenherzen [Barber *et al.*, 1991].

Die anticholinerge Wirkung führt zu Mundtrockenheit, Obstipation, Akkomodationsstörungen und insbesondere zu kardiovaskulären Nebenwirkungen [Mutschler *et al.*, 2001]. Unter Gabe von Amitriptylin treten häufig Hypotension, Orthostasestörungen, Tachykardie und Arrhythmien auf [Glassmann *et al.*, 1993; Brahmī *et al.*, 2007].

1.1.2 Fluoxetin

Fluoxetin ist ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (SSRI) [Mutschler *et al.*, 2001]. Es ist ein Propylamin-Derivat und hat eine molare Masse von 309,33 g/mol.

Durch die Hemmung des Serotonintransporters (5-HT-Transporter) wirkt es als indirekter Agonist an 5-HT₂- und 5-HT₃-Rezeptoren [Preskorn *et al.*, 2004]. Zusätzlich ist es ein direkter Antagonist an 5-HT₃- [Fan *et al.*, 1994] und 5-HT_{2C}- Rezeptoren [Ni *et al.*, 1997] in Neuronen.

Unter SSRI-Therapie sieht man kaum [Roose *et al.*, 1998] bzw. schwächere hypotensive Verläufe als bei trizyklischen Antidepressiva. Kardiodepressive und vasodilatatorische Effekte wurden für Fluoxetin berichtet [Pacher *et al.*, 1998]. Allerdings soll Fluoxetin in Vergleich zu anderen SSRIs (wie Fluvoxamin, Sertralin, Citalopram mit einer Häufigkeit von 1% der behandelten Patienten) seltener diese Nebenwirkung hervorrufen [Fernandez *et al.*, 2007].

1.1.3 Tranylcypromin

Tranylcypromin ist ein Cyclopropylaminderivat [Mutschler *et al.*, 2001] und hat eine molare Masse von 133,190 g/mol.

Tranlycypromin ist ein unselektiver, irreversibler Inhibitor der Monoaminoxidasen MAO-A und MAO-B, wodurch die synaptische Konzentration von Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin im Gehirn zunimmt [Mutschler *et al.*, 2001]. Es hemmt zusätzlich die Synthese von Prostazyklin I₂ und von Arachidonsäure [Hong *et al.*, 1980].

Tranlycypromin verursacht meist eine Blutdrucksenkung [Mallinger *et al.*, 1986; O'Brien *et al.*, 1992]. Es gibt einige Fallberichte zu hypertensiven Krisen [Fallon *et al.*, 1988; Lavin *et al.*, 1993], die besonders im Zusammenhang mit Tyramin-Aufnahme ausgelöst werden [Peet *et al.*, 1981].

1.1.4 Venlafaxin

Venlafaxin ist ein Cyclohexan-Derivat [Mutschler *et al.*, 2001] mit einer molaren Masse von 277,40 g/mol.

Es ist ein selektiver Hemmer der Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin (SNRI) und in geringem Umfang auch von Dopamin. Im Gegensatz zu Amitriptylin hat es keine antagonistischen Eigenschaften an histaminergen, noradrenergen oder cholinergen Rezeptoren [Gründer *et al.*, 1996].

SNRIs wie Venlafaxin sind in Fallberichten mit steigendem Blutdruck und steigender Herzfrequenz [Fantaskey *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1996], aber auch mit der Auslösung einer Hypotension assoziiert [Johnson *et al.*, 2007]. Venlafaxin hat insgesamt aber kaum einen Einfluss auf den Blutdruck und wird als sicheres Therapeutikum mit wenigen Nebenwirkungen bezeichnet [Ballenger, 1996].

1.2 Struktureller Aufbau arterieller Gefäße

Arterielle Gefäße besitzen drei Wandschichten: die Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Intima besteht aus dem Endothel und einer darunter gelegenen Basalmembran sowie einer subendothelialen bindegewebshaltigen Schicht. Die Media enthält glatte Muskulatur, deren Zellen über *gap junctions* funktionell gekoppelt sind, und durch Regulierung der Wandspannung die Kontraktion oder Relaxation des Gefäßes erzeugt. Die in diesen Experimenten verwendeten Aorten gehören zu den Arterien elastischen Typs, d.h. dass die Media aus konzentrisch angeordneten elastischen Membranen und glatten Muskelzellen in abwechselnd geschichteten Lagen besteht [Lüllmann-Rauch, 2003]. Die Adventitia besteht aus Bindegewebe mit kollagenen und elastischen Fasern und enthält die Vasa vasorum. Hier finden sich die efferent innervierenden Nervenfasern von Sympathikus und Parasympathikus. In den Varikositäten der neuromuskulären Synapsen sind Neurotransmitter wie Noradrenalin

oder Acetylcholin gespeichert, die bei einer Erregung in den synaptischen Spalt gelangen und an die Rezeptoren der postsynaptischen Muskelzellmembran gelangen [Lüllmann-Rauch, 2003].

1.3 Aufbau des Kontraktionsapparates der glatten Muskelzelle

Die glatte Muskelzelle enthält die Myofilamente Aktin und Myosin, die in schrägen Bündeln im Zellplasma angeordnet sind. Die Aktinfilamente sind an den *dense bodies*, die α -Aktinin enthalten, untereinander verbunden. Über das aus Desmin und Vimentin bestehende Zytoskelett ist Aktin mit der Zellmembran (Sarkolemm) an den Anheftungsplaques verankert. Aktin bindet die Moleküle Tropomyosin und Calmodulin [Lüllmann-Rauch, 2003].

Das Polymer Myosin liegt in Reihen zwischen den Aktinfilamenten und ist über die Myosinköpfe an Aktin gebunden. Ein Myosinmolekül besteht aus zwei schweren Ketten (heavy chains) und je zwei regulatorischen sowie essentiellen leichten Ketten (light chains). Die schweren Ketten bestehen aus drei Regionen: dem Kopf, der Hinge-Region und dem Schwanz. Am Myosinkopf befindet sich die Bindungsstelle für Adenosintriphosphat (ATP) mit der ATPase-Aktivität [Lüllmann-Rauch, 2003].

1.4 Kontraktionsablauf

Die Grundlage der Kontraktion ist der Querbrückenzyklus. In Ruhe sind die Myosinköpfe in einem 45° -Winkel starr an Aktin gebunden. Im relaxierten Zustand ist ATP am Myosinkopf gebunden und reduziert die Affinität zu Aktin, sodass keine Verbindung zwischen Myosin und Aktin besteht. Bei Aktivierung der Myosin-ATPase wird ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) und freiem Phosphat hydrolysiert, dadurch kann Myosin locker im 90° -Winkel an Aktin binden. Nach Freisetzung des Phosphats verfestigt sich diese Bindung, die resultierende chemische Energie wird in einen "Ruderschlag" umgesetzt, in dem sich der Myosinkopf in der Hinge-region um 45° dreht, sodass Aktin in Richtung des Myosinschwanzes verschoben wird. Durch diesen Prozess an mehreren Querbrücken wird die Kraft und Bewegung des Muskels realisiert. Nach der Dissoziation des ADP-Moleküls verbleibt der Myosinkopf in einer rigiden Position am Aktinmolekül, bis erneut ATP bindet [Boron *et al.*, 2005].

Voraussetzung für die Aktivierung des Querbrückenzyklus ist ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Zuerst bindet Ca^{2+} an Calmodulin, bildet einen Komplex und aktiviert das Enzym Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK). Die MLCK phosphoryliert die regulatorische Leichtkette des Myosinmoleküls. Dadurch ändert sich die Konformation des

Myosinkopfes, die ATPase wird aktiviert und der Querbrückenzyklus kann beginnen [Hartshorne, 1987; Kamm *et al.*, 1985].

1.5 **K⁺-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur**

Von Nelson *et al.* (1995) wurden K⁺-Kanäle im arteriellen glatten Muskel in vier größere Gruppen mit Subtypen unterteilt:

- spannungsabhängige K⁺-Kanäle (K_v)
- Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle (K_{Ca})
- Einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle (K_{IR})
- ATP-sensitive K⁺-Kanäle (K_{ATP})

Spannungsabhängige K⁺-Kanäle steigern ihre Aktivität durch Depolarisation der Zellmembran der glatten Muskulatur und sind daher für die Limitierung einer weiteren Membrandepolarisation in Arterien verantwortlich. Durch anhaltende Depolarisation werden K_v inaktiviert. K_v werden selektiv durch *4-Aminopyridin (4-AP)* und in höheren Konzentrationen auch durch *Tetraethylammonium (TEA)* blockiert.

Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle (meist Maxi-K_{Ca}-Kanäle mit sehr schneller Leitfähigkeit für K⁺) werden durch den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und Membrandepolarisation aktiviert. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des myogenen Tonus in Arterien. K_{Ca} werden durch *TEA* und *Charybdotoxin* blockiert.

K_{IR} werden durch Hyperpolarisation aktiviert und leiten K⁺-Ströme nach intrazellulär, um einer zu starken Negativierung des Membranpotentials entgegen zu wirken.

ATP-sensitive K⁺-Kanäle schließen bei Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration, womit eine Depolarisation der Zellmembran ausgelöst wird. Sie werden durch ADP aktiviert. Somit reagieren sie auf Veränderungen des metabolischen Status der Zelle, aber auch auf endogene Vasodilatoren und Medikamente. *Glibenclamid* blockiert selektiv K_{ATP} [Nelson *et al.*, 1995].

1.6 **Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration: pharmakomechanische und elektromechanische Kopplung**

In der glatten Muskulatur erfolgt die Kontraktion bzw. Relaxation durch einen Anstieg bzw. Abfall der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Ca²⁺ stammt hauptsächlich aus dem Extrazellulärraum, intrazellulärer Speicher ist zusätzlich das sarkoplasmatische Retikulum [Somlyo *et al.*, 1989]. Bei der Kalziumregulation wird die pharmakomechanische von der elektromechanischen Kopplung unterschieden [Somlyo *et al.*, 1968; Itoh, 1991, Lamb, 2000].

Unter der pharmakomechanischen Kopplung versteht man eine rezeptorgesteuerte Kontraktion der glatten Muskulatur, die ohne eine Änderung des Membranpotentials ausgelöst wird. Die Rezeptoragonisten (Pharmaka, Neurotransmitter oder Hormone wie beispielsweise Phenylephrin, Noradrenalin, Serotonin und Prostaglandine) führen über eine Aktivierung von *second-messenger*-Systemen und rezeptorgesteuerten Kalziumkanälen im Sarkolemm zu einem Anstieg des zytoplasmatischen Kalziums [Schmidt *et al.*, 2004]. Durch die Transmitter des Sympathischen Nervensystems Adrenalin und Noradrenalin wird der Tonus der Gefäßmuskulatur reguliert, in Abhängigkeit der Expression der Adrenozeptor-Typen wird eine Kontraktion oder Relaxation hervorgerufen [Schmidt *et al.*, 2004].

Der wichtigste Rezeptor zur Auslösung einer Kontraktion ist der α_1 -Rezeptor [Guimaraes *et al.*, 2001]. Nach Bindung von Noradrenalin aktiviert dieser G-Protein-gekoppelt die Phospholipase C, die Phosphoinositol-Biphosphat (PIP₂) in Inositol-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ aktiviert einen Ca²⁺-Kanal im Sarkoplasmatischen Retikulum und DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche rezeptorgesteuerte Ca²⁺-Kanäle im Sarkolemm durch Phosphorylierung aktiviert und einen weiteren Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration bewirkt [Smith, 1996; Horowitz *et al.*, 1996]. *Prazosin* ist ein selektiver α_1 -Rezeptor-Blocker [Mutschler *et al.*, 2001].

Eine Relaxation der peripheren arteriellen Gefäße wird durch die Aktivierung von β_2 -Rezeptoren erreicht [Guimaraes *et al.*, 2001]. G-Protein-gekoppelt wird die lösliche Adenylatcyclase angeregt, vermehrt zyklisches AMP (cAMP) zu bilden. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche wiederum eine Ca²⁺-ATPase im Sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) anregt, Ca²⁺ vermehrt in das Sarkoplasmatische Retikulum zurückzupumpen, wo Ca²⁺ an Calreticulin gebunden wird. Zudem hemmt cAMP die MLCK direkt. Über die Plasmamembran wird Ca²⁺ zusätzlich durch den Na⁺-Ca²⁺-Exchanger sowie eine Ca²⁺-Pumpe entfernt [Boron *et al.*, 2005]. *Propranolol* ist ein unselektiver β -Rezeptorenblocker [Mutschler *et al.*, 2001], *SQ 22536* hemmt die lösliche Adenylatcyclase der glatten Muskelzellen [Fabbri *et al.*, 1991].

Die elektromechanische Kopplung im glatten Muskel setzt eine Änderung des Ruhemembranpotentials voraus, welches bei ca. -40 mV liegt und dem Gleichgewichtspotential von K⁺ entspricht. Die Blockade von K⁺-Kanälen oder eine hohe Konzentration an extrazellulärem Kalium führt durch den Anstieg an intrazellulärem K⁺ zu einer Depolarisation der Zellmembran. Diese bewirkt die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle ab einem Membranpotential von ca. -30 mV, sodass extrazelluläres Kalzium

in die Muskelzelle einströmt und die Kontraktionsmechanismen aktiviert [Karaki *et al.*, 1984]. Eine K⁺-Kanal aktivierende Substanz bewirkt hingegen einen erhöhten K⁺-Ausstrom aus der Zelle und eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle, was zu einer Relaxation des Muskels führt [Nelson *et al.*, 1995]. Im glatten Muskel spielt die Generierung von Aktionspotentialen keine Rolle, denn hier reicht eine Änderung des Potentials von ca. 3 mV, um eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des Ca²⁺-Einstroms zu bewirken [Schmidt *et al.*, 2004].

1.7 Blutdruckregulation

Der mittlere arterielle Druck ist durch das Herzzeitvolumen und den peripheren Gefäßwiderstand beeinflussbar. Eine Veränderung einer dieser beiden Größen führt zur Erhöhung bzw. Minderung des arteriellen Blutdrucks. Die Änderung des Sympathikotonus oder des Parasympathikotonus, des Herzzeitvolumens, der renalen Natrium- und Wasser-ausscheidung sowie des peripheren Widerstands sind die Regelgrößen der systemischen Blutdruckregulation [Lang *et al.*, 2008].

Bei der lokalen Regulation des Blutdrucks beeinflussen verschiedene Faktoren in der unmittelbaren Gefäßumgebung die Gefäßweite. Die myogene Regulation bezeichnet die durch Dehnung eines Gefäßes (z.B. bei Blutvolumenzunahme) ausgelöste automatische Kontraktion, den Bayliss-Effekt, des Gefäßes. Sie wird durch die Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle ausgelöst. Des Weiteren beeinflussen lokal produzierte Metabolite maßgeblich den Kontraktionszustand der Gefäßmuskulatur und somit die periphere Durchblutungssituation. So führen Sauerstoffmangel und hohe Konzentrationen von Adenosin, CO₂, H⁺- und K⁺-Ionen zu einer Vasorelaxation [Lang *et al.*, 2008].

Die wichtigste Rolle spielen endothelabhängige Relaxations- und Kontraktionsfaktoren, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben werden.

1.8 Endothelabhängige Vasodilatation

1.8.1 Freisetzung von Stickoxid aus dem Endothel

Neben der Aktivierung von β-Rezeptoren im glatten Gefäßmuskel ist die NO-abhängige Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur am wichtigsten. Furchgott *et al.* berichteten 1980, dass die Acetylcholin-induzierte Dilatation von isolierten Kaninchenarterien von der Integrität des Gefäßendothels abhängig ist. Nach Entfernung des Endothels konnten keine Relaxationen mehr durch Acetylcholin ausgelöst werden. Zunächst wurde die noch nicht identifizierte

Substanz „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) genannt. Ignarro *et al.* sowie Palmer *et al.* fanden 1987, dass EDRF NO entspricht.

Acetylcholin bindet an den M₃-Rezeptor des Endothels [Hammerström *et al.*, 1995]. Dadurch wird über ein G_q-Protein die Phospholipase C aktiviert, die IP₃ und DAG freisetzt. Über IP₃ wird die Ca²⁺-Konzentration im Endothel erhöht, die Voraussetzung der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Über Ca²⁺-Kanäle der endothelialen Zellmembran [Nilius *et al.*, 2001] kann Ca²⁺ von extrazellulär in die Zelle strömen. Die endotheliale NO-Synthase ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym und katalysiert die Umwandlung von Sauerstoff und zelleigenem L-Arginin zu NO und Citrullin [Palmer *et al.*, 1988, Alderton *et al.*, 2001]. *L-NAME* (*N^G-nitro-L-arginine methyl ester*) ist ein Prodrug des L-NNA (*N^G-nitro-L-arginine*), welches die eNOS hemmt [Dubbin *et al.*, 1990].

Viele andere Mediatoren können die endotheliale NO-Ausschüttung stimulieren, wie zum Beispiel Noradrenalin, ADH, Oxytocin, Histamin und Serotonin [Lang *et al.*, 2008]. Die endotheliale NO-Synthase kann auch durch Schubspannung (Stretching) aktiviert werden [Hutcheson *et al.*, 1996]. Die eNOS wird dabei über eine kalziumunabhängige Phosphorylierung aktiviert [Fisslthaler *et al.*, 2000].

1.8.2 Stickoxidabhängige Relaxation der Gefäßmuskulatur

Nach der Freisetzung aus dem Endothel diffundiert NO in die glatten Muskelzellen und aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC) [Ignarro *et al.*, 1986, Ignarro, 1989]. Folge ist ein Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration. *ODQ* (*1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one*) hemmt irreversibel sGC und somit die Synthese von cGMP [Olson *et al.*, 1997].

NO löst über mehrere Mechanismen eine Relaxation aus [Plane *et al.*, 1998]:

- cGMP-abhängig über Proteinkinasen und Phosphodiesterasen
- cGMP-vermittelt über eine Repolarisation der Muskelzelle durch Regulation von Ionenkanälen
- cGMP-unabhängig über eine Repolarisation durch direkte Aktivierung von Kalium-Kanälen.

Rezeptorproteine für cGMP sind cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) [Hofmann, 2005]. Diese stimulieren Ca²⁺-ATPasen sowohl im Sarkolemm als auch die SERCA, wodurch sich die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration verringert. cGMP aktiviert des Weiteren eine Proteinkinase G, welche die MLCP anregt und den Aktin-Myosin-Querbrückenzyklus direkt hemmt [Lincoln *et al.*, 1993, 2001]. cGMP reguliert auch Phosphodiesterasen [Sonnenburg *et*

al., 1994]. Es inhibiert in der glatten Gefäßmuskulatur die Phosphodiesterase 3 [Choi *et al.*, 2001], die vorwiegend die Hydrolyse von cAMP katalysiert [Juilfs *et al.*, 1999]. cGMP ändert des Weiteren über direkte Regulation von Kationenkanälen („cyclic nucleotide-gated cation channels“, CNG-Kanäle) das Membranpotential verändern [Biel *et al.*, 1999].

1.8.3 Weitere vasoaktive Funktionen des Endothels

Neben NO gibt es weitere Substanzen, die im Endothel gebildet werden und die glatte Muskulatur relaxieren. Hierbei sind Prostazykline wie Prostazyklin I₂, und EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor) wichtig [Furchgott *et al.*, 1989].

Vasokonstriktorisch wirksame, im Endothel gebildete Faktoren sind Endothelin 1, Angiotensin II, Thromboxan A₂ oder Prostaglandine [Nilius *et al.*, 2001].

1.9 Isotonische Myotonometrie an isolierten Aortenringsegmenten

Diese Technik ist eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung der Mechanismen der Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie der Regulation des arteriellen Gefäßtonus durch endotheliale oder äußere Faktoren. Grundlage ist das Gesetz von Hagen-Poiseuille. Dieses sagt aus, dass der Widerstand eines zylindrischen Gefäßes gleich $(8\eta L)/(\pi r^4)$, wobei η der Viskosität, L der Länge des Gefäßes und r dem Radius des Gefäßes entspricht, ist. Daher führt eine kleine Minderung des Gefäßdurchmessers zu einer starken Erhöhung des Gefäßwiderstandes. In arteriellen Gefäßen wird der Radius durch die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur geändert. So ist es möglich, den Effekt von vasoaktiven Substanzen auf den Blutdruck vorherzusagen: führt die Substanz zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöht sich der Blutdruck, eine Relaxation verringert den Blutdruck.

Um eine Kontraktion oder Relaxation von vaskulärer glatter Muskulatur zu demonstrieren, werden bei der isotonischen Myotonometrie Aortenringsegmente mit einem isometrischen Kraftwandler verbunden, um die Änderungen des Gefäßdurchmessers und somit der Spannung nach Gabe von den zu untersuchenden Substanzen aufzunehmen [Gonzales *et al.*, 2000].

1.10 Prinzipien des verwendeten experimentellen Protokolls

Unsere *in vitro* Studie stellt allgemeine Untersuchungen von antidepressiv wirksamen Substanzen zu ihren Einflüssen auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur dar.

Die Prüfung selbst besteht aus einer Konzentrations-Antwort-Kurve in Aortenringpräparationen, welche dem Effekt der Antidepressiva auf den Tonus nach Vorkontraktion der glatten Muskulatur entspricht. Die Vorkontraktion wird mit verschiedenen Substanzen generiert: mit hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen, dem α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin [Guimaraes *et al.*, 2001] oder Prostaglandin F_{2 α} . Dilatiert ein Antidepressivum beispielsweise nur die mittels Phenylephrin vorkontrahierten Präparationen, so ist anzunehmen, dass es hemmend auf α_1 -Adrenozeptoren wirkt.

An endothelfreien Aortenringen werden dieselben Untersuchungen durchgeführt, um eine Endothelabhängigkeit des vasoaktiven Effekts des Antidepressivums festzustellen. Dilatiert die untersuchte Substanz nur Aorten mit intaktem Endothel und endothelfreie nicht, so entspricht dies einem endothelabhängigen Relaxationsmechanismus.

Intrazelluläre Signalwege, die zu einer Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Muskulatur führen, können mit korrespondierenden Antagonisten gehemmt werden. In weiteren Experimenten werden daher zusätzlich Antagonisten an Adrenozeptoren, Hemmer des NO-cGMP-Signalweges oder K⁺-Kanal-Blocker als kurze Vorinkubation (ca. 30 Minuten) eingesetzt. Das untersuchte Antidepressivum mit dem unbekanntem Wirkmechanismus wird erneut auf seine vasoaktiven Effekte geprüft. Verursachen die blockierenden Substanzen eine Änderung der Konzentrations-Antwort-Kurve des untersuchten Antidepressivums, so interferiert es mit dem zuvor gehemmten Signalweg.

In ergänzenden Experimenten werden Aortenringsegmente mit den Antidepressiva vorinkubiert. Danach wird der Effekt des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin auf den Basistonus dieser vorinkubierten Präparationen ermittelt. Verändert sich die Konzentrations-Antwort-Kurve von Phenylephrin gegenüber den nicht inkubierten, so ist eine Interaktion mit α_1 -adrenergen Einflüssen des untersuchten Antidepressivums anzunehmen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die **Problemstellung** dieser Arbeit ist es, die Ursachen der bekannten Nebenwirkungen von Amitriptylin, Fluoxetin, Venlafaxin und Tranylcypromin auf den arteriellen Blutdruck zu definieren. Dabei wird die Rolle der peripheren Gefäßmuskulatur und des Endothels betont.

Folgende **Arbeitshypothese** wird angenommen: Die Antidepressiva Amitriptylin, Fluoxetin, Venlafaxin und Tranylcypromin beeinflussen den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur durch direkte Interaktion mit Signalkaskaden des glatten Muskels oder des Endothels.

Die **Nullhypothese** dieser Arbeit lautet: Keines der vier untersuchten Antidepressiva hat direkte vasoaktive Effekte an isolierten Rattenaortenringen.

Der **primäre Ausgangsmesspunkt** ist in unseren Untersuchungen entweder der aktive oder der basale Tonus der Gefäßmuskulatur.

Der aktive Tonus wird durch eine Vorkontraktion erreicht: Durch Verwendung des selektiven α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin [Guimaraes *et al.*, 2001] sowie des Prostaglandinrezeptoragonisten $\text{PGF}_{2\alpha}$ [Cohen *et al.*, 1994] wird die pharmakomechanische Kopplung an der glatten Muskulatur [Itoh, 1991] repräsentiert; die elektromechanische Kopplung wird durch Gabe hoher extrazellulärer K^+ -Konzentrationen [Somlyo *et al.*, 1968, Karaki *et al.*, 1984] dargestellt. **Sekundäre Messpunkte** sind die Einflüsse der Antidepressiva auf die vorkontrahierten Aortenringe in Form von Konzentrations-Antwort-Kurven. Weitere sekundäre Betrachtungen sind die Wirkungen der Antidepressiva auf präkontrahierte Aortenringe nach zusätzlichen Interventionen: nach Endothelentfernung oder nach Inkubation mit Substanzen, die Signalwege im Endothel oder in der glatten Muskulatur beeinflussen. Damit kann der Modus des bevorzugten vasoaktiven Mechanismus des jeweiligen Antidepressivums differenziert werden. Führt zum Beispiel eine Inkubation mit einer K^+ -Kanal blockierenden Substanz zu einer Verschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve eines Antidepressivums, so ist es wahrscheinlich, dass dieses über eine Beeinflussung von K^+ -Kanälen vasoaktiv wirksam ist. Zeigt sich keine Bewegung der Konzentrations-Antwort-Kurve, so ist eine Wirkung über diesen Mechanismus unwahrscheinlich.

Der basale Tonus der Rattenaorta ist **primärer Messpunkt** für **sekundäre Messungen** in Form von Konzentrations-Antwort-Kurven, die durch ansteigende Konzentrationen des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin entstehen. Zusätzliche Interventionen sind eine Endothelentfernung sowie eine Inkubation mit jeweils einem der vier Antidepressiva. Verschiebt sich zum Beispiel die Konzentrations-Antwort-Kurve von Phenylephrin durch die

Inkubation mit Amitriptylin, so ist eine Wirkung von Amitriptylin auf α_1 -Adrenozeptoren wahrscheinlich.

Folgende **Fragen** werden in dieser Arbeit erörtert:

1. Hat nur Amitriptylin eine direkte Wirkung oder haben auch die nicht-trizyklischen Antidepressiva Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin periphere Effekte auf einen vorkontrahierten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur?
2. Führen kumulative Konzentrationen des jeweiligen Antidepressivums zu einer Kontraktion oder Dilatation der Rattenaorta?
3. Ist dieser Effekt endothelabhängig und welche Rolle spielen dabei Stickstoffoxid (NO) sowie dessen intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen am Endothel?
4. Wirkt das Antidepressivum am glatten Gefäßmuskel über eine Beeinflussung von K^+ -Kanälen und damit der elektromechanischen Kopplung? Beeinflusst das Antidepressivum die pharmakomechanische Kopplung in Form einer Interaktion mit Adrenozeptoren oder Prostaglandinen?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Diese Experimente wurden in Übereinstimmung mit den lokalen Verordnungen der Universitätsmedizin Greifswald und dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland nach § 6 Absatz 1 Nr. 4 TierSchG des Bundesgesetzblattes, nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-2.3-021/06), durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden Aorten von Lewis 1A Ratten mit einem Gewicht von 250-400 g verwendet. Die Ratten wurden von der tierexperimentellen Abteilung Karlsburg geliefert. Alle Tiere wurden in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Kleintiernahrung gehalten.

3.2 Präparation

Die Tiere wurden vor der Arterienentnahme durch intraperitoneale Gabe von Trapanal® (Dosis 25-50 mg/kg) anästhesiert. Nach der Laparotomie, schnellen Exsanguation durch Durchtrennung der Bauchaorta und Thorakotomie wurde die Brustaorta entnommen und schnell in Krebs-Lösung (Zusammensetzung siehe Punkt 4.3.2) transferiert und bei Raumtemperatur weiter bearbeitet. Hier wurde sie vom umgebenen Gewebe gereinigt und in Ringe von ca. 1-2 mm Breite geschnitten. Für die Untersuchungen an endothelfreien Aortenringen wurde das Endothel mechanisch entfernt, indem mit einem angefeuchteten, mit einem Baumwollfaden umwickelten Metallstift die Innenseite der Aortenringe vorsichtig abgerieben wurde [Abbildung 1].

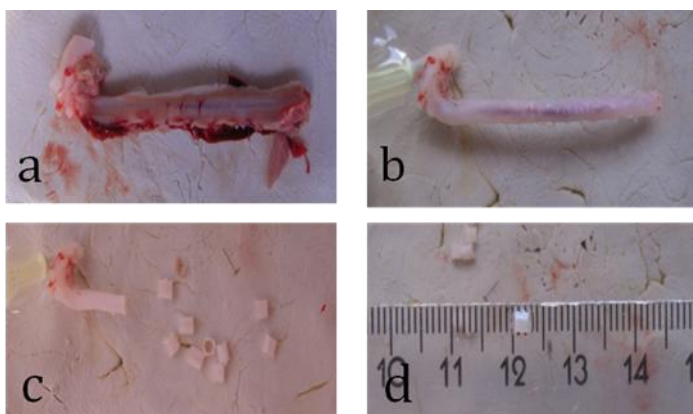


Abb. 1 Präparation der Rattenaorten (a) Aorta in Krebs-Nährlösung kurz nach Entnahme aus dem thorakalen Organpaket; (b) nach vorsichtiger Reinigung vom umgebenen Fett- und Bindegewebe; (c), (d) abgeteilte Aortenringe von 1 bis 2 mm Länge.

3.3 Versuchsmethoden

3.3.1 Versuchsaufbau der isometrischen Myotonometrie

Die Aortenringpräparationen wurden in üblicher Weise [Abbildung 2a] zwischen zwei rostfreien Stahlhaken in mit Krebs-Lösung gefüllten Glasgefäßen mit einem Fassungsvermögen von 20 ml aufgehängt und gespannt [Abbildung 2b] [Gonzales *et al.*, 2000].

Die Untersuchungen erfolgten mithilfe der isometrischen Myotonometrie: Der obere Haken, verbunden mit dem isometrischen Kraftwandler, kann durch den Mikromanipulator genau und kontrolliert in vertikaler Richtung bewegt werden, um den Aortenring bei einer ausreichenden Spannung zu stabilisieren. Das Spannungssignal wird verstärkt und mittels eines X/Y-Schreibers auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Über ein zu- und abführendes Schlauchsystem kann die Krebs-Lösung im Glasgefäß regelmäßig ausgetauscht werden. Die Begasung der Lösung mit dem 95% O₂/5% CO₂-Gemisch erfolgt über ein kleineres Schlauchsystem im oberen Gefäßabschnitt.

Die Temperatur der Krebs-Lösung wird mittels eines Wasserbades mit angeschlossenem Thermozyklationsystem auf 37 °C konstant gehalten.

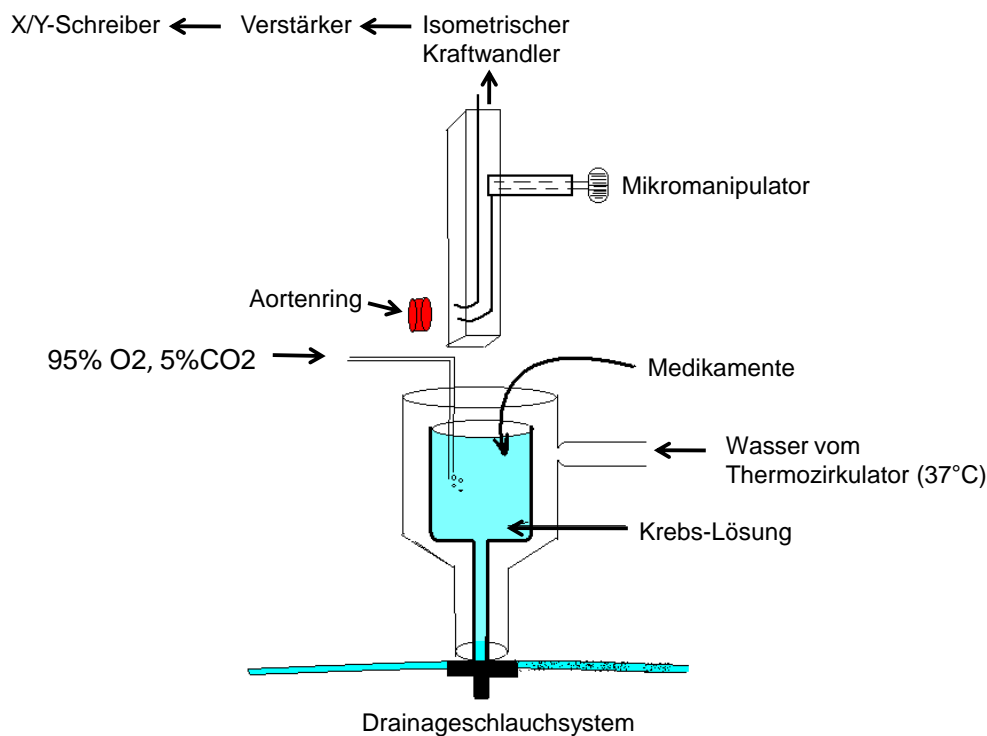


Abb. 2a. Schematische Darstellung der isometrischen Myotonometrie

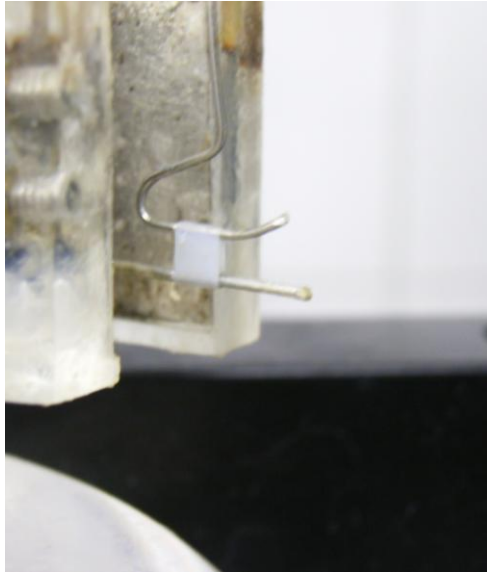


Abb. 2b. Gespannter Aortenring zwischen zwei rostfreien Stahlhaken

3.3.2 Chemikalien

Pufferlösung: Die Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung (hergestellt aus den entsprechenden Substanzen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland und destilliertem Wasser) ist in der **Tabelle 1** dargestellt.

	Normal	Modifiziert als KCl 20 mM	Modifiziert als KCl 40 mM
NaCl	113,0 mM	97,8 mM	77,8 mM
KCl	4,8 mM	20 mM	40 mM
MgCl₂	1,3 mM	1,3 mM	1,3 mM
KH₂PO₄	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
NaHCO₃	25,0 mM	25,0 mM	25,0 mM
CaCl₂	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Glucose	5,7 mM	5,7 mM	5,7 mM

Tab. 1. Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

Acetylcholin (Acetylcholinhydrochlorid)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen, Deutschland

4-Aminopyridin (4-AP)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Amitryptilin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Charybdotoxin (Chtx)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fluoxetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glibenclamid (Glib)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid (KCl, modifizierte Krebs-Lösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenylephrin (Phenylephrinhydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Prazosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propranolol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Prostaglandin F _{2α} (PGF _{2α})	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SQ 22536 (SQ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tetraethylammonium (TEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tranlycypromin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trapanal® (Thiopental)	Byk Gulden Lomberg GmbH, Konstanz, Deutschland.
Venlafaxin	Trevilor®, Wyeth Pharma GmbH, Münster, Deutschland

Eine Kapsel Trevilor® (84,84 mg) enthält: 75 mg Venlafaxin, Mikrokristallin Cellulose, Hypromellose, Ethylcellulose, Gelatine, Schellack, Propylenglykol, Titaniumdioxid (E 171), Eisen (III) Oxid (E172), Eisenoxidhydrat, Simeticone (wie vom Hersteller in der ROTEN LISTE® angegeben).

DMSO diente als Lösungsmittel für die Substanzen Venlafaxin, Glibenclamid und SQ 22536. Von Pitts *et al.* (1986) konnte gezeigt werden, dass DMSO in geringen Konzentrationen von 0,0001 bis 0,5 % keine direkten vasoaktiven Wirkungen hat. Erst in hohen Konzentrationen >1 % besitzt es vasorelaxierende Eigenschaften. In den hier durchgeführten Untersuchungen lagen die Konzentrationen unter 0,01%, sodass vasoaktive Effekte ausgeschlossen werden können.

Trapanal® (Thiopental) hat geringe vasodilatative Wirkungen [Mutschler *et al.*, 2001]. Durch das mehrmalige Waschen der Aortenringe mit Krebs-Lösung wird dieser mögliche Effekt ausgeschlossen.

3.3.3 Geräte und Zubehör

Kraftwandler	Entran, ELJ-S045C-35G, EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Verstärker	STA 2808, EMKA Technologies, Paris, Frankreich
Multikanalschreiber	Rikadenki multipen recorder, R-50 series, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glasmaterialien	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kunststoff-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen	ABIMED Analysetechnik GmbH, Langenfeld, Deutschland
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland

3.3.4 Versuchsprotokoll

Das folgende Schema illustriert das allgemeine Versuchsprotokoll [Abbildung 3]:

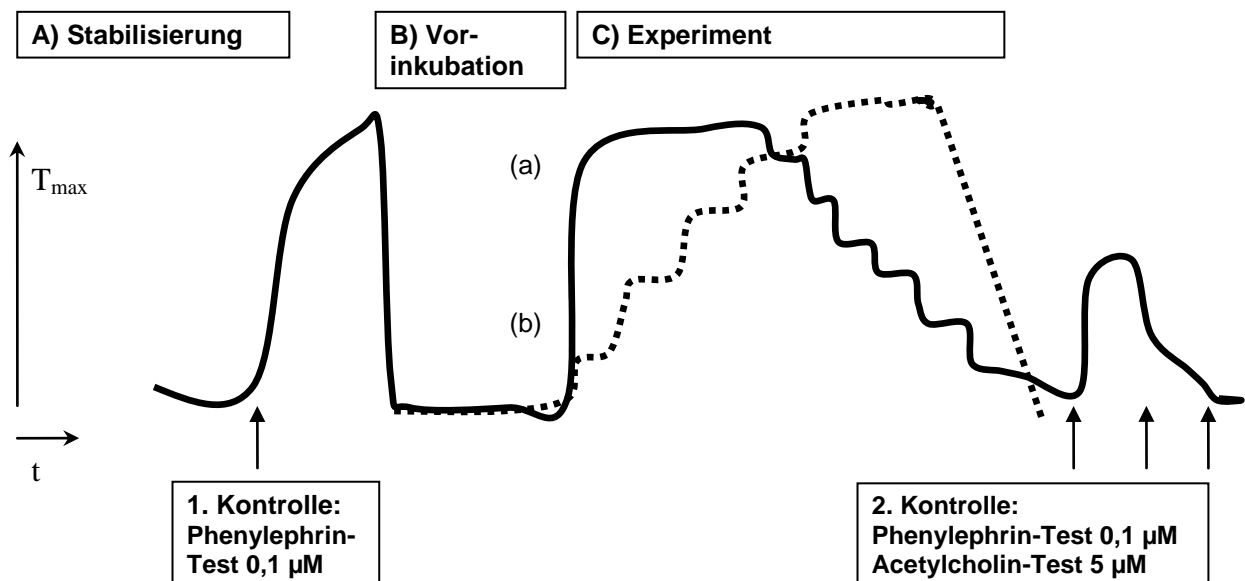


Abb. 3. Schematisiertes Versuchsprotokoll. Die vertikale Achse entspricht der maximal erreichten Spannung T_{\max} , die horizontale Achse der Zeit t .

A) Stabilisierung: Die Anpassungs- und Stabilisierungsperiode im Wasserbad (20 ml) dauerte ca. 40 bis 70 Minuten, bei langsamer Erwärmung der Krebslösung auf 37°C , pH 7,4, Begasung mit 95% O_2 /5% CO_2 -Gemisch und Austausch der Krebslösung nach jeweils 20 Minuten. Nach dieser Zeitspanne wurden die Aortenringe auf ihre optimale Länge gedehnt,

welche, in vorangegangenen Experimenten etabliert als Idealspannung und -länge, einem Zählergewicht von 2 g entspricht.

1. Kontrolle: Nach der Stabilisierungsphase wurde vor Beginn jedes Experimentes eine Phenylephrin-Test-Kontraktion (Konzentration 0,1 μM) durchgeführt, um die Vitalität und die Kontraktionsfähigkeit der Arterien für das folgende Experiment zu prüfen. Danach erfolgte das mehrmalige Waschen der Arterienringe mittels Krebs-Lösung.

B) Vorinkubation: Falls ein Inkubationsexperiment durchgeführt wurde, wurden die Rattenaorten in dieser Phase vor dem eigentlichen Experiment für ca. 20-30 Minuten mit den jeweiligen Substanzen inkubiert.

C) Experiment:

(a) - durchgehende Linie: In den Relaxationsuntersuchungen wurden die Arterien mittels Phenylephrin (Konzentration 0,1 μM), Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ (Konzentration 5 μM) oder Kaliumchloridlösung (Konzentration 20 mM bzw. 40 mM) kontrahiert und anschließend durch steigende Konzentrationen der Antidepressiva relaxiert.

(b) - gestrichelte Linie: Bei den Inkubationsexperimenten mit den Antidepressiva wurden ansteigende Konzentrationen von Phenylephrin hinzugegeben, die zu einer zunehmenden Kontraktion der Aortenringe führen.

2. Kontrolle: Nach dem Experiment wurden die Aorten mit Pufferlösung gewaschen. Um die funktionelle Integrität des Endothels zu testen, wurden nach jedem Experiment eine weitere Phenylephrin-Testkontraktion zur Vitalitätsprüfung (Konzentration 0,1 μM) und nach Erreichen des Kontraktionsplateaus zwei Testungen mit Acetylcholin (Konzentration 5 μM) durchgeführt. Bei einer Relaxation auf 50% des vorherigen Spannungsniveaus galt das Endothel als erhalten, da die Acetylcholin induzierte Vasodilatation nur über das Endothel durch die NO-Freisetzung möglich ist [Furchgott *et al.*, 1980]. Zugleich diente dieser Test als Nachweis für die erfolgreiche mechanische Endothelentfernung, wobei bei diesen Präparationen die Relaxation völlig ausbleiben musste.

3.3.5 Versuchsreihen

3.3.5.1 Relaxationsexperimente nach Vorkontraktion (Kontrollexperimente)

Kaliumchlorid (KCl) wurde in diesen Untersuchungen als modifizierte Krebslösung mit verringertem NaCl-Gehalt verwendet um die Äquimolarität zu gewährleisten. Es wurden endothelintakte und endothelfreie Aortenringe mittels einer einmaligen Gabe von Kaliumchlorid (Konzentration 20 mM), Phenylephrin (Konzentration 0,1 μM) oder Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$ Konzentration 5 μM) vorkontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus wurden anschließend kumulative Konzentrationen (0,05 μM -500 μM) jeweils eines der vier Antidepressiva Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin hinzu pipettiert.

3.3.5.2 Relaxationsexperimente nach Inkubation und Vorkontraktion

3.3.5.2.1 Vorkontraktion mit Phenylephrin

Als Kontrollversuche dienten die mittels Phenylephrin (Konzentration 0,1 μM) vorkontrahierten endothelintakten Aorten. Nach der Vorinkubation der Aortenringe für 20 Minuten wurden diese mit einer Phenylephrin-Konzentration von 0,1 μM kontrahiert und nach Erreichen eines bleibenden Plateaus kumulative Konzentrationen (0,05 μM -500 μM) des jeweiligen Antidepressivums hinzugegeben. Zur Inkubation wurden folgende Substanzen verwendet: *N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME*, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung; Konzentration 500 μM), *1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ*, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung; Konzentration 1 μM), *SQ 22536 (SQ*; gelöst in DMSO; Konzentration 100 μM), *4-Aminopyridin (4-AP*, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung; Konzentration 100 μM), *Charybdotoxin (Chtx*, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung; Konzentration 0,05 μM), *Glibenclamid (Glib*, gelöst in DMSO, Konzentration 10 μM), *Tetraethylammonium (TEA*, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung, Konzentration 10 mM).

3.3.5.2.2 Vorkontraktion mit Kaliumchlorid

KCl wurde als modifizierte Krebslösung mit verringertem NaCl-Gehalt verwendet, um die Äquimolarität zu gewährleisten. Für die Kontrolluntersuchungen wurden Aorten mit KCl 40 mM vorkontrahiert und nach Erreichen eines stabilen Plateaus mittels kumulativer Konzentrationen (0,05 μM -100 μM) von Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin oder Venlafaxin relaxiert. Bei den Inkubationsexperimenten erfolgte nach einer Dauer von 20 Minuten Vorinkubation die Gabe kumulativer Konzentrationen (0,05 μM -500 μM) der

Antidepressiva. Zur Inkubation wurden folgende Substanzen verwendet: *Propranolol* (gelöst in 0,9% NaCl-Lösung, Konzentration 10 μM), *Prazosin* (gelöst in 0,9% NaCl-Lösung, Konzentration 10 μM).

3.3.5.3 Kontraktionsexperimente

Bei diesen Untersuchungen wurden endothelintakte und endothelfreie Aorten mit Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin in einer Konzentration von jeweils 500 nM für eine Dauer von 30 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht inkubierte, endothelintakte Aorten. Nach der Vorinkubation erfolgte die Zugabe von kumulativen Phenylephrin-Konzentrationen (0,5 nM-0,5 mM).

Einen Überblick über die durchgeführten Experimente je Antidepressivum geben die **Tabellen 2a und b:**

Inkubation mit	Vorkontraktion der Aorten mit	(n)
	Kaliumchlorid (20 mM)	7
	endothelfrei	7
	Phenylephrin	8
	endothelfrei	8
	PGF _{2α}	4
	endothelfrei	4
L-NAME	Phenylephrin	4
ODQ	Phenylephrin	4
SQ 22536	Phenylephrin	4
4-Aminopyridin	Phenylephrin	4
Charybdotoxin	Phenylephrin	4
Glibenclamid	Phenylephrin	4
TEA	Phenylephrin	4
	Kaliumchlorid (40mM)	8
Propranolol	Kaliumchlorid (40mM)	4
Prazosin	Kaliumchlorid (40 mM)	4

Tab. 2a. Relaxationsexperimente: Die Relaxation erfolgte mittels ansteigenden Konzentrationen jedes der vier Antidepressiva nach Vorkontraktion. n entsprechend der verwendeten Aorten pro Antidepressivum.

Inkubation mit	Dosisabhängige Kontraktion mit	(n)
Amitriptylin	Phenylephrin	8
	endothelfrei	4
Fluoxetin	Phenylephrin	8
	endothelfrei	3
Tranlycypromin	Phenylephrin	6
	endothelfrei	5
Venlafaxin	Phenylephrin	8
	endothelfrei	5
	Phenylephrin	4

Tab. 2b. Kontraktionsexperimente: Die dosisabhängige Kontraktion mittels ansteigender Konzentrationen Phenylephrin erfolgte nach Inkubation mit jeweils einem der vier Antidepressiva. n entsprechend der verwendeten Aorten pro Antidepressivum.

3.4 Auswertung

Die Veränderungen des Gefäßtonus wurden durch den Schreibers registriert und sind in der dargestellten Original-Konzentrations-Antwort-Kurve [Abbildung 4] exemplarisch nachzuvollziehen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe eines Personalcomputers und des Programmes Excel (Microsoft Office XP). Die vom Rikadenki-Schreiber aufgezeichneten Relaxations-/Kontraktionskurven wurden auf dem Millimeterpapier ausgemessen (y-Achse: 50 mm entsprechend 1 g) und zunächst als absolute Werte in Gramm in Excel-Tabellen übertragen. Die absoluten Werte der einzelnen Relaxations- bzw. Kontraktionsstufen wurden dann in Relation zur maximalen Spannung T_{max} gesetzt, welche 100% gleich gesetzt wurde.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler (S.E.M., *standard error of mean*) wurden mittels Excel berechnet und graphisch dargestellt (Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit logarithmischer x-Achse; x-Achse: Konzentrationen in $-\log M$; y-Achse: Mittelwerte in % von T_{max}).

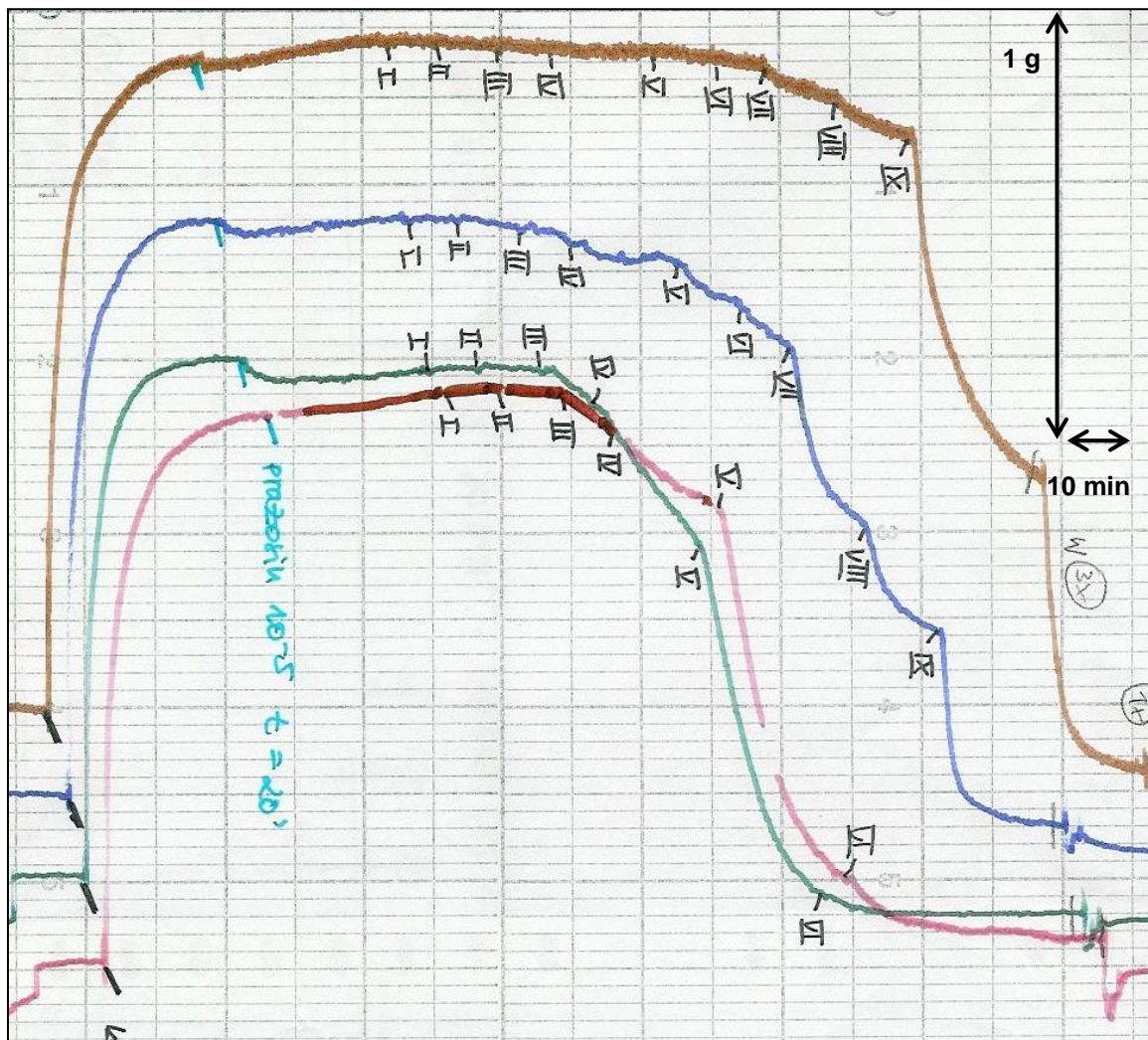


Abb. 4. Original-Konzentrations-Antwort-Kurve. Präkontraktion der Aorten mit Kaliumchlorid (Konzentration 40 mM). Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus Inkubation mit Prazosin (Konzentration 10 μ M). Nach 20 Minuten ($t=20'$) Gabe kumulativer Konzentrationen (0,05 μ M-100 μ M entsprechend I-IX) von Amitriptylin (rot), Fluoxetin (grün), Tranylcypromin (braun) oder Venlafaxin (blau). Vertikale Achse: 50 mm entsprechend 1 g, horizontale Achse: 10 mm entsprechend 10 min.

3.5 Statistik

Die Mittelwerte der Konzentrations-Antwort-Kurven wurden mittels der nicht-linearen Regressionsanalyse in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) unter Verwendung der Hill-Langmuir-Gleichung untersucht, um deren halbmaximale Effektivkonzentration (EC_{50}) zu ermitteln. Die Angabe erfolgt als negativer Logarithmus der Substanzkonzentration ($-\log$), entsprechend einem positiven Zahlenwert (pEC_{50}). Die Ergebnisse sind als Mittelwert (*mean*) \pm Standardfehler (*S.E.M.*) dargestellt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte ebenfalls mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5. Für die statistische Auswertung der pEC_{50} -Werte wurden die Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*) mit *Dunnet's post hoc*-Test eingesetzt. Es erfolgte der statistische Vergleich

von Präparationen mit gegenüber ohne Endothel, Vorinkubation gegenüber der Kontrollgruppe sowie der Antidepressiva untereinander. Die Anwendung der Varianzanalyse setzt eine Normalverteilung der Stichprobenvariablen voraus. Die Überprüfung auf Normalverteilung war bei unseren Experimenten nicht sinnvoll, da die Fallzahlen 3 bis 8 pro Gruppe betragen. Um die ermittelten Werte dennoch statistisch vergleichen zu können, wurde die Varianzanalyse durchgeführt, wie es bei dieser experimentellen Methode üblich ist [Pacher *et al.*, 1999; Ungvari *et al.*, 1999; Pavlovic *et al.*, 2008].

Für die Interpretation der Ergebnisse wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ angenommen. Als statistisch signifikant galt $P < \alpha$ entsprechend $P < 0.05$ [Biebler *et al.*, 2001].

3.6 Bewertung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Konzentrations-Antwort-Kurven der vier Antidepressiva sowie die errechneten halbmaximalen Effektivdosen pEC_{50} wurden zur Auswertung herangezogen.

Bei der Betrachtung der Relaxationskurven der Experimente mit Interventionen (wie einer Endothelentfernung oder einer Inkubation) zeigt sich im Vergleich zum Kontrollexperiment entweder kein Unterschied oder eine Verschiebung nach rechts oder links. In den Inkubationsuntersuchungen setzten wir blockierende Substanzen an K^+ -Kanälen, Adrenozeptoren oder der NO-Signalkaskade ein. Eine Rechtsverschiebung entspricht einem höheren pEC_{50} -Wert. Das bedeutet, dass die glatte Muskulatur der Aortenringe weniger empfindlich auf das untersuchte Antidepressivum reagiert und eine höhere Konzentration notwendig ist, um die inkubierte Aorta zu relaxieren. Verursacht die Intervention eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve, lässt sich auf eine Behinderung des bevorzugten Relaxationsmechanismus des Antidepressivums schließen, da eine höhere Dosis zur Dilatation der Aorta vonnöten ist.

Bei der Auswertung der Kontraktionskurven werden die Experimente mit Intervention (Inkubation mit jeweils einem der vier Antidepressiva) mit den Kontrollexperimenten verglichen. Eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve von Phenylephrin entspricht wieder einer Zunahme des pEC_{50} -Wertes. Führt die Inkubation mit einem Antidepressivum zu einer Rechtsverschiebung, so hemmt es direkt oder indirekt die agonistische Wirkung von Phenylephrin an α_1 -Adrenozeptoren.

4. Ergebnisse

4.1 Relaxationsexperimente nach Vorkontraktion (Kontrollexperimente)

Im Vergleich ist die Relaxationspotenz der vier Antidepressiva nach Vorkontraktion mit Phenylephrin in Präparationen mit Endothel in unterschiedlichem Maße ausgeprägt, in absteigender Reihenfolge angeordnet: Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin, Venlafaxin (pEC_{50} $6,98 \pm 0,13$, $6,11 \pm 0,05$, $5,33 \pm 0,05$, $4,45 \pm 0,08$; Amitriptylin gegenüber Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin, $P < 0,001$). Nach Vorkontraktion mit KCl in Präparationen mit Endothel: Fluoxetin, Venlafaxin, Tranylcypromin, Amitriptylin ($6,00 \pm 0,06$, $5,02 \pm 0,07$, $4,99 \pm 0,30$, $4,89 \pm 0,11$; Fluoxetin gegenüber Venlafaxin, Tranylcypromin und Amitriptylin, $P < 0,001$). Nach Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ zeigt sich kein Unterschied der Relaxationskurven zwischen den Antidepressiva, für Tranylcypromin war kein pEC_{50} -Wert ermittelbar (siehe 4.1.3.).

4.1.1 Amitriptylin

Ansteigende Konzentrationen von Amitriptylin relaxierten die mittels KCl sowie Phenylephrin vorkontrahierten Aorten vollständig. Der Vergleich der Konzentrations-Antwort-Kurven zeigte keinen Unterschied der Aorten mit Endothel gegenüber den endothelfreien Aorten. Nach Präkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ konnten die endothelintakten Aorten durch ansteigende Konzentrationen von Amitriptylin nicht vollständig dilatiert werden, jedoch die endothelfreien Präparationen [**Abbildung 5 a**].

4.1.2 Fluoxetin

Kumulative Konzentrationen von Fluoxetin relaxierten die mittels KCl und Phenylephrin vorkontrahierten Aorten vollständig. Der Vergleich der Konzentrations-Antwort-Kurven zeigte keinen Unterschied der Aorten mit Endothel gegenüber den endothelfreien Aorten. Nach Präkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ war eine vollständige Relaxation der endothelintakten Aorten durch ansteigende Konzentrationen von Fluoxetin nicht möglich. Die Konzentrations-Antwort-Kurven zeigten eine Rechtsverschiebung und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivkonzentration der Aorten mit Endothel (pEC_{50} $5,03 \pm 0,37$) gegenüber denen ohne Endothel (pEC_{50} $5,83 \pm 0,36$) ($P < 0,05$) [**Abbildung 5 b**].

4.1.3 Tranlycypromin

Nach Vorkontraktion mittels KCl führten ansteigende Konzentrationen von Tranlycypromin zu einer vollständigen Dilatation der endothelfreien Aorten, endothelintakte Aorten konnten nicht bis zur Ausgangsspannung relaxiert werden.

Kumulative Konzentrationen von Tranlycypromin dilatierten die mittels Phenylephrin präkontrahierten Aortenringe gänzlich. Es ergab sich kein Unterschied zwischen den Präparationen.

Nach Präkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ zeigten die endothelintakten Aorten durch ansteigende Konzentrationen von Tranlycypromin eine zusätzliche Kontraktion (der pEC_{50} -Wert konnte aufgrund der nicht erreichten halbmaximalen Relaxation nicht berechnet werden), die endothelfreien Aorten konnten nicht vollständig dilatiert werden [Abbildung 5 c].

4.1.4 Venlafaxin

Kumulative Konzentrationen von Venlafaxin relaxierten die mittels KCl vorkontrahierten Aorten gänzlich. Der Vergleich der Konzentrations-Antwort-Kurven zeigte keinen Unterschied der Präparationen.

Ansteigende Konzentrationen von Venlafaxin dilatierten die mittels Phenylephrin präkontrahierten Aortenringe vollständig. Es fand sich eine Rechtsverschiebung der Präparationen mit Endothel gegenüber denen ohne Endothel (pEC_{50} endothelintakte/endothelfreie Aorten $4,45 \pm 0,08 / 4,96 \pm 0,07$; $P < 0,001$).

Nach Präkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ war eine vollständige Relaxation der endothelintakten Aorten durch ansteigende Konzentrationen von Venlafaxin nicht möglich. Die Konzentrations-Antwort-Kurven zeigten eine Rechtsverschiebung und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivdosis der Aorten mit Endothel (pEC_{50} $3,07 \pm 0,07$) gegenüber denen ohne Endothel (pEC_{50} $4,17 \pm 0,17$) ($P < 0,001$) [Abbildung 5 d].

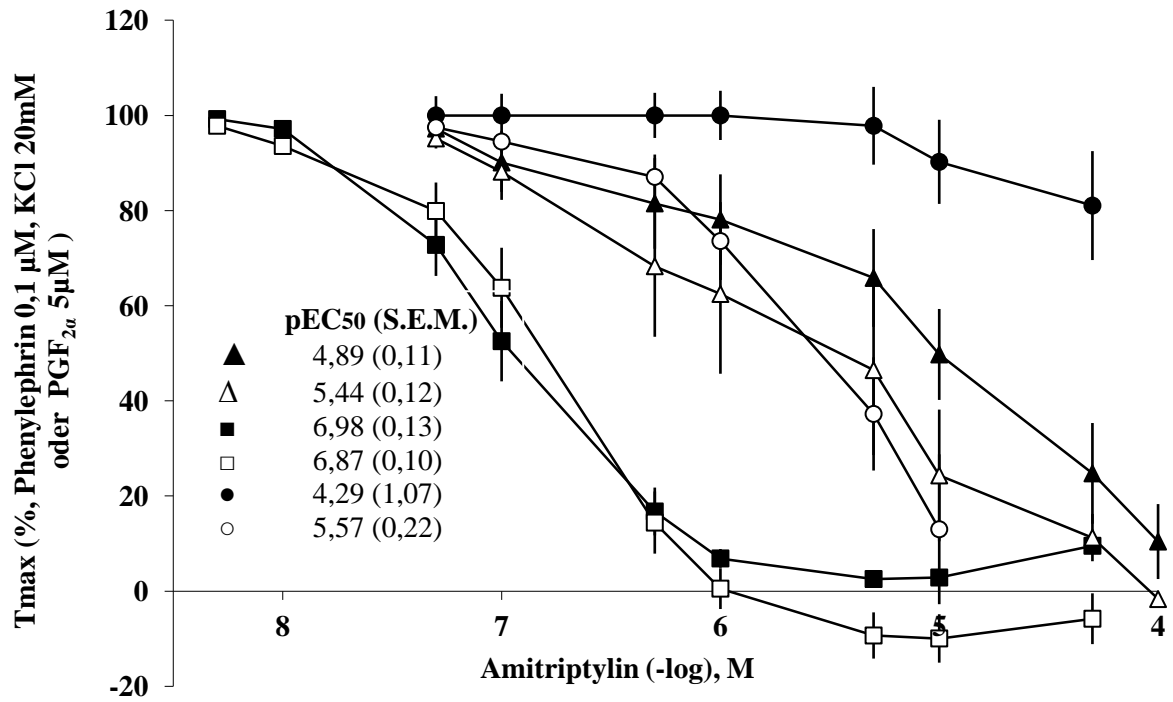


Abb. 5a

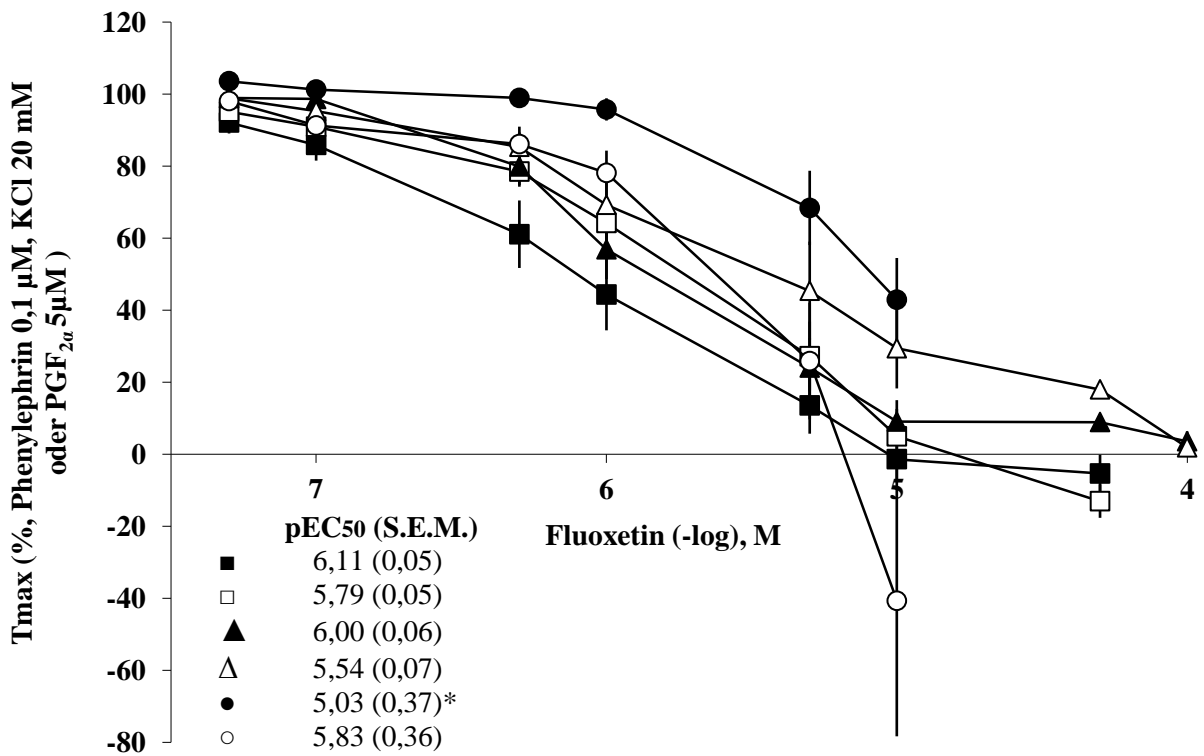


Abb. 5b

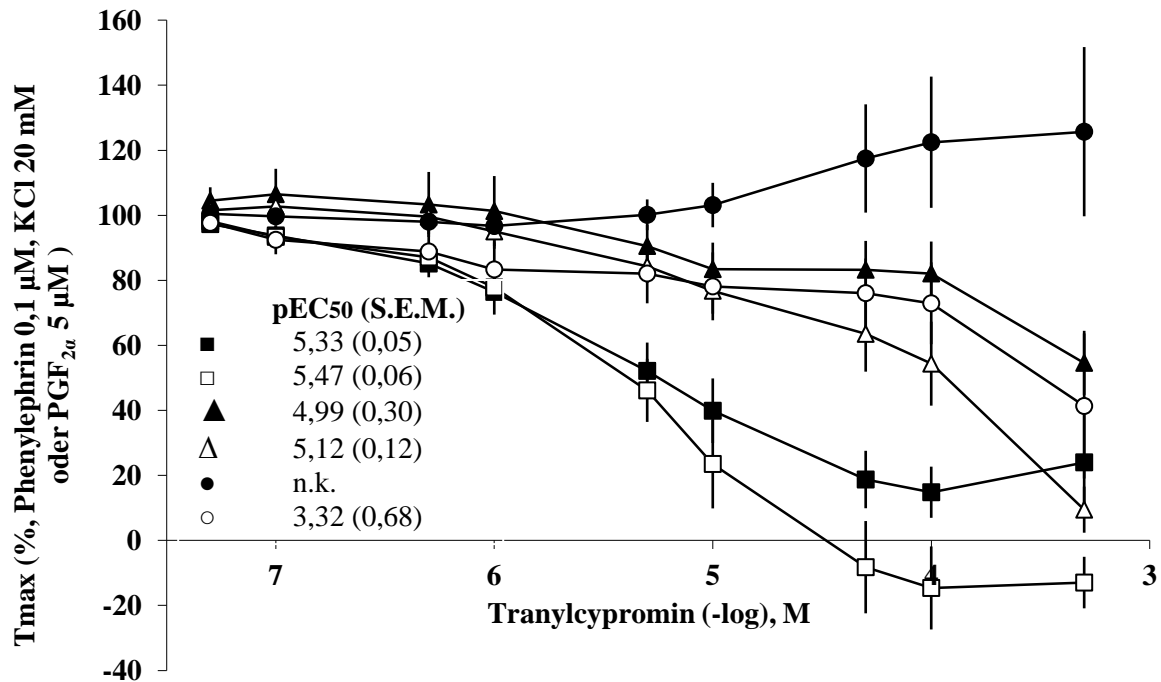


Abb. 5c

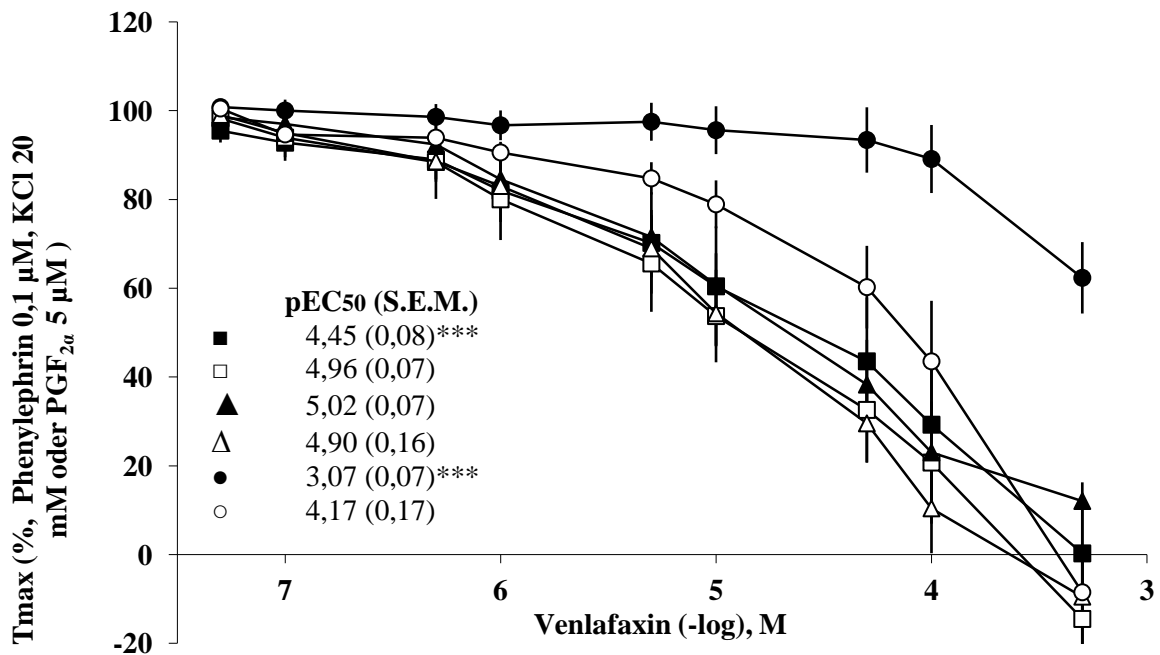


Abb. 5d

Abb. 5. Konzentrations-Relaxationskurven von (a) Amitriptylin, (b) Fluoxetin, (c) Tranylcypromin und (d) Venlafaxin in Rattenaorten (jeweils 0,05 μ M-500 μ M) mit Endothel (schwarze Symbole) oder nach Endothelentfernung (weiße Symbole) nach Vorkontraktion mit ■/□ Phenylephrin (0,1 μ M; n=8), ▲ / △ KCl (20 mM; n=7) oder ●/○ Prostaglandin F_{2 α} (5 μ M; n=4). Daten als Prozentwerte von T_{max}, pEC₅₀ als Mittelwert (S.E.M.). Vergleich der Präparationen mit gegenüber denen ohne Endothel innerhalb des jeweiligen Präkontraktionsexperimentes: *P<0,05; ***P<0,001. n.k. nicht konvergierbar.

4.2. Relaxationsexperimente nach Inkubation und Vorkontraktion

4.2.1 Vorkontraktion mit Phenylephrin

Nach Durchführung der Kontrollexperimente mit KCl, Phenylephrin und $\text{PGF}_{2\alpha}$ verglichen wir die Konzentrations-Antwort-Kurven aller Antidepressiva. Eine Linksverschiebung stellte sich für die Phenylephrin- gegenüber den KCl- und $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Präkontraktionen in den Relaxationskurven von Amitriptylin, Fluoxetin und Tranylcypromin. Dieser Vergleich erfolgte nur anhand der graphischen Darstellung ohne statistische Analyse. Eine Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurven entspricht einer höheren Empfindlichkeit der Aorten auf geringe Konzentrationen der Antidepressiva. Für die Inkubationsexperimente ist dies von Vorteil, da schon bei geringen Konzentrationen ein eventueller Effekt der Inkubation mit einer Rechtsverschiebung der Kurve sichtbar wird. Daher wurde Phenylephrin als präkontrahierende Substanz für die folgenden Inkubationsuntersuchungen verwendet.

4.2.1.1 Amitriptylin

Nach Inkubationen mit L-NAME zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Dosis-Antwort-Kurven und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivkonzentrationen der durch Amitriptylin induzierten Vasorelaxation gegenüber den Kontrollpräparationen (pEC_{50} L-NAME $6,05 \pm 0,09$, Kontrolle $6,98 \pm 0,13$) ($P < 0,05$) [**Abbildung 6a**]. Die Inkubationen mit ODQ, SQ, TEA, 4-AP, Charybdotoxin und Glibenclamid ergaben keinen Unterschied zur Kontrolle.

4.2.1.2 Fluoxetin

Für die Inkubationen mit L-NAME, ODQ, 4-AP und TEA fanden sich Rechtsverschiebungen der Relaxationskurven und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivkonzentrationen der durch Fluoxetin induzierten Vasodilatation gegenüber den Kontrollpräparationen (pEC_{50} in absteigender Reihenfolge: ODQ $5,39 \pm 0,16$, $P < 0,01$; TEA $5,55 \pm 0,15$, $P < 0,05$; 4-AP $5,58 \pm 0,08$, $P < 0,05$; L-NAME $5,62 \pm 0,13$, $P < 0,05$; Kontrolle $6,11 \pm 0,05$) [**Abbildung 6b**].

Die Inkubationen mit SQ, Charybdotoxin und Glibenclamid ergaben keinen Unterschied zur Kontrolle.

4.2.1.3 Tranylcypromin

Nach den Inkubationen mit L-NAME, ODQ, 4-AP und TEA zeigten sich Rechtsverschiebungen der Relaxationskurven und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivkonzentrationen der durch Tranylcypromin verursachten Vasodilatation gegenüber den Kontrollpräparationen (pEC_{50} in absteigender Reihenfolge: TEA $4,16 \pm 0,06$, $P < 0,001$; 4-AP $4,64 \pm 0,12$, $P < 0,001$; ODQ $4,65 \pm 0,16$, $P < 0,001$; L-NAME $4,77 \pm 0,15$, $P < 0,001$; Kontrolle $5,33 \pm 0,05$) [**Abbildung 6c**].

Bei den Inkubationen mit SQ, Charybdotoxin und Glibenclamid fanden sich keine Unterschiede zur Kontrolle.

4.2.1.4 Venlafaxin

Nach den Inkubationen mit L-NAME, ODQ, 4-AP und TEA zeigten sich Rechtsverschiebungen der Konzentrations-Antwort-Kurven und eine Zunahme der halbmaximalen Effektivkonzentrationen der durch Venlafaxin induzierten Vasodilatation gegenüber den Kontrollpräparationen (pEC_{50} in absteigender Reihenfolge: ODQ $3,65 \pm 0,21$, $P < 0,001$; 4-AP $3,66 \pm 0,12$, $P < 0,001$; L-NAME $3,69 \pm 0,12$, $P < 0,001$; TEA $3,94 \pm 0,13$, $P < 0,05$; Kontrolle $5,33 \pm 0,05$). Eine Linksverschiebung der Relaxationskurve gegenüber der Kontrolle fand sich nach Inkubation mit SQ, die Erhöhung der halbmaximalen Effektivdosis war statistisch signifikant (pEC_{50} SQ $5,97 \pm 0,11$, $P < 0,001$).

Bei den Inkubationen mit Charybdotoxin und Glibenclamid fanden sich keine Unterschiede zur Kontrolle [**Abbildung 6d**].

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über alle ermittelten halbmaximalen Effekte pEC_{50} . Die zugehörigen Graphen finden sich in den **Abbildungen 6a-d** und stellen eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für jedes Antidepressivum einzeln dar. Nur ein Teil der Werte aus Tabelle 3 ist in den Abbildungen miterfasst.

	Kontrolle	L-NAME 500 µM	ODQ 1 µM	SQ 100 µM	4-AP 100 µM	Chtx 0.05 µM	Glib 10 µM	TEA 10 mM
AMI	6,98±0,13	6,05±0,09 *	6,66±0,10	7,03±0,41	6,53±0,15	6,85±0,23	6,98±0,50	6,66±0,25
FLUO	6,11±0,05	5,62±0,13 *	5,39±0,16 **	6,04±0,09	5,58±0,08 *	5,67±0,14	5,82±0,32	5,55±0,15 *
TRAN	5,33±0,05	4,77±0,15 ***	4,65±0,09 ***	5,36±0,12	4,64±0,12 ***	5,15±0,09	5,07±0,11	4,16±0,06 ***
VENLA	4,45±0,08	3,69±0,12 ***	3,65±0,21 ***	5,97±0,11 ***	3,66±0,12 ***	4,28±0,07	4,15±0,26	3,94±0,13 *

Tab. 3. Halbmaximale Effektivkonzentrationen (pEC₅₀) der Antidepressiva in der Rattenaorta nach Inkubation mit den blockierenden Agenzien L-NAME, ODQ, SQ, 4-AP, Charybdotoxin (Chtx), Glibenclamid (Glib) oder TEA; jeweilige Konzentrationen in der Tabelle gegeben; jeweils 30 Minuten, n=4 pro Gruppe; Kontrollgruppe (n=8) ohne Inkubation. Präkontraktion mit Phenylephrin (0,1 µM) und folgender Applikation kumulativer Konzentrationen (0,05 µM-500 µM) von Amitriptylin (AMI), Fluoxetin (FLUO), Tranylcypromin (TRAN) oder Venlafaxin (VENLA). Mittelwerte ± S.E.M. der pEC₅₀ – Werte. Inkubation im Vergleich gegenüber der Kontrolle: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

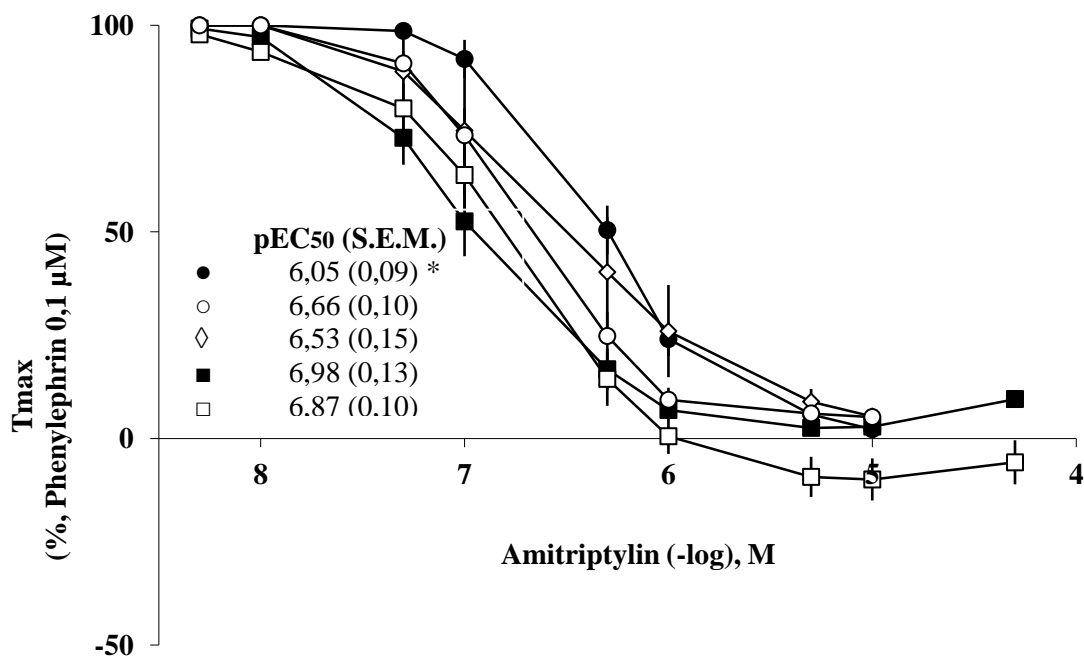


Abb. 6a

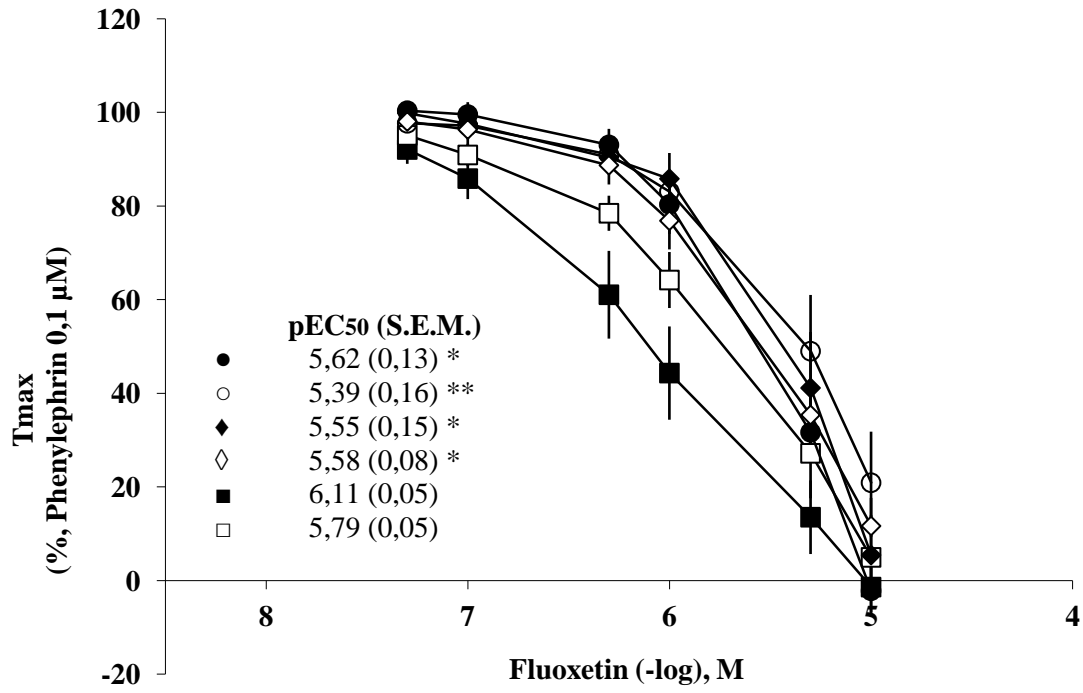


Abb. 6b

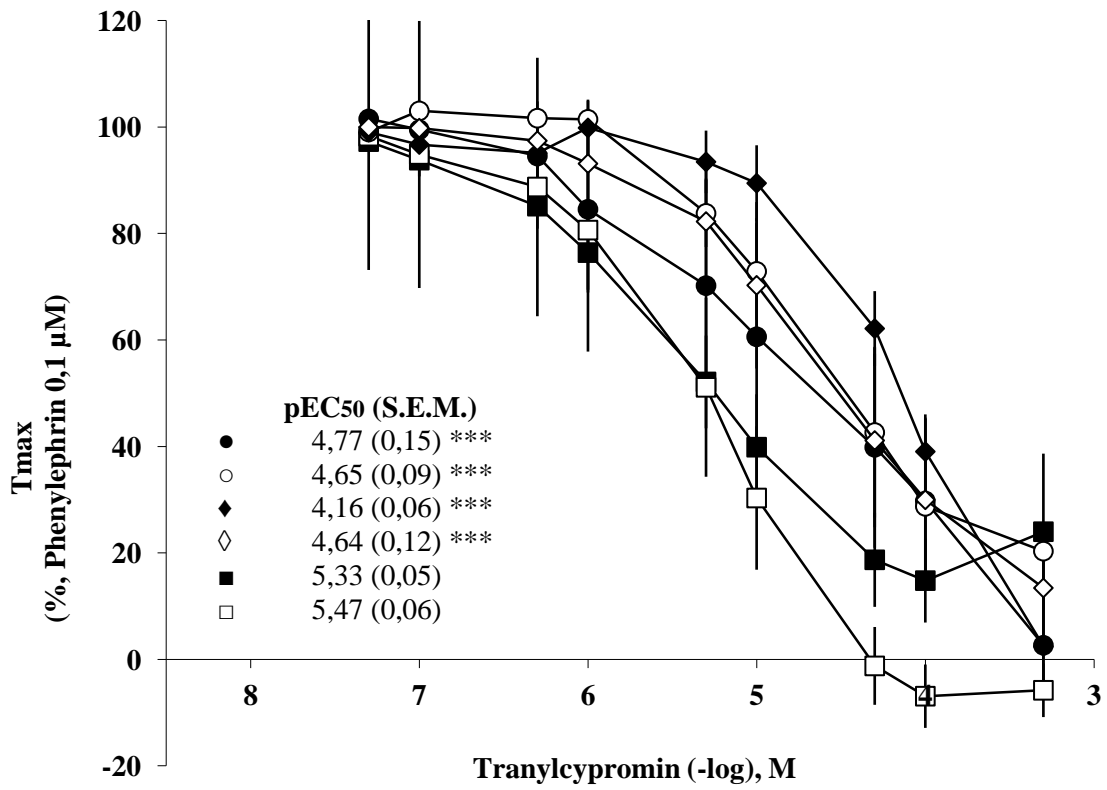


Abb. 6c

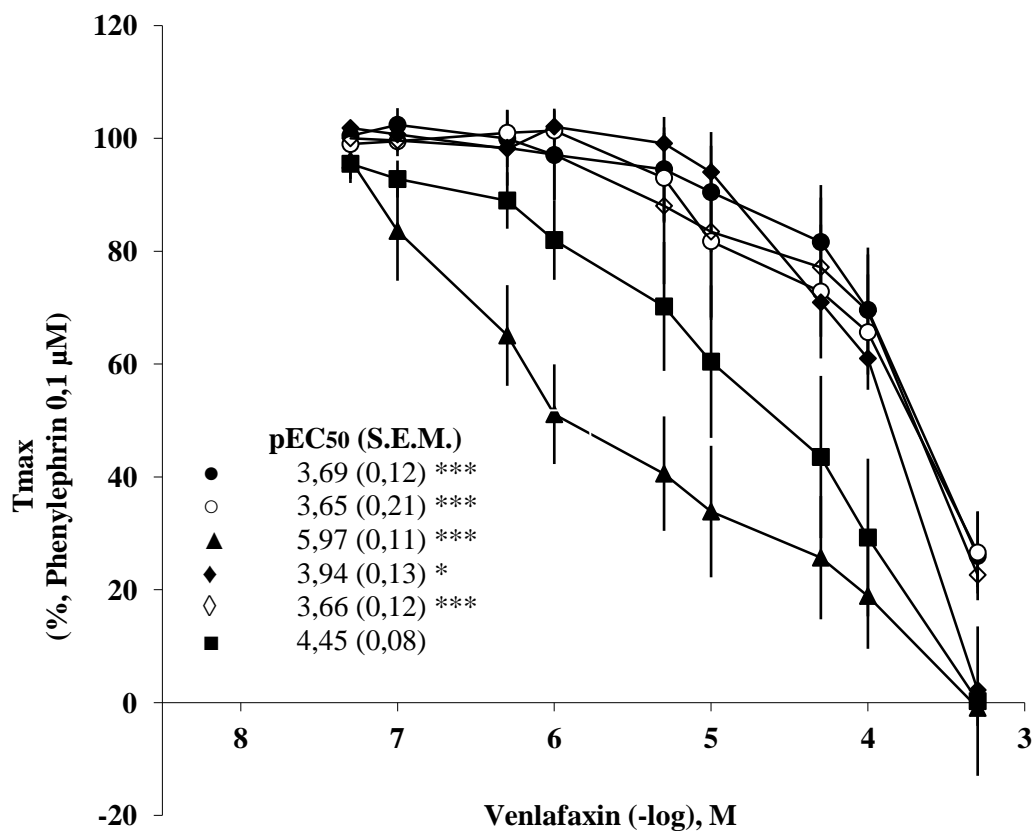


Abb. 6d

Abb. 6. Konzentrations-Relaxationskurven von (a) Amitriptylin, (b) Fluoxetin, (c) Tranylcypromin und (d) Venlafaxin in Rattenaorten (jeweils 0,05 μ M-500 μ M) nach Vorkontraktion mit Phenylephrin (0,1 μ M). Kontrollgruppen (■ mit Endothel n=8; □ ohne Endothel, n=8) oder vorhergehende Inkubation mit ● L-NAME 500 μ M, n=4; ○ ODQ 1 μ M, n=4; ▲ SQ 22536 100 μ M, n=4; ◆ TEA 10 mM, n=4; ◇ 4-AP 100 μ M, n=4 (jeweils 20 min.). Daten als Prozentwerte von T_{max}, pEC₅₀-Werte als Mittelwert (S.E.M.). Vergleich der Inkubation gegenüber der Kontrolle: * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001.

4.2.2 Vorkontraktion mit Kaliumchlorid

Die Vorkontraktion erfolgte bei den Inkubationen mit Prazosin und Propranolol mit KCl 40 mM, da eine Vorkontraktion mittels Phenylephrin aufgrund der Blockade der Adrenozeptoren nicht möglich war (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.2.2.1 Amitriptylin

Beim Vergleich der mit Propranolol oder Prazosin inkubierten Aorten fanden sich keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle in den Konzentrations-Antwort-Kurven von Amitriptylin.

4.2.2.2 Fluoxetin

Die mit Propranolol oder Prazosin inkubierten Aorten zeigten keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle in den Relaxationskurven von Fluoxetin.

4.2.2.3 Tranlycypromin

Im Vergleich der mit Propranolol oder Prazosin inkubierten Aorten fanden sich keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle in den Relaxationskurven von Tranlycypromin.

4.2.2.4 Venlafaxin

Die Konzentrations-Antwort-Kurven von Venlafaxin zeigten eine Linksverschiebung der mit Propranolol bzw. Prazosin inkubierten Aortenringe gegenüber der Kontrolle [**Abbildung 7**]. Die berechneten halbmaximalen Effektiv Konzentrationen waren verringert (pEC_{50} in aufsteigender Reihenfolge: Kontrolle $4,16 \pm 0,03$, Propranolol $4,31 \pm 0,05$, $P < 0,05$, Prazosin $4,44 \pm 0,08$, $P < 0,001$).

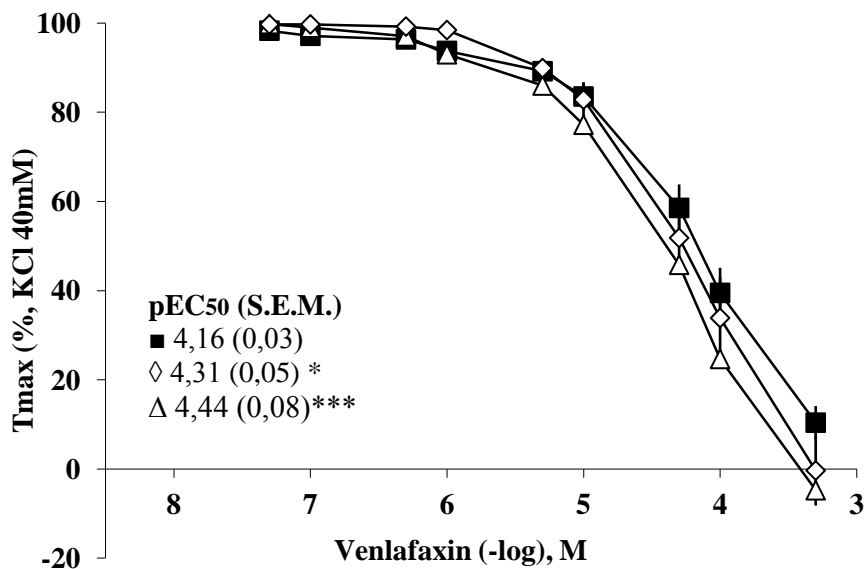


Abb. 7. Konzentrations-Relaxationskurven von Venlafaxin (0,05 μ M-500 μ M) in Rattenaorten nach Vorkontraktion mit KCl (40 mM). Kontrollgruppen (■, n=8) und nach Inkubation mit Propranolol (◇, n=4) bzw. Prazosin (△, n=4). Daten als Prozentwerte von T_{max} , pEC₅₀-Werte als Mittelwert (S.E.M.). Vergleich der Inkubation gegenüber der Kontrolle: * P<0,05, *** P<0,001.

Die **Tabelle 4** gibt eine Übersicht über die ermittelten halbmaximalen Effektivkonzentrationen pEC₅₀.

	Inkubation mit					
	Propranolol	n	Prazosin	n	Kontrolle	n
Amitriptylin	5,68±0,09	4	5,75±0,10	4	5,53±0,05	8
Fluoxetin	5,85±0,15	4	5,78±0,12	4	5,72±0,06	8
Tranlycypromin	3,47±0,15	4	3,64±0,08	4	3,32±0,11	8
Venlafaxin	4,31±0,05*	4	4,44±0,08***	4	4,16±0,03	8

Tab. 4. Halbmaximale Effektivkonzentrationen (pEC₅₀) der Antidepressiva in der Rattenaorta nach Inkubation mit Propranolol oder Prazosin (Konzentration jeweils 10 μ M für 20 min., n Experimente wie angegeben); Kontrollgruppe ohne Inkubation. Präkontraktion mit KCl 40 mM und folgender Applikation kumulativer Konzentrationen (0,05 μ M-500 μ M) der Substanzen Amitriptylin, Fluoxetin, Tranlycypromin oder Venlafaxin. Mittelwerte \pm S.E.M. der pEC₅₀ -Werte. Inkubation im Vergleich gegenüber der Kontrolle: *P<0,05; ***P<0,001.

4.3 Kontraktionsexperimente

4.3.1 Amitriptylin

Nach der Inkubation der endothelintakten Aorten mit Amitriptylin zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Phenylephrin induzierten Konzentrations-Antwort-Kurven gegenüber der Kontrolle. Die zugehörigen halbmaximalen Effektivkonzentrationen erhöhten sich (pEC_{50} endothelintakte Aorten: Amitriptylin-Inkubation $5,73 \pm 0,02$, Kontrolle $7,20 \pm 0,04$, $p < 0,001$). Die Präparationen ohne Endothel unterschieden sich des Weiteren von denen mit Endothel mit einer Verringerung der pEC_{50} -Werte (pEC_{50} endothelintakt/endothelfrei $5,73 \pm 0,02 / 5,98 \pm 0,12$, $P < 0,05$).

4.3.2 Fluoxetin

Nach Fluoxetin-Inkubation der endothelintakten Aorten fand sich eine Rechtsverschiebung der Phenylephrin induzierten Kontraktionskurven gegenüber der Kontrolle. Die zugehörigen halbmaximalen Effektivkonzentrationen erhöhten sich (pEC_{50} endothelintakte Aorten: Fluoxetin-Inkubation $6,93 \pm 0,02$, Kontrolle $7,20 \pm 0,04$, $P < 0,001$). Die Präparationen ohne Endothel unterschieden sich von denen mit Endothel mit einer Verringerung der pEC_{50} -Werte (pEC_{50} endothelintakt/endothelfrei $6,93 \pm 0,02 / 7,31 \pm 0,07$, $P < 0,001$).

4.3.3 Tranlycypromin

Nach Tranlycypromin-Inkubation der endothelintakten Aorten fand sich eine Linksverschiebung der Phenylephrin induzierten Konzentrations-Antwort-Kurven gegenüber der Kontrolle. Die zugehörigen halbmaximalen Effektivkonzentrationen verringerten sich (pEC_{50} endothelintakte Aorten: Tranlycypromin-Inkubation $7,79 \pm 0,07$, Kontrolle $7,20 \pm 0,04$, $P < 0,001$). Die Präparationen ohne Endothel unterschieden sich von denen mit Endothel mit einer Verringerung der pEC_{50} -Werte (pEC_{50} endothelintakt/endothelfrei $7,79 \pm 0,07 / 8,39 \pm 0,07$, $P < 0,001$).

4.3.4 Venlafaxin

Nach Inkubation der endothelintakten Aorten mit Venlafaxin zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Phenylephrin induzierten Kontraktionskurven gegenüber der Kontrolle. Die zugehörigen halbmaximalen Effektivkonzentrationen erhöhten sich (pEC_{50} endothelintakte Aorten: Venlafaxin-Inkubation $6,95 \pm 0,02$, Kontrolle $7,20 \pm 0,04$, $P < 0,001$). Die Präparationen ohne Endothel unterschieden sich von denen mit Endothel mit einer

Verringerung der pEC₅₀-Werte (pEC₅₀ endothelintakt/endothelfrei 6,95±0,02/7,23±0,08, P<0,001).

Die **Tabelle 5** gibt eine Übersicht über die ermittelten halbmaximalen Effektivkonzentrationen pEC₅₀, die zugehörige graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt die **Abbildung 8**. Nur die Werte der Aorten mit Endothel aus Tabelle 5 ist in der Abbildung miterfasst.

Inkubation mit	mit Endothel	n	ohne Endothel	n	
Amitriptylin	5,73±0,02***	8	5,98±0,12	4	#
Fluoxetin	6,93±0,02***	8	7,31±0,07	3	###
Tranlycypromin	7,79±0,07***	6	8,39±0,07	5	###
Venlafaxin	6,95±0,02***	8	7,23±0,08	5	###
Kontrolle	7,20±0,04	4			

Tab. 5. Halbmaximale Effektivkonzentrationen (pEC₅₀) nach Gabe kumulativer Konzentrationen von Phenylephrin (0,5 nM bis 0,5 mM) in der Rattenaorta nach Inkubation mit Amitriptylin, Fluoxetin, Tranlycypromin oder Venlafaxin (Konzentration jeweils 0,5 µM, 30 min); Kontrollgruppen ohne Inkubation. Mittelwerte ± S.E.M. der pEC₅₀ - Werte von *n* Experimenten wie angegeben, in Präparationen mit bzw. ohne Endothel. Inkubation im Vergleich gegenüber der Kontrolle: *** P<0,001; Vergleich der Präparationen mit gegenüber denen ohne Endothel: # P<0,05, ### P<0,001.

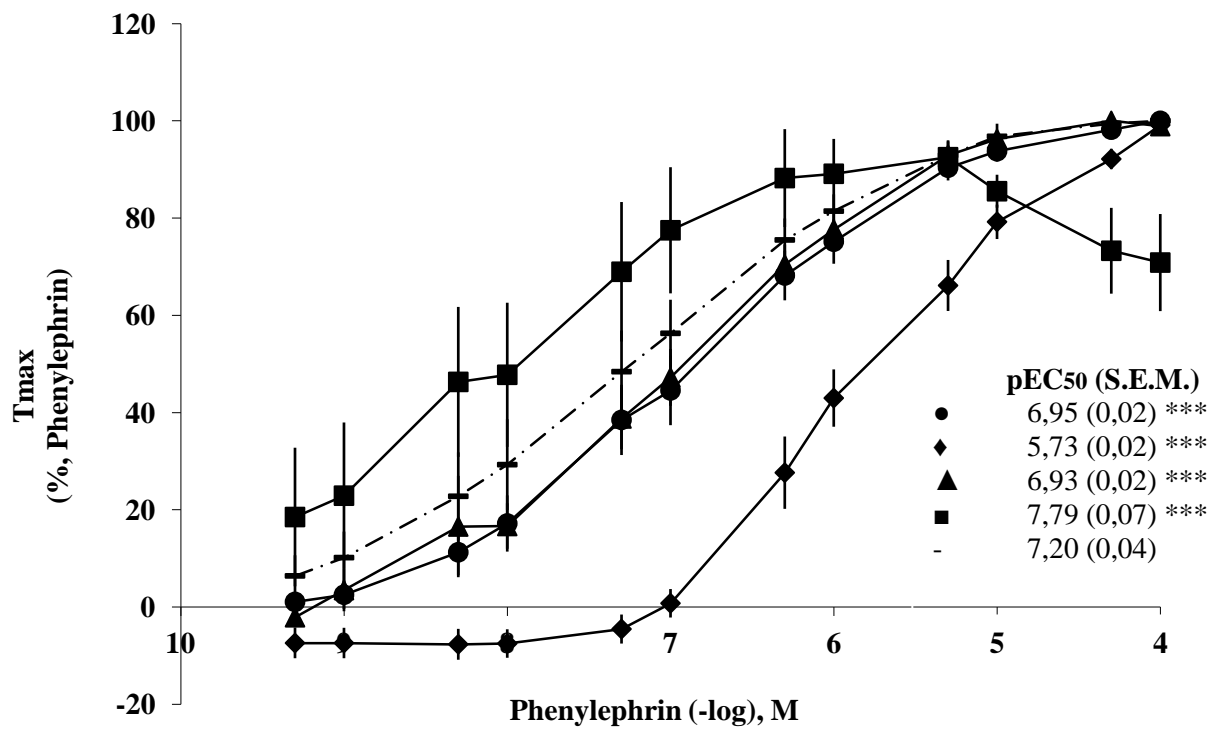


Abbildung 8. Konzentrations-Kontraktionskurven von Phenylephrin (0,5 nM-0,5 mM) auf in Rattenaorten. Kontrollgruppen (-, n=4) und nach Inkubation mit den Antidepressiva (jeweils 0,5 μ M für 30 min.), ◆ Amitriptylin (n=8), ▲ Fluoxetin (n=8), ■ Tranylcypromin (n=6) und ● Venlafaxin (n=8). Daten als Prozentwerte von T_{max} , pEC₅₀-Werte als Mittelwert (S.E.M.). Vergleich der Inkubation gegenüber der Kontrolle: *** P<0,001.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der vasoaktiven Effekte der Antidepressiva

Wirkungen:

Alle vier Antidepressiva haben direkte Effekte auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur der Rattenaorta *in vitro*. Sie dilatieren konzentrationsabhängig mittels KCl, Phenylephrin oder PGF_{2α} vorkontrahierte Aortenringe. Die Relaxationspotenz ist unterschiedlich ausgeprägt, in absteigender Reihenfolge angeordnet: Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin, Venlafaxin.

Amitriptylin, Fluoxetin und Venlafaxin hemmen die Kontraktionsantwort von Aortenringen auf adrenerge Einflüsse, Tranylcypromin verstärkt diese hingegen.

Mechanismen:

Amitriptylin hat einen hemmenden Einfluss auf α_1 -Adrenozeptoren. Auch Venlafaxin interagiert mit Adrenozeptoren. Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin wirken durch eine K⁺-Kanal-Aktivierung vasodilatierend.

Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch die antidepressiven Medikamente ist teilweise abhängig von der Integrität des Endothels, da insbesondere eine Aktivierung der NO-cGMP-Signalkaskade durch die Antidepressiva stattfindet. Die zusätzlich vasokonstriktive Wirkung von Tranylcypromin lässt sich durch seine bekannte Interaktion mit dem Prostaglandin-Stoffwechsel erklären.

5.1.1 Amitriptylin

Unsere Experimente zeigen, dass die Hypotension, die durch Medikation mit Amitriptylin hervorgerufen werden kann, hauptsächlich auf die α_1 -Adrenozeptorblockade zurückgeführt werden kann, es aber auch Hinweise auf weitere Interaktionen von Amitriptylin mit dem Endothel bzw. der vaskulären glatten Muskulatur gibt.

Aus mehreren Studien geht hervor, dass die durch Amitriptylin induzierte Hypotension weiterhin durch eine Na⁺-Kanal-Blockade und damit Kontraktilitätshemmung am Herzen, kombiniert mit einem reduzierten peripheren Gefäßwiderstand durch α_1 -Adrenozeptor-Blockade entsteht [Kopera, 1978; Thanacody *et al.*, 2005].

Amitriptylin zeigt in unseren Relaxationsuntersuchungen mit KCl, Phenylephrin bzw. PGF_{2α} als Vorkontraktion ohne Inkubationen eine starke konzentrationsabhängige Relaxationspotenz. Dieser Effekt stellt sich in der graphischen Darstellung endothelunabhängig dar. Besonders die Vorkontraktion mit Phenylephrin wird durch Amitriptylin schnell aufgehoben.

Die Präkontraktionen mit KCl und $\text{PGF}_{2\alpha}$ sind resistenter gegenüber ansteigenden Amitriptylin-Konzentrationen als die Präkontraktion mittels Phenylephrin, da erst in höheren Konzentrationen von Amitriptylin eine vollständige Vasodilatation erreicht wird.

Huang (1996) fand für Amitriptylin eine Hemmung einer Agonist-induzierten Muskelkontraktion mittels Noradrenalin, Endothelin und KCl an Rattenaorten, die sich als endothelunabhängig darstellte, ähnlich wie in unseren Untersuchungen.

Der in unseren Experimenten ausgeprägte vasodilatative Effekt ist auf die bekannte α_1 -blockierende Wirkung von Amitriptylin zurückzuführen [Gillmann, 2007]: Phenylephrin stimuliert relativ selektiv die vaskulären α_1 -Adrenozeptoren und durch die Zugabe von Amitriptylin wird somit der einzige konstringierende Stimulus schon mit niedrigen Amitriptylin-Konzentrationen aufgehoben.

Adrenerg vermittelte Kontraktionen von vaskulärer glatter Muskulatur werden bei fast allen Spezies durch den α_1 -Subtyp vermittelt. Eine Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren führt G-Protein gekoppelt zu einer Aktivierung der IP_3 -Kaskade und einem intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration [Guimaraes *et al.*, 2001]. Durch den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} bindet dieses nun an Calmodulin, und aktiviert als Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex die MLCK, welche die Myosin-Leichtketten phosphoryliert. Dies ermöglicht die Aktin-Myosin-Interaktion und somit die Kontraktion der glatten Muskulatur [Itoh, 1991; Horowitz *et al.*, 1996].

Anders ist dies bei kontrahierenden Substanzen, die mit anderen Mechanismen die glatte Muskulatur beeinflussen: Hohe Konzentrationen an K^+ -Ionen (im Falle der Vorkontraktion mit KCl) hemmen langanhaltend K^+ -Kanäle der glatten Muskelzellen. Dies führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran, Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zur Muskelkontraktion [Cohen *et al.*, 1994].

Für eine halbmaximale Dilatation der mittels KCl vorkontrahierten Aorten sind in unseren Untersuchungen deutlich höhere Konzentrationen an Amitriptylin notwendig als bei den mittels Phenylephrin präkontrahierten Präparationen. Dies bestätigt die oben genannte vorherrschende α_1 -blockierende Wirkung von Amitriptylin. Die durch Kaliumchlorid entstandene Depolarisation und Kontraktion der Muskelzelle ist unabhängig von der Aktivierung von Adrenozeptoren und kann durch Amitriptylin erst in hohen Konzentrationen aufgehoben werden.

Der α_1 -Antagonismus von Amitriptylin erklärt, weshalb die Inkubation mit dem α_1 -Adrenozeptor-Blocker Prazosin nach Vorkontraktion mit KCl 40 mM keinen Unterschied

zur Kontrolle zeigt. Durch Prazosin werden schon vor Zugabe von Amitriptylin alle α_1 -Rezeptoren besetzt. Die Möglichkeit der Vasorelaxation über diesen Mechanismus ist ausgeschöpft. Erst in hohen Konzentrationen von Amitriptylin konnten die durch KCl kontrahierten Arterienringe wieder dilatiert werden.

Amitriptylin hat in unseren Experimenten keinen Einfluss auf K^+ -Kanäle, da sich kein Unterschied der Konzentrations-Antwort-Kurven gegenüber der Kontrolle nach Inkubation der Aorten mit K^+ -Kanal blockierenden Substanzen findet. Auch Huang (1996) schloss eine Beeinflussung von K^+ -Kanälen durch Amitriptylin aus.

In unseren Untersuchungen fand sich, dass Aorten, die mit L-NAME inkubiert wurden, gegenüber ansteigenden Konzentrationen an Amitriptylin weniger empfindlich sind als die Kontrollpräparationen. Durch die ODQ-Inkubation trat hingegen kein Unterschied zur Kontrolle auf.

In vivo konnte gezeigt werden, dass eine L-NAME-Infusion die durch Amitriptylin induzierte Hypotension in Ratten vermindert [Tuncok *et al.*, 2002]. L-NAME blockiert die endotheliale NO-Synthase [Dubbin *et al.*, 1990], die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig NO aus L-Arginin freisetzt [Moncada *et al.*, 1997]. Die Ineffektivität der cGMP-Weg Blockade mittels ODQ weist darauf hin, dass Amitriptylin über einen cGMP-unabhängigen Mechanismus die vasodilatativen Wirkungen von NO beeinflusst. NO kann z.B. auch direkt K^+ -Kanäle in der glatten Muskulatur aktivieren [Fèlètou *et al.*, 2006], und somit eine Hyperpolarisation mit konsekutiver Dilatation hervorrufen.

Amitriptylin ist ein Antagonist an postsynaptischen cholinergen Rezeptoren [Preskorn *et al.*, 2004]. Anticholinerge Eigenschaften dieses Antidepressivums sind auch an der glatten Muskulatur beim Menschen nachgewiesen [Rehavi *et al.*, 1987]. Aufgrund einer Blockade dieser cholinergen Rezeptoren der Gefäßmuskulatur ist eine zusätzliche Vasodilatation möglich. Es sollte daher geprüft werden, welchen Anteil der ausgeprägten vasodilatativen Potenz von Amitriptylin die anticholinerge Wirkung ausmacht.

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist eine Na^+ -Kanal-Blockade durch Amitriptylin, welche am Herzen bei Kaninchen mittels patch-clamp-Methodik nachgewiesen ist, und zu einer Kontraktilitätshemmung des Herzens führt [Barber *et al.*, 1991]. Eine Hemmung von Na^+ -Kanälen am glatten Muskel führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, wodurch eine Relaxation ausgelöst werden würde. Allerdings ist ein direkt dilatativer Effekt an der

Muskelzelle durch diesen Mechanismus unwahrscheinlich, da das Membranpotential der glatten Muskulatur vorrangig durch Ca^{2+} -Ströme getriggert wird, und nicht durch Na^{+} -Ströme. Weiterhin überwiegt in der glatten Muskulatur die pharmakomechanische Kopplung zur Kontraktionsentstehung gegenüber der elektromechanischen Kopplung, so dass der Einfluss von Na^{+} -Strömen im glatten Muskel gering ist [Cohen *et al.*, 1994].

Amitriptylin wirkt als 5-HT₂-Rezeptor-Antagonist [Gillmann, 2007]. Ein Teil der induzierten Vasodilatation durch Amitriptylin wird möglicherweise durch eine Blockade von Serotonin-Rezeptoren in der Aorta hervorgerufen, die von Cohen *et al.* (1981) in der Rattenaorta nachgewiesen wurde. 5-HT₂-Rezeptoren vermitteln an peripheren Arterien eine Vasokonstriktion über eine Aktivierung der IP₃-Signalkaskade [Roth *et al.*, 1986]. Amitriptylin könnte auch über die Hemmung dieses Weges eine Vasodilatation vermitteln. Es gibt bisher keine eindeutigen Ergebnisse zu Interaktionen von Amitriptylin mit Serotoninrezeptoren an peripheren Gefäßen. Weitere Untersuchungen sind nötig, z.B. mithilfe einer Inkubation mit 5-HT₂-Antagonisten wie Ketanserin oder Metergolin, um einen Einfluss von Amitriptylin auf Serotoninrezeptoren zu prüfen.

5.1.2 Fluoxetin

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen eine vasodilatative Wirkung von Fluoxetin, die zumindest teilweise durch endothelabhängige Mechanismen vermittelt wird.

Fluoxetin zeigt im Vergleich zu Amitriptylin eine geringere Potenz der Vasorelaxation in endothelintakten Arterien nach Vorkontraktion mit Phenylephrin. Dies ist an der Rechtsverschiebung der Relaxationskurve von Fluoxetin gegenüber der von Amitriptylin sichtbar. Bei fehlendem Unterschied der Konzentrations-Antwort-Kurven der endothelfreien gegenüber den endothelintakten Aorten ist die Dilatation nach den Vorkontraktionen mit Phenylephrin und KCl nicht endothelabhängig. Bei deutlicher Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve in Präparationen ohne Endothel ist auch die dosisabhängige Relaxation nach PGF_{2 α} -Präkontraktion nicht an die Integrität des Endothels gebunden.

Die Inkubation mit Fluoxetin hemmt die Kontraktionsantwort der Aortenringe auf ansteigende Phenylephrin-Konzentrationen, da sich eine Linksverschiebung der Kontraktionskurve bei den Fluoxetin-inkubierten gegenüber den Kontrollpräparationen zeigt.

Fluoxetin interagiert mit dem NO-cGMP-Signaltransduktionsweg. Die durch Fluoxetin verursachte Relaxation wird durch L-NAME und ODQ statistisch signifikant unterschiedlich

zur Kontrolle gehemmt. Es fällt besonders auf, dass die halbmaximalen Effektivdosen pEC_{50} von L-NAME und den Kontrollpräparationen ohne Endothel nahe beieinander liegen. Dies stützt die Vermutung, dass Fluoxetin eine endothelabhängige NO-Freisetzung bewirkt, die zu einer Aktivierung der NO-cGMP-Signalkaskade führt. Dieser Signalweg ist in den letzten Jahren auch in den Mittelpunkt der Pathophysiologie der Depression gerückt (McLeod *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2003). Weiterführende Studien sind nötig, um einen Zusammenhang des NO-freisetzenden Effekts von Fluoxetin und seiner antidepressiven Wirkung im ZNS zu klären.

Da die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase vorwiegend Ca^{2+} -abhängig ist [Alderton *et al.*, 2001], scheint Fluoxetin einen Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zu bewirken. Dieser kann z.B. über eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen der Endothelmembran [Nilius *et al.*, 2001] oder der IP_3 -Kaskade ausgelöst werden [Smith, 1996].

Unsere Ergebnisse der Fluoxetin-Inkubation untermauern einen endothelabhängigen Mechanismus dieses SSRI. Nach der Inkubation verringert sich die Kontraktionsantwort auf Phenylephrin an endothelintakten im Vergleich zu endothelfreien Aorten nach der Inkubation mit Fluoxetin, was auf eine endothelabhängige Hemmung der Vasokonstriktion hinweist. Es ist bekannt, dass eine Endothelentfernung die kontraktile Reaktion von unbehandelten arteriellen Gefäßen auf α_1 -Agonisten verstärkt. Dieser Effekt wird auf die fehlende reaktive NO-Freisetzung aus dem Endothel zurückgeführt [Carrier *et al.*, 1985; Gürdal *et al.*, 2005]. Die Inhibition der Vasokonstriktion nach Fluoxetin-Inkubation ist aber nicht nur auf eine reaktive NO-Freisetzung des Endothels zurückzuführen, denn die Rechtsverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve der mittels Fluoxetin behandelten Aorten gegenüber der Kontrolle zeigt, dass eine zusätzliche Inhibition der Kontraktionsantwort durch Fluoxetin auftritt.

Ungvari *et al.* (1999) führten *in vitro* Experimente an Rattenarterien durch, bei welchen Fluoxetin diese Gefäße nach Vorkontraktion mit Noradrenalin vollständig dilatierte. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen war dieser Effekt endothelunabhängig. Diese Arbeitsgruppe verwendete isolierte kleine Cerebralarterien, die womöglich anders auf Fluoxetin reagieren als größere Arterien wie Aorten. Brandes *et al.* (2000) beschrieben, dass in kleinen Gefäßen die Freisetzung des EDHF und in größeren Gefäßen die NO-cGMP-Signalkaskade überwiegt. Dies könnte die differierende Wirkung von Fluoxetin auf Cerebralarterien erklären, da hier die Aktivierung der NO-cGMP-Signalkaskade eine geringere Rolle für die Vasodilatation spielt als in Aorten.

In den Untersuchungen von Ungvari *et al.* (1999) hemmte Fluoxetin die Agonist-induzierte Kontraktion mittels Noradrenalin. Diese Wirkung wurde auch an isolierten Arteriolen der Skelettmuskulatur gezeigt [Pacher *et al.*, 1999].

Des Weiteren zeigen unsere Resultate, dass Fluoxetin eine aktivierende Wirkung auf K_v -Kanäle der glatten Muskulatur hat, denn nach Inkubation mit den K^+ -Kanal-Blockern 4-AP und TEA wird die Fluoxetin-induzierte Dilatation gehemmt. Diese Aktivierung von K^+ -Kanälen direkt an der Membran der Muskelzellen führt zu einer Hyperpolarisation und damit einer Relaxation der glatten Muskulatur [Fèlètou *et al.*, 2006]. Ungvari *et al.* (1999) schlossen hingegen einen Einfluss von Fluoxetin auf die Aktivität von K_v -Kanälen in Cerebralarterien aus. In der vaskulären glatten Muskulatur gibt es verschiedene Subtypen von K_v -Kanälen, die sich in ihrer Aktivierung, Sensitivität auf Inhibitoren und der Leitfähigkeit von K^+ -Ionen unterscheiden [Nelson *et al.*, 1995]. In Cerebralarterien [Albarwani *et al.*, 2003] und Aorten [Cox *et al.*, 2001] von Ratten wurden teilweise dieselben K_v -Kanal-Klassen detektiert. Cox *et al.* fanden allerdings, dass bestimmte K_v -Kanal-Subtypen in der Rattenaorta dominieren sowie noch weitere Arten der Kanäle exprimiert werden. Die Expression von K_v -Kanäle divergiert somit in Abhängigkeit von der Organlokalisierung.

Dies erklärt, weshalb Fluoxetin in der Rattenaorta K_v -Kanäle aktiviert, und nicht in zerebralen Arterien. In weiteren Studien sollte untersucht werden, welche Subklassen dabei relevant sind.

Farrugia untersuchte 1996 die Wirkungen von Fluoxetin auf K^+ -Kanäle in humanen Jejunalarterien mittels *patch-clamp*-Methodik. Er beschrieb einen aktivierenden Einfluss von Fluoxetin auf K_{Ca} -Kanäle. In unseren Experimenten ließ sich keine Wirkung auf K_{Ca} -Kanäle belegen, da die Charybdotoxin-Inkubation keinen Unterschied zu den Kontrollpräparationen ergab. Diese differierenden Ergebnisse sind auf die Nutzung der experimentellen Methode (*patch-clamp*) zurückzuführen, bei der auch sehr geringe Ionenströme gemessen werden können. Möglicherweise hat Fluoxetin einen geringen aktivierenden Effekt auf K_{Ca} , der allerdings nur zu kleinen Hyperpolarisationen führt, die in unseren Untersuchungen keine sichtbaren Auswirkungen auf den glatten Muskeltonus hatte.

Ungvari *et al.* (1999) fanden in Cerebralarterien von Ratten, dass Fluoxetin die Kontraktionen hemmt, die durch Serotonin (5-HT) und Bay K 8644 (ein Öffner von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen) ausgelöst wurden. Ihre Schlussfolgerung war, dass Fluoxetin die durch

Agonisten (wie 5-HT) verursachte Aktivierung dieser Ca^{2+} -Kanäle und damit die glatte Muskelkontraktion antagonisiert.

Am Rattenherzen ist neben einer Blockade von K^+ -Kanälen auch eine Hemmung von L-Type- Ca^{2+} -Kanälen in Rattenmyozyten und damit eine Kontraktilitätshemmung mit konsekutiver Hypotension verifiziert worden [Park *et al.*, 1999].

Ein Einfluss von Fluoxetin auf Ca^{2+} -Kanäle sollte auch in unserem Modell untersucht werden, da spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der glatten Muskulatur von Rattenaorten exprimiert werden [Cohen *et al.*, 1999], und eventuell ein Teil des vasodilatativen Effektes von Fluoxetin auf eine Hemmung dieser Kanäle zurückzuführen ist. Dies kann in unserem Versuchmodell mittels Inkubation der Rattenaorten mit dem von Ungvari *et al.* (1999) verwendeten BAY K 8644 analysiert werden.

Es ist bekannt, dass Fluoxetin im zentralen Nervensystem die Serotonin-Wiederaufnahme hemmt. Fluoxetin fungiert dabei als Blocker des 5-HT-Transporters und damit als indirekter Agonist an 5-HT₂- und 5-HT₃-Rezeptoren [Preskorn *et al.*, 2004]. Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass der Serotonintransporter auch in peripherer vaskulärer glatter Muskulatur existiert und von Fluoxetin gehemmt wird und es außerhalb des zentralen Nervensystems den Serotonin-Spiegel erhöht [Ni *et al.*, 2004]. Cohen *et al.* (1981) zeigten, dass die Rattenaorta hauptsächlich 5-HT₂-Rezeptoren exprimiert, deren Aktivierung eine Vasokonstriktion hervorruft. Ein Anstieg der Serotoninkonzentration aufgrund einer Hemmung der Serotoninwiederaufnahme durch Fluoxetin müsste somit eher zu einer Kontraktion führen. In unseren Untersuchungen zeigte sich keine Fluoxetin induzierte Vasokonstriktion, sondern eine Relaxation der Rattenaorten. Eine Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren durch einen Serotoninanstieg ist daher nicht wahrscheinlich.

Serotonin kann aber auch Stickoxid aus dem Endothel freisetzen und auf diesem Weg vasorelaxierend wirken, wie es an Rattenkoronarien gezeigt werden konnte [Mankad *et al.*, 1991].

Die Beteiligung von Serotoninrezeptoren bei der Fluoxetin-induzierten Vasorelaxation ist weiter zu analysieren. Es ist bekannt, dass Fluoxetin ein direkter Antagonist an 5-HT₃- [Fan *et al.*, 1994] und 5-HT_{2C}- Rezeptoren [Ni *et al.*, 1997] in Neuronen ist. Es wäre interessant, ob es an den 5-HT₂-Rezeptoren in der peripheren vaskulären glatten Muskulatur [Roth *et al.*, 1986] eine vasorelaxierende Wirkung hervorrufen kann. Für andere SSRIs wie Femoxetin oder Paroxetin ist ein peripher-vaskulärer 5-HT-Rezeptorantagonismus nachgewiesen [Petersen *et al.*, 1979]. Für das SSRI Sertralin wurde auch an Rattenaorten eine

endothelunabhängige Relaxation nach Agonist-Stimulation gezeigt [van Melle *et al.*, 2004]. Mittels Inkubationsversuchen mit 5-HT-Rezeptorblockern wie z.B. Mianserin oder Metergolin sollte eine Beeinflussung von Serotoninrezeptoren durch Fluoxetin in der Rattenaorta anhand unseres *in vitro* Modells weiter untersucht werden.

5.1.3 Tranylcypromin

Tranylcypromin weist eine geringe Relaxationstendenz an vorkontrahierten Aortenringen auf. Tranylcypromin hat in unseren Untersuchungen unterschiedliche bzw. entgegengesetzte Wirkungen auf die Reaktionen der vaskulären glatten Muskulatur.

In niedrigen Konzentrationen bzw. zu Beginn der Experimente wirkt es zunächst vasodilatativ, da es zu einer Relaxation der vorkontrahierten Aortenmuskulatur kommt. Ab einer Konzentration von ca. 5 μ M verringert sich diese Wirkung, was sich in einer stagnierenden Relaxationskurve darstellt. In den endothelintakten Präparationen kann auch durch hohe Konzentrationen an Tranylcypromin keine vollständige Vasodilatation auf die Ausgangsspannung erreicht werden.

Tranylcypromin führt teilweise zu einer weiteren Vasokonstriktion der endothelintakten Aorten. Nach PGF_{2 α} -Vorkontraktion zeigt die graphische Darstellung der Dosis-Antwort-Kurven an Aorten mit Endothel, dass ab einer Konzentration von ca. 5 μ M Tranylcypromin zusätzliche Kontraktionen hervorgerufen werden. Da der pEC₅₀-Wert durch das Graphikprogramm nicht berechnet werden konnte, war es nicht möglich, eine statistische Auswertung vorzunehmen.

Die mit Tranylcypromin inkubierten Aorten reagieren im Vergleich zu den Kontrollpräparationen schneller und empfindlicher auf ansteigende Phenylephrin-Konzentrationen. Schon vor adrenerger Stimulation zeigt sich eine durch Tranylcypromin verursachte Kontraktion.

Es ist weiter zu analysieren, ob der vasokonstriktive Effekt von Tranylcypromin nur konzentrations- oder auch zeitabhängig ist, da sich der kontrahierende Effekt erst nach einer Einwirkzeit der kumulativen Konzentrationen von mindestens 30 Minuten darstellt.

Der variierende Effekt von Tranylcypromin auf die glatte Gefäßmuskulatur spiegelt sich auch in der klinischen Anwendung wieder. Eine Hypothese zu den differenten Wirkungen von Tranylcypromin auf den Blutdruck wurde von Keck *et al.* (1991) folgendermaßen formuliert: Die hypertensive Reaktion nach Tranylcypromingabe wird durch den Noradrenalin-Anstieg aufgrund der Hemmung des MAO-Enzyms verursacht. Der hypotensive Effekt nach längerer

Zeit ist auf eine direkte Interaktion von Tranylcypromin mit α -Adrenozeptoren zurückzuführen.

In unseren Inkubationsexperimenten mit Propanolol bzw. Prazosin fehlt eine Verschiebung der Relaxationskurve gegenüber den Kontrolluntersuchungen. Daher hat Tranylcypromin in unserem *in vitro* Modell keine direkte Wirkung auf α - bzw. β - Adrenozeptoren.

Die nach Tranylcypromin-Inkubation auftretende Verstärkung des kontrahierenden Effektes von Phenylephrin in unseren Untersuchungen entspricht der bekannten Wirkung von Tranylcypromin als irreversibler Hemmer der Monoaminoxidase A und B. Die MAO-Inhibition führt zu einer Potenzierung der Effekte von endogenen Aminen wie Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, den sogenannten „Trace-Aminen“ wie Tyramin, Phenylethylamin, Octopamin und auch exogenen Sympathomimetika wie Phenylephrin [Baker *et al.*, 1992; Preskorn *et al.*, 2004]. Die MAO-A ist in Arterien immer in Assoziation zu sympathischen Ganglien zu finden und anscheinend abhängig von deren adrenerger Innervation. Sie ist intrazellulär immer an Mitochondrien gebunden, sowohl in den glatten Muskeln der Arterien, als auch direkt in den adrenergen Nervenendigungen [Coquil *et al.*, 1973].

Die Wirkung als MAO-Inhibitor lässt sich mit unseren Inkubationsergebnissen gut vereinbaren. Hier ist die Einwirkzeit (ca. 30 Minuten) von Tranylcypromin ausschlaggebend. Durch den Anstieg nicht abgebauter, kontrahierend wirkender Katecholamine wird schon vor Phenylephringabe eine Tonussteigerung der Arterien erreicht. Die Vasokonstriktion wird durch ansteigende Dosen dieses Adrenozeptor-Agonisten weiter potenziert. Der zeitabhängige MAO-Inhibitionseffekt von Tranylcypromin bestätigt sich in den Relaxationsversuchen, in denen es ab einer gewissen Zeit bzw. Konzentration an Tranylcypromin zu keiner weiteren Dilatation sondern sogar Kontraktion kommt.

Für Tranylcypromin ist von mehreren Autoren [Hong *et al.*, 1980; Ioannou *et al.*, 1984; Chaud *et al.*, 1987; Frieling *et al.*, 2006] ein Einfluss auf die Prostaglandin- und Arachidonsäure-Synthese nachgewiesen worden. Prostaglandine sind lokale, kurzlebige Mediatoren, die aus endothelialen Zellen, Thrombozyten und Leukozyten freigesetzt werden. Sie gehören zu der Gruppe der Eicosanoide, welche alle als Ausgangssubstanz Arachidonsäure aus Zellmembran-Phospholipiden benötigen [Cohen *et al.*, 1994].

Für unsere Betrachtungen sind die Prostaglandine PGI₂, PGF₂ und PGE₂ interessant. Prostaglandine vermitteln ihre Signale am glatten Muskel über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Das dilatatorisch wirksame PGI₂ führt zu einem Anstieg der cAMP-

Konzentration. Die vasokonstriktorisch wirkenden Prostaglandine PGF₂ und PGE₂ regen die IP₃-Signalkaskade an, sodass Ca²⁺ im Cytosol ansteigt [Cohen *et al.*, 1994].

Tranlylcypromin scheint einen vorwiegend hemmenden Effekt auf die Synthese bzw. die Wirkung von PGI₂ zu haben. Chaud *et al.* (1987) führten *in-vitro*-Untersuchungen an Rattenaorten durch. Sie fanden, dass eine durch PGI₂ induzierte Vasorelaxation durch Tranlylcypromin inhibiert wurde. Hong *et al.* (1980) beschrieben an endothelialen Zellen der Rinderaorta eine Hemmung der PGI₂-Synthetase sowie der Arachidonsäure-Freisetzung durch Tranlylcypromin. Daher wird auch die Synthese von kontrahierenden Prostaglandinen wie PGF₂ und PGE₂ beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Tranlylcypromin an mehreren Stellen des Prostaglandinstoffwechsels sowie deren Signalmechanismen eingreift.

Unsere Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass in niedrigen Konzentrationen (bis ca. 5 µM) und bei kurzer Wirkdauer Tranlylcypromin zunächst relaxierend über eine Hemmung der Prostaglandin-Synthese wirkt, wobei der Einfluss auf die Synthese der kontrahierenden PGE₂ und PGF₂ überwiegt. Der Effekt von Tranlylcypromin nach Vorkontraktion mit PGF_{2α} untermauert diesen Wirkmechanismus: Die Inhibition der PGF_{2α}-Bildung ist in unserem Experiment wenig wirksam, da dieser Mediator in dieser Untersuchung nicht nur durch das Aortenendothel gebildet wird, sondern zusätzlich synthetisches PGF_{2α} zu einer Muskelkontraktion führt. Die Relaxation durch ansteigende Tranlylcyprominkonzentrationen bleibt aus. Da die Prostaglandin-Synthese vorwiegend im Endothel stattfindet [Cohen *et al.*, 1994], ist es plausibel, dass nur die endothelintakten Arterien diese zusätzlichen Kontraktionen aufweisen.

Es ist genauer zu untersuchen, ab welcher Konzentration bzw. Inkubationszeit die Wirkung von Tranlylcypromin als Inhibitor der MAO oder als Hemmer der Prostaglandin-Synthese überwiegt.

Tranlylcypromin beeinflusst die NO-cGMP-Signalkaskade und aktiviert K_v-Kanäle. Nach Inkubation mit L-NAME und ODQ bzw. 4-AP und TEA kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Relaxationskurve von Tranlylcypromin. Eine direkte Wirkung von Tranlylcypromin auf das NO-System oder auf K⁺-Kanäle wurde bisher nicht beschrieben. Es ist zu analysieren, ob dieser Effekt auf direkte Wirkungen von Tranlylcypromin oder indirekt auf die Beeinflussung des Prostaglandin-Stoffwechsels zurückzuführen ist. PGI₂ kann z.B. cAMP-abhängig K⁺-Kanäle in der glatten Muskulatur aktivieren [Cohen *et al.*, 1994].

5.1.4 Venlafaxin

Die Relaxationspotenz von Venlafaxin ist im Vergleich zu Amitriptylin und Fluoxetin gering. Unabhängig von dem vorkontrahierenden Agens konnten alle Arterien mittels ansteigender Konzentrationen von Venlafaxin vollständig dilatiert werden.

Venlafaxin dilatiert Aorten nach Vorkontraktion endothelunabhängig. Nach Phenylephrin- sowie PGF_{2α}-Vorkontraktion zeigte sich eine statistisch signifikante Rechtsverschiebung der endothelintakten gegenüber den endothelfreien Aorten, d.h. Venlafaxin übt seine relaxierenden Wirkungen in diesen Untersuchungen nicht über das Endothel aus.

Die Inkubationsversuche mit Venlafaxin weisen darauf hin, dass dieses Antidepressivum mit Signaltransduktionsmechanismen interagiert, die vom Endothel abhängig sind. Durch Inkubation der Aortenringe mit Venlafaxin verschiebt sich die Konzentrations-Antwort-Kurve von Phenylephrin nach links. Daher vermindert Venlafaxin die Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur auf ansteigende Konzentrationen dieses Adrenozeptor-Agonisten. Bei intaktem Endothel findet sich eine zusätzliche Verzögerung der Vasokonstriktion, da die Linksverschiebung der Kontraktionskurve bei endothelintakten gegenüber endothelfreien Aortenringen verstärkt ist.

Venlafaxin wirkt vasoaktiv durch eine Beeinflussung der NO-cGMP-Signalkaskade. In unseren Experimenten hatten die L-NAME- und ODQ-Inkubationen einen deutlichen Einfluss auf die Relaxationskurve von Venlafaxin. Die Dosis-Antwort-Kurve der Inkubationen ist zu einem statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle nach rechts verschoben. Angulo *et al.* (2004) fanden bei *in-vivo*-Experimenten an weiblichen Kaninchen, dass Venlafaxin und ein weiteres SNRI Paroxetin den durch Elektrostimulation induzierten genitalen Blutfluss im Corpus cavernosum hemmen. Ebenso verminderten Infusionen von Noradrenalin und L-NAME den Blutfluss. Sie vermuteten, dass der inhibitorische Effekt von Venlafaxin auf einen Anstieg von Noradrenalin durch die Wiederaufnahmehemmung dieses Transmitters an den neuronalen Synapsen bedingt ist. Eine Interaktion von Venlafaxin mit dem NO-cGMP-Signalweg wurde allerdings ausgeschlossen, da eine Infusion von L-Arginin den inhibitorischen Effekt nicht beeinflusste. Angulo *et al.* verwendeten ein *in-vivo*-Modell und gaben des Weiteren als Maßparameter nur den Blutfluss im genitalen Gefäßbett an, sodass aus diesen Untersuchungen nicht hervorgeht, ob venöse oder arterielle Blutgefäße durch die Venlafaxin-Infusion beeinflusst wurden. Die Verwendung des divergenten Untersuchungsmodells sowie Experimente an nicht definierten Blutgefäßen erklärt die von unserer Studie abweichenden Resultate dieser Arbeitsgruppe. Die Beschreibung der

vasoaktiven Effekte von Venlafaxin von Angulo *et al.* (2004) deuten auf eine vasokonstriktorische, Noradrenalin-ähnliche Wirkung hin. Des Weiteren fanden sie keinen Hinweis auf eine Stickoxid-abhängige Vasoaktivität. Unsere Ergebnisse zeigen hingegen, dass Venlafaxin die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert und zu einer Vasodilatation führt, die teilweise durch eine Beeinflussung der NO-cGMP-Signalkaskade bedingt ist.

Venlafaxin hat eine aktivierende Wirkung auf K_v -Kanäle der glatten Muskulatur mit konsekutiver Hyperpolarisation der Muskelzelle. Nach Inkubation mit den K^+ -Kanal-Blockern 4-AP und TEA wurde die Venlafaxin-induzierte Dilatation der präkontrahierten Aortenringe gehemmt. Die Aktivierung von K^+ -Kanälen an der Gefäßmuskulatur erklärt, weshalb Venlafaxin auch Aorten ohne Endothel dilatiert, obwohl diesen das endotheliale NO fehlt, durch dessen Freisetzung Venlafaxin an endothelintakten Aortenringen zusätzlich vasodilatativ wirkt.

Die SQ 22536-Inkubation führte zu einer Linksverschiebung der durch Venlafaxin induzierten Konzentrations-Antwort-Kurve mit einem statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. SQ hemmt die intrazelluläre Adenylatzyklase der glatten Muskulatur, wodurch der cAMP-Spiegel sinkt [Fabbri *et al.*, 1991]. Im glatten Muskel führt dies zu einer fehlenden Aktivierung der Proteinkinase A und somit der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums. Die Ca^{2+} -Konzentration steigt und es kommt zu einer Kontraktion der Muskulatur mit konsekutiver Vasokonstriktion [Itoh, 1991]. In unseren Experimenten führen ansteigende Venlafaxinkonzentrationen nach SQ-Inkubation aber zu einer stärkeren Vasodilatation. Venlafaxin beeinflusst daher die cAMP-Konzentration bzw. dessen Signalkaskaden der Ca^{2+} -Regulation und der Muskelkontraktion im glatten Muskel. Eine Inhibition der Ca^{2+} -ATPase durch Venlafaxin ist in Neuronen gezeigt worden [Couture *et al.*, 2001]. Dieser Mechanismus würde allerdings im Muskel zu einer Kontraktion führen, da eine Hemmung der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führt [Itoh, 1991]. Eine Hemmung der muskulären Ca^{2+} -ATPase erklärt daher nicht die vasodilatative Wirkung von Venlafaxin. Im Endothel führt eine Inhibition der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels [Hutcheson *et al.*, 1997]. Ca^{2+} aktiviert wiederum die endotheliale NO-Synthase [Alderton *et al.*, 2001], wodurch eine NO-vermittelte Vasodilatation ausgelöst wird. Die in unseren Experimenten zu vermutende Aktivierung des NO-cGMP-Weges durch Venlafaxin unterstützt die Vermutung, dass eine Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase stattfindet. Diese mögliche Wirkung von Venlafaxin auf die Ca^{2+} -ATPase im Endothel bzw.

im glatten Muskel sollte näher analysiert werden. Dazu könnten in unserem *in-vitro*-Modell zusätzliche Inkubationsversuche von endothelintakten und endothelfreien Aortenringen mit spezifischen Inhibitoren der Ca^{2+} -ATPase z.B. Thapsigargin [Verboomen *et al.*, 1992] erfolgen. In diesem Zusammenhang ist zu klären, ob Venlafaxin eher kontrahierend durch die Hemmung der Ca^{2+} -ATPase im Muskel, der SERCA, oder relaxierend über eine Inhibition der endothelialen Ca^{2+} -ATPase wirkt. Daher sollte auch in endothelfreien Aorten die Wirkung der SQ-Inkubation auf ansteigende Konzentrationen an Venlafaxin geprüft werden.

Venlafaxin ist das einzige der vier getesteten Antidepressiva, bei welchem die Propranolol- und Prazosin-Inkubationen eine Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve gegenüber der Kontrolle mit einem statistisch signifikanten Unterschied zeigen. Die Linksverschiebung bedeutet, dass diese Aorten schneller als die Kontrollpräparationen durch ansteigende Dosen von Venlafaxin relaxieren. Der Unterschied wurde aber erst in hohen Konzentrationen an Venlafaxin deutlich.

Venlafaxin hat eine bekannte, stark dosisabhängige Wirkung auf die Reuptake-Transporter für Serotonin bzw. Noradrenalin. Venlafaxin hat dabei eine höhere Affinität zum Serotonin-Reuptake-Transporter (SERT) als für den von Noradrenalin (NRT) und wirkt demzufolge in geringeren Dosen wie ein SSRI. Erst in hohen Konzentrationen wirkt es vermehrt auf den NRT [Owens *et al.*, 1997]. So kommt es erst nach Gaben hoher Dosen an Venlafaxin zu hypertensiven Reaktionen, da der Noradrenalin-Spiegel ansteigt. Mehrere Studien unterstützen die Hypothese, dass Venlafaxin den Blutdruck dosisabhängig durch einen Noradrenalin-Konzentrationsanstieg und die resultierende Potenzierung der sympathischen Aktivität erhöht [Thase, 1998; Feighner, 1995]. *In vivo* konnte am Menschen gezeigt werden, dass Venlafaxin die durch Noradrenalin hervorgerufene Venenkonstriktion dosisabhängig verstärkt [Abdelmawla *et al.*, 1999].

Auf unsere Experimente übertragen bedeutet dies, dass die Adrenozeptor-Blocker Propranolol, ein unselektiver β_1 - und β_2 -Rezeptorblocker, und Prazosin, ein selektiver α_1 -Rezeptorhemmer, die kontrahierenden Wirkungen des durch Wiederaufnahmehemmung ansteigenden Noradrenalins hemmen. Für Prazosin ist dieser Effekt plausibel, da hauptsächlich α_1 -Rezeptoren an der vaskulären glatten Muskulatur als kontraktionsvermittelnde Rezeptoren dominieren. Propranolol blockiert die eine Vasodilatation vermittelnden β_2 -Rezeptoren, da diese in Arterien prädominieren [Guimaraes *et al.*, 2001]. Daher müsste die Propranololinkubation eher eine weitere Kontraktion bei dem zu vermutenden Noradrenalinanstieg durch die Venlafaxingabe hervorrufen. Dieser Widerspruch ist weitergehend zu untersuchen. Dafür sollten z.B. Inkubationen mit selektiven

β_1 - bzw. β_2 -Rezeptorblockern erfolgen, um die Relevanz der jeweiligen Rezeptoren bei der induzierten Vasodilatation zu ermitteln. Des Weiteren könnte man versuchen, während des Experimentes die Noradrenalin-Konzentration mittels chemischer Analyse innerhalb der Lösung zu bestimmen, da die Menge dieses Katecholamins aufgrund der Wiederaufnahmemhemmung durch Venlafaxin in der Lösung ansteigen müsste.

Ein direkter Effekt von Venlafaxin an α_1 -Adrenozeptoren oder cholinergen Rezeptoren ist unwahrscheinlich, da es zu diesen eine geringe Affinität aufweist [Owens *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2004].

Im zentralen Nervensystem hemmt Venlafaxin die Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin [Gründer *et al.*, 1996]. Da es in niedrigen Dosen wie ein SSRI agiert, wirkt es auch als indirekter Agonist an 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2C}- und 5-HT₃-Rezeptoren. In hohen Dosen hemmt Venlafaxin vermehrt die Noradrenalin-Wiederaufnahme. Bei gleichzeitiger Gabe von Noradrenalin-Agonisten treten hypertensive Krisen, Tachykardie und Tremor auf [Preskorn *et al.*, 2004].

Es ist nicht bekannt, ob Venlafaxin wie z.B. Fluoxetin den Serotonin-Transporter direkt an Arterien hemmt, oder ob sich seine Interaktionen auf die Reuptake-Transporter in sympathischen Nervenfasern beschränken [Gründer *et al.*, 1996].

Khalifa *et al.* (1999) führten mit Venlafaxin *in vitro* Untersuchungen an Myozyten von Meerschweinchen durch, und fanden, dass es hier Na⁺-Kanäle und den Na⁺-Einwärtsstrom nach intrazellulär konzentrationsabhängig hemmt. Über eine Kontraktilitätshemmung könnte auch dieser Mechanismus zu Blutdrucksenkungen führen.

Venlafaxin wird über CYP2D6 zu O-Desmethylvenlafaxin abgebaut. Dieser Metabolit hat dieselben pharmakodynamischen Eigenschaften wie seine Muttersubstanz [Preskorn *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1997]. Möglicherweise trägt O-Desmethylvenlafaxin zu kardiovaskulären Effekten von Venlafaxin bei.

Da wir in unseren Untersuchungen Venlafaxin aus Tabletten gewonnen haben (Trevilor®), sind vasoaktive Nebeneffekte der darin enthaltenen Zusatzstoffe (siehe auch im Kapitel 4.6 Material und Methoden, Chemikalien) nicht auszuschließen. Bis zum Abschluss unserer Untersuchungen bestand ein Patent von Wyeth Pharma auf dieses Medikament, sodass Untersuchungen an der Reinsubstanz bis dahin nicht möglich waren.

Schaller *et al.* (2005) fanden z.B., dass intravenöse Eiseninfusionen bei Dialyse-Patienten vasodilatatorische Effekte haben. Allerdings wird dies erst in sehr hohen Konzentrationen von

300 mg in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung erreicht. In unseren Experimenten wurden diese Konzentrationen bei weitem nicht erreicht.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Verwendung der Rattenaorten als Modell für endothelhaltige arterielle Gefäße

In vitro Untersuchungen an isolierten Rattenaorten haben den Vorteil, dass die beobachteten Effekte getrennt von der Interaktion mit anderen Organsystemen bewertet werden können. Im Modell der isometrischen Myotonometrie an Gefäßringen können durch Entfernung des Endothels endothelvermittelte und direkte Wirkungen der untersuchten Antidepressiva an der glatten Gefäßmuskulatur differenziert werden.

Unsere Experimente konzentrierten sich auf die generellen Wirkungen der Antidepressiva auf das Endothel und die glatte Gefäßmuskulatur. Kleinere Gefäße als Aorten von Ratten sind für das genutzte *in vitro* System ungeeignet, da nur Arterien mit einem Mindestdurchmesser von 2 mm untersucht werden können [Gonzales *et al.*, 2000].

Beim Menschen verursachen kleinere Arterien bzw. Arteriolen den Hauptanteil des peripheren Gefäßwiderstandes und beeinflussen den Blutdruck maßgeblich [Lang *et al.*, 2008]. Ob die Antidepressiva ähnliche Wirkungen auf diese Gefäße haben wie auf die Aorta von Ratten, sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

5.2.2 Gruppengröße n

Bei den Experimenten wurden Gruppengrößen von 3 bis 8 verwendet. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen gelten als Vorversuche und die Ergebnisse stellen die Tendenz der jeweiligen Substanz dar, unter bestimmten Bedingungen (z.B. Blockade von K⁺-Kanälen oder des NO-cGMP-Weges) vasodilatativ oder vasokonstriktorisch zu wirken.

5.2.3 Verwendete Konzentration von PGF_{2α}

Nach PGF_{2α}-Vorkontraktion war bei den endothelintakten Aorten durch keines der Antidepressiva eine komplette Dilatation erreichbar (vergleiche auch die Abbildungen 5 a-d). Es ist möglich, dass die verwendete Konzentration dieses Prostaglandins zu hoch gewählt war. Ähnliche Konzentrationen wurden allerdings auch bei *in vitro* Experimenten anderer Arbeitsgruppen verwendet [Sasaki *et al.*, 2003; Szekeres *et al.*, 1998] und daher bei unseren Untersuchungen ebenso dosiert. Um mögliche Wirkungen der Antidepressiva auf den

Prostaglandinstoffwechsel näher zu definieren, sollten Folgeexperimente mit einer angepassten niedrigeren PGF_{2α}-Konzentration durchgeführt werden.

5.2.4 Nebeneffekte der verwendeten blockierenden Substanzen

Für alle Inkubationsexperimente gilt, dass es zwischen den Substanzen und anderen Proteinen Interaktionen sowie eine fehlende Komplettblockade des Zielproteins geben kann.

Bei den Inkubationen mit L-NAME, ODQ, Charybdotoxin und TEA kam es bereits vor Gabe von Phenylephrin zu einer Kontraktion, nach Gabe von SQ und Glibenclamid zu einer geringen Dilatation der Aorten (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei der Auswertung wurde die summativ erreichte Maximalspannung nach Inkubation und Präkontraktion als 100 % angesehen.

Die Adrenozeptorblocker Propranolol und Prazosin waren in unseren Vorexperimenten selbst stark vasodilatativ (Ergebnisse nicht dargestellt). Beide Substanzen dilatierten Aorten, die mit 20 mM KCl vorkontrahiert waren, schnell und komplett auf die Ausgangsspannung. Untersuchungen zu den Antidepressiva waren hier nicht möglich, da ein stabiles Kontraktionsplateau vonnöten ist. Nach Vorkontraktion mittels einer höheren Dosis KCl (40 mM) blieb auch nach Inkubation mit Propranolol bzw. Prazosin das Kontraktionsplateau stabil.

5.2.5 Fehlende pharmakodynamische Bindungsstudien

Die beschriebenen Einflüsse der untersuchten Antidepressiva auf verschiedene Signalmechanismen und -proteine in unseren Untersuchungen geben nur einen Hinweis auf eine direkte Interaktion. Anhand unserer Studie kann keine Aussage über die Art der Interaktion am Protein gemacht werden, also ob die Substanz beispielsweise ein Agonist, ein partieller Agonist oder ein Antagonist am untersuchten Protein ist. Zur Klärung sind pharmakodynamische Bindungsstudien zu der jeweiligen vermuteten Wechselwirkung von Antidepressivum und Protein bzw. Rezeptor notwendig.

6. Zusammenfassung

Einleitung: In dieser Studie wurden die antidepressiv wirksamen Medikamente Amitriptylin, Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin auf ihre peripheren vasoaktiven Eigenschaften hin untersucht, da sie in der klinischen Anwendung häufig zu Blutdruckveränderungen führen.

Material und Methoden: Es wurden *in-vitro*-Untersuchungen an endothelintakten und endothelfreien Rattenaorten durchgeführt. Wir ermittelten die Effekte der Antidepressiva in kumulativer Dosierung auf mittels KCl, Phenylephrin und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ präkontrahierte Aortenringe. Weiterhin wurden die zugrunde liegenden vasoaktiven Mechanismen im Hinblick auf die NO-cGMP-Signaltransduktion, den *second-messenger* cAMP und die Beteiligung von K^+ -Kanälen sowie Adrenozeptoren näher untersucht.

Ergebnisse: Alle vier Antidepressiva haben direkte Effekte auf die Rattenaorta *in-vitro*. Sie dilatieren konzentrationsabhängig vorkontrahierte Aortenringe; pEC_{50} nach Vorkontraktion mit Phenylephrin (0,1 μ M): Amitriptylin (6,98 \pm 0,13), Fluoxetin (6,11 \pm 0,05), Tranylcypromin (5,33 \pm 0,05), Venlafaxin (4,45 \pm 0,08) (n=8); mit KCl (20 mM): Amitriptylin (4,89 \pm 0,11), Fluoxetin (6,00 \pm 0,06), Tranylcypromin (4,99 \pm 0,30), Venlafaxin (5,02 \pm 0,07) (n=7). Hohe Konzentrationen an Tranylcypromin führen nach Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ zu einer weiteren Kontraktion endothelintakter Aorten. Gegenüber den Kontrollexperimenten führte die Hemmung des NO-cGMP-Signalweges, der cAMP-Produktion sowie die Blockade von K^+ -Kanälen und Adrenozeptoren zu Verschiebungen der Dosis-Antwort-Kurven der Antidepressiva. Amitriptylin, Fluoxetin und Venlafaxin hemmen die Kontraktionsantwort von Aortenringen auf adrenerge Einflüsse, Tranylcypromin verstärkt diese hingegen.

Diskussion: Amitriptylin interagiert mit der pharmakomechanischen Kopplung im glatten Gefäßmuskel, indem es die Aortenringe durch eine antagonistische Wirkung an α_1 -Adrenozeptoren relaxiert. Auch Venlafaxin interagiert mit Adrenozeptoren. Fluoxetin, Tranylcypromin und Venlafaxin wirken über die elektromechanische Kopplung durch eine K^+ -Kanal-Aktivierung vasodilatierend. Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch die antidepressiven Medikamente ist teilweise abhängig von der Integrität des Endothels, da insbesondere eine Aktivierung der endothelabhängigen Induktion der NO-cGMP-Signalkaskade durch die Antidepressiva stattfindet. Die zusätzlich vasokonstriktive Wirkung von Tranylcypromin lässt sich durch seine bekannte Interaktion mit dem Prostaglandin-Stoffwechsel erklären. Die Relaxation der Rattenaorta *in vitro* und das Auftreten hypotensiver Verläufe bei klinischer Anwendung der untersuchten Antidepressiva kann durch die in dieser Studie gezeigten direkten peripheren vaskulären Effekte dieser Medikamente mit erklärt werden.

7. Literaturverzeichnis

ABDELMAWLA AH, LANGLEY RW, SZABADI E, BRADSHAW CM. Comparison of the effects of venlafaxine, desipramine, and paroxetine on noradrenaline- and methoxamine-evoked constriction of the dorsal hand vein. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48:345-54.

ALBARWANI S, NEMETZ LT, MADDEN JA, TOBIN AA, ENGLAND SK, PRATT PF, RUSCH NJ. Voltage-gated K⁺ channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *J Physiol.* 2003; 551:751-63.

ALDERTON W, COOPER C, KNOWLES RG Review: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357: 593-615.

ANGULO J, CUEVAS P, CUEVAS B, GUPTA S, SÀENZ DE TEJADA I. Mechanisms for the inhibition of genital vascular responses by antidepressants in a female rabbit model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310:141-9.

BAKER GB, COUTTS RT, MCKENNA KF, SHERRY-MCKENNA RL. Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. *J Psychiatry Neurosci.* 1992; 17:206-14.

BALLENGER JC. Clinical evaluation of venlafaxine. *Clin Psychopharmacol.* 1996; 16:29-35. (abstract)

BARBER MJ, STARMER CF, GRANT AO. Blockade of cardiac sodium channels by amitriptyline and diphenylhydantoin. Evidence for two use-dependent binding sites. *Circ Res.* 1991; 69:677-96. (abstract)

BIEBLER KE, JÄGER B, WODNY M. Biomathematik - Vorlesungen und Übungen für Mediziner. *Shaker Verlag* 2001, Aachen. S. 112-120.

BIEL M, ZONG X, LUDWIG A, SAUTTER A, HOFMANN F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999; 135:151-171.

BORON WF, BOULPAEP EL. Medical Physiology: a cellular and molecular approach. *Elsevier Saunders Verlag* 2005, Philadelphia, USA. S. 230-254.

BRAHMI N, THABET H, KOURAICHI N, DRISS I, AMAMOU M. Brugada syndrome and other cardiovascular abnormalities related to tricyclic antidepressants and related drugs intoxication. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2007; 100:28-33. (abstract)

BRANDES RP, SCHMITZ-WINNENTHAL FH, FELETOU M, GÖDECKE A, HUANG PL, VANHOUTTE PM, FLEMING I, BUSSE R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9747-52.

CARRIER GO, WHITE RE. Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985; 232(3):682-7. (abstract)

CHAUD M, FRANCHI AM, GIMENO MA, GIMENO AL. Possible prostacyclin involvement on disparate tonic responses to "in vitro" norepinephrine in circular and in longitudinal preparations from rat thoracic aorta. *Prostaglandins Leukot Med.* 1987; 30:17-28. (abstract)

CHOI YH, EKHOLM D, KRALL J, AHMAD F, DEGERMAN E, MANGANIELLO VC, MOVSESIAN MA. Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem J.* 2001; 353:41-50.

COHEN ML, FULLER RW, WILEY KS. Evidence for 5-HT₂ receptors mediating contraction in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981; 218:421-5.

COHEN, SZEKERES, PAPP. Pharmacology of Smooth Muscle. Handbook of Experimental Pharmacology (Vol.111). *Springer Verlag* 1994, Berlin/Heidelberg, Deutschland. S. 35-50, 57-101, 127-153, 597-606.

COHEN RA, WEISBROD RM, GERICKE M, YAGHOUBI M, BIERL C, BOLOTINA VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res.* 1999; 84:210-219.

COQUIL JF, GORIDIS C, MACK G, NEFF NH. Monoamine oxidase in rat arteries: Evidence for different forms and selective localization. *Br J Pharmacol.* 1973; 48:590–599.

COUTURE L, ELIE R, LAVOIE PA. Effect of antidepressants on ATP-dependent calcium uptake by neuronal endoplasmic reticulum. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001; 79:946-52. (abstract)

COX RH, FOLANDER K, SWANSON R. Differential Expression of Voltage-Gated K⁺ Channel Genes in Arteries From Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *Hypertension* 2001; 37:1315-22.

DUBBIN PN, ZAMBETIS M, DUSTING GJ. Inhibition of endothelial nitric oxide biosynthesis by N-nitro-Larginine. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*1990; 17:281-286. (abstract)

EDWARDS RP, MILLER RD, ROIZEN MF, HAM J, WAY WL, LAKE CR, RODERICK L. Cardiac responses to imipramine and pancuronium during anesthesia with halothane or enflurane. *Anesthesiology.* 1979; 50:421-5.

FABBRI E, BRIGHENTI L, OTTOLENGHI C. Inhibition of adenylate cyclase of catfish and rat hepatocyte membranes by 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ 22536). *J Enzyme Inhib.* 1991; 5:87-98. (abstract)

FALLON B, FOOTE B, WALSH BT, ROOSE SP. 'Spontaneous' hypertensive episodes with monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychiatry.* 1988; 49:163-5 (abstract)

FAN P. Inhibition of a 5-HT₃ receptor-mediated current by the selective serotonin uptake inhibitor, fluoxetine. *Neurosci Lett.* 1994; 173:210-2. (abstract)

FANTASKEY A, BURKHART KK. A case report of venlafaxine toxicity. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1995; 33:359-61. (abstract)

FARRUGIA G. Modulation of ionic currents in isolated canine and human jejunal circular smooth muscle cells by fluoxetine. *Gastroenterology.* 1996; 110:1438-1445. (abstract)

FEIGHNER JP. Cardiovascular safety in depressed patients: focus on venlafaxine. *J Clin Psychiatry.* 1995; 56:574-9. (abstract)

FÈLÈTOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1215-1225.

FERNANDEZ A, BANG SE, SRIVATHSAN K, VIEWEG WVR. Cardiovascular side effects of newer antidepressants. *Anadolu Kardiyol Derg* 2007; 7:305-9.

FISLTHALER B, DIMMELER S, HERMANN C, BUSSE R, FLEMING I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168:81-88. (abstract)

FRIELING H, BLEICH S. Tranylcypromine: new perspectives on an "old" drug. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006; 256:268-73. (abstract)

FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989; 3:2007-18.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376. (abstract)

GILLMANN PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Brit J Pharmac.* 2007; 151, 737–748.

GLASSMANN AH, PREUD'HOMME XA. Review of the cardiovascular effects of heterocyclic antidepressants. *J Clin Psychiatry.* 1993; 54:16-22. (abstract)

GONZALES RJ, CARTER RW, KANAGY NL. Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic ring segments. *Adv Physiol Educ.* 2000; 24:13-21.

GRÜNDER G, WETZEL H, SCHLÖSSER R, BENKERT O. Subchronic antidepressant treatment with venlafaxine or imipramine and effects on blood pressure and heart rate: assessment by automatic 24-hour monitoring. *Pharmacopsychiatry.* 1996; 29:72-8. (abstract)

GUIMARAES S, MOURA D. Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol Rev* 2001; 53:319–356.

GÜRDAL H, CAN A, UGUR M. The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged alpha1-adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* 2005; 145:203-10.

HAMMARSTRÖM AK, PARKINGTON HC, COLEMAN HA. Release of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) by M3 receptor stimulation in guinea-pig coronary artery. *Br J Pharmacol.* 1995; 115:717-22.

HARTSHORNE DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. Physiology of the gastrointestinal tract. *Academic Press* 1987, Raven, New York, USA. S. 423-482.

HOFMANN F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2005; 280: 1-4.

HONG SL, CARTY T, DEYKIN D. Tranylcypromine and 15-Hydroperoxyarachidonate Affect Arachidonic Acid Release in Addition to Inhibition of Prostacyclin Synthesis in Calf Aortic Endothelial Cells. *J Biolog Chem.* 1980; 255:9538-9540.

HOROWITZ A, MENICE CB, LAPORTE R , MORGAN KG. Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews* 1996; 76:967-1003. (abstract)

HUANG, Y. Inhibitory effect of noradrenaline uptake inhibitors on contractions of rat aortic smooth muscle. *Brit. J. Pharmac.* 1996; 117:533-539.

HUTCHESON IR, GRIFFITH TM. Mechanotransduction through the endothelial cytoskeleton: mediation of flow- but not agonist-induced EDRF release. *Br J Pharmacol.* 1996; 118:720-6.

HUTCHESON IR, GRIFFITH TM. Central role of intracellular calcium stores in acute flow- and agonist-evoked endothelial nitric oxide release. *Br J Pharmacol.* 1997; 122:117-25.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:9265-9269.

IGNARRO LJ, HARBISON RG, WOOD KS, KADOWITZ PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 237:893-900. (abstract)

IGNARRO LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 1989; 3: 31-36.

IOANNOU P, TALESNIK J. Blockade of coronary reactions to arachidonic acid by glyceryl trinitrate and tranlycypromine. *Eur J Pharmacol*. 1984; 106:515-29. (abstract)

ITOH T. Pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle cells--an overview. *Jpn J Pharmacol*. 1991; 55:1-9.

JOHNSON EM, WHYTE E, MULSANT BH, POLLOCK BG, WEBER E, BEGLEY AE, REYNOLDS CF. Cardiovascular changes associated with venlafaxine in the treatment of late-life depression. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2007; 15:725. (abstract)

JUILFS DM, SODERLING S, BURNS F, BEAVO JA. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999; 135:67-104.

KAMM KE, STULL JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1985; 25:593-620.

KARAKI H, URAKAWA N, KUTSKY P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi*. 1984; 20:427-44. (abstract)

KECK PE, CARTER WP, NIERENBERG AA, COOPER TB, POTTER WZ, ROTHSCHILD AJ. Acute cardiovascular effects of tranlycypromine: correlation with plasma drug, metabolite, norepinephrine, and MHPG levels. *J Clin Psychiatry*. 1991; 52:250-4. (abstract)

KHALIFA M, DALEAU P, TURGEON J. Mechanism of Sodium Channel Block by Venlafaxine in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *JPET* 1999; 291:280-284.

KOPERA, H. Anticholinergic and blood pressure effects of mianserine, amitriptyline and placebo. *Br J Clin Pharmacol*. 1978; 5:29-34.

LAMB GD. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27:216-224. (abstract)

LANG F, LANG P. Basiswissen Physiologie. *Springer Verlag* 2008, Berlin, Deutschland. S. 81-84, 90.

LAVIN MR, MENDELOWITZ A, KRONIG MH. Spontaneous hypertensive reactions with monoamine oxidase inhibitors. *Biol Psychiatry*. 1993; 34:146-51. (abstract)

- LINCOLN TM, CORNWELL TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J*. 1993; 7:328-38.
- LINCOLN TM, DEY N, SELLAH H. *Signal Transduction in Smooth Muscle*: Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*. 2001; 91:1421-1430.
- LÜLLMANN-RAUCH R. *Histologie*. Thieme Verlag 2003, Stuttgart, Deutschland. S. 199-212.
- MALLINGER AG, EDWARDS DJ, HIMMELHOCH JM, KNOPF S, EHLER J. Pharmacokinetics of tranlycypromine in patients who are depressed: relationship to cardiovascular effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1986; 40:444-50. (abstract)
- MANKAD PS, CHESTER AH, YACOUB MH. 5-Hydroxytryptamine mediates endothelium dependent coronary vasodilatation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 1991; 25:244-8. (abstract)
- MCLEOD TM, LOPEZ-FIGUERA AL, LOPEZ-FIGUERA MO. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol Bull*. 2001; 35:24-41.
- MONCADA S, HIGGS A, FURCHGOTT R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*. 1997; 49:137-42.
- MUTSCHLER E, GEISLINGER G, KROEMER HK, SCHÄFER-KORTING M. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH* 2001, Stuttgart, Deutschland. S. 171-179, 281, 340-342.
- NELSON MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995; 268:C799-C822.
- NI YG, MILEDI R. Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:2036-40.
- NI W, THOMPSON JM, NORTHCOTT CA, LOOKINGLAND K, WATTS SW. The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43:770-81. (abstract)

- NILIUS B, DROOGMANS G. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *Physiol Rev.* 2001; 81:1415-1459.
- O'BRIEN S, MCKEON P, O'REGAN M, O'FLAHERTY A, PATEL R. Blood pressure effects of tranlycypromine when prescribed singly and in combination with amitriptyline. *J Clin Psychopharmacol.* 1992; 12:104-9. (abstract)
- OLSON LJ, KNYCH ET JR, HERZIG TC, DREWETT JG. Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension.* 1997; 29:254-61. (abstract)
- OWENS MJ, MORGAN WN, PLOTT SJ, NEMEROFF CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:1305-22.
- PACHER P, UNGVARI Z, KECSKEMETI V, FURST S. Review of cardiovascular effects of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, compared to tricyclic antidepressants. *Curr Med Chem.* 1998; 5:381-90. (abstract)
- PACHER P, UNGVARI Z, KECSKEMETI V, KOLLER A. Serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, dilates isolated skeletal muscle arterioles. Possible role of altered Ca²⁺ sensitivity. *Br J Pharmacol.* 1999; 127:740-746.
- PACKER MA, STASIV Y, BENRAISS A, CHMIELNICKI E, GRINBERG A, WESTPHAL H, GOLDMAN SA, ENIKOLOPOV G. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:9566-9571.
- PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333:664-666. (abstract)
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327:524-6. (abstract)
- PARK KS, KONG ID, PARK KC, LEE JW. Fluoxetine inhibits L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Yonsei Med J.* 1999; 40:144-51.

PARK C, SOHN Y, SHIN KS, KIM J, AHN H, HUH Y. The chronic inhibition of nitric oxide synthase enhances cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2003; 339:9-12. (abstract)

PARSONS AT, ANTHONY RM, MEEKER JE. Two fatal cases of venlafaxine poisoning. *J Anal Toxicol.* 1996; 20:266-8. (abstract)

PAVLOVIC D, FRIELING H, USICHENKO T, NEDELJKOV V, NAFISSI T, LEHMANN C, AUBIER M, WENDT M. s-Carboxymethylcysteine inhibits carbachol-induced constriction of epithelium-denuded rat and human airway preparations. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35:663-9.

PEET M, YATES RA, CARROLL JA, MIDDLEMISS DN. The Interaction of tyramine with a single dose of tranylcypromine in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1981; 11:212-14. (letter to the editor)

PETERSEN EN, EDVINSSON L, HARDEBO JE. 5-HT antagonism on cerebral and common carotid arteries by the 5-HT uptake inhibitors femoxetine and paroxetine. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1979; 45:296-301. (abstract)

PITTS LH, YOUNG AR, McCULLOCH J, MacKENZIE E. Vasomotor effects of dimethyl sulfoxide on cat cerebral arteries in vitro and in vivo. *Stroke.* 1986; 17:483-7.

PLANE F, WILEY KE, JEREMY JY, COHEN RA, GARLAND CJ. Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 123:1351-1358.

PRESKORN, FEIGHNER, STANGA, ROSS. Antidepressants: Past, Present and Future. Handbook of Experimental Pharmacology (Vol.157). *Springer Verlag* 2004, Berlin/Heidelberg, Deutschland. S. 14-16, 48-72, 149, 174-187, 242-258, 286-291.

RAO GH, EINZIG S, REDDY KR, WHITE JG. Tranylcypromine induced hypertension is not mediated by the inhibition of prostacyclin synthesis. *Prostaglandins Med.* 1979; 3:201-10. (abstract)

REHAVI M, WEISS H, NISSENKORN I, RUBINSTEIN R, COHEN S. A comparative study of the affinities of some tricyclic antidepressants for the muscarinic cholinergic receptor in

human and guinea-pig bladder, ileum and brain in relation to differential drug potency. *Life Sci.* 1987; 40:1819-27. (abstract)

ROOSE SP, GLASSMANN AH, ATTIA E, WOODRING S, GIARDINA EG, BIGGER JT Jr. Cardiovascular effects of fluoxetine in depressed patients with heart disease. *Am J Psychiatry.* 1998; 155:660-5.

ROTE LISTE® 2010 Arzneimittelinformation für Deutschland. Rote Liste ® Service GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland. S. 1530.

ROTH BL, NAKAKI T, CHUANG DM, COSTA E. 5-Hydroxytryptamine₂ receptors coupled to phospholipase C in rat aorta: modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 238:480-5. (abstract)

SASAKI Y, GOTO H, TOHDA C, HATANAKA F, SHIBAHARA N, SHIMADA Y, TERASAWA K, KOMATSU K. Effects of curcuma drugs on vasomotion in isolated rat aorta. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:1135-43. (abstract)

SCHALLER G, SCHEIBER-MOJDEHKAR B, WOLZT M, PUTTINGER H, MITTERMAYER F, HÖRL WH, FÖDINGER M, SUNDER-PLASSMANN G, VYCHYTL A. Intravenous iron increases labile serum iron but does not impair forearm blood flow reactivity in dialysis patients. *Kidney Int.* 2005; 68:2814-22.

SCHWARTZ T, JINDAL S, VIRK S, WADE M. Safety and Tolerability of Extended-Release Venlafaxine in Severe Medical and Surgical Illness. *Psychosomatics.* 2004; 45:217–219.

SCHMIDT RF, THEWS G, LANG F. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. *Springer Verlag* 2004, Berlin, Deutschland. S. 140-141.

SMITH JB. Calcium haemostasis in smooth muscle cells. *New Horiz* 1996; 4:2-18. (abstract)

SOMLYO AP, HIMPENS B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 1989; 3:2266-2276.

SOMLYO AV, SOMLYO AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968; 159:129-145. (abstract)

- SONNENBURG WK, BEAVO JA. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol.* 1994; 26:87-114. (abstract)
- SPRUNG J, SCHOENWALD PK, LEVY P, KRAJEWSKI LP. Treating intraoperative hypotension in a patient on long-term tricyclic antidepressants: a case of aborted aortic surgery. *Anesthesiology.* 1997; 86:990-2.
- SZEKERES M, NADASY GL, DEZSI L, OROSZ M, TÖKES A, MONOS E. Segmental differences in geometric, elastic and contractile characteristics of small intramural coronary arteries of the rat. *J Vasc Res.* 1998; 35:332-44. (abstract)
- THANACODY HK, TKOMAS SH. Tricyclic antidepressant poisoning : cardiovascular toxicity. *Toxicol Rev.* 2005; 24:205-14. (abstract)
- THASE ME. Effects of venlafaxine on blood pressure: a meta-analysis of original data from 3744 depressed patients. *J Clin Psychiatry.* 1998; 59:502-8. (abstract)
- TRENDELENBURG, WEINER. Catecholamines I/II. Handbook of Experimental Pharmacology (Vol. 90). *Springer Verlag* 1988, Berlin/Heidelberg, Deutschland. S. 321-390.
- TUNCOK Y, KALKAN S, MURAT N, ARKAN F, GUVEN H, AYGOREN O, KURT S. The effect of the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40:121-7. (abstract)
- UNGVARI Z, PACHER P, KECSKEMÉTI V, KOLLER A. Fluoxetine dilates isolated small cerebral arteries of rats and attenuates constrictions to serotonin, norepinephrine, and a voltage-dependent Ca(2+) channel opener. *Stroke.* 1999; 30:1949-54.
- VAN MELLE JP, BUIKEMA H, VAN DEN BERG MP, VAN BUITEN A, VAN VELDHUISEN DJ, BOONSTRA PW, VAN GILST WH. Sertraline causes strong coronary vasodilation: possible relevance for cardioprotection by selective serotonin reuptake inhibitors. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004; 18:441-7. (abstract)
- VELASCO A, ARRUZA A, MAROTO M, CARVAJAL A, FERNANDEZ DEL BUSTO E, GARCIA DEL POZO J. Effect of venlafaxine hydrochloride in different preparations of isolated guinea-pig and rat organ tissues. *J Auton Pharmacol.* 1999; 19:109-13. (abstract)

VERBOOMEN H, WUYTACK F, DE SMEDT H, HIMPENS B, CASTEELS R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J.* 1992; 286:591-595.

VILA JM, MEDINA P, SEGARRA G, LLUCH P, PALLARDO F, FLOR B, LLUCH S. Relaxant effects of antidepressants on human isolated mesenteric arteries. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48:223-9.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensine converting enzyme (Englisch)</i> : Angiotensin konvertierendes Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AMI	Amitriptylin
ANOVA	<i>analysis of variance (Englisch)</i> : Varianzanalyse
4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Chtx	Charybdotoxin
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Halbmaximale Effektivdosis (50%)
EDHF	<i>Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (Englisch)</i>
EDRF	<i>Endothelium Derived Relaxing Factor (Englisch)</i>
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
<i>et al.</i>	<i>et alii (Lateinisch)</i> : und andere
η	<i>Eta (Griechisch)</i> : dynamische Viskosität
FLUO	Fluoxetin
Glib	Glibenclamid
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ⁺	Wasserstoffkationen
HT _{2/3} -Rezeptoren	Untergruppen von Serotoninrezeptoren

IP ₃	Inositoltrisphosphat
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Länge
L-NAME	NG-nitro-L-arginine-methyl-ester
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginine
MAO (I)	Monoaminoxidase (Inhibitor)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLCK	<i>myosin light chain kinase (Englisch):</i> Myosin-Leichtkettenkinase
MLCP	<i>myosin light chain kinase phosphatase (Englisch):</i> Myosin-Leichtkettenkinasephosphatase
n	<i>numerus/-i (Lateinisch):</i> Anzahl der Experimente pro Gruppe
n.k.	nicht konvergierbar
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NET	Noradrenalin-Transporter
nNOS	neuronale Stickoxidsynthase
NO	<i>Nitric oxide (Englisch):</i> Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric oxide Synthetase (Englisch):</i> Stickoxidsynthase
O ₂	Sauerstoffmolekül
ODQ	1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one
π	Kreiszahl <i>Pi (Griechisch)</i> ~ 3,14
PE	Phenylephrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLC	Phospholipase C
PRAZ	Prazosin
PROP	Propranolol
r	Radius

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
S.	Seite
SERCA	kalziumtransportierende ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SERT	Serotonin – Transporter
S.E.M.	<i>standard error of the mean (Englisch)</i> = Standardfehler
sGC	<i>soluble guanylylcyclase (englisch)</i> : lösliche Guanylylzyklase
SNRI	<i>Serotonine Noradrenalin Reuptake Inhibitor (Englisch)</i> : Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SSRI	<i>Selektive Serotonine Reuptake Inhibitor (Englisch)</i> : Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SQ	SQ 22536
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
T _{max}	maximal erreichte Spannung
TRAN	Tranylcypromin
VENLA	Venlafaxin
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2	Einheiten
°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
mol	Molar
mV	milli Volt
m	Milli (10 ⁻³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
n	Nano (10 ⁻⁹)
t	Zeit
V	Volumen

8.3 Veröffentlichungen

Helge Frieling, Silvia Ribback, Thomas Hillemacher, Johannes Kornhuber, Christian Lehmann, Michael Wendt, Stefan Bleich and Dragan Pavlovic. Effects of Amitriptyline, Fluoxetine, Tranylcypromin and Venlafaxine on rat aortal smooth muscle tone *in vitro* – the role of the endothelium. *HAI, Berlin 2008, Anästhesiologie & Intensivmedizin*; Volume 49, Suppl. 7, S. 247.

Poster abstract:

Background. Hypotension is an often seen side effect of antidepressive treatment which, if administered simultaneously with some anaesthetics, may potentiate their hypotensive effects. We tested amitriptyline (AMI), fluoxetine (FLUO), tranylcypromine (TRAN) and venlafaxine (VENLA) for their direct vasoactive properties *in vitro*.

Methods. We used isometric preparations of rat thoracic aortal rings with and without endothelium (+ and – End) to examine the effects of cumulative concentrations (10nM-100µM) of the antidepressants on tension elicited by KCl, phenylephrine and prostaglandine. The influence of preincubation (20min) with the substances (500nM) on agonist induced contraction was also tested. Blockers of the NO-cGMP pathway, adrenergic pathways and potassium channels were also used.

Results. All antidepressants showed vasorelaxing properties in preparations precontracted with phenylephrine 0,1µM: EC50, (s.e.m.), Amitriptyline, 6.98 (0.13), Fluoxetine, 6.11 (0.05), Tranylcypromine, 5.33 (0.05); Venlafaxine, 4.45 (0.08) (N=8), or KCl 20mM: Amitriptyline, 4.89 (0.11), Fluoxetine, 6.0 (0.06), Tranylcypromine, 4.99 (0.3); Venlafaxine, 5.02 (0.07) (N=7) while those preparations precontracted with prostaglandine F2α did not relax. These effects were partially endothelium depending, especially in the case of FLUO, and were partially reversed by the inhibition of the potassium channels. They cannot be explained by adrenoceptor activation. Preincubation with antidepressants also produced profound effects on agonist induced tension.

Conclusion. These results indicate that hypotension due to antidepressant treatment may partially be caused by peripheral, vascular effects of these drugs. They should be used with prudence if given concomitantly with the anaesthetic agents.

8.4 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 keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Silvia Ribback

8.5 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Silvia Ribback,
geboren am 25.11.1983 in Forst/Lausitz,
evangelisch, ledig

Ausbildung

1990-1996 Grundschule Groß Schacksdorf
1996-2003 Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium Forst/Lausitz

Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

2003-2005 E.-M.-A.-Universität Greifswald, Vorklinischer
Studienabschnitt

Abschluss des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung

2005-2009 E.-M.-A.-Universität Greifswald, Klinischer Studienabschnitt

Abschluss des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung

10.12.2009 Approbation als Ärztin

Seit

01.01.2010 Assistenzärztin am Institut für Pathologie der
Universitätsmedizin Greifswald

Famulaturen:

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum
Greifswald (August 2006 und März 2008)

Praxis für Innere Medizin, Hämatologie und Onkologie, Dr. B. Meyer Greifswald
(September 2006)

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin,
Universitätsklinikum Greifswald (Juni 2008)

Ausbildung im Praktischen Jahr:

1. Terial: Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Greifswald
2. Terial: Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Greifswald
3. Terial: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum
Greifswald

Greifswald, den

8.6 Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Dragan Pavlovic für die Bereitstellung des Themas sowie für seine umfangreiche Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Bei Frau Dr. Frauke Steinmüller und Professor Dr. med. Dombrowski bedanke ich mich für die kritischen und konstruktiven inhaltlichen Anmerkungen bei der Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin möchte ich Sabine Will für die Unterstützung bei der Organisation der Experimente danken.

Dr. Kolyschkow danke ich für die Ratschläge zur kritischen Betrachtung der statistischen Auswertung.