

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

Sektion Pharmakokinetik
(Leiter: Prof. Dr. Michael Weiss)

**Einfluss pathophysiologischer Zustände auf α_1 -Adrenozeptor-
Bindungs- und Signaltransduktionsparameter
am isoliert perfundierten Rattenherzen:
Pharmakokinetik-Pharmakodynamik Modellierung**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Petra Arendt

geboren am 9. Juli 1986 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Michael Weiss
Prof. Dr. Reinhard Neubert
Prof. Dr. Werner Siegmund, Greifswald

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 26.02.2013

Datum der Verteidigung: 13.08.2013

Referat

Zielsetzung: Unter Anwendung eines bestehenden pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Modells (Sermsappasuk und Weiss, 2009) für den durch α_1 -Adrenozeptoren induzierten inotropen Effekt sollte in dieser Arbeit der Einfluss pathophysiologischer Zustände auf die Bindungs- und Signaltransduktionsparameter der α_1 -Adrenozeptoren des Rattenherzens untersucht werden. Dabei handelte es sich um die Effekte einer einstündigen Infusion mit 12,3 μM Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung, einer 20-minütigen partiellen Hypoxie sowie einer durch Isoprenalin-Injektionen induzierten Myokardhypertrophie.

Methoden: Unter Nutzung einer Langendorff-Apparatur wurden die Versuche an isoliert perfundierten Rattenherzen durchgeführt. Das zugrundeliegende pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modell basiert auf dem „operational model of agonism“ (Black und Leff, 1983), das die Stimulus-Wirkungs-Beziehung zwischen einem Agonisten und seinem induzierten Effekt beschreibt. Durch die Modellierung der Kinetik der kompetitiven Interaktion zwischen dem α_1 -Agonisten Phenylephrin und dem α_1 -Antagonisten Prazosin ließen sich die Agonisten-Parameter für jede Versuchsreihe aus den Zeitverläufen der Prazosin-Ausflusskonzentration und des inotropen Effekts unter Anwendung der Software ADAPT 5 (Programm MLEM) schätzen. Verglichen wurden die geschätzten Parameter unter Kontrollbedingungen zu Beginn des Versuches mit denen, die nach Einwirkung einer einstündigen Infusion mit 12,3 μM Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung oder einer 20-minütigen partiellen Hypoxie ermittelt wurden. Die Hypertrophie wurde durch intraperitoneale Injektionen einer Isoprenalin-Lösung (5 mg/kg), die innerhalb einer Woche einmal täglich appliziert wurden, induziert.

Ergebnisse: Die akuten Infusionen von Phenylephrin- bzw. Isoprenalin-Lösung induzierten keine signifikanten Parameteränderungen, die die Vermutung einer Rezeptordesensitivierung stützen würden. Die 20-minütige partielle Hypoxie führte zu einer Reduktion der maximalen am System möglichen Wirkung. Bei den Hypertrophie-Herzen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Rezeptordichte sowie eine Zunahme des maximal erreichbaren Effekts.

Schlussfolgerungen: Die Pharmakokinetik-Pharmakodynamik Modellierung erweist sich für Liganden mit einer hohen spezifischen Bindung als eine geeignete Methode, um sowohl Bindungs- als auch Signaltransduktionsparameter der α_1 -Adrenozeptoren unter verschiedenen pathophysiologischen Einflüssen zu ermitteln.

Arendt, Petra: Einfluss pathophysiologischer Zustände auf α_1 -Adrenozeptor-Bindungs- und Signaltransduktionsparameter am isoliert perfundierten Rattenherzen: Pharmakokinetik-Pharmakodynamik Modellierung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1 Systempharmakologie und pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung.....	1
1.2 Elektromechanische Kopplung am Herzen.....	2
1.3 Überblick über Adrenozeptoren.....	3
2. Zielsetzung	9
3. Material und Methodik	10
3.1 Das Langendorff-Herz.....	10
3.1.1 Prinzip und Entwicklung.....	10
3.1.2 Aufbau des Systems.....	11
3.1.3 Krebs-Henseleit-Puffer.....	13
3.1.4 Vorbereitungen vor Versuchsbeginn.....	13
3.1.5 Präparation des Rattenherzens.....	13
3.2 Versuchsprotokoll.....	14
3.2.1 Verwendete Pharmaka.....	14
3.2.2 Herstellung der Stammlösungen.....	14
3.2.3 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin.....	14
3.2.4 Effekt einer einstündigen Infusion von Isoprenalin.....	15
3.2.5 Einfluss einer partiellen Hypoxie.....	16
3.2.6 Einfluss einer Myokardhypertrophie.....	17
3.3 Messung der Prazosin-Konzentrationen.....	18
3.4 Pharmakokinetisch-pharmakodynamisches Modell und Datenanalyse.....	18
3.4.1 Pharmakonaufnahme und Rezeptorbindungs-Kinetik.....	18
3.4.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.....	22
3.4.3 Gleichgewichts-Konzentrations-Wirkungs-Kurve.....	23
3.4.4 Datenanalyse mittels ADAPT 5.....	24
3.4.5 Statistische Analyse.....	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin.....	27
4.2 Effekt einer einstündigen Infusion mit Isoprenalin.....	36
4.3 Einfluss einer partiellen Hypoxie.....	45
4.4 Einfluss einer Myokardhypertrophie.....	53

5. Diskussion	61
5.1 Kontrollen der Versuchsreihen.....	61
5.2 Einfluss der Behandlungen.....	63
5.2.1 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin bzw. Isoprenalin	63
5.2.2 Einfluss einer partiellen Hypoxie	64
5.2.3 Einfluss einer Myokardhypertrophie.....	65
5.2.4 Methodendiskussion.....	67
5.2.5 Schlussfolgerungen	70
6. Zusammenfassung und Ausblick	71
7. Literaturverzeichnis.....	72
8. Thesen.....	80

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
Acl	Adenylatcyclase
AIC	Akaike Information Criterion
AR	Adrenozeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CP	koronarer Perfusionsdruck
CVR	koronarer Gefäßwiderstand
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK	extrazellulär signal-regulierte Proteinkinase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HR	Herzfrequenz
I_{Ca}	Ca^{2+} -Einstrom
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MLC	Myosin-leichte-Ketten
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
NCX	Na^+/Ca^{2+} -Austauscher
part.	partielle
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRZ	Prazosin
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SD	Standardabweichung

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Systempharmakologie und pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung

Die Systempharmakologie vereint experimentelle Studien mit mathematischen Modellen. Ziel dabei ist der Verständnissgewinn im Hinblick auf die Wirkungsweisen, Effekte und mögliche Nebenwirkungen von Medikamenten im Kontext des biologischen Systems. Dabei wird versucht, die gewonnenen strukturellen Informationen mit pathophysiologischen Veränderungen zu korrelieren. Vor allem die Optimierung bestehender Therapien sowie die Ausweitung der Nutzung von bereits bekannten Wirkstoffen rückt dabei immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung (Wist et al., 2009).

Quantitative Pharmakologie ist ein Ansatz in der Entwicklung von Arzneimitteln, bei der verschiedene Wissenszweige kombiniert werden. So gehen sowohl Kenntnisse über biologische und (patho-)physiologische Vorgänge als auch Untersuchungen zu Wirkungs- und Bindungscharakteristiken des Wirkstoffes sowie in-vitro- und in-vivo-Studien an Tieren und später am Menschen in den Entwicklungs- und Entscheidungsprozess mit ein (Zhang et al., 2006, 2008). Potentielle Gefahren können aus verschiedenen Faktoren heraus entstehen, wie Unterschieden in der Bioverfügbarkeit, der Bildung aktiver Metaboliten, nicht-linearen Dosis-Konzentrations-Beziehungen, konzentrationsabhängiger Plasmaproteinbindung oder Interspeziesunterschieden. Deshalb sind besonders die Untersuchung und Verbindung der gewonnenen Kenntnisse aus Konzentrations-Wirkungs-, Dosis-Wirkungs- und Dosis-Konzentrations-Kurven sowie deren zeitlichen Verläufe ein wichtiger Bestandteil der Arzneimittelforschung. Ein besonderes Augenmerk richtet sich dabei auf die Modell-basierte Arzneimittelentwicklung, bei der die pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung eine zentrale Rolle in der pharmakologischen Grundlagenforschung einnimmt (Gabrielsson und Green, 2009).

Hierbei wird ein pharmakokinetisches Modell, das den zeitlichen Verlauf eines Wirkstoffes und seiner Metaboliten beschreibt, mit einem pharmakodynamischen Modell, welches die Beziehung zwischen der Konzentration des Wirkstoffes und dem erzielten Effekt charakterisiert, kombiniert. Es wird zwischen einer empirischen und einer mechanismusbasierten Herangehensweise unterschieden. Das empirische Konzept wird genutzt, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf eines Effektes und seiner Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration zu treffen. Bei der mechanismusbasierten Herangehensweise werden weitere Determinanten untersucht, die den Weg zwischen Wirkstoff und hervorgerufenem Effekt charakterisieren. Dazu zählen die Verteilung des Targets (zum Beispiel einem bestimmten Rezeptor), Targetbindung und -aktivierung, pharmakodynamische Interaktionen, Transduktion,

homöostatische Feedback-Mechanismen sowie der Effekt des Wirkstoffes auf einen Krankheitsverlauf und die Krankheitsprogression. Bei dieser Form der pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Modellierung wird zwischen Parametern unterschieden, die zum einen wirkstoffspezifische Eigenschaften und zum anderen spezifische Eigenschaften des biologischen Systems beschreiben. Dabei zählen zu den wirkstoffspezifischen Eigenschaften solche, welche die Interaktion zwischen dem Wirkstoff und dem biologischen System hinsichtlich Target-Affinität und Target-Aktivierung charakterisieren. Diese sind oft bei unterschiedlichen Spezies identisch. Demgegenüber beziehen sich systemspezifische Eigenschaften auf die Funktionsweise des biologischen Systems selbst. Dazu gehört unter anderem die Höhe der Expression des Target-Proteins.

Diese systemspezifischen Parameter können zwischen den verschiedenen Spezies, einzelnen Individuen sowie unter veränderten systemischen Bedingungen variieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Beachtung von intra- und interindividueller Variabilität vor allem bei den systemspezifischen und nur in geringem Maße bei den wirkstoffspezifischen Eigenschaften (Meibohm, 2006; Danhof et al., 2007; Breimer, 2008).

1.2 Elektromechanische Kopplung am Herzen

Zum besseren Verständnis der Herzphysiologie ist in Abb. 1 ein Überblick über die elektromechanische Kopplung am Herzen dargestellt.

Das Aktionspotential im Arbeitsmyokard zeichnet sich durch einen mehrphasigen Verlauf aus: Der steile Aufstrich in der frühen Phase (Phase 0) wird durch die Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle hervorgerufen, die zur Depolarisation führen. In der ersten Phase kommt es durch die Wirkung von transient auswärtsgerichteten K^+ -Kanälen zu einer initialen Repolarisation. Daran schließt sich die Ausbildung eines Plateaus an, das durch die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle gebildet wird (Phase 2). In der dritten Phase erfolgt durch die Öffnung von K^+ -Kanälen die Repolarisation, die schließlich in Phase 4 zur Normalisierung des Membranpotentials beitragen (Schmidt et al., 2000).

Das Aktionspotential breitet sich entlang der Zellmembranen aus und wird über das transversale (T-)Tubulussystem auch ins Zellinnere fortgeleitet. Dort kommt es zur Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren). Der dadurch ausgelöste initiale Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) reicht zunächst nicht aus, um den kontraktilem Apparat hinreichend zu aktivieren. Er dient vor allem als Triggerreiz und führt durch die Stimulation von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) zur sogenannten Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). So steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma an und die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C ermöglicht anschließend durch eine

Konformationsänderung die Bildung von Querbrücken zwischen Aktin und Myosin mit nachfolgender Kontraktion des Muskels.

Während der Diastole wird Ca^{2+} über ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpen des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) sowie über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und Ca^{2+} -ATPasen im Sarkolemm wieder aus dem Zytosol entfernt. Der Na^+ -Gradient wird über die Na^+-K^+ -ATPase aufrechterhalten. Mit dem Absinken der Ca^{2+} -Konzentration und der fehlenden Ca^{2+} -Bindung an Troponin C folgt die Relaxation der Herzmuskelzellen (Wier und Balke, 1999; Bers, 2002; Maier und Bers, 2007).

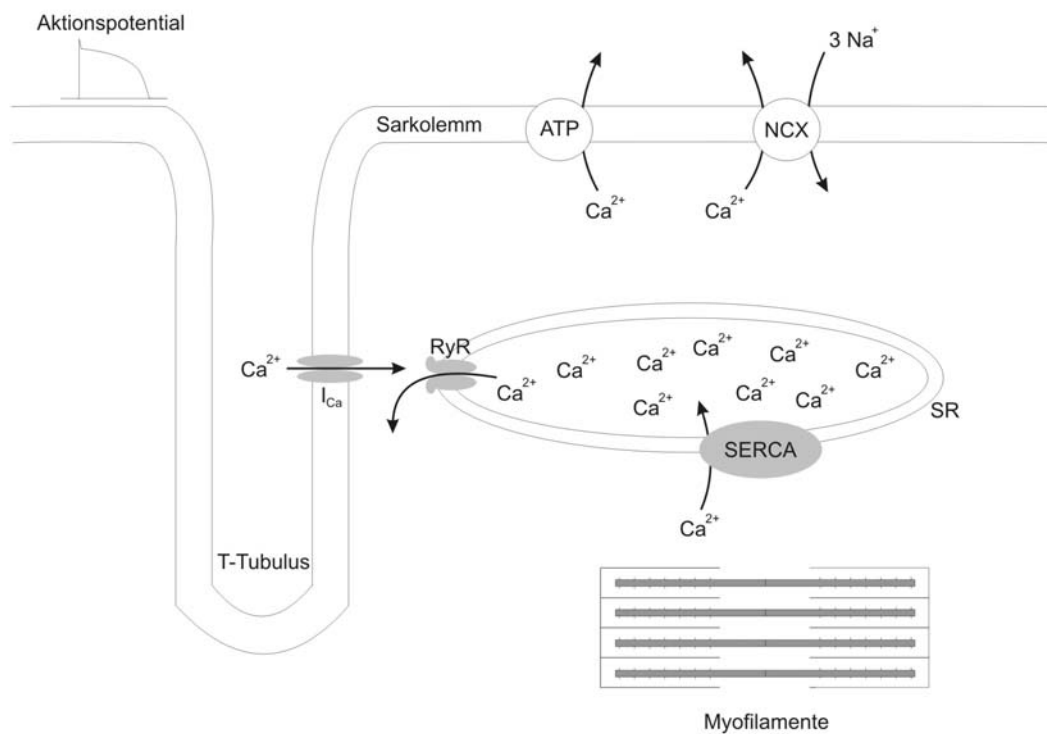


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der elektromechanischen Kopplung am Herzen (modifizierte Abb. nach Maier und Bers, 2007).

1.3 Überblick über Adrenozeptoren

Adrenozeptoren (AR) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen, die in neun Subtypen eingeteilt werden. Man unterscheidet α - und β -Adrenozeptoren, die sich in α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} sowie in β_1 , β_2 und β_3 unterteilen lassen (Hieble et al., 1995).

Als zusätzlicher Subtyp der α_1 -ARs wird α_{1L} -AR diskutiert. In einer Studie mit Knockout-Mäusen konnte festgestellt werden, dass es sich dabei um einen funktionellen Phänotyp neben dem eigentlichen α_{1A} -AR handelt, die sich beide vom selben α_{1A} -AR-Gen ableiten (Muramatsu et al., 2008). Ursprünglich wurde ein α_{1C} -AR beschrieben, für den sich später jedoch die gleichen Eigenschaften wie für α_{1A} -AR zeigten (Perez et al., 1994). Aus menschlichen Geweben

konnten sechzehn verschiedene α_{1A} -AR-Isoformen differenziert werden, von denen fünf Splice-Varianten in voller Länge und elf gekürzte Splice-Varianten darstellen (Hawrylyshyn et al., 2004). Dabei exprimieren verschiedene Gewebe unterschiedliche Isoformen. Es wird vermutet, dass sich die Varianten mit voller Länge sowohl in ihrer G-Protein-Spezifität als auch in ihren Mechanismen der Downregulation unterscheiden. Die kurzen Splice-Varianten haben weder Anteil an der Ligandenbindung noch an der Signaltransduktion, jedoch wird ihre Rolle bei der Modifizierung der α_{1A} -AR-Expression diskutiert (Chang et al., 1998; Cogé et al., 1999).

Bezüglich der Verteilung der α -AR-Subtypen konnte initial gezeigt werden, dass α_{1A} -ARs den Hauptanteil im menschlichen Herzen bilden, während im Rattenherzen sowohl α_{1A} -AR als auch α_{1B} -AR dominieren (Michelotti et al., 2000). Hinsichtlich der Verteilung der α_1 -ARs wurde im Rattenherzen die höchste Anzahl im linken Ventrikel festgestellt, mit jeweils abnehmender Anzahl im linken Vorhof, Apex, rechten Ventrikel, Ventrikelseptum bis zum rechten Vorhof (Wolff et al., 1998). In einer späteren Studie am menschlichen Myokard konnte ebenfalls die Expression von mRNA aller drei α_1 -AR-Subtypen nachgewiesen werden, wobei α_{1A} vorherrschend ist. Dagegen konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass in der Bindung von Agonisten an die ARs nur α_{1A} und α_{1B} identifiziert werden konnten, mit mehrheitlicher Bindung an α_{1B} . Dies impliziert eine vergleichbare Verteilung der α_1 -ARs im menschlichen wie im Rattenherzen (Jensen et al., 2009a). Unter Normalbedingungen sind jedoch β -ARs (β_1 und β_2) sowohl im menschlichen als auch im Rattenherzen vorherrschend, die den positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt von Katecholaminen vermitteln (Brodde, 1993).

Für α_{1D} -ARs konnte sowohl für die mRNA als auch das Protein eine prädominante Verteilung in menschlichen Koronararterien nachgewiesen werden. Die selektive Aktivierung der α_{1D} -ARs führte zur Koronarkonstriktion. In der Bindung an β -ARs zeigte sich der β_2 -Subtyp in menschlichen Koronararterien vorherrschend (Jensen et al., 2009b). Durch Stimulation mit einem Agonisten konnte eine vermehrte Expression von α_{1A} -AR-mRNA sowie eine verminderte Expression von α_{1B} -AR- und α_{1D} -AR-mRNA in Myozyten-Zellkulturen von Ratten von beobachtet werden (Rokosh et al., 1996).

Sowohl die α_1 -ARs als auch β -ARs werden durch Adrenalin und Noradrenalin aktiviert. Die Aktivierung von α_1 -ARs wie von β -ARs führt zu einer positiv inotropen Reaktion sowohl im menschlichen als auch im Rattenherzen (Brückner et al., 1984; Steinfath et al., 1992b; Williamson et al., 1994). Bei Mäusen konnte durch Stimulation der α_1 -ARs im Myokard des linken Ventrikels eine positiv inotrope Reaktion nachgewiesen werden, währenddessen im rechten Ventrikel eine negativ inotrope Reaktion beobachtet wurde (Wang et al., 2006). Dieser positiv inotrope Effekt durch Stimulation von α_1 -ARs wird bei adulten Ratten vor allem über die Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und zu einem kleineren Anteil auch über die Rho-Kinase vermittelt (Andersen et al., 2002). Unter Normalbedingungen kommt es im

gesunden Herzen zu keiner chronotropen Reaktion bei der Aktivierung von α_1 -ARs (Wagner und Brodde, 1978).

Die Stimulation von β -ARs führt überwiegend über G_s zur Aktivierung der Adenylatcyclase (Acl) mit konsekutiver Erhöhung des cAMP-Spiegels. Dieser Second-Messenger aktiviert die Proteinkinase A, die intrazelluläre Proteine, wie zum Beispiel Phospholamban, Ca^{2+} -Kanäle sowie Myofilament-Proteine, phosphoryliert. Ebenfalls ist die Aktivierung von G_i -Proteinen durch β_2 -ARs beschrieben worden (Xiao et al., 1999).

Die Aktivierung von α_1 -ARs führt hauptsächlich über Pertussis-Toxin-insensitive G-Proteine $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$ zur Hydrolyse von Membranproteinen mit nachfolgender Aktivierung der Phospholipase C_β (PLC). Daraufhin kommt es zur Bildung von Second-Messengern in Form von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) sowie Diacylglycerol (DAG). IP_3 stimuliert die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum verschiedene zelluläre Substrate phosphorylieren kann (Summers und McMartin, 1993). Dadurch wird sowohl der positiv inotrope Effekt vermittelt als auch unter anderem die Produktion von antiapoptotischen Protein Bcl-2 (Leszczynski et al., 1994), die Aktivierung vom Na^+/H^+ -Austauscher sowie vom Na^+/Ca^{2+} -Austauscher stimuliert (Rehring et al., 1998; Stengl et al., 1998; Yokoyama et al. 1998).

Während die Aktivierung der PLC über $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$ für alle drei Subtypen beschrieben wurde (Chen et al., 1996), konnte auch eine Kopplung an andere G-Proteine nachgewiesen werden. So ließ sich sowohl für α_{1A} -ARs als auch für α_{1B} -ARs eine Aktivierung der PLC durch Stimulation von $G_{\alpha 14}$ sowie für α_{1B} -ARs ebenfalls durch Stimulation von $G_{\alpha 16}$ zeigen (Wu et al., 1992). Für α_{1A} - und α_{1B} -ARs wurde außerdem eine Kopplung an den G_s /cAMP-Pfad beschrieben (Shinoura et al., 2002). Über diesen konnte die α_{1A} - und α_{1B} -AR-vermittelte Hemmung von K^+ -Kanälen dargestellt werden, die eine Verlängerung des Aktionspotentials zur Folge hat (Lee und Rosen, 1994; Gallego et al., 2005). In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass die α_1 -AR-Stimulation durch geringe Phenylephrin-Konzentrationen zu einer Aktivierung von K^+ -Kanälen und daraus resultierend zu einer Verkürzung des Aktionspotentials führt. Dies bewirke außerdem eine Verkürzung der funktionellen Refraktärperiode in ischämischem Gewebe und damit die Auslösung von Arrhythmien (Gorostiza et al., 1995).

α_{1B} -ARs können außerdem an G_i koppeln und über die Aktivierung der Proteinkinase C zur ischämischen Präkonditionierung beitragen (Hu und Nattel, 1995).

Weiterhin ließ sich eine subtypenspezifische Bindung von α_{1B} -ARs und α_{1D} -ARs an G_h nachweisen (Chen et al., 1996; Hwang et al., 1996). Ebenfalls wurde die Aktivierung der Phospholipase D, Phospholipase A_2 sowie spannungsabhängiger und -unabhängiger Ca^{2+} -Kanäle durch Stimulation von α_1 -ARs beschrieben (Perez et al., 1993). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass α_{1A} -ARs überwiegend an die Signalkaskade der Phosphatidylhydrolyse gekoppelt sind, wohingegen α_{1B} -ARs vornehmlich den Mitogen-aktivierte-Proteinkinase

(MAPK)-Pfad aktivieren (Wenham et al., 1997; McWhinney et al., 2000). Über Stimulation von α_{1B} -ARs kommt es über G_q zur Aktivierung der Signalkaskade über Rho-GEF/RhoA-GTPase, Calmodulin (CaM), Src-Tyrosin-Kinasen, MAPKK-Kinase (MAPKKK), MAPK-Kinase (MAPKK) sowie MAPK. Zu den MAPK gehören verschiedene Subgruppen: unter anderem c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), extrazellulär-signalregulierte Proteinkinasen (ERK) und p38-MAPK (Della Rocca et al., 1997; Pearson et al., 2001; Qi und Elion, 2005). In einer anderen Studie an α_1 ABKO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK nur durch den α_{1A} -Subtyp erfolgt. Dadurch konnte ebenfalls die Vermittlung einer kardioprotektiven Wirkung durch α_1 -ARs nachgewiesen werden (Huang et al., 2007). Für die RhoA-GTPase/Rho-Kinase konnte eine kontraktilitätssteigernde Wirkung in Rattenmyozyten durch Organisation der Myofibrillen (Hoshijima et al., 1998), eine direkte Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten (MLC) sowie eine Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) nachgewiesen werden (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996).

Eine Übersicht der Signalkaskaden für die α_1 -ARs ist in Abb. 2 dargestellt.

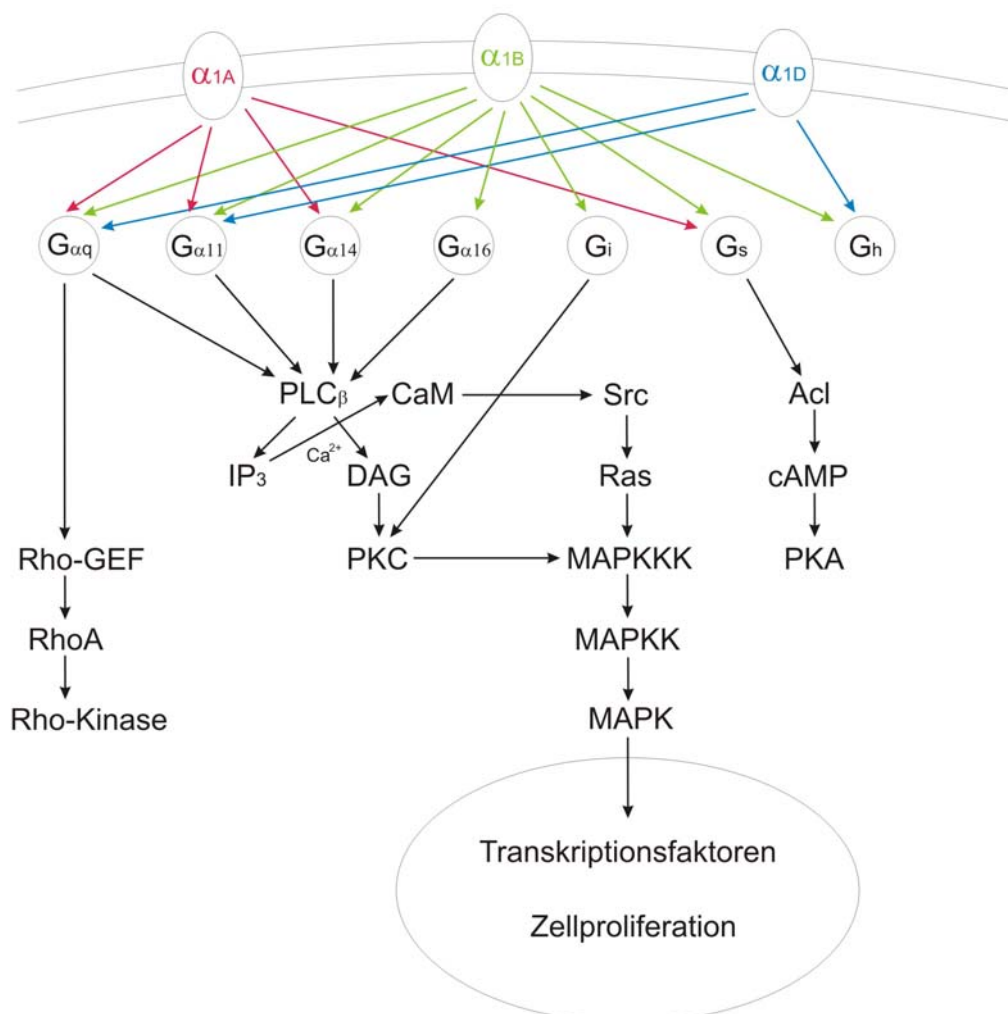


Abb. 2 Schematische und vereinfachte Übersicht über die Signalkaskaden der α_1 -ARs (modifizierte Abb. nach Della Rocca et al., 1997 und Michelotti et al., 2000).

ARs können auch in der Abwesenheit von Agonisten mit G-Proteinen interagieren, was als „Precoupling“ bezeichnet wird. Diese von Agonisten unabhängigen Effekte spielen eine Rolle für den Basaltonus (Lefkowitz et al., 1993). Weiterhin konnte die Beteiligung von Aktinfilamenten an der Agonisten-vermittelten Internalisation der α_{1A} -ARs nachgewiesen werden (Xu et al., 2007). Für den weiteren Transport der α_{1A} -AR-Endosomen nach initialer Aktin-Beteiligung wurde eine Mitwirkung der Mikrotubuli beschrieben. Es wurde eine maximale Transportgeschwindigkeit von 0,2 m/s für den initialen Endosomen-Transport entlang der Aktinfilamente ermittelt (Liang et al., 2007).

Phenylephrin konnte als voller Agonist an α_1 -ARs identifiziert werden (Minnemann und Esbenshade, 1994; Taniguchi et al., 1999). Prazosin agiert als inverser Agonist sowohl an α_{1A} -ARs als auch an α_{1B} -ARs (Rossier et al., 1999). Volle Agonisten zeigen eine höhere Affinität zur aktiven Rezeptorkonformation und führen zur Stimulation der Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung der Signaltransduktion. Dagegen wurde für inverse Agonisten eine höhere Affinität für die inaktive Rezeptorkonformation nachgewiesen. Durch Beeinflussung des Gleichgewichts hin zum inaktiven Rezeptor wird dieser Rezeptorzustand stabilisiert (Lefkowitz et al., 1993; Samama et al., 1993).

In Abb. 3 ist die Strukturformel für Phenylephrin sowie in Abb. 4 für Prazosin dargestellt.

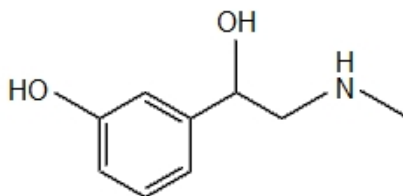


Abb. 3 Strukturformel von Phenylephrin

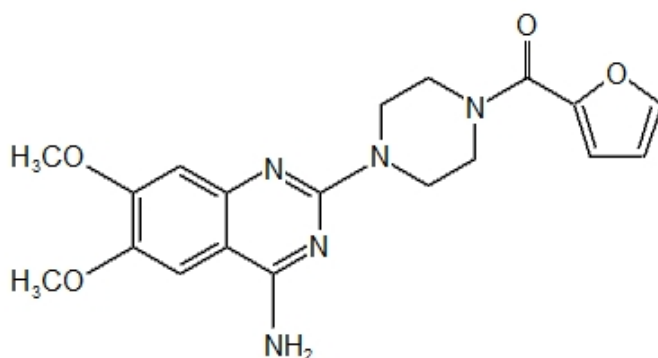


Abb. 4 Strukturformel von Prazosin

Des Weiteren werden in der Literatur diverse pathophysiologische Bedeutungen der α_1 -ARs diskutiert. So wurde an Rattenfibroblasten der Einfluss der α_1 -AR-Subtypen auf den Zellzyklus untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch die Stimulation von α_1 -ARs in

Fibroblasten die Transkription von den Zellzyklus regulierenden Genen beeinflusst wird. Dabei führte die Aktivierung von α_{1A} -ARs und α_{1D} -ARs zu einem Arrest, die Aktivierung von α_{1B} -ARs zu einer Progression des Zellzyklus (Gonzalez-Cabrera et al., 2004). Potentiell könnte über diesen Mechanismus vaskuläres Remodeling vermittelt werden. Dabei wird, durch Experimente an KO-Mäusen gestützt, vermutet, dass dieser Prozess ebenso wie die Ausbildung einer Hypertension nach chronischer Noradrenalin-Infusion durch den α_{1B} -Subtypen vermittelt wird. Selektive Aktivierung von α_{1A} -ARs könnte demnach einem vaskulärem Remodeling entgegenwirken (Vecchione et al., 2002; Zhang et al., 2004; Simpson, 2006). Chaulet et al. (2006) demonstrierten an Mäusen, dass eine kardiale Überexpression von α_{1A} -ARs zur Entwicklung einer progressiven myokardialen Fibrose führt.

In einer Studie an ventrikulären Rattenmyozyten konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation von α_1 -ARs über Erhöhung der Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers eine Steigerung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofibrillen vermittelt wird (Kusakari et al., 2002). Ebenfalls diskutiert wird die Beteiligung der durch α_1 -AR-Stimulierung hervorgerufenen Aktivierung der PKC in Bezug auf die Translokation von GLUT-1 und GLUT-4 von intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran (Fischer et al., 1996). Beide Mechanismen implizieren eine direkte bzw. durch verbesserte Glukoseaufnahme der Myozyten eine indirekte Verbesserung der Myokardkontraktilität durch Stimulation von α_1 -ARs.

Diese Studien zeigen, dass der Untersuchung der α_1 -AR eine große Bedeutung sowohl für die regulatorischen Mechanismen im Zuge einer Ischämie als auch im Rahmen einer Herzinsuffizienz zukommt.

2. Zielsetzung

Pathophysiologische Veränderungen während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beinhalten die Downregulation und Desensitivierung der β -ARs, vor allem des β_1 -Subtyps, sowie einen erhöhten basalen Katecholaminspiegel durch dauerhafte Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Bristow et al., 1982, 1986; Fowler et al., 1986; Calderone et al., 1991). Es wurde weiterhin festgestellt, dass bei Herzinsuffizienz keine Downregulation von α_{1A} -ARs und α_{1B} -ARs stattfindet, statt dessen deutete sich sogar eine Tendenz zur Zunahme der α_{1A} -AR-Anzahl an (Jensen et al., 2009a).

Den α_1 -ARs scheint durch diesen Prozess eine größere Bedeutung in der Vermittlung von Inotropie im Herzen zuzukommen (Böhm et al., 1988), aber auch der Stimulation von Kardiomyozytenwachstum sowie der Entwicklung einer Hypertrophie mit daraus resultierendem erhöhtem myokardialen Sauerstoffbedarf (Knowlton et al., 1993; O'Connell et al., 2003). Ebenfalls spielen α_1 -ARs eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus (Jensen et al., 2009b).

Es existieren bereits verschiedene Studien am menschlichen und am Nagetiermyokard sowie an Zellkulturen über das Verhalten unter kompletter Hypoxie sowie nachfolgender Reperfusion. In diesen wird ein ischämischer Präkonditionierungseffekt beschrieben, der das Herz nach kurzzeitigen Ischämiephasen vor Schäden nach langandauernder Ischämie schützt. Dieser Prozess soll auch durch α_1 -ARs vermittelt werden (Murry et al., 1986; Heathers et al., 1987; Hu und Nattel, 1995; Ghosh et al., 2000; Loubani und Galiñanes, 2001; Rorabaugh et al., 2005).

Für α_1 -ARs konnte bereits ein mechanismusbasiertes pharmakokinetisch-pharmakodynamisches Modell etabliert werden (Sermsappasuk und Weiss, 2009). Aufbauend auf diesem Modell soll in der vorliegenden Arbeit die Veränderung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. So stellt die Einführung einer partiellen Hypoxie auf das System der α_1 -ARs einen neuen Ansatz dar, das Verhalten des Herzens unter inkompletter Ischämie zu untersuchen. Außerdem wird das Verhalten der Parameter auf anhaltende Stimulation durch einen α_1 -Agonisten (Phenylephrin) und ein nicht-selektives β -Sympathomimetikum (Isoprenalin) sowie auf Hypertrophie des Herzens untersucht. Dabei liegt der Vorteil der verwendeten mathematischen Analyse der kinetischen Daten in der Möglichkeit, zwischen dem Einfluss von Rezeptorbindung und Signaltransduktion zu unterscheiden.

3. Material und Methodik

3.1 Das Langendorff-Herz

3.1.1 Prinzip und Entwicklung

Das Langendorff-Herz ist eines der frühesten Modelle für isoliert perfundierte Herzen, das erstmals von O. Langendorff im Jahre 1895 beschrieben wurde. Es ist heute eine weitverbreitete Methode sowohl in der physiologischen, pharmakologischen, biochemischen als auch in der klinischen Forschung. Sie ermöglicht die Untersuchung der ventrikulären Muskelkontraktion, des Stoffwechsels im Herzen sowie von Effekten an den koronaren Blutgefäßen.

Die Langendorff-Apparatur wurde mit der fortschreitenden technischen Entwicklung immer wieder modifiziert und weiterentwickelt. Das Grundprinzip hat sich jedoch nicht verändert: Das isolierte Herz wird mittels einer Kanüle durch die Aorta retrograd mit physiologischem Puffer perfundiert. Der durch die retrograde Perfusion entwickelte Druck schließt die Aortenklappen, so dass das Perfusat über die Koronararterien das Herz mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen kann. Über die Koronarien und den Sinus coronarius gelangt das Perfusat in den rechten Vorhof und den rechten Ventrikel. Von dort fließt es schließlich über die Pulmonalarterie wieder hinaus.

Als Perfusat kann Blut, Locke- oder Tyrode-Lösung sowie Krebs-Henseleit-Puffer genutzt werden. Es sollte kontinuierlich mit Carbogen begast und auf physiologische Körpertemperatur (37 °C) erwärmt werden. Die Flussrate des Perfusats kann für Konstant-Druck-Bedingung durch hydrostatischen Druck bestimmt, für Konstant-Fluss-Bedingung durch eine Schlauchpumpe erzeugt werden (Döring, 1996; Fawzi, 1997; Dhein, 2005). Für die nachfolgenden Versuche wurde die Konstant-Fluss-Bedingung gewählt.

Die Vorteile des isolierten Langendorff-Herzens bestehen in den fehlenden Wechselwirkungen durch hormonelle und nervale Kontrolle, die im Körper von außen auf das Herz einwirken. Dadurch lassen sich die spezifischen Effekte von Wirkstoffen am Herzen besser unter kontrollierten Bedingungen untersuchen.

3.1.2 Aufbau des Systems

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Langendorff-Apparatur für isolierte Herzen Größe 3 (HSE-Harvard, March-Hugstetten, Deutschland) genutzt. Eine schematische Darstellung der Apparatur ist in Abb. 5 gezeigt.

Die Apparatur besteht aus mehreren Komponenten: einer Schleuderpumpe, einem Oxygenator, einer Schlauchpumpe, einem Wärmetauscher, einer Herzkammer und Messfühlern. Der Oxygenator ist ein doppelwandiges, temperierbares Glasgefäß, dessen Innenfläche in Form dreier Kugeln ausgebildet ist, um eine möglichst große Oberfläche zu erhalten. An seiner unteren Seite wird ein Gasgemisch eingeleitet und eine Niveauelektrode ist ebenfalls dort fixiert. Das Perfusat wird von oben in den Oxygenator gepumpt und trifft dort auf eine rotierende Schleuderpumpe. Diese verteilt das Perfusat fein, so dass es an der Innenseite des Oxygenators als dünner Film herunter fließt. Die große Oberfläche ermöglicht die Erwärmung des Perfusats und die Sättigung mit dem Gasgemisch. Mit Hilfe der Niveauelektrode, eines elektronischen Reglers und der Schleuderpumpe wird der Flüssigkeitspegel im Oxygenator konstant gehalten. Diese Funktionsweise des Oxygenators erlaubt einen raschen Wechsel zwischen verschiedenen Gasgemischen innerhalb eines Versuchs. Ebenso kann dadurch auf ein Vorbegasen und Vorwärmen des Perfusats verzichtet werden (Zink et al., 2007).

Eine Schlauchpumpe transportiert das temperierte und mit Gas gesättigte Perfusat zum Herzen und stellt einen konstanten Perfusionsfluss her. Ein kleiner Wärmetauscher aus Glas soll dabei den Temperaturverlust im Pumpenschlauch kompensieren. Bevor das Perfusat durch die Aortenkanüle zum Herzen fließt, ist noch eine Blasenfalle zwischengeschaltet, die gegebenenfalls im Perfusat befindliche Gasblasen abfängt, bevor sie in das Herz und die Koronargefäße gelangen können.

Nach Anbringen des Herzens an die Apparatur wird eine Kammer über das Herz geschoben. Es handelt sich um ein temperierbares, doppelwandiges Gefäß, das dort als feuchte Kammer dienen und die Temperatur konstant halten soll.

Schließlich zeichnen die Messfühler 1 und 2 den Perfusionsdruck beziehungsweise den linksventrikulären Druck auf. Dabei ist der Messfühler 1 an die Blasenfalle angeschlossen, während der Messfühler 2 mit einem Latex-Ballon verbunden ist, der in den linken Ventrikel eingeführt wird.

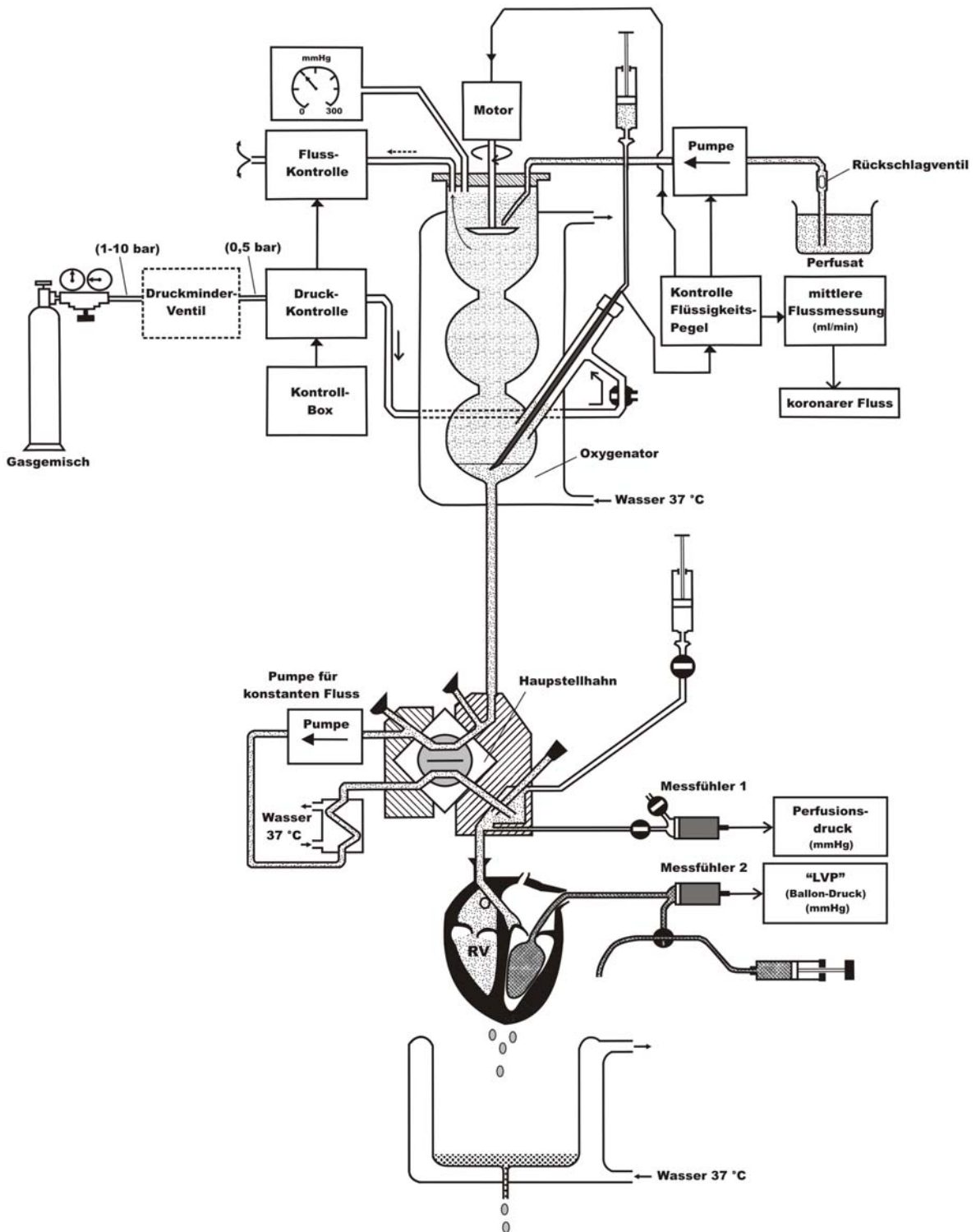


Abb. 5 Schematischer Aufbau der Langendorff-Apparatur unter Konstant-Fluss-Bedingung (modifizierte Abb. nach Dhein, 2005 und Zink et al., 2007).

3.1.3 Krebs-Henseleit-Puffer

Als Perfusatflüssigkeit wurde modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer genutzt. Er enthält: NaCl (118 mmol l^{-1}), KCl ($4,7 \text{ mmol l}^{-1}$), CaCl_2 ($1,5 \text{ mmol l}^{-1}$), MgSO_4 ($1,66 \text{ mmol l}^{-1}$), NaHCO_3 ($24,88 \text{ mmol l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,18 \text{ mmol l}^{-1}$), Glukose ($5,55 \text{ mmol l}^{-1}$), Na-Pyruvat (2 mmol l^{-1}) und bovines Serumalbumin (0,1% w/v). Der Puffer wurde an jedem Versuchstag frisch mit destilliertem Wasser angemischt und durch eine $0,45 \mu\text{m}$ hydrophile Mikrofiltrationsmembran aus Polyethersulfon (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) filtriert.

3.1.4 Vorbereitungen vor Versuchsbeginn

An der Langendorff-Apparatur wurde ein konstanter Fluss von $9,5 \pm 0,5 \text{ ml min}^{-1}$ eingestellt. Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde ständig mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) begast und auf eine Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt.

3.1.5 Präparation des Rattenherzens

Die Herzen wurden männlichen adulten Wistar-Ratten (Gewicht: 250-300 g) entnommen. Zunächst wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Pentobarbital-Injektion (Narcoren®, 16g/100ml Pentobarbital-Natrium; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) von 50-80 mg/kg Körpergewicht betäubt. Zusätzlich wurden 1500 Einheiten Heparin intraperitoneal injiziert. Sobald die Ratte betäubt war, folgte eine zervikale Dislokation durch Fixierung des Rattenhalses und einem kräftigen Zug am Schwanz der Ratte. Nach einem zusätzlichen Schmerzprovokationstest begann die Operation.

Zunächst wurde die Trachea freigelegt, inzidiert und intubiert. Danach folgte ein vertikaler Bauchschnitt bis zum Zwerchfell. Anschließend wurde der Schnitt zu beiden Seiten erweitert und das Zwerchfell inzidiert. Es folgte eine laterale Durchtrennung beidseits und ein Umklappen des Thorax. Nach Abklemmen der Vena cava caudalis wurde das Herz exzidiert und in oxygenierten, eiskalten Krebs-Henseleit-Puffer überführt.

Sobald das Herz still stand, wurde es im Puffer präpariert. Die Aorta wurde freigelegt und auf circa 3 bis 5 mm Länge gekürzt. Danach folgte das Einführen einer mit oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Kanüle, die an der Aorta fixiert wurde. Schließlich wurde das an der Kanüle fixierte Herz rasch an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Die Lungen wurden entfernt ebenso wie Reste von Trachea und Ösophagus. Es folgte ein Schnitt neben dem rechten Herzohr, der ein wenige Millimeter großes Loch in den linken Ventrikel eröffnete. Durch dieses wurde ein Latex-Ballon eingeführt, der mit einem Druckmessfühler verbunden war. Der Ballon war mit 50-prozentigem Methanol gefüllt. Diese Vorfüllung sollte einen diastolischen Druck von 5 bis 6 mmHg erzeugen.

Das angeschlossene Registriersystem (HSE Harvard, March-Hugstetten, Deutschland) erfasste während des gesamten Versuchs die Messwerte: linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), Herzfrequenz (HR) und den koronaren Perfusionsdruck (CP). Dabei ist zu beachten, dass der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) definiert ist als $LVDP = LVSP - LVEDP$. Der koronare Gefäßwiderstand (CVR) wird berechnet als Quotient aus Perfusionsdruck und koronarem Fluss.

Für jede Versuchsreihe wurden sechs Rattenherzen präpariert, die jeweils der gleichen Behandlung unterzogen wurden.

Die Versuche erfolgten konform zu den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere. Das Versuchsvorhaben wurde vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Abteilung Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten) genehmigt.

3.2 Versuchsprotokoll

3.2.1 Verwendete Pharmaka

Prazosin Hydrochlorid, L-Phenylephrin Hydrochlorid und D,L-Isoproterenol Hydrochlorid wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen. [7-methoxy-³H]-Prazosin wurde von PerkinElmer (Boston, USA) erworben, Dimethylsulfoxid (DMSO) von Carl Roth GmbH und Co. (Karlsruhe, Deutschland).

3.2.2 Herstellung der Stammlösungen

Eine Stammlösung von konzentriertem Prazosin wurde hergestellt, indem 2 mg Prazosin in 1 ml DMSO gelöst wurden. 15 µl dieser Stammlösung wurden mit Perfusatpuffer auf 50 ml aufgefüllt, so dass man eine 1,4 µM Prazosin-Lösung erhielt.

Eine Phenylephrin-Stammlösung mit der Konzentration 12 mg/ml in destilliertem Wasser wurde hergestellt und jeweils 100 bzw. 200 µl dieser Lösung mit Puffer auf 1 Liter aufgefüllt, um eine 6,1 und eine 12,3 µM Lösung zu erhalten.

3.2.3 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin

Für den Versuch wurden 4,5 ml der 1,4 µM Prazosin-Lösung mit 8,2 µl [7-methoxy-³H]-Prazosin gemischt. Dieses markierte Prazosin wurde später ins Herz infundiert.

Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abb. 6. Nach einer 25-minütigen Stabilisierungsphase wurde vom Perfusatpuffer auf eine 12,3 µM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Nach 15

Minuten wurden zusätzlich 1,286 nmol markiertes Prazosin innerhalb einer Minute in die Aortenkanüle direkt über dem isolierten Herzen infundiert. Danach wurden alle 5 Sekunden für 1,5 Minuten, alle 10 Sekunden für die nächsten 1,5 Minuten, alle 30 Sekunden für die nächsten 7 Minuten und jede Minute für die nächsten 5 Minuten Proben des ausfließenden Perfusats genommen.

Anschließend wurde auf eine 6,1 μM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Erneut wurden 15 Minuten abgewartet, nach denen wiederum dieselbe Dosis markiertes Prazosin infundiert und die Proben auf die oben beschriebene Weise gewonnen wurden.

Nach der letzten Probennahme wurde nochmals auf die 12,3 μM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Nach einer Stunde wurde erneut Prazosin infundiert und Proben genommen.

Die gesammelten Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und innerhalb von drei Tagen analysiert.

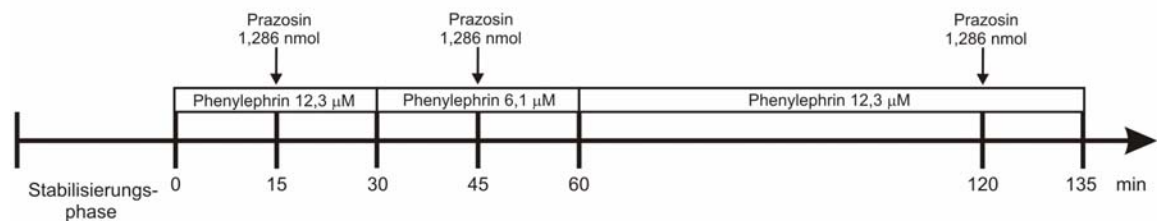


Abb. 6 Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe mit einstuündiger Phenylephrin-Infusion.

3.2.4 Effekt einer einstuündigen Infusion von Isoprenalin

Für den Versuch wurde eine Isoprenalin-Stammlösung mit der Konzentration 4 mM hergestellt, indem 1 mg Isoprenalin in 1 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. 124 μl dieser Stammlösung wurden mit Puffer auf einen Liter aufgefüllt, um eine $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung zu erhalten. 4,5 ml der 1,4 μM Prazosin-Lösung wurden mit 8,2 μl [7-methoxy- ^3H]-Prazosin gemischt. Dieses markierte Prazosin wurde später ins Herz infundiert.

Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abb. 7. Nach einer 25-minütigen Stabilisierungsphase wurde vom Perfusatpuffer auf eine 12,3 μM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Nach 15 Minuten wurden zusätzlich 1,286 nmol markiertes Prazosin innerhalb einer Minute in die Aortenkanüle direkt über dem isolierten Herzen infundiert. Während dieser Minute wurden alle 5 Sekunden für 1,5 Minuten, alle 10 Sekunden für die nächsten 1,5 Minuten, alle 30 Sekunden für die nächsten 7 Minuten und jede Minute für die nächsten 5 Minuten Proben des Ausflusses genommen.

Danach wurde auf eine 6,1 μM Phenylephrin-Lösung umgeschaltet. Erneut wurden 15 Minuten abgewartet, nach denen wieder dieselbe Dosis markiertes Prazosin infundiert und die Proben auf die beschriebene Weise gewonnen wurden.

Nach der letzten Probennahme wurde auf eine $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung gewechselt. Nach einer Stunde wurde erneut auf eine $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung umgeschaltet und 5 Minuten Anpassungszeit abgewartet. Danach wurde wieder Prazosin infundiert und Proben genommen. Die gesammelten Proben wurden bei -20°C gelagert und innerhalb von drei Tagen analysiert.

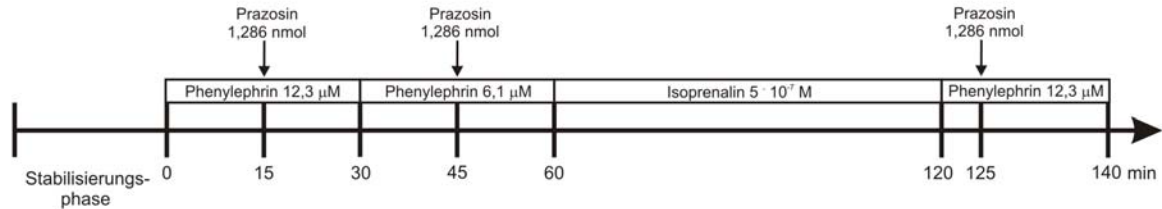


Abb. 7 Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe mit einstündiger Isoprenalin-Infusion.

3.2.5 Einfluss einer partiellen Hypoxie

Für den Versuch wurden $3,6 \text{ ml}$ der $1,4 \mu\text{M}$ Prazosin-Lösung mit $6,5 \mu\text{l}$ [7-methoxy- ^3H]-Prazosin gemischt. Dieses markierte Prazosin wurde später ins Herz infundiert.

Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abb. 8. Nach einer 25-minütigen Stabilisierungsphase wurde vom Perfusatpuffer auf eine $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung gewechselt. Nach 15 Minuten wurden zusätzlich $1,286 \text{ nmol}$ markiertes Prazosin innerhalb einer Minute in die Aortenkanüle direkt über dem isolierten Herzen infundiert. Während dieser Minute wurden alle 5 Sekunden für 1,5 Minuten, alle 10 Sekunden für die nächsten 1,5 Minuten, alle 30 Sekunden für die nächsten 7 Minuten und jede Minute für die nächsten 5 Minuten Proben des Ausflusses genommen.

Danach wurde auf ein Gasgemisch folgender Zusammensetzung umgeschaltet: 35 % Stickstoff, 60 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid (Linde AG, Leuna, Deutschland). Eine Stabilisierungsphase von 20 min wurde abgewartet. Danach wurden erneut $1,286 \text{ nmol}$ markiertes Prazosin infundiert und die Proben auf die gleiche Weise gewonnen.

Die gesammelten Proben wurden bei -20°C gelagert und innerhalb von drei Tagen analysiert.

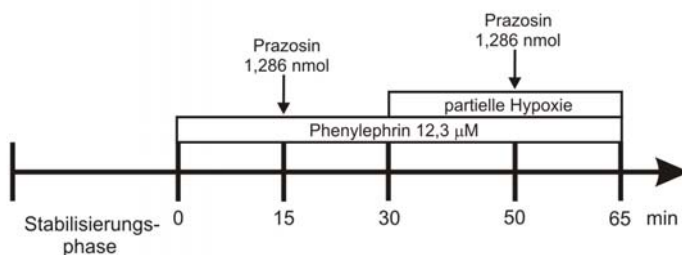


Abb. 8 Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe unter partieller Hypoxie.

3.2.6 Einfluss einer Myokardhypertrophie

Für den Versuch wurde eine Isoprenalin-Stammlösung mit der Konzentration 5 mg/ml hergestellt, indem 7,5 mg Isoprenalin in 1,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurden. 3,6 ml der 1,4 μM Prazosin-Lösung wurden mit 6,5 μl [7-methoxy- ^3H]-Prazosin gemischt. Dieses markierte Prazosin wurde später ins Herz infundiert.

Allen Versuchstieren wurden täglich sieben Tage lang zur gleichen Uhrzeit 0,3 ml der Isoprenalin-Stammlösung intraperitoneal (5 mg/kg) appliziert. 24 h nach der letzten Injektion wurde das Herz entnommen und der Versuch durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde als Pilotstudie geplant ohne Durchführung einer Kontrollreihe, in der die Ratten mit NaCl statt Isoprenalin vorbehandelt wurden, da vorangegangene Versuche gezeigt haben, dass eine Scheinbehandlung die Parameter nicht beeinflusste.

Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abb. 9. Nach einer 25-minütigen Stabilisierungsphase wurde vom Perfusatpuffer auf eine 12,3 μM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Nach 15 Minuten wurden zusätzlich 1,286 nmol markiertes Prazosin innerhalb einer Minute in die Aortenkanüle direkt über dem isolierten Herzen infundiert. Während dieser Minute wurden alle 5 Sekunden für 1,5 Minuten, alle 10 Sekunden für die nächsten 1,5 Minuten, alle 30 Sekunden für die nächsten 7 Minuten und jede Minute für die nächsten 5 Minuten Proben des Ausflusses genommen.

Danach wurde auf eine 6,1 μM Phenylephrin-Lösung gewechselt. Erneut wurden 15 Minuten abgewartet, nach denen wieder die identische Dosis markiertes Prazosin infundiert und die Proben auf die gleiche Weise gewonnen wurden.

Die gesammelten Proben wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und innerhalb von drei Tagen analysiert.

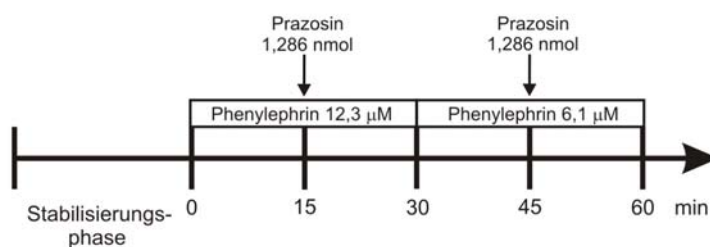


Abb. 9 Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe mit hypertrophierten Herzen.

3.3 Messung der Prazosin-Konzentrationen

Die in den Versuchen gesammelten Proben wurden innerhalb von drei Tagen mittels eines Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer Instruments, Shelton, USA) bestimmt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, indem die 1,4 μM markierte Prazosin-Lösung zuerst 1 : 10, dann fortlaufend 1 : 2 verdünnt wurde bis zur Verdünnung von 1 : 20480. Anhand dieser Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt.

Je 200 μl der Proben wurden mit je 2 ml Lumasafe Plus gemischt und mittels des Liquid Scintillation Counter gemessen. Den ermittelten Messwerten konnte anhand der Eichkurve die Höhe der Konzentration des Prazosins zugeordnet werden.

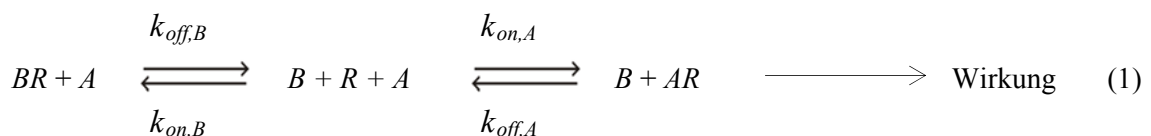
3.4 Pharmakokinetisch-pharmakodynamisches Modell und Datenanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem von Sermsappasuk und Weiss (2009) beschriebenen Modell, auf dem auch die folgende Darstellung beruht.

Dabei handelt es sich um ein Zwei-Kompartiment-Modell, bei dem das zentrale Kompartiment den vaskulären Raum und das periphere Kompartiment den myokardialen interstitiellen Raum darstellt. Dieses Modell beschreibt den transkapillären Transport von Prazosin, dessen kompetitive Bindung an den Rezeptor, die zu einem Abfall der Rezeptorbindung von Phenylephrin führt, sowie die Veränderungen der inotropen Wirkung. Das Kompartiment-Modell, das die Änderungen der Prazosin-Konzentrationen im vaskulären Raum und im Myokard beschreibt, ist in Abb. 10 dargestellt.

3.4.1 Pharmakonaufnahme und Rezeptorbindungs-Kinetik

Die kompetitive Interaktion zwischen dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (A) und dem α_1 -Antagonisten Prazosin (B) lässt sich wie folgt beschreiben:



wobei k_{on} und k_{off} die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation bzw. Dissoziation darstellen. In den durchgeführten Versuchen wurde Phenylephrin kontinuierlich mit gleichbleibender Konzentration infundiert, sodass angenommen werden kann, dass für die Bindung AR zum Zeitpunkt der einminütigen Prazosin-Infusion (t_1) im Steady-State gilt:

$$AR_{ss} = \frac{R_{tot}[A]}{[A] + K_A}, \quad BR(t_1) = 0 \quad (2)$$

wobei $[A]$ für die Agonisten-Konzentration steht und K_A die Dissoziationskonstante im Gleichgewicht darstellt. Für K_A gilt:

$$K_A = \frac{k_{off,A}}{k_{on,A}} \quad (3)$$

R_{tot} beschreibt die Menge der Rezeptorstellen, die zur Bindung fähig sind:

$$R_{tot} = AR + BR + R \quad (4)$$

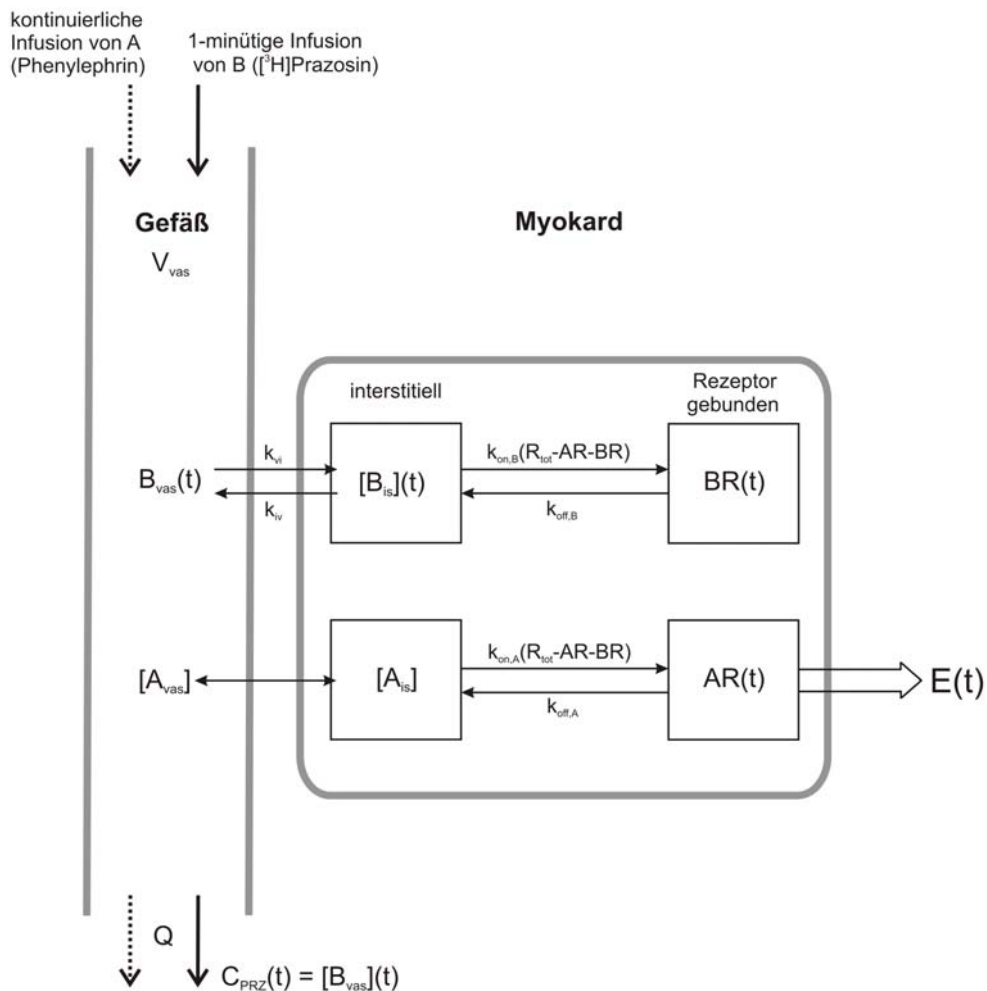


Abb. 10 Zwei-Kompartiment-Modell der kardialen Uptake-Kinetik und der Bindung des Antagonisten Prazosin (B) und des Agonisten Phenylephrin (A) an α_1 -Rezeptoren. Die Rezeptorbesetzung (AR) führt zum inotropen Effekt (E) (siehe Text); (modifizierte Abb. nach Sermsappasuk und Weiss, 2009).

Der Perfusat-Fluss Q gelangt durch die intraaortale Kanüle direkt in den vaskulären Raum, der das Volumen V_{vas} besitzt. Von diesem aus können die Substanzen über transkapillären Transport ins myokardiale Gewebe gelangen. Dabei kann für den Steady-State des passiven Transportes angenommen werden, dass die vaskuläre $[A_{vas}]$ der interstitiellen Phenylephrin-Konzentration $[A_{is}]$ identisch ist, die wiederum der Konzentration im Perfusat entspricht. k_{vi} und k_{iv} bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten, die den Prazosin-Transport zwischen vaskulärem und interstitiellem Raum beschreiben.

Davon ausgehend, dass die Wirkstoffe am Herzen über die Bindung an Rezeptoren an der Zellmembranoberfläche ihre Wirkung vermitteln, ist die interstitielle Konzentration des Agonisten entscheidend (Weiss, 2011).

Die Uptake-Clearance (auch Permeabilitäts-Oberflächenprodukt genannt) ergibt sich aus

$$CL_{vi} = k_{vi} \cdot V_{vas} \quad (5)$$

und ist damit sowohl von k_{vi} als auch von V_{vas} abhängig. Unter der Annahme passiver Transportvorgänge gilt:

$$k_{vi} \cdot V_{vas} = k_{iv} \cdot V_{app,is} \quad (6)$$

wobei $V_{app,is}$ das scheinbare Verteilungsvolumen des interstitiellen Raums beschreibt. Aufgrund der quasi sofort auftretenden unspezifischen Gewebsbindung von Prazosin ist dieses größer als der reale Verteilungsraum V_{is} .

Die freie Konzentration von Prazosin im interstitiellen Raum, die für die Rezeptorbindung maßgeblich ist, ergibt sich wie folgt:

$$[B_{is}](t) = \frac{B_{is}(t)}{V_{app,is}}, \text{ mit } V_{app,is} = \left(\frac{k_{vi}}{k_{iv}}\right)V_{vas} \quad (7)$$

Für die zeitabhängigen fraktionalen Bindungsraten von Prazosin und Phenylephrin an freie Membranrezeptoren gilt dann:

$$k_{on,B}[R_{tot} - AR(t) - BR(t)] \text{ und } k_{on,A}[R_{tot} - AR(t) - BR(t)] \quad (8)$$

wobei $AR(t)$ und $BR(t)$ die Höhe an zum Zeitpunkt t am Rezeptor gebundenen Phenylephrin und Prazosin beschreiben. Die Phenylephrin-Konzentration $[A_{is}](t)$ ist vor und nach Änderung der Konzentration von 12,3 μM auf 6,1 μM als konstant anzunehmen.

Der α_1 -Antagonist Prazosin verdrängt den Agonisten Phenylephrin; das führt zur Verringerung der Rezeptorbesetzung $AR(t)$, die über eine Stimulus-Wirkungs-Beziehung zur Verringerung des inotropen Effekts durch Phenylephrin führt. $E(t)$ ist die beobachtete Veränderung des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP). Die Konzentration von B im Ausfluss ($C_{PRZ}(t)$) wird gemessen und entspricht der vaskulären Konzentration $[B_{vas}] = B_{vas}(t)/V_{vas}$.

Die Rezeptorbesetzung vor Phenylephrin-Infusion zum Zeitpunkt $t = 0$ kann jedoch nicht als null angenommen werden, da die Bindung endogener Liganden an diese Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann.

$$AR(0) = AR_0 \quad (9)$$

Das Modell von Pharmakonaufnahme und Rezeptorbindung wird durch folgende auf dem Massenwirkungsgesetz basierende Differentialgleichungen beschrieben:

$$\frac{dB_0(t)}{dt} = -\frac{Q}{V_0} B_0(t) + I_B(t) \quad (10)$$

$$\frac{dB_{vas}(t)}{dt} = -\left(\frac{Q}{V_{vas}} + k_{iv}\right) B_{vas}(t) + k_{iv} B_{is}(t) + \frac{Q}{V_0} B_0(t) \quad (11)$$

$$\frac{dB_{is}(t)}{dt} = k_{vi} B_{vas}(t) - k_{iv} B_{is}(t) - k_{on,B} (R_{tot} - AR(t) - BR(t)) \frac{B_{is}(t)}{V_{app,is}} + k_{off,B} BR(t) \quad (12)$$

$$\frac{dBR(t)}{dt} = k_{on,B} (R_{tot} - AR(t) - BR(t)) \frac{B_{is}(t)}{V_{app,is}} - k_{off,B} BR(t) \quad (13)$$

$$\frac{dAR(t)}{dt} = k_{on,A} (R_{tot} - AR(t) - BR(t)) [A_{is}](t) - k_{off,A} AR(t) \quad (14)$$

wobei I_B für die Inputrate von Prazosin steht (1,286 nmol als einminütige Infusion). Zuerst passiert Prazosin das Mischvolumen V_0 in der Kanüle und den großen Gefäßen, die nicht am Austausch mit dem Gewebe teilnehmen, und gelangt danach in den vaskulären Raum.

Für die Prazosin-Konzentration im vaskulären Kompartiment gilt dann:

$$C_{PRZ} = \frac{B_{vas}(t)}{V_{vas}} \quad (15)$$

Die Differentialgleichungen 10 bis 14 werden im Prozess der Parameterschätzung mit der Software ADAPT 5 numerisch gelöst (Kurvenanpassung der Prazosin-Konzentrationen und inotropen Wirkung, siehe Kapitel 3.4.4 *Datenanalyse mittels ADAPT 5*). Die Initialbedingungen sind dabei: $B_0(0) = B_{vas}(0) = B_{is}(0) = BR(0) = 0$. Vom Programm ermittelt wird $AR(0) = AR_0$.

3.4.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Die Beziehung zwischen der Rezeptorbesetzung durch einen Agonisten und dem dadurch induzierten positiv inotropen Effekt wird durch die Stimulus-Wirkungs-Beziehung $\Delta E(t) = \phi[AR(t)]$ beschrieben, wobei sich ϕ auf die Kette zellulärer Prozesse bezieht, bei der aus dem Stimulus eine Wirkung entsteht. Nach dem „operational model of agonism“ (Black und Leff, 1983; Black et al., 1985; Kenakin, 2004, 2012) kann die Signalübertragung von der Rezeptorbesetzung in eine Wirkung ϕ durch eine hyperbolische Funktion

$$E(t) = E_{base} + \frac{\phi_{max} AR(t)^N}{K_E^N + AR(t)^N} \quad (16)$$

beschrieben werden. Dabei ist E_{base} der Baseline-Effekt für $AR = 0$, ϕ_{max} der maximal erreichbare Effekt und K_E die Transducer-Konstante, bei der die Agonistenbindung an den Rezeptor AR 50 % von ϕ_{max} erzeugt. K_E stellt dabei auch die virtuelle Michaelis-Menten-Konstante für die Interaktion vom Rezeptor mit gebundenem Agonisten und der Zelle dar, wobei die Zelle als virtuelles Enzym definiert wird. N ist der Hill-Koeffizient, der die Sigmoidität der Kurve bestimmt. Sinkt K_E , steigt der Wirkungseffekt.

Die Daten für $LVDP(t)$ werden dabei als ein Maß für den inotropen Effekt verwendet: $E(t) = LVDP(t)$. Bereits vor der Rezeptorstimulation durch Phenylephrin kann eine gewisse Inotropie (E_{base}) bestehen und endogene Liganden können einen möglichen Effekt $E_0 = E_{base} + \phi[AR_0]$ hervorrufen. Die Kinetik der Verdrängung des Agonisten von den Rezeptoren durch Prazosin führt zu einem vorübergehenden Absinken in $LVDP(t)$.

3.4.3 Gleichgewichts-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Steady-State kann durch Substitution von $AR = AR_{ss}$ aus Gleichung 2 in Gleichung 16 unter Verwendung von $N = 1$ hergeleitet werden.

$$E_{ss} = E_{base} + \frac{\phi_{max} R_{tot} [A]}{K_E K_A + [A](K_E + R_{tot})} \quad (17)$$

Durch Substitution von $\frac{R_{tot}}{K_E}$ durch τ ergibt sich:

$$E_{ss} = E_{base} + \frac{\phi_{max} \tau [A]}{K_A + [A](1 + \tau)} \quad (18)$$

Dies ist die Grundgleichung des „operational model“ der Arzneimittelwirkung. τ steht dabei sowohl für die intrinsische Wirksamkeit des Agonisten als auch die Sensitivität des Rezeptors zum Agonisten sowie die Effizienz der Rezeptor-Kopplung an den Stimulus-Wirkungs-Mechanismus der Zelle (Kenakin, 2004, 2012).

Die Änderung im positiv inotropen Effekt durch Phenylephrin kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta E_{PE} = \frac{\phi_{max} R_{tot}}{K_E + R_{tot}} \left(\frac{[A_0] + C_{PE}}{EC_{50} + C_{PE}} - \frac{[A_0]}{EC_{50}} \right) \quad (19)$$

wobei C_{PE} für die Konzentration an Phenylephrin und $[A_0]$ für die endogener Liganden steht, für die gilt:

$$[A]_0 = \frac{AR_0 K_A}{R_{tot} - AR_0} \quad (20)$$

und

$$[A] = [A_0] + C_{PE} \quad (21)$$

Der Wert $EC_{50,PE}$ beschreibt die Konzentration C_{PE} , die 50 % von $\Delta E_{max, PE}$ hervorruft. $EC_{50,PE}$ ergibt sich wie folgt:

$$EC_{50,PE} = K_A \left(\frac{K_E}{K_E + R_{tot}} + \frac{1}{R_{tot} / AR_0 - 1} \right) \quad (22)$$

Der maximal durch Phenylephrin induzierte Effekt auf die LVDP-Änderung lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$\Delta E_{max,PE} = \frac{\phi_{max} R_{tot}}{K_E + R_{tot}} \left(1 - \frac{(R_{tot} / AR_0 - 1) K_E}{K_E + R_{tot}} \right) \quad (23)$$

Aus den Gleichungen 19 bis 23 lassen sich mittels ADAPT 5 die Sekundärparameter $[A_0]$, $EC_{50, PE}$ und $\Delta E_{max, PE}$ ermitteln.

3.4.4 Datenanalyse mittels ADAPT 5

Für die Schätzung der Modellparameter wurde die Maximum-Likelihood-Schätzung mit Hilfe des EM-Logarithmus genutzt (Walker, 1996), die in der Software ADAPT 5 (D'Argenio et al., 2009) implementiert ist (Programm MLEM). Das zugrundeliegende Modell ist durch die Differentialgleichungen 10 bis 14 gegeben (siehe Kapitel 3.4.1.) Die Prazosin-Ausflusskonzentrations-Daten und die Effektdaten (Änderung von LVDP) wurden simultan gefittet. Es erfolgte eine Populationsanalyse, das heißt die Daten aller Experimente einer Versuchsreihe wurden gleichzeitig analysiert. Die Initialwerte für die MLEM-Analyse wurden der Literatur und den Ergebnissen früherer Experimente entnommen (Sermasappasuk und Weiss, 2009).

Das Programm bietet die Möglichkeit die Mittelwerte der Population, die Inter-Subjekt-Variabilität und die individuellen Parameter zu schätzen. Dazu wurden die ermittelten Werte für die Prazosin-Konzentrationen und für die Änderung von LVDP als Ausdruck der inotropen Wirkung mit den Modellfunktionen C_{PRZ} und $E(t)$ gefittet, um die Werte der Parameter V_{vas} , k_{vi} , k_{iv} , K_B , $k_{off,B}$, K_A , $k_{off,A}$, R_{tot} , K_E , ϕ_{max} , N und E_{base} zu bestimmen. Für $k_{on,A}$ und $k_{on,B}$ gilt dabei:

$$k_{on,A} = \frac{k_{off,A}}{K_A} \quad \text{und} \quad k_{on,B} = \frac{k_{off,B}}{K_B} \quad (24)$$

Die Parameterschätzung beruht auf den nachstehenden Annahmen:

Die ermittelten Messwerte lassen sich mit der Gleichung

$$z(t_i) = y(\theta, t_i) + e(t_i) \text{ mit } i = 1, \dots, n \quad (25)$$

beschreiben, wobei $z(t_i)$ den Vektor der beobachteten Werte für den Modell-Output-Vektor $y(\theta, t_i)$ zum Zeitpunkt t_i mit dem Systemparameter-Vektor θ und dem Vektor des additiven Output-Fehlers e_i beschreibt. Anteilig handelt es sich bei e_i um Fehler während des Messprozesses. Für die Varianz von e_i ($\text{var}\{e(t)\}$) wird folgende Annahme gemacht:

$$\text{var}\{e(t_i)\} = (\sigma_{inter} + \sigma_{slope} y(\theta, t_i))^2 \text{ mit } i = 1, \dots, n \quad (26)$$

Dabei beschreibt die Gleichung $\sigma_i = \sigma_{inter} + \sigma_{slope} y(\theta, t_i)$ eine lineare Funktion mit dem Ordinatenschnittpunkt σ_{inter} und dem Anstieg $\sigma_{slope} y(t)$.

Die Dichtefunktion der Parameterverteilung kann im MLEM-Programm wie folgt definiert gewählt werden:

$$\begin{aligned} p(\theta) &= N(\mu, \Sigma) \quad \text{für multivariate normalverteilte Parameter und} \\ p(\theta) &= LN(\mu, \Sigma) \quad \text{für multivariate lognormalverteilte Parameter,} \end{aligned} \quad (27)$$

wobei μ den Vektor des Anfangserwartungswertes und Σ die Kovarianz-Matrix der Modellparameter θ beschreibt (D'Argenio et al., 2009).

Der EM-Logarithmus arbeitet in zwei Schritten: im ersten *Estimation*-Schritt werden die bedingten Erwartungswerte und Kovarianzen für jeden individuellen Parameter abgeschätzt. Im zweiten *Maximization*-Schritt werden die Populations-Mittelwerte und die Kovarianz- sowie die Fehler-Varianz-Parameter ermittelt. Diese Schritte werden iteriert, bis es zur Konvergenz kommt (Walker, 1996; D'Argenio et al., 2009).

Bei der Parameterschätzung wurde eine Normalverteilung angenommen und beim Fitten anstelle des Lognormal-Modus verwendet, da die Qualität der Fits dadurch zunahm.

Um die Güte der Modell-Anpassung zu ermitteln, wurde der AIC-Wert (Akaike Information Criterion) (D'Argenio et al., 2009) sowie die grafische Darstellung der vorhergesagten Werte gegen die ermittelten Messergebnisse herangezogen. Je kleiner der AIC eines Modells im

Vergleich mit anderen ist, desto besser beschreibt es die vorliegenden Daten. Des Weiteren ermittelt das Programm MLEM die interindividuelle Variabilität der geschätzten Parameter. Ebenfalls zur Güteabschätzung eines Fits wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 genutzt, für das gilt:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (28)$$

wobei \hat{Y} die vom Modell abgeschätzten Werte und \bar{Y} die Mittelwerte der Messdaten darstellen (Menard, 2000). Die Werte für R^2 können zwischen 0 und 1 liegen, wobei eine Untergrenze von 0,8 festgelegt wurde.

Der Hill-Koeffizient N wurde auf 1 festgesetzt, da sich die Kalkulationen von N nicht signifikant unterschieden.

3.4.5 Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) bzw. mit der interindividuellen Variabilität (%) angegeben. In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

Die Signifikanzprüfung der Parameter-Änderungen erfolgte für die Versuchsreihen unter einstündiger Infusion einer 12,3 μ M Phenylephrin-Lösung bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung sowie unter partieller Hypoxie mit dem gepaarten t-Test. Für die Versuchsreihe der Hypertrophie-Herzen erfolgte die Signifikanzprüfung mit dem ungepaarten t-Test. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin

Insgesamt vier Versuche wurden zur Modellierung herangezogen. Die Ausgangswerte zu Beginn des Experiments betragen dabei für LVDP $106,15 \pm 4,25$ mmHg, für die Herzfrequenz 218 ± 21 min^{-1} und für CVR $2,83 \pm 0,51$ $\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$. Die inotrope Wirkung von Phenylephrin zeigte einen triphasischen Verlauf mit initial positiv inotropen Effekt, gefolgt von einer kurzzeitigen negativ inotropen Reaktion, an die sich eine anhaltend positiv inotrope Wirkung anschloss. Für die Modellierung aller Versuchsreihen wurde dabei nur die positiv inotrope Wirkung ohne kurzzeitigen Negativeffekt verwendet. Die Veränderungen des LVDP sind anhand Abb. 11 beispielhaft für einen Versuch der Reihe gezeigt. In Abb. 12 bis 14 sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der ermittelten Messwerte für den Prazosin-Ausfluss, LVDP sowie für die Herzfrequenz dargestellt.

Die initiale viertelstündige Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung bewirkte eine signifikante Zunahme von CVR um $48,78 \pm 19,63$ % ($p < 0,05$). Die Herzfrequenz änderte sich dabei nicht signifikant, LVDP nahm um 15 % zu. Während der ersten einminütigen Infusion von $1,286$ nmol Prazosin (15. Minute) nahm die Herzfrequenz dagegen signifikant um $5,29 \pm 2,62$ % zu, CVR sank signifikant um $23,28 \pm 6,41$ % ($p < 0,05$). Während der zweiten (45. Minute) und dritten (120. Minute) Prazosin-Infusion blieb die Herzfrequenz unverändert, aber CVR fiel maximal um $26,77 \pm 6,85$ % bzw. um $15,62 \pm 4,2$ % ab ($p < 0,01$). Verglichen mit der CVR nach der ersten viertelstündigen Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung, stieg die CVR nach einstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung signifikant um $6,19 \pm 0,85$ % ($p < 0,05$).

Die Höhen der Grundlinien des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unterschieden sich signifikant mit $108,18 \pm 18,0$ mmHg direkt vor und $98,0 \pm 16,77$ mmHg nach einstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung ($p < 0,01$). Der maximale Effekt der Prazosin-Infusionen auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) – ausgedrückt als prozentualer Anteil des maximalen Abfalls vom Ausgangswert des LVDP – differiert ebenfalls signifikant mit $16,26 \pm 2,88$ % nach viertelstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung und $25,34 \pm 4,11$ % nach einstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung ($p < 0,05$).

Mit Hilfe des in Kapitel 3.4 beschriebenen Modells wurden die ermittelten Daten mittels MLEM gefittet. Daraus ergaben sich die in Tab. 1 dargestellten Werte für die Parameter unter Kontrollbedingungen und in Tab. 2 nach einstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung. Signifikante Änderungen ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollen für k_{iv} , K_A und K_B . In Abb. 15 sind die ermittelten Messwerte und die Modell-Vorhersage für die Prazosin-Konzentration im Ausfluss und in Abb. 16 für die Werte von LVDP für die Kontrollen

dargestellt. In Abb. 17 und Abb. 18 folgt die gleiche Darstellung für die Prazosin-Infusion nach der einstündigen Behandlung mit 12,3 μM Phenylephrin-Lösung.

Abb. 19 zeigt beispielhaft den Fit eines Kontroll-Versuches für den Verlauf der Prazosin-Konzentration im Ausfluss und Abb. 20 für den Verlauf von LVDP. In Abb. 21 und 22 folgt die gleiche Darstellung nach der Behandlung.

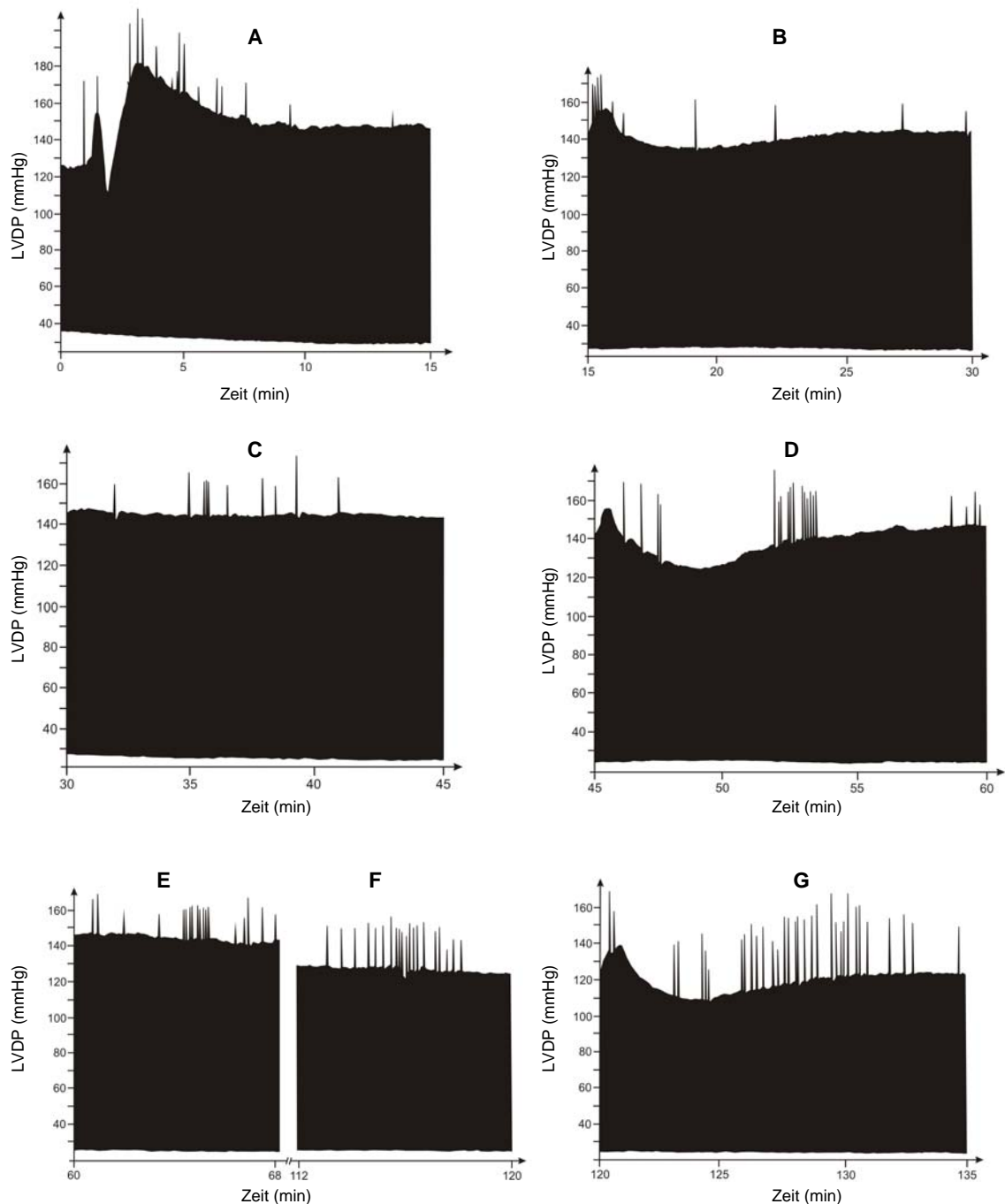


Abb. 11 Aufgezeichnete Änderungen im Verlauf des LVDP für die Kontrollen bei Beginn der 12,3 μM Phenylephrin-Infusion (A), während und nach einminütiger Prazosin-Infusion (B), für die Umstellung auf 6,1 μM Phenylephrin-Infusion (C) und während sowie nach einminütiger Prazosin-Infusion unter 6,1 μM Phenylephrin-Infusion (D). Danach folgte die Umstellung auf 12,3 μM Phenylephrin-Infusion für eine Stunde (E zu Beginn, F am Ende der Infusion). Im Anschluss erneute einminütige Prazosin-Infusion (G).

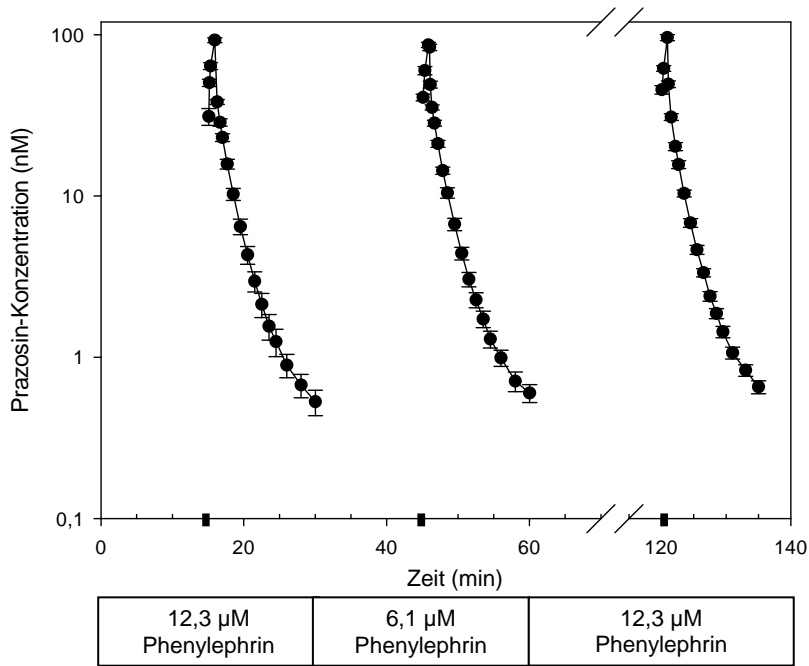


Abb. 12 Prazosin-Konzentration im Ausfluss vor und nach einstündiger Infusion von 12,3 µM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte.

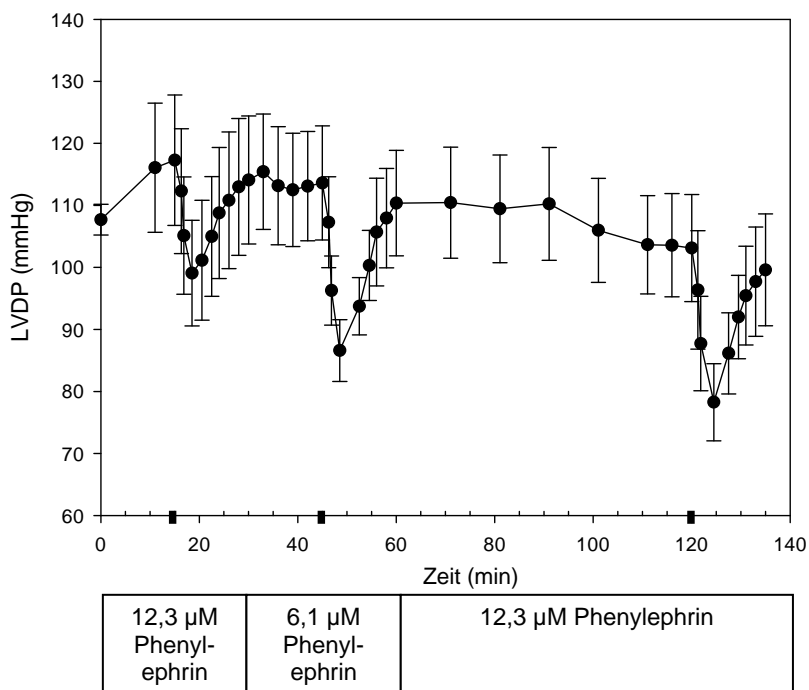


Abb. 13 Verlauf des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) vor und nach einstündiger Infusion von 12,3 µM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Anstieg nach Prazosin-Injektion.

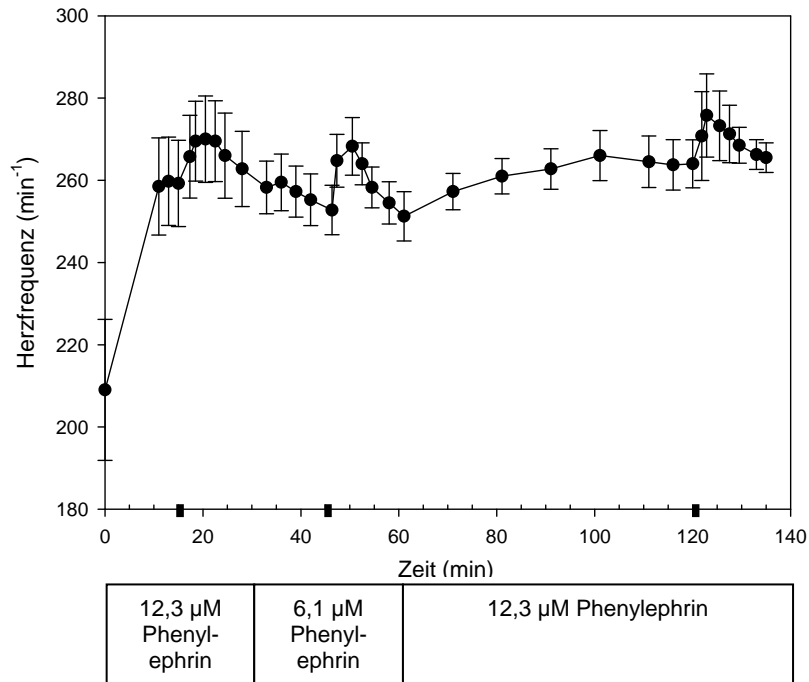


Abb. 14 Verlauf der Herzfrequenz vor und nach einstündiger Infusion von 12,3 μM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Abfall nach Prazosin-Injektion.

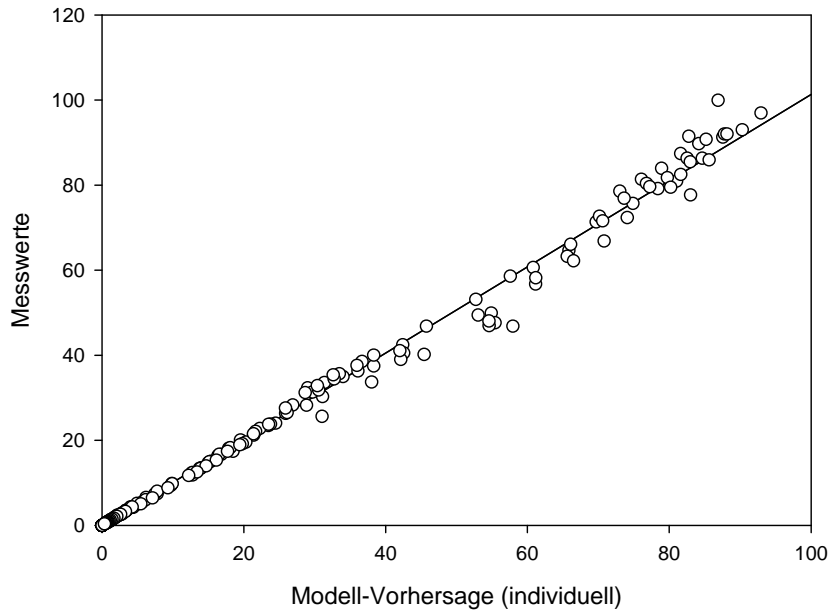


Abb. 15 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

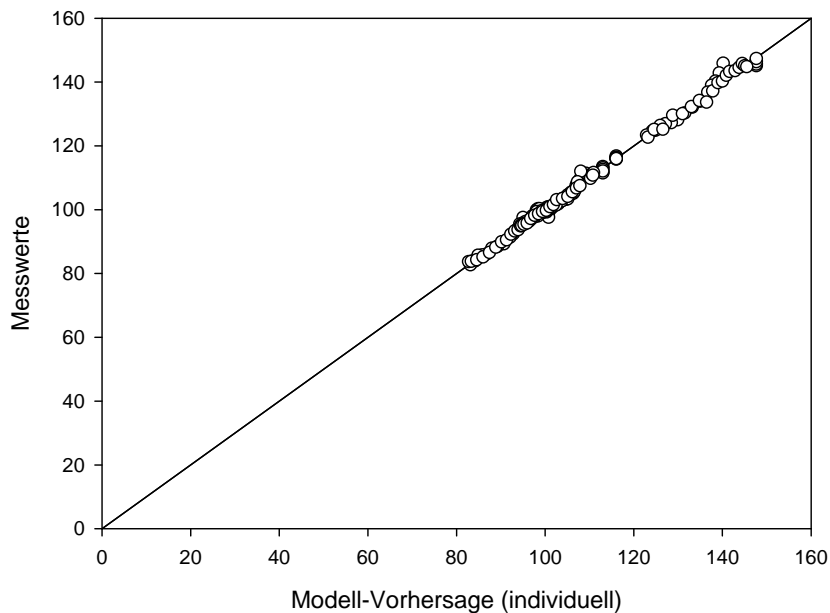


Abb. 16 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

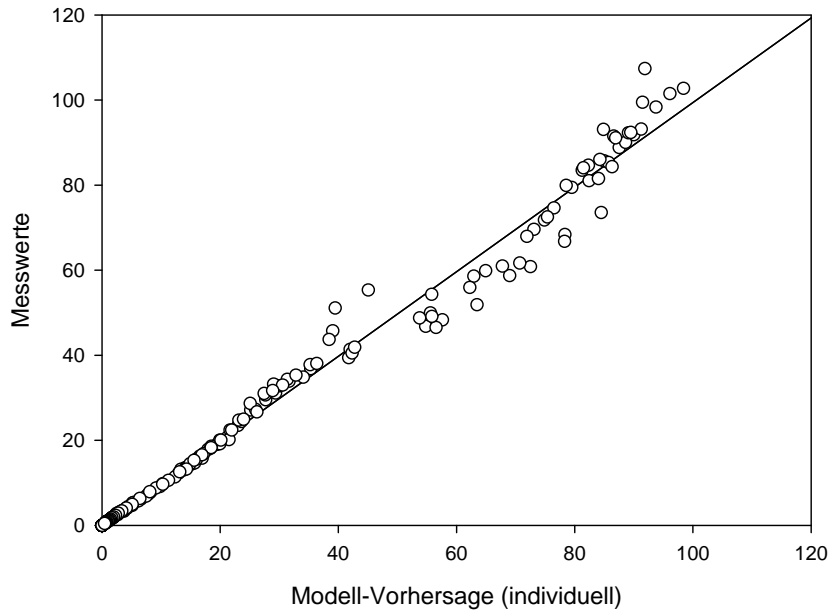


Abb. 17 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss nach einstündiger Behandlung mit $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung sowie nach Injektion von $1,286 \text{ nmol}$ Prazosin (120. Minute) in der Anwesenheit von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

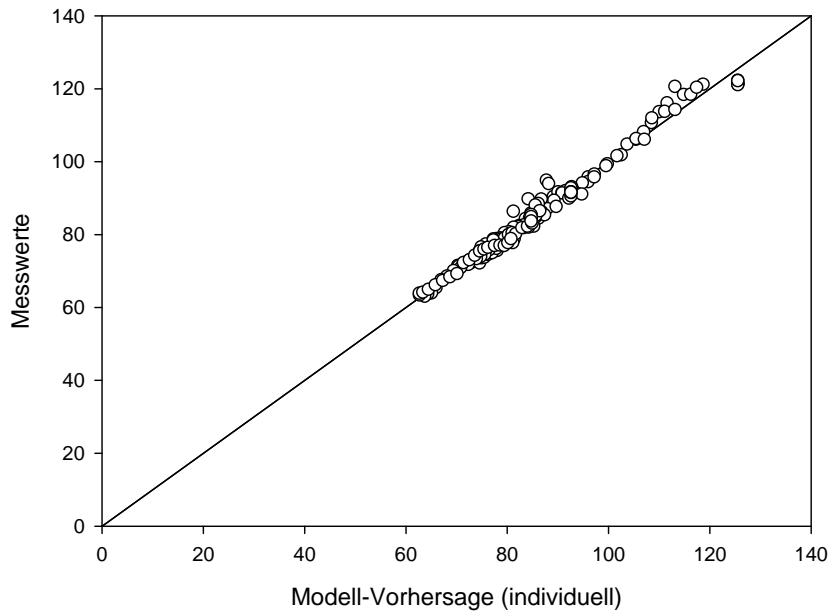


Abb. 18 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) nach einstündiger Behandlung mit $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung sowie nach Injektion von $1,286 \text{ nmol}$ Prazosin (120. Minute) in der Anwesenheit von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

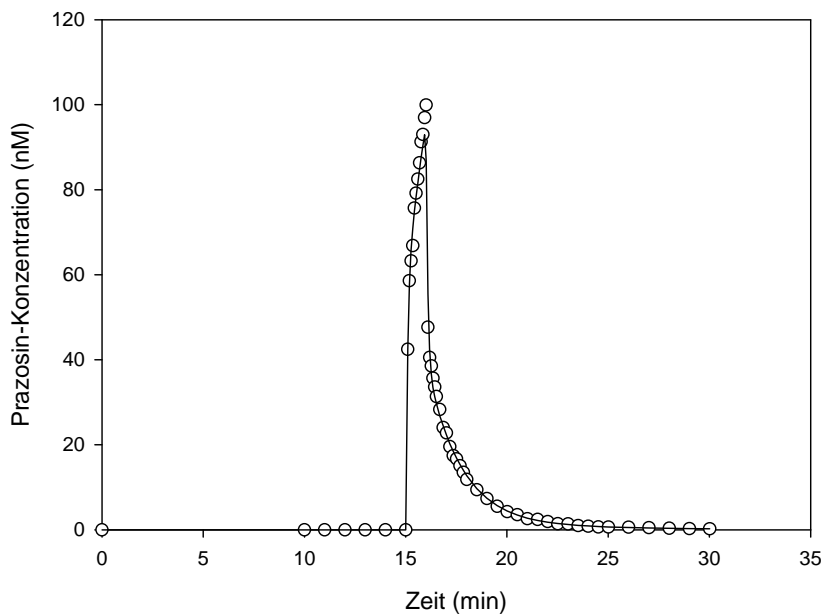


Abb. 19 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

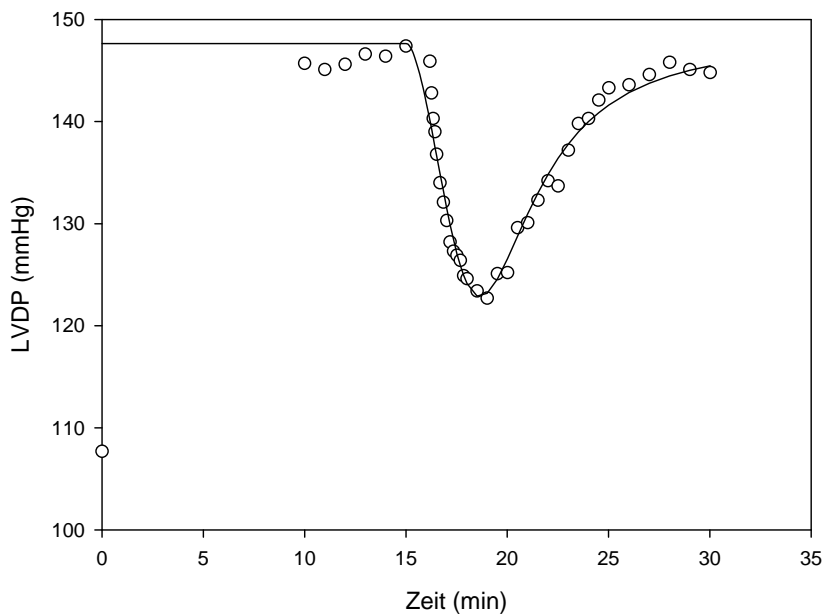


Abb. 20 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

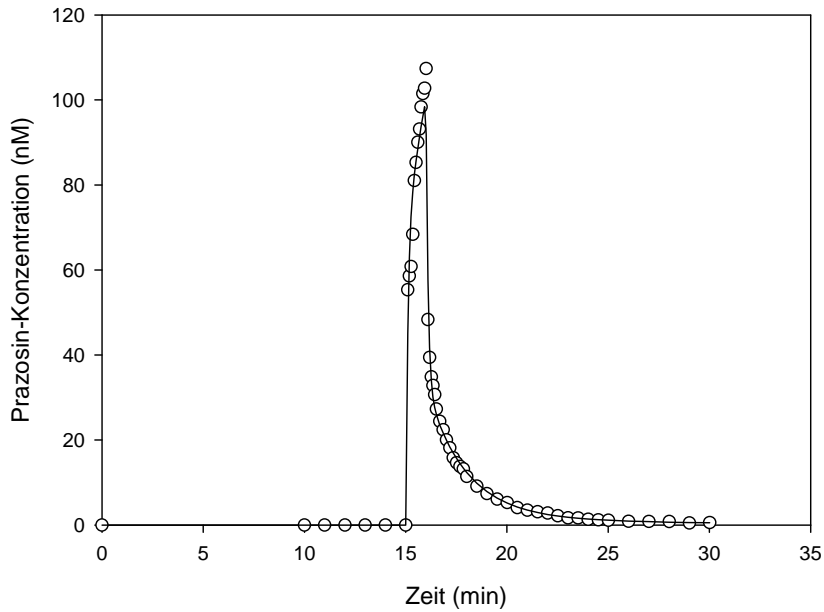


Abb. 21 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 120. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μM Phenylephrin nach einstündiger Infusion von 12,3 μM Phenylephrin-Lösung. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

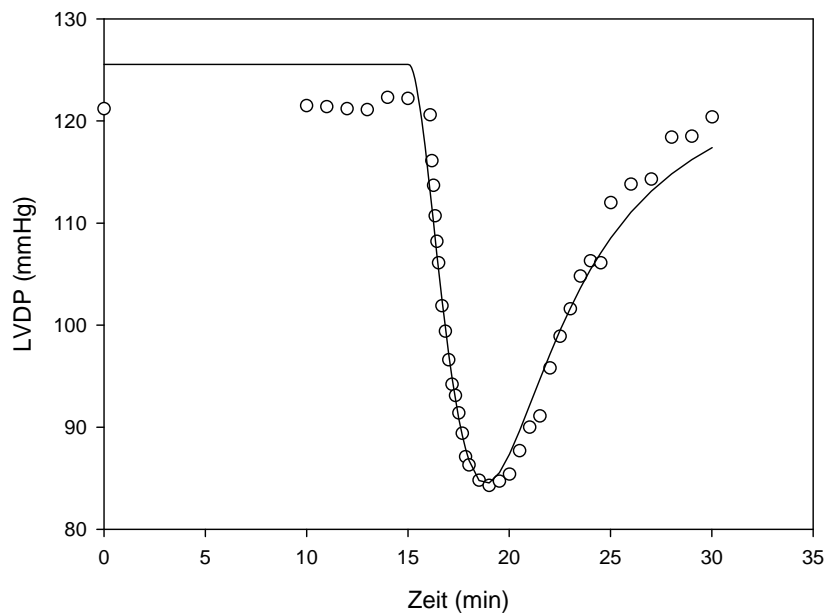


Abb. 22 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 120. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μM Phenylephrin nach einstündiger Infusion von 12,3 μM Phenylephrin-Lösung. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

Tab. 1 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung unter Kontrollbedingungen mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 4).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,0780	3,11
k_{vi} (min ⁻¹)	182	5,02
k_{iv} (min ⁻¹)	1,37	0,894
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0346	4,84
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,200	37,7
R_{tot} (pmol)	108,1	31,9
K_A (nmol l ⁻¹)	87,7	4,41
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,10	16,4
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	106,8	16,9
K_E (pmol)	12,3	52,7
E_{base} (mmHg)	23,3	20,0
$AR(0)$ (pmol)	157	205
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	5,17	190
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	166	195

Tab. 2 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung nach einstündiger Behandlung mit 12,3 μ M Phenylephrin-Lösung mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 4).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,0706	9,97
k_{vi} (min ⁻¹)	176	6,33
k_{iv} (min ⁻¹)	1,14 *	10,2
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0340 *	0,958
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,181	25,4
R_{tot} (pmol)	114,6	17,3
K_A (nmol l ⁻¹)	89,4 *	0,982
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,06	2,87
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	93,4	22,8
K_E (pmol)	24,1	10,3
E_{base} (mmHg)	23,2	1,02
$AR(0)$ (pmol)	148	46
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	7,34	39,5
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	163	43,1

* p < 0,05 vs. Kontrolle (gepaarter t-Test)

4.2 Effekt einer einstündigen Infusion mit Isoprenalin

Insgesamt fünf Versuche wurden zur Modellierung herangezogen. Die Ausgangswerte zu Beginn des Experiments betragen dabei für LVDP $103,4 \pm 13,86$ mmHg, für die Herzfrequenz 245 ± 28 min^{-1} und für CVR $3,85 \pm 0,47$ $\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$. Die Veränderungen des LVDP sind anhand Abb. 23 beispielhaft für einen Versuch der Reihe gezeigt. In Abb. 24 bis 26 sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der ermittelten Messwerte für den Prazosin-Ausfluss, LVDP sowie für die Herzfrequenz dargestellt.

Die initiale viertelstündige Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung bewirkte eine signifikante Zunahme von CVR um $50,16 \pm 24,68$ % ($p < 0,01$). LVDP nahm dabei um 16 % zu, die Herzfrequenz änderte sich nicht signifikant. Während der ersten einminütigen Infusion von $1,286$ nmol Prazosin (15. Minute) nahm die Herzfrequenz dagegen signifikant um $4,21 \pm 3,11$ % zu ($p < 0,05$), CVR sank signifikant um $13,87 \pm 5,39$ % ($p < 0,01$). Während der zweiten Prazosin-Infusion (45. Minute) blieb die Herzfrequenz unverändert, aber CVR fiel maximal um $18,22 \pm 8,8$ % ab ($p < 0,05$). Nach der einstündigen Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung stieg die CVR signifikant um $246,24 \pm 180,94$ % ($p < 0,05$).

Die Höhen der Grundlinien des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unterschieden sich signifikant mit $115,44 \pm 5,92$ mmHg nach der initialen viertelstündigen Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung und $102,10 \pm 4,93$ mmHg nach der einstündigen Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung und der folgenden fünfminütigen Umstellung auf $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung, dies entspricht einer Abnahme um $11,32 \pm 7,07$ % ($p < 0,05$). Nach der einstündigen Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung und der folgenden fünfminütigen Umstellung auf $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung stieg dagegen die Herzfrequenz signifikant um $10,51 \pm 4,89$ % im Vergleich zur initialen viertelstündigen Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung ($p < 0,01$). Der maximale Effekt der Prazosin-Infusionen auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) unterscheidet sich signifikant mit $16,84 \pm 4,27$ % nach viertelstündiger Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung und $27,36 \pm 9,56$ % nach einstündiger Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung und der folgenden fünfminütigen Umstellung auf $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung ($p < 0,05$).

Die ermittelten Daten wurden mittels MLEM gefittet. Daraus ergaben sich die in Tab. 3 dargestellten Werte für die Parameter unter Kontrollbedingungen und in Tab. 4 nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung. Es ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollen signifikante Änderungen für k_{iv} und K_A . In Abb. 27 sind die ermittelten Messwerte und die Modell-Vorhersage für die Prazosin-Konzentration im Ausfluss und in Abb. 28 für die Werte von LVDP für die Kontrollen dargestellt. In Abb. 29 und Abb. 30 folgt die gleiche Darstellung für die Prazosin-Infusion nach der einstündigen Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung.

Abb. 31 zeigt beispielhaft den Fit eines Kontroll-Versuches für den Verlauf der Prazosin-Konzentration im Ausfluss und Abb. 32 für den Verlauf von LVDP. In Abb. 33 und 34 folgt die gleiche Darstellung nach der Infusion.

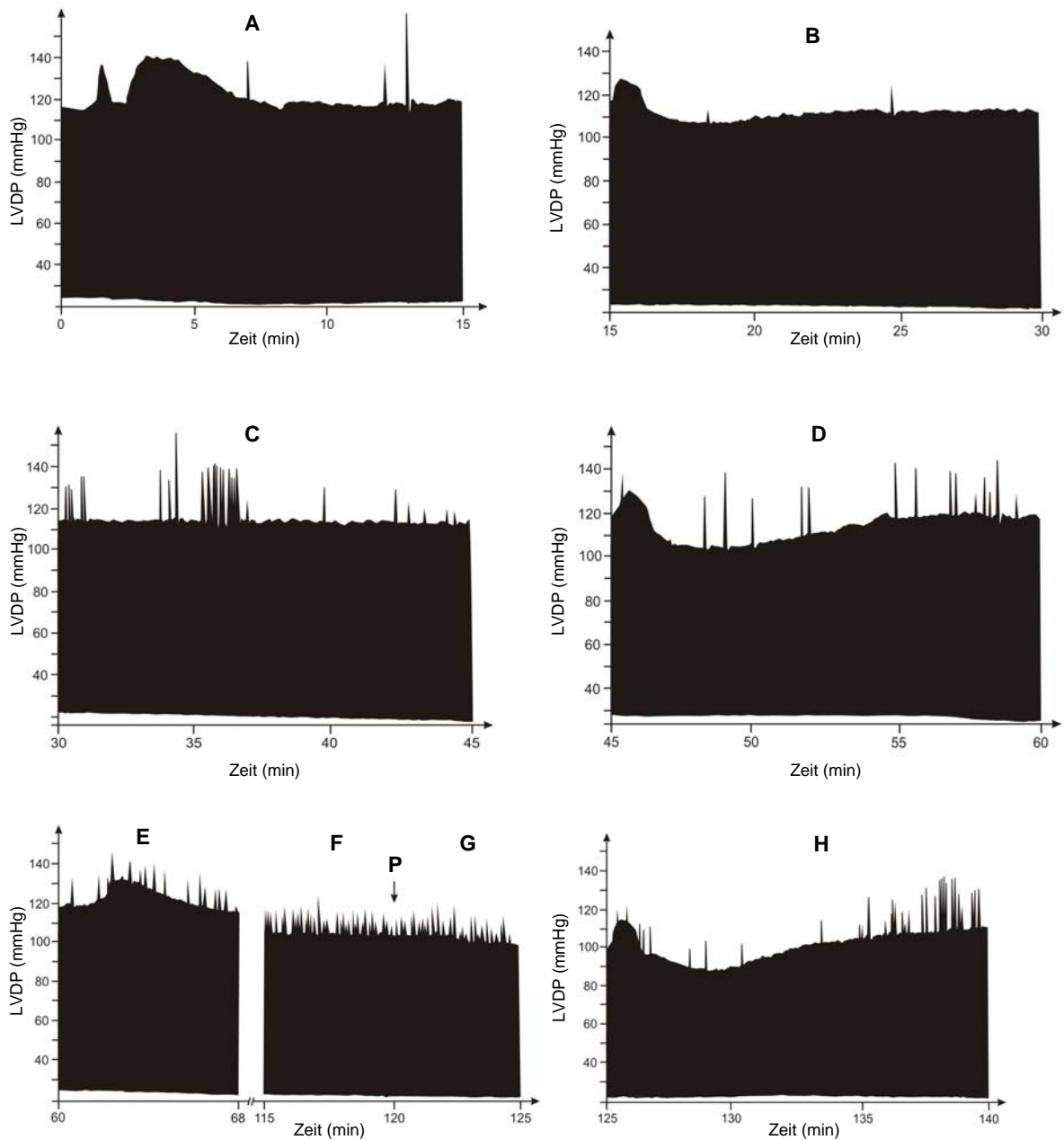


Abb. 23 Aufgezeichnete Änderungen im Verlauf des LVDP für die Kontrollen bei Beginn der $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Infusion (A), während und nach einminütiger Prazosin-Infusion (B), für die Umstellung auf $6,1 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Infusion (C) und während und nach einminütiger Prazosin-Infusion unter $6,1 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Infusion (D). Danach folgte die Umstellung auf $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ Isoprenalin-Lösung für eine Stunde (E zu Beginn, F am Ende der Infusion). Im Anschluss erneuter Wechsel zu einer $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Infusion (P) und 5 min Stabilisierungsphase (G), vor einminütiger Prazosin-Infusion (H).

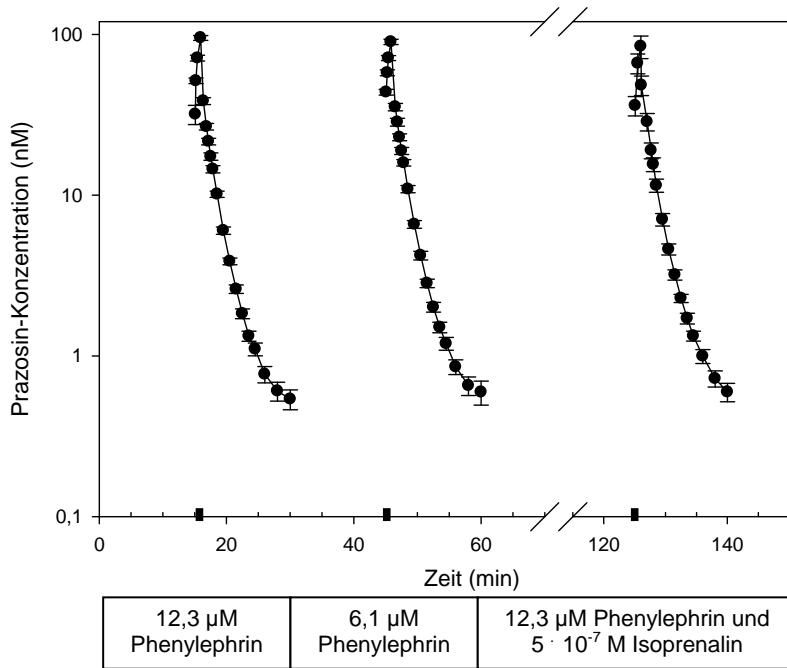


Abb. 24 Prazosin-Konzentration im Ausfluss vor und nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte.

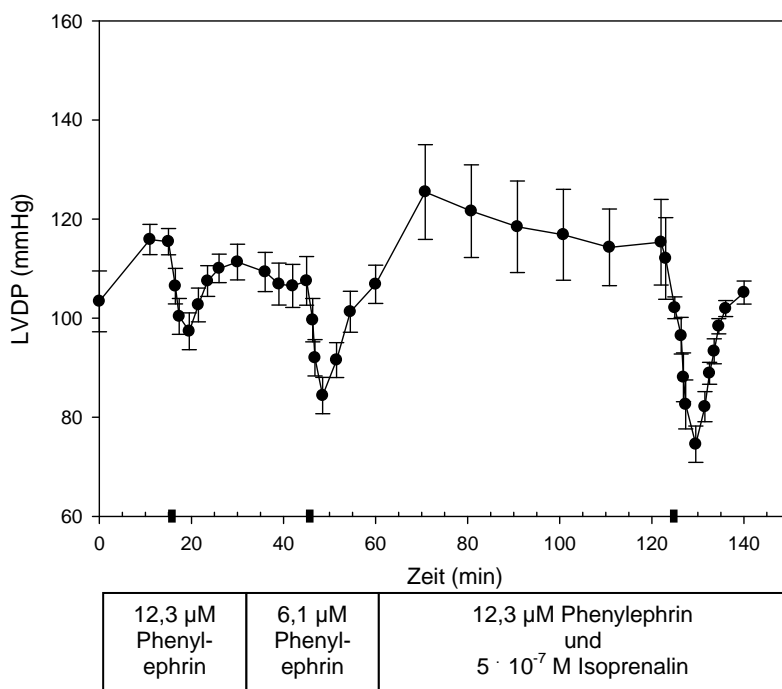


Abb. 25 Verlauf des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) vor und nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Anstieg nach Prazosin-Injektion.

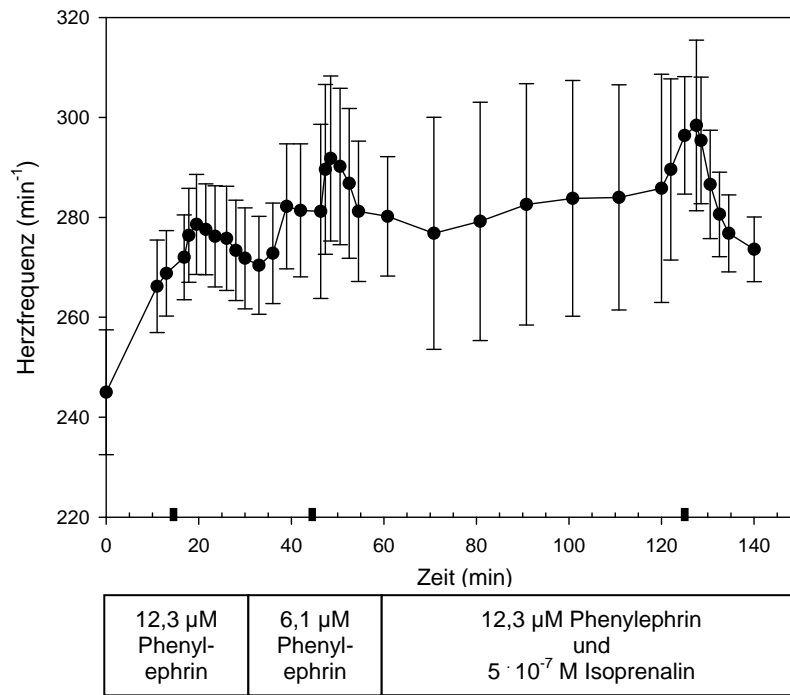


Abb. 26 Verlauf der Herzfrequenz vor und nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Abfall nach Prazosin-Injektion.

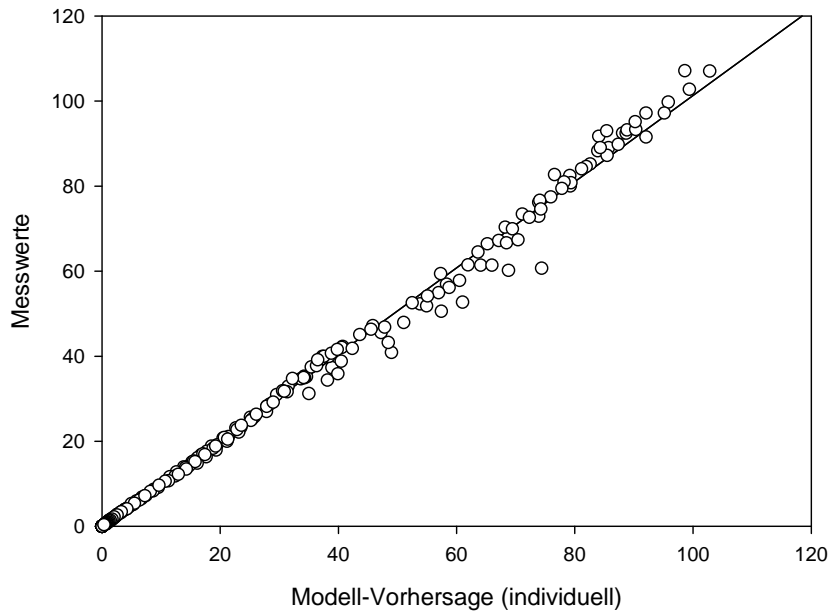


Abb. 27 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

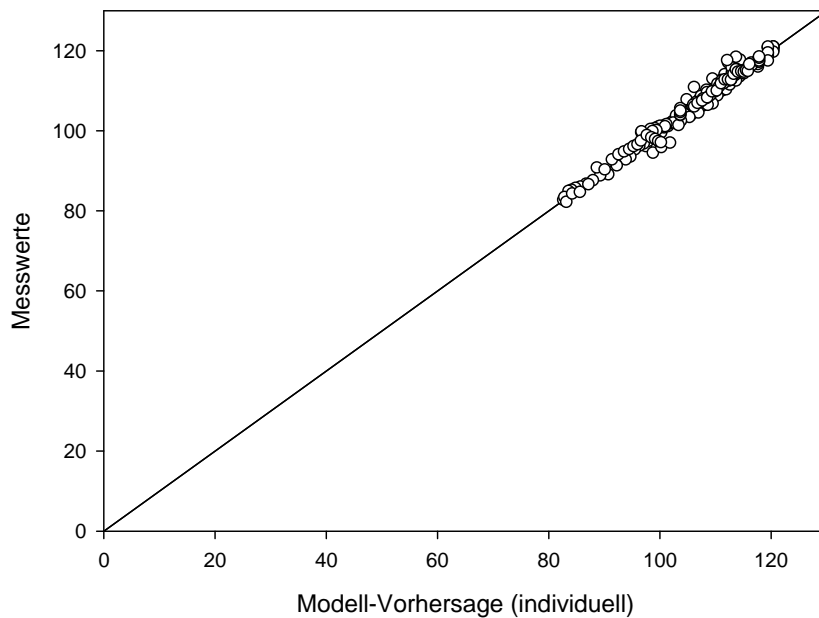


Abb. 28 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

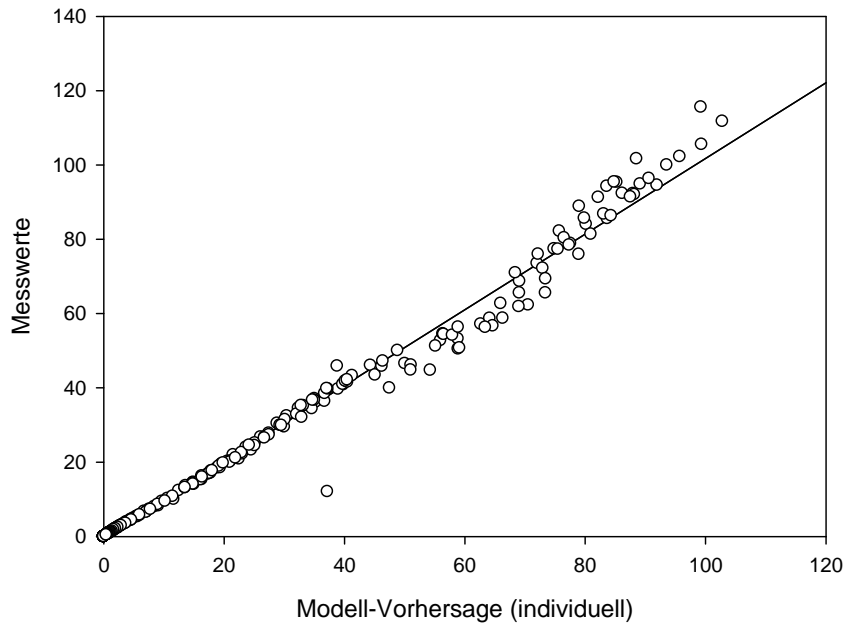


Abb. 29 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss nach einstündiger Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung sowie nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (125. Minute) in der Anwesenheit von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

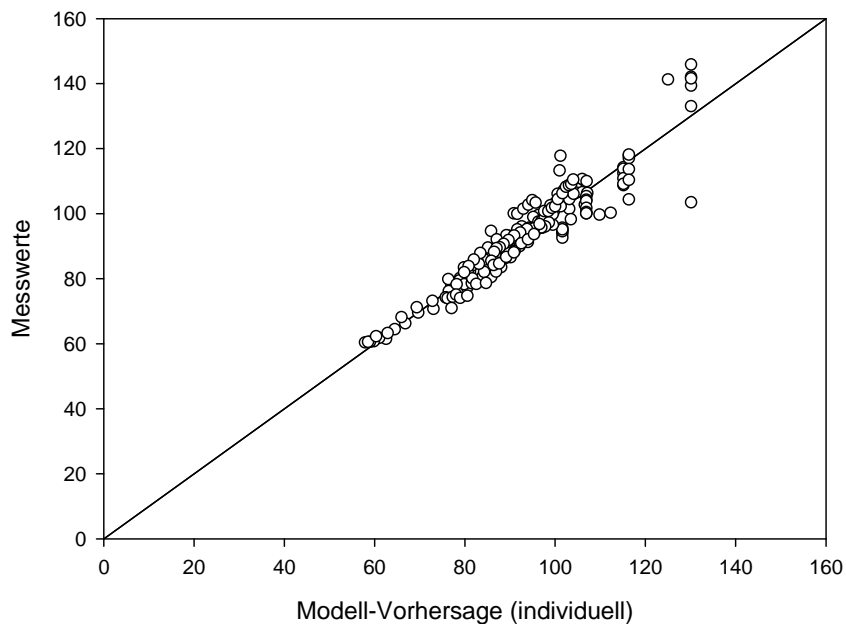


Abb. 30 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) nach einstündiger Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung sowie nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (125. Minute) in der Anwesenheit von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

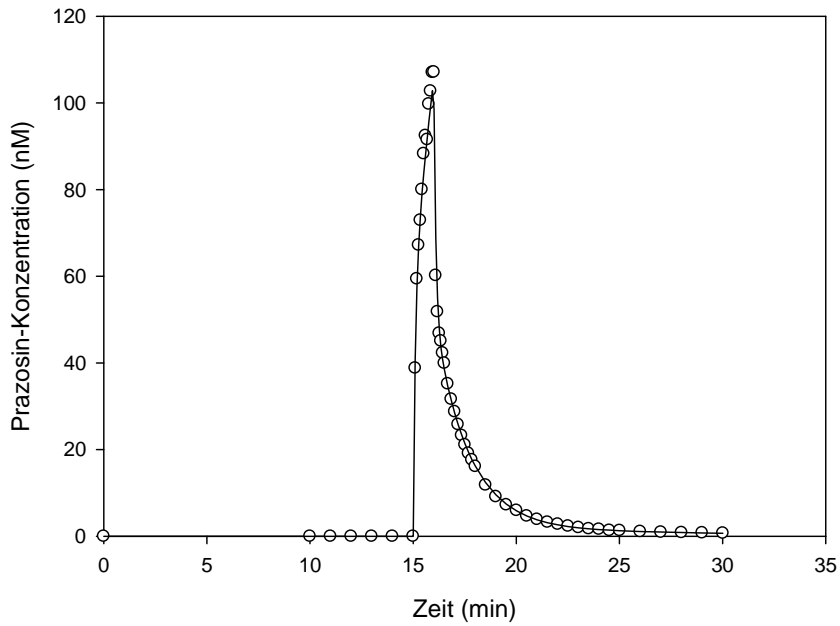


Abb. 31 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

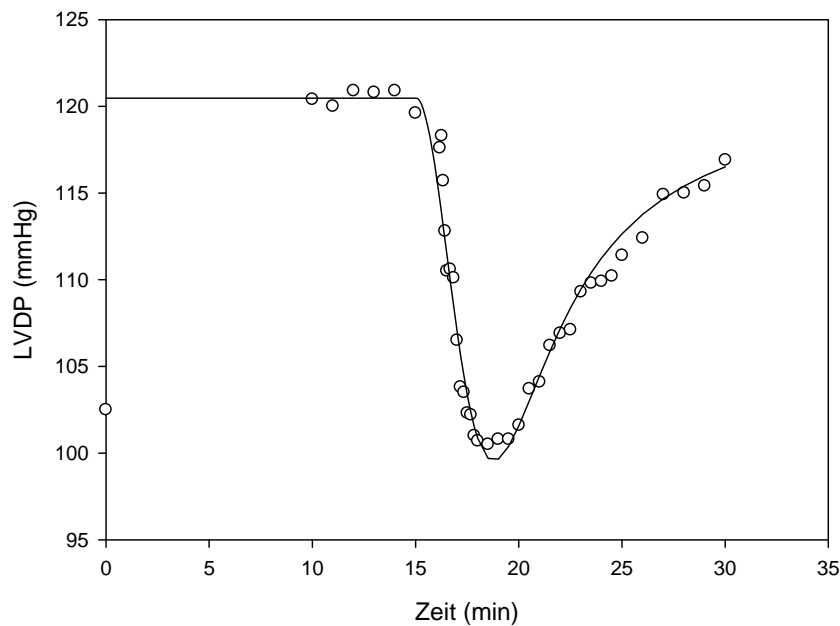


Abb. 32 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

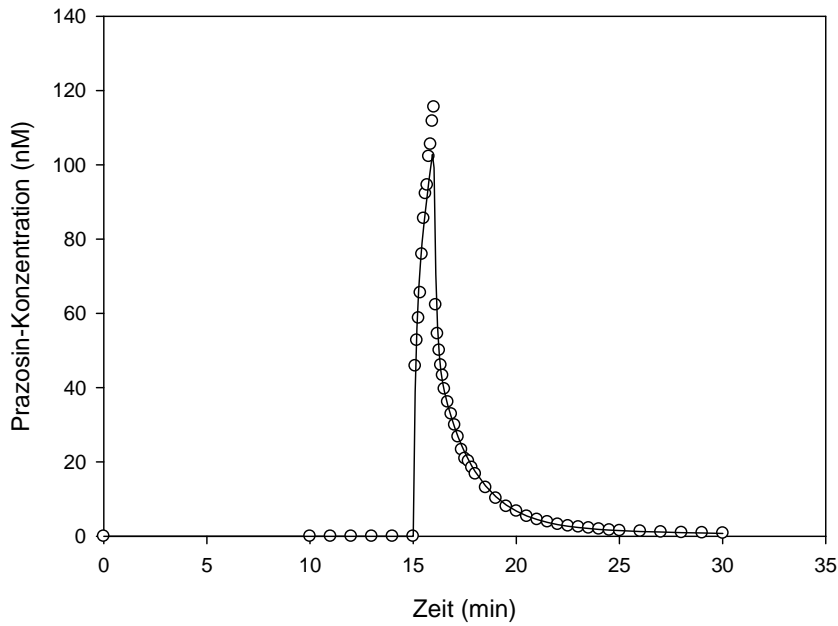


Abb. 33 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 125. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

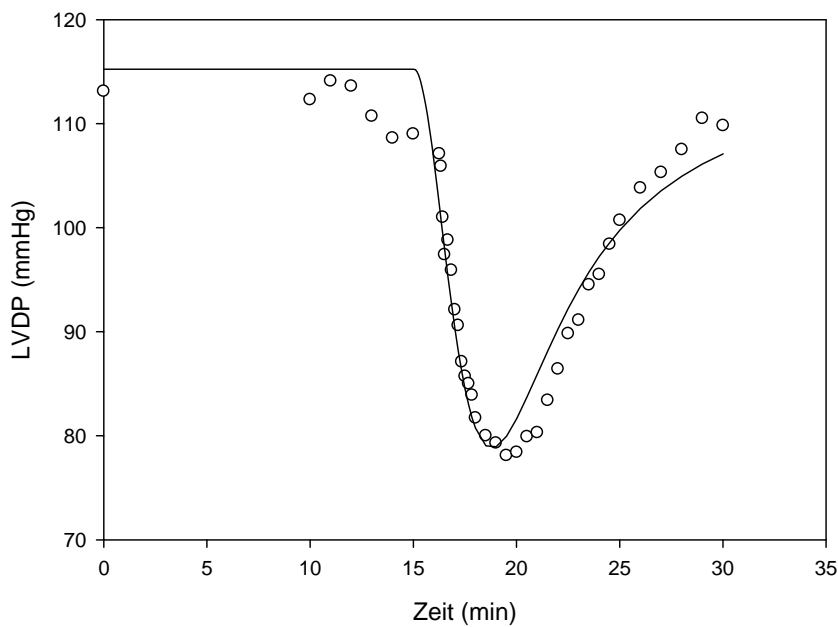


Abb. 34 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 125. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin nach einstündiger Infusion von $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

Tab. 3 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung unter Kontrollbedingungen mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 5).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,0889	5,60
k_{vi} (min ⁻¹)	182	7,33
k_{iv} (min ⁻¹)	1,64	1,32
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0401	29,8
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,147	5,52
R_{tot} (pmol)	118,8	36,5
K_A (nmol l ⁻¹)	114,8	7,06
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,24	4,75
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	97,1	5,18
K_E (pmol)	9,71	33,9
E_{base} (mmHg)	26,7	16,4
$AR(0)$ (pmol)	130	153
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	5,62	134
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	139	144

Tab. 4 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung nach einstündiger Infusion mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 5).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,0898	3,68
k_{vi} (min ⁻¹)	180	9,14
k_{iv} (min ⁻¹)	1,57 ***	2,17
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0391	1,13
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,165	12,3
R_{tot} (pmol)	122,0	31,0
K_A (nmol l ⁻¹)	118,2 **	1,20
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,27	3,15
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	126,6	43,8
K_E (pmol)	38,8	71,3
E_{base} (mmHg)	26,5	1,04
$AR(0)$ (pmol)	135	66,4
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	16,8	67,3
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	164	59,5

** p < 0,01 vs. Kontrolle (gepaarter t-Test)

*** p < 0,001 vs. Kontrolle (gepaarter t-Test)

4.3 Einfluss einer partiellen Hypoxie

Insgesamt fünf Versuche wurden zur Modellierung herangezogen. Die Ausgangswerte zu Beginn des Experiments betragen dabei für LVDP $84,9 \pm 15,14$ mmHg, für die Herzfrequenz 231 ± 14 min⁻¹ und für CVR $3,04 \pm 0,64$ mmHg min ml⁻¹.

Die Veränderungen des LVDP sind anhand Abb. 35 beispielhaft für einen Versuch der Reihe gezeigt. In Abb. 36 bis 38 sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der ermittelten Messwerte für den Prazosin-Ausfluss, LVDP sowie für die Herzfrequenz dargestellt.

Die initiale viertelstündige Infusion von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung bewirkte eine signifikante Zunahme von CVR um $74,15 \pm 55,99$ % ($p < 0,05$). Die Herzfrequenz stieg signifikant um $20,48 \pm 4,22$ % ($p < 0,001$), LVDP nahm um $26,05 \pm 22,91$ % zu ($p < 0,05$). Während der ersten einminütigen Infusion von $1,286$ nmol Prazosin (15. Minute) nahm die Herzfrequenz signifikant um $3,25 \pm 2,36$ % zu, CVR sank signifikant um $17,83 \pm 9,74$ % ($p < 0,05$). Nach der Umstellung auf das Gasgemisch (35 % Stickstoff, 60 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) und während der zweiten Prazosin-Infusion (50. Minute) blieben die Herzfrequenz und CVR unverändert.

Die Höhen der Grundlinien des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unterschieden sich signifikant mit $104,3 \pm 13,61$ mmHg direkt vor und $66,26 \pm 5,55$ mmHg nach 20-minütiger Umstellung auf das Gasgemisch ($p < 0,001$). Dies entspricht einer Abnahme um $36,14 \pm 3,28$ %. Der maximale Effekt der Prazosin-Infusionen auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Kontrolle und Behandlung mit dem Gasgemisch.

Mit Hilfe des in Kapitel 3.4 beschriebenen Modells wurden die ermittelten Daten mittels MLEM gefittet. Daraus ergaben sich die in Tab. 5 dargestellten Werte für die Parameter unter Kontrollbedingungen und in Tab. 6 nach Umstellung auf das Gasgemisch für die partielle Hypoxie. Für Φ_{max} zeigte sich eine signifikante Abnahme um $51,2 \pm 6,53$ % ($p < 0,001$).

In Abb. 39 sind die ermittelten Messwerte und die Modell-Vorhersage für die Prazosin-Konzentration im Ausfluss und in Abb. 40 für die Werte von LVDP für die Kontrollen dargestellt. In Abb. 41 und Abb. 42 folgt die gleiche Darstellung für die Prazosin-Infusion nach der Umstellung auf das Gasgemisch.

Abb. 43 zeigt beispielhaft den Fit eines Kontroll-Versuches für den Verlauf der Prazosin-Konzentration im Ausfluss und Abb. 44 für den Verlauf von LVDP. In Abb. 45 und 46 folgt die gleiche Darstellung unter partieller Hypoxie.

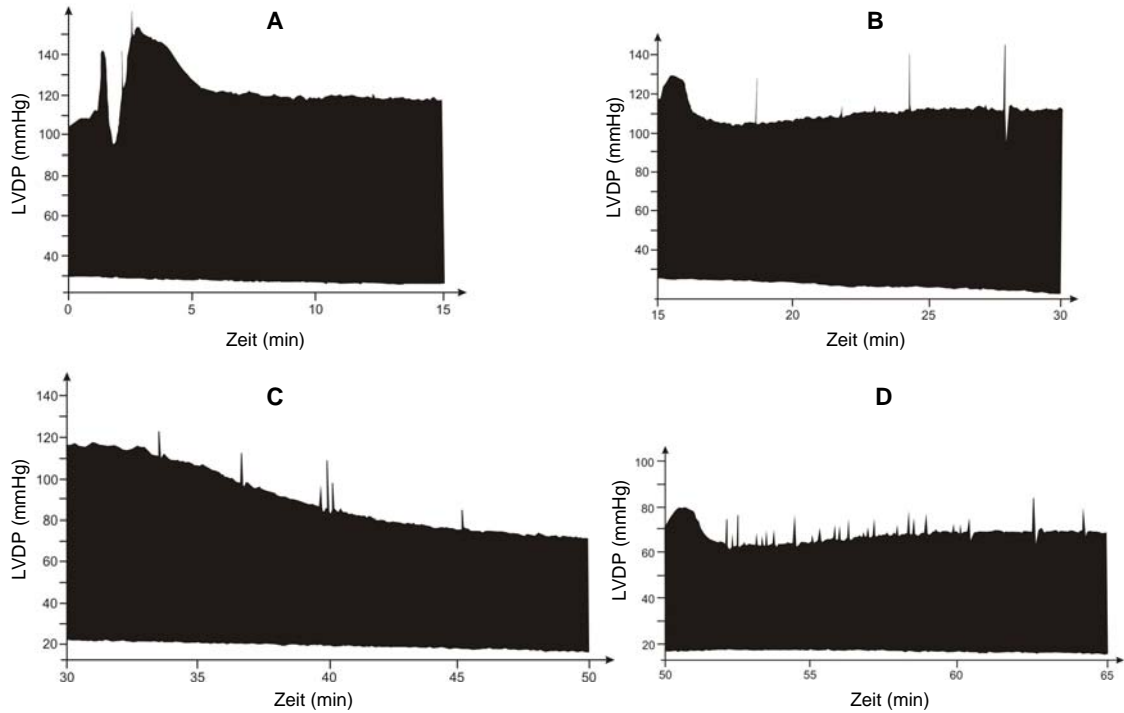


Abb. 35 Aufgezeichnete Änderungen im Verlauf des LVDP für die Kontrolle bei Beginn der 12,3 μM Phenylephrin-Infusion (A), während und nach einminütiger Prazosin-Infusion (B), für die Umstellung auf partielle Hypoxie (C) und während und nach einminütiger Prazosin-Infusion unter partieller Hypoxie (D).

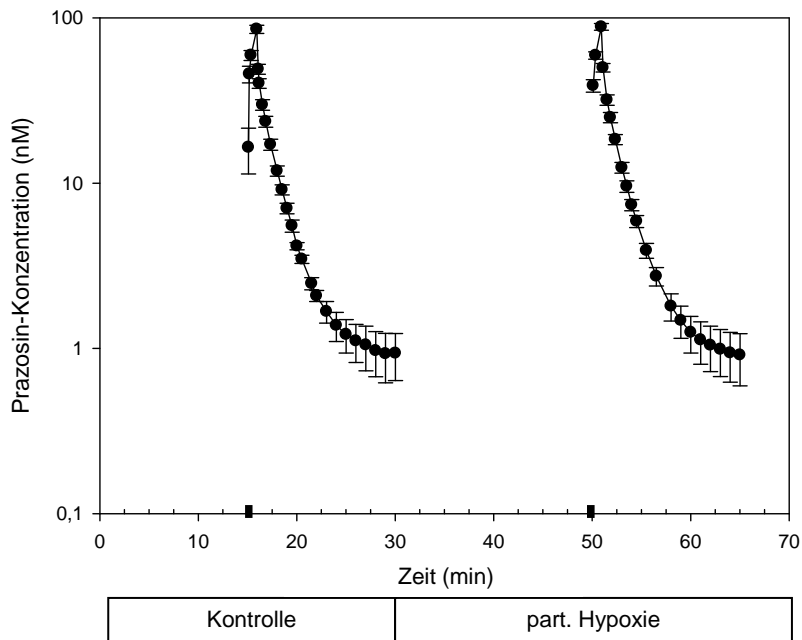


Abb. 36 Prazosin-Konzentration im Ausfluss unter normoxischen Kontrollbedingungen und unter partieller Hypoxie jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte.

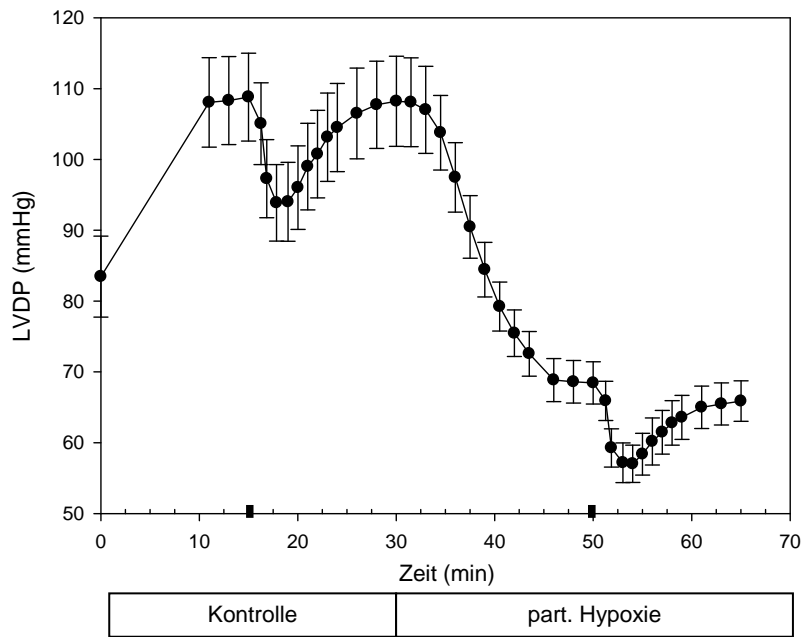


Abb. 37 Verlauf des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unter Kontrollbedingungen und unter partieller Hypoxie jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Anstieg nach Prazosin-Injektion.

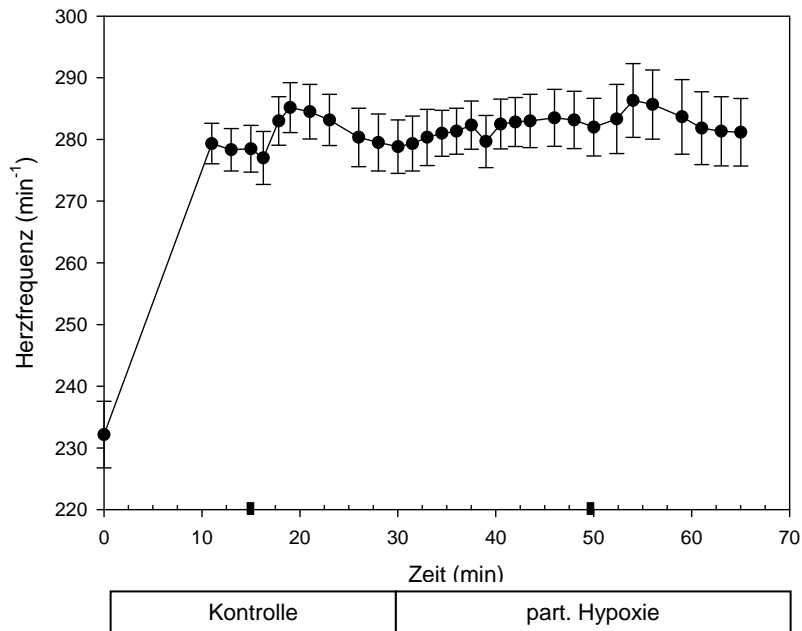


Abb. 38 Verlauf der Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen und unter partieller Hypoxie jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Abfall nach Prazosin-Injektion.

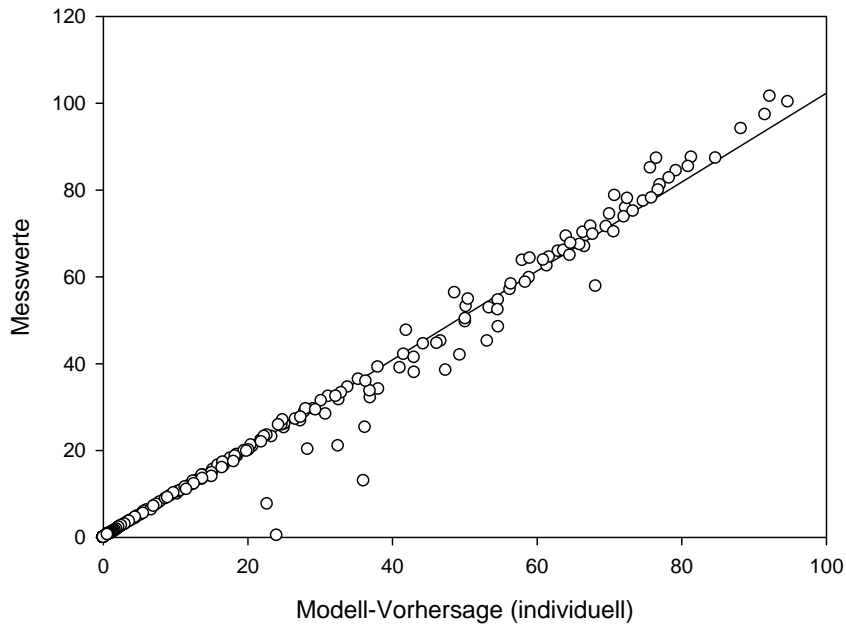


Abb. 39 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

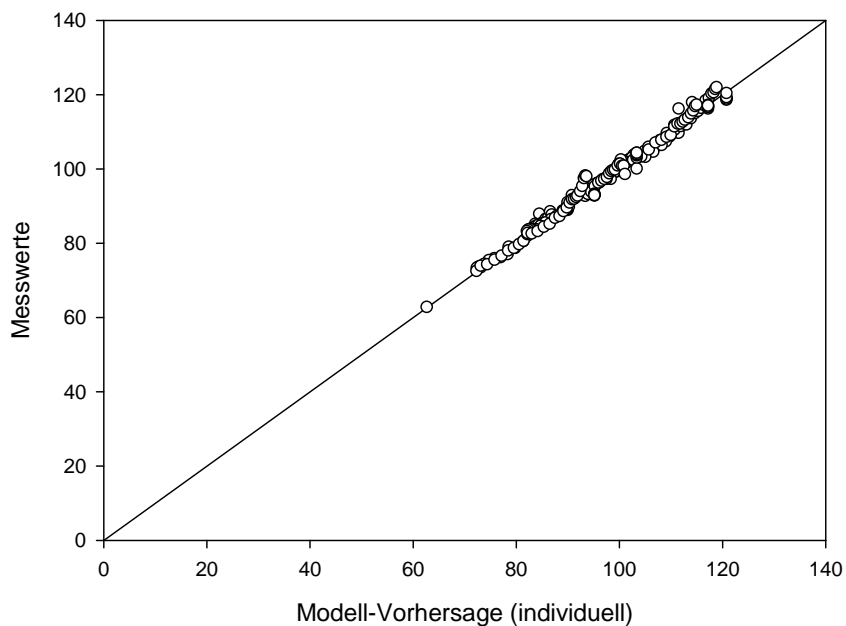


Abb. 40 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) bei den Kontrollen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

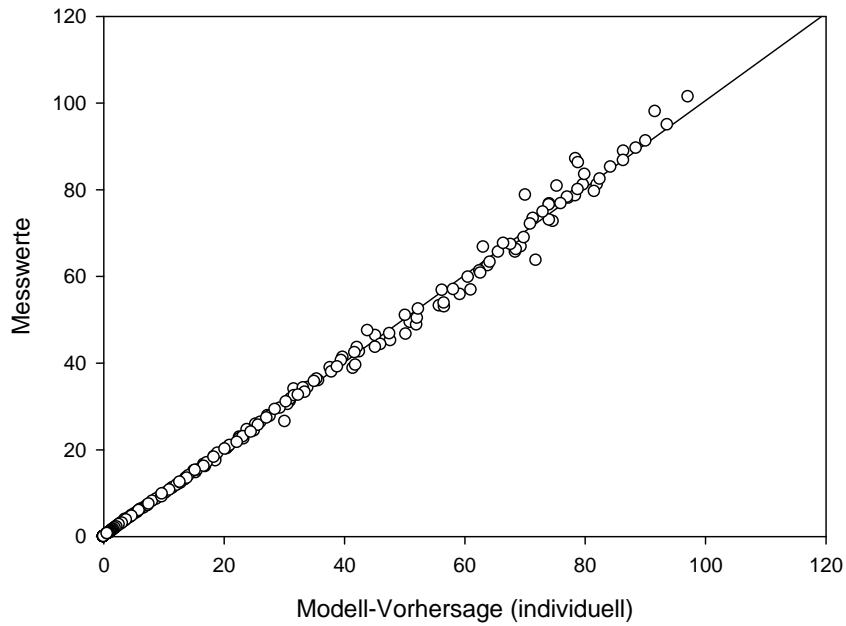


Abb. 41 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss unter partieller Hypoxie nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (50. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

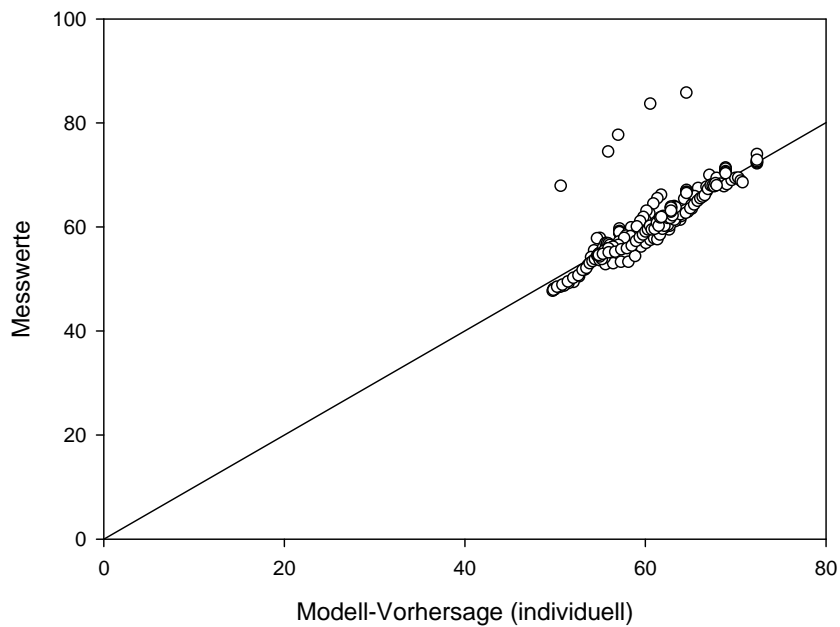


Abb. 42 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) unter partieller Hypoxie nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (50. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

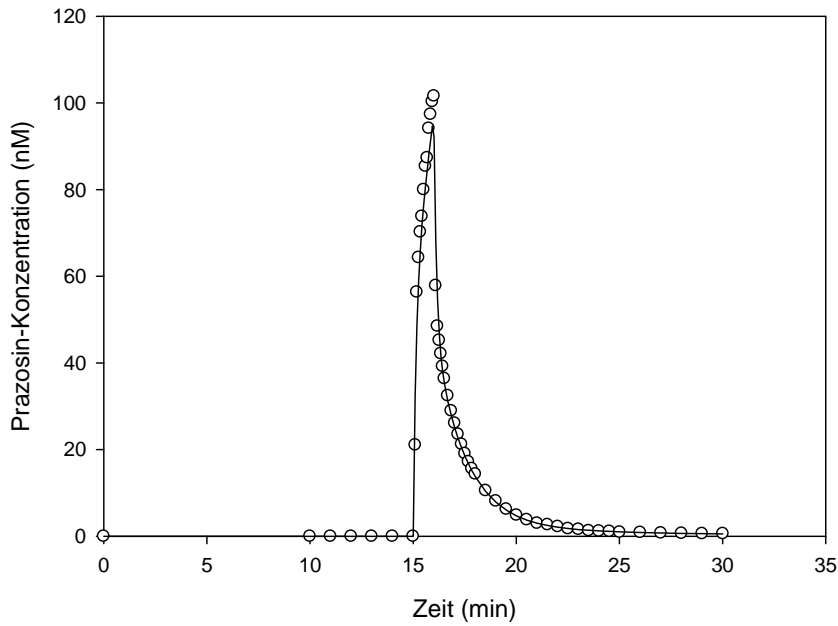


Abb. 43 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μM Phenylephrin unter Kontrollbedingungen. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

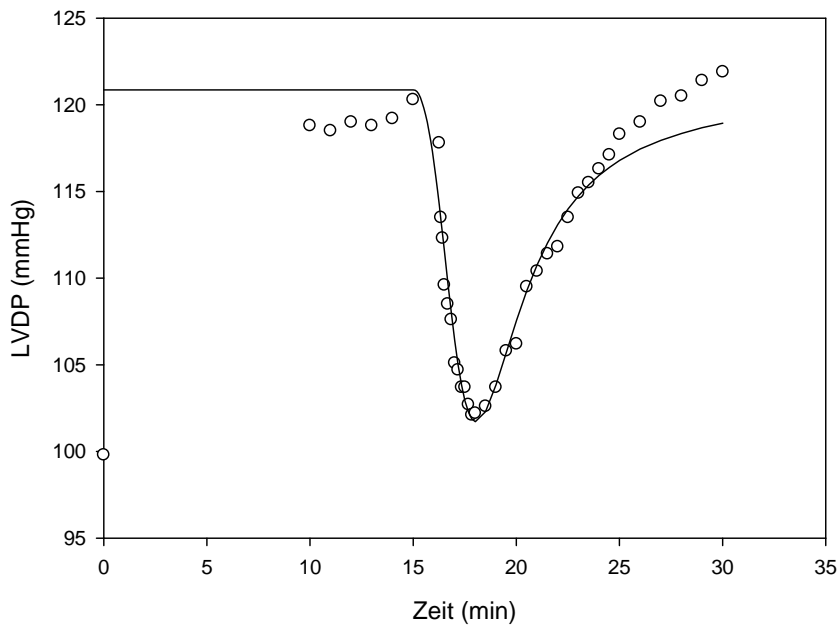


Abb. 44 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μM Phenylephrin unter Kontrollbedingungen. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

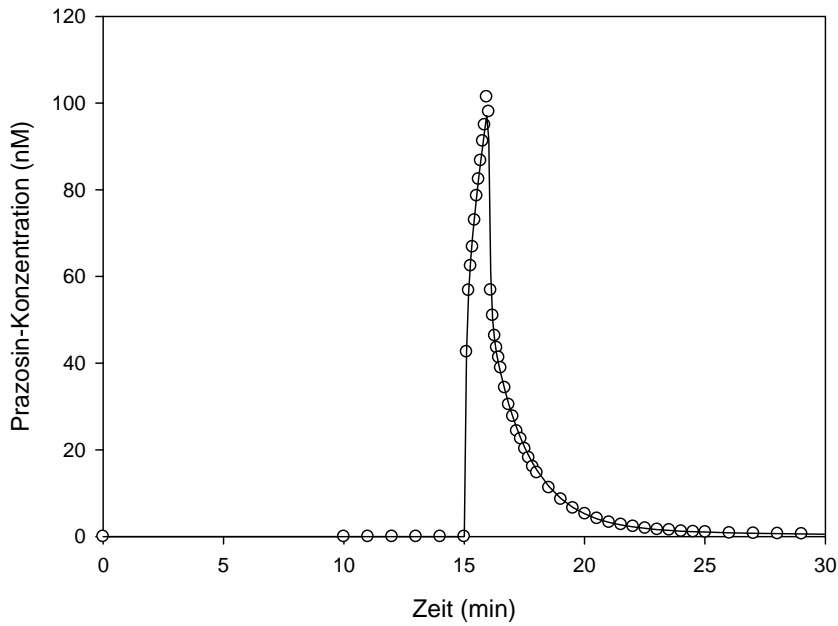


Abb. 45 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 50. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin unter partieller Hypoxie. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

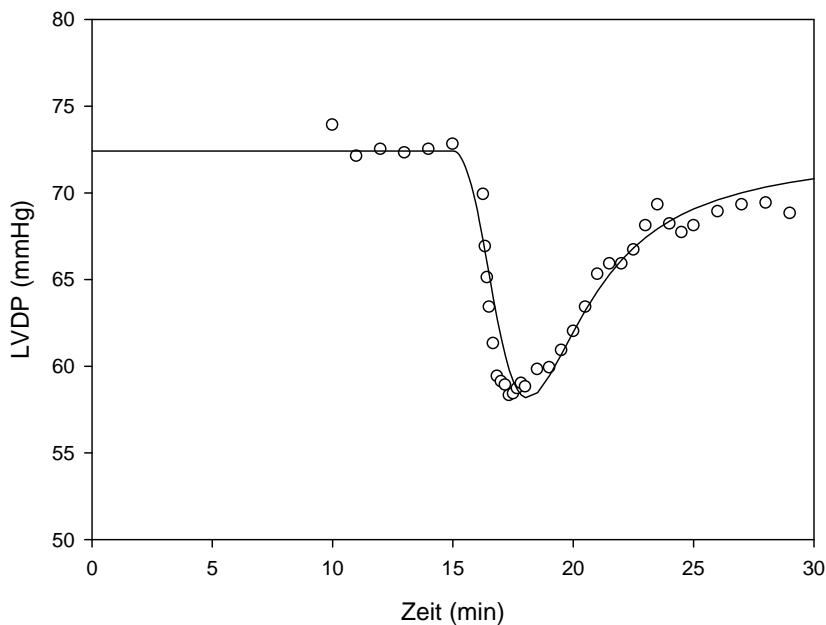


Abb. 46 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute – entspricht der 50. Minute im Gesamtversuchsverlauf) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin unter partieller Hypoxie. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

Tab. 5 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung unter Kontrollbedingungen mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 5).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,102	14,1
k_{vi} (min ⁻¹)	169	10,9
k_{iv} (min ⁻¹)	1,57	10,2
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0289	12,7
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,157	22,2
R_{tot} (pmol)	150,1	15,0
K_A (nmol l ⁻¹)	117,4	7,81
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,88	8,28
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	82,5	6,29
K_E (pmol)	8,19	29,3
E_{base} (mmHg)	27,2	42,2
$AR(0)$ (pmol)	22,8	71,5
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	16,5	58,4
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	28,9	57,8

Tab. 6 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung unter partieller Hypoxie mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 5).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,113	22,3
k_{vi} (min ⁻¹)	164	6,33
k_{iv} (min ⁻¹)	1,80	18,5
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0283	0,882
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,156	0,992
R_{tot} (pmol)	135,8	13,8
K_A (nmol l ⁻¹)	120,1	0,981
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,90	0,954
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	40,3 ***	13,9
K_E (pmol)	8,11	14,2
E_{base} (mmHg)	27,2	1,00
$AR(0)$ (pmol)	27,2	17,0
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	7,58	17,5
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	34,0	16,4

*** p < 0,001 vs. Kontrolle (gepaarter t-Test)

4.4 Einfluss einer Myokardhypertrophie

Insgesamt vier Versuche wurden zur Modellierung herangezogen. Da die Versuchsreihe als Pilotstudie ohne Durchführung einer eigenen Kontrollreihe geplant wurde, wurden hier die Kontrollreihen der vorangehenden Versuchsreihe mit partieller Hypoxie ($n = 5$) als Kontrollen zu den hypertrophierten Herzen herangezogen.

Das absolute Herzgewicht bei den mit intraperitonealen Isoprenalin-Injektionen (5 mg/kg) vorbehandelten Ratten betrug im Mittel $1,77 \pm 0,10$ g und war damit signifikant um 11,71 % gegenüber den Kontrollen mit $1,58 \pm 0,08$ g erhöht ($p < 0,05$). Ebenso zeigte sich das relative Herzgewicht als Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht signifikant erhöht, mit $0,66 \pm 0,06$ % vs. $0,55 \pm 0,03$ % ($p < 0,05$). Tab. 7 stellt sowohl das Körpergewicht als auch das dazugehörige Herzgewicht für die vorbehandelten Ratten, Tab. 8 für die Kontrollen dar. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht der Ratten, mit $268,0 \pm 9,6$ g für die vorbehandelten Ratten und $285,6 \pm 6,7$ g für die Kontrollen.

Tab. 7 Aufstellung über Körper- und Herzgewicht der vorbehandelten Versuchstiere.

Versuchsnummer	Körpergewicht (g)	absolutes Herzgewicht (g)	relatives Herzgewicht (%)
1	257	1,82	0,71
2	265	1,88	0,71
3	270	1,71	0,63
4	280	1,65	0,59

Tab. 8 Aufstellung über Körper- und Herzgewicht der Kontrollen.

Versuchsnummer	Körpergewicht (g)	absolutes Herzgewicht (g)	relatives Herzgewicht (%)
1	274	1,62	0,59
2	287	1,65	0,57
3	288	1,55	0,54
4	288	1,62	0,56
5	291	1,46	0,50

Die Ausgangswerte zu Beginn des Experiments betragen für LVDP $104,55 \pm 7,88$ mmHg, für die Herzfrequenz 240 ± 9 min^{-1} und für CVR $3,94 \pm 0,9$ $\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Grundwerten der Kontrollen. Die Veränderungen des LVDP sind anhand Abb. 47 beispielhaft für einen Versuch der Reihe gezeigt. In Abb. 48 bis 50 sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der ermittelten Messwerte für den Prazosin-Ausfluss, LVDP sowie für die Herzfrequenz dargestellt. Abb. 51 und 52 stellen vergleichend den Verlauf von LVDP sowie der Herzfrequenz der Kontrollen den der hypertrophierten Herzen gegenüber.

Die initiale viertelstündige Infusion von $12,3$ μM Phenylephrin-Lösung bewirkte eine signifikante Zunahme von CVR um $52,08 \pm 18,96$ % ($p < 0,05$). Die Herzfrequenz stieg

signifikant um $18,13 \pm 4,26 \%$ ($p < 0,01$), LVDP nahm um 11 % zu. Während der ersten einminütigen Infusion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) veränderte sich die Herzfrequenz nicht, CVR sank signifikant um $18,13 \pm 8,79 \%$ ($p < 0,05$). Während der zweiten Prazosin-Infusion (45. Minute) stieg die Herzfrequenz signifikant um $5,15 \pm 2,17 \%$ ($p < 0,05$), CVR blieb unverändert. Der maximale Effekt der Prazosin-Infusionen auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) – ausgedrückt als prozentualer Anteil des maximalen Abfalls vom Ausgangswert des LVDP – unterscheidet sich signifikant mit $17,68 \pm 3,76 \%$ nach viertelstündiger Infusion von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung und $26,79 \pm 3,11 \%$ nach viertelstündiger Infusion von $6,1 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung ($p < 0,05$). Verglichen mit den Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen für LVDP, die Herzfrequenz sowie CVR nach der ersten viertelstündigen Infusion von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung oder der nachfolgenden Infusion von 1,286 nmol Prazosin.

Die ermittelten Daten wurden mittels MLEM gefittet. Daraus ergaben sich die in Tab. 10 dargestellten Werte für die Parameter der Herzen mit Myokardhypertrophie. In Tab. 9 sind die Parameter der Kontrollen gegenübergestellt. Signifikante Änderungen ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollen bei k_{iv} , R_{tot} (bezogen auf das Herzgewicht) und Φ_{max} . Die relative Anzahl an Rezeptoren betrug für die Kontrollen $94,97 \pm 14,43 \text{ pmol g}^{-1}$ und für die hypertrophierten Herzen $74,6 \pm 9,45 \text{ pmol g}^{-1}$, dies entspricht einer signifikanten Reduktion um 21,45 % ($p < 0,05$). Für Φ_{max} wurde bei den Kontrollen ein Wert von $82,49 \pm 5,19 \text{ mmHg}$ ermittelt, bei den hypertrophierten Herzen dagegen von $92,67 \pm 7,20 \text{ mmHg}$, was einer signifikanten Zunahme um 12,35 % entspricht ($p < 0,05$).

In Abb. 53 sind die ermittelten Messwerte und die Modell-Vorhersage für die Prazosin-Konzentration im Ausfluss und in Abb. 54 für die Werte von LVDP für die hypertrophierten Herzen dargestellt. Abb. 55 zeigt beispielhaft den Fit für den Verlauf der Prazosin-Konzentration im Ausfluss und Abb. 56 für den Verlauf von LVDP.

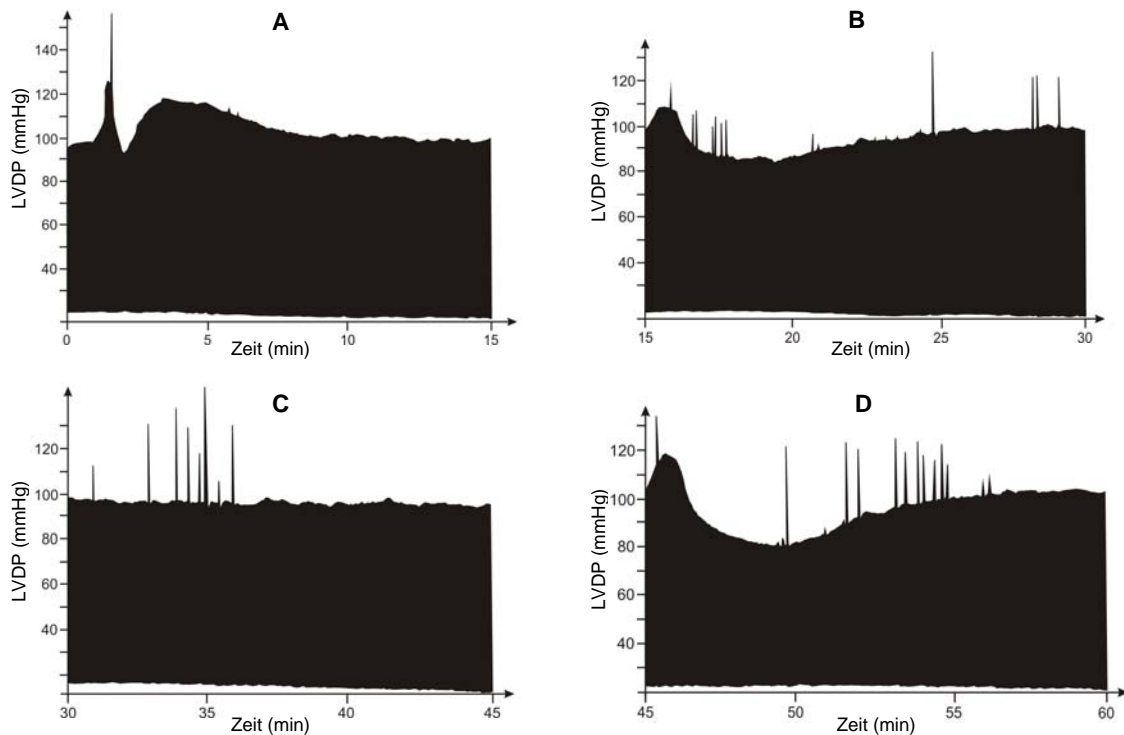


Abb. 47 Aufgezeichnete Änderungen im Verlauf des LVDP für die Herzen mit Myokardhypertrophie bei Beginn der 12,3 μM Phenylephrin-Infusion (A), während und nach einminütiger Prazosin-Infusion (B), für die Umstellung auf 6,1 μM Phenylephrin-Infusion (C) und während und nach einminütiger Prazosin-Infusion unter 6,1 μM Phenylephrin-Infusion (D).

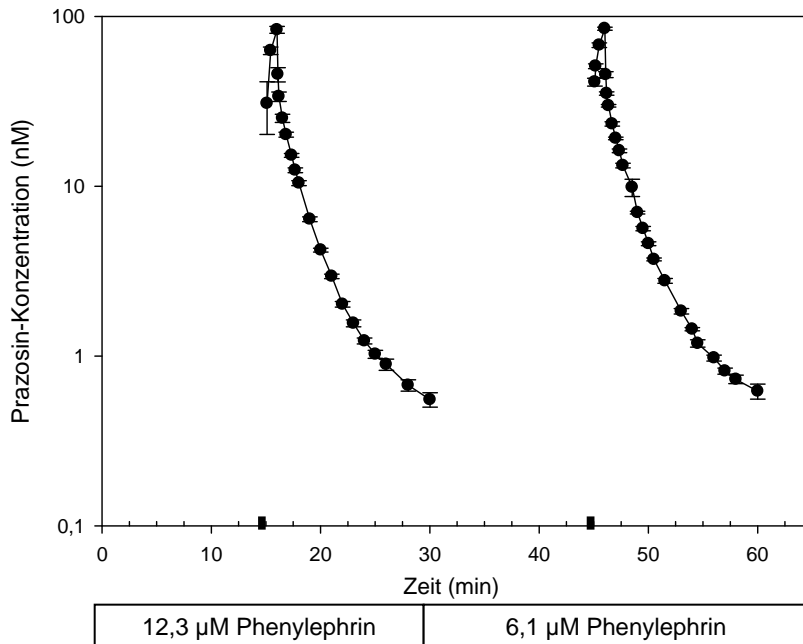


Abb. 48 Prazosin-Konzentration im Ausfluss unter Infusion von 12,3 μM bzw. 6,1 μM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 4$). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte.

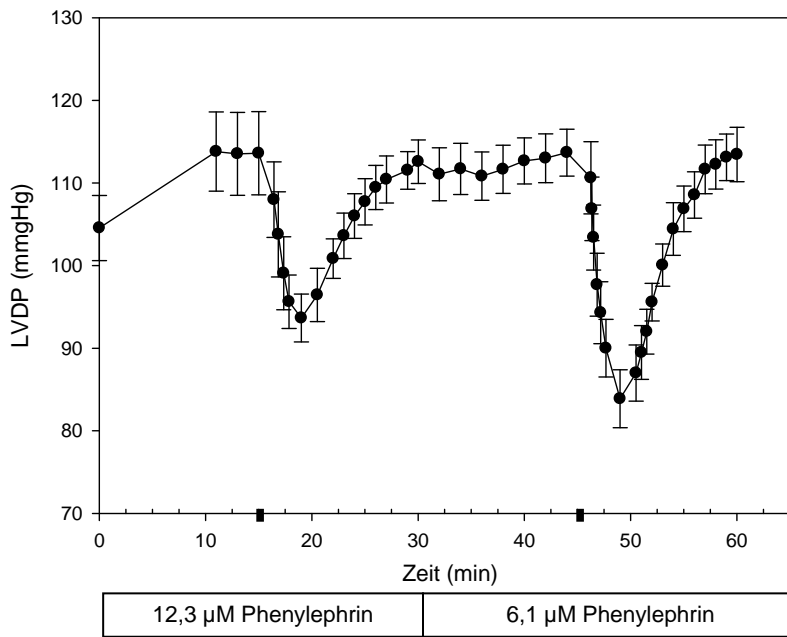


Abb. 49 Verlauf des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unter Infusion von 12,3 µM bzw. 6,1 µM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Anstieg nach Prazosin-Injektion.

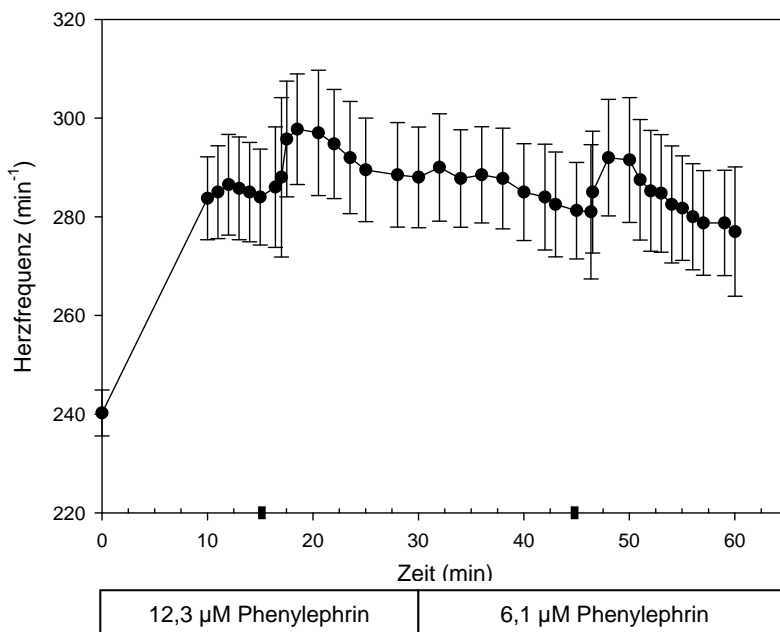


Abb. 50 Verlauf der Herzfrequenz unter Infusion von 12,3 µM bzw. 6,1 µM Phenylephrin-Lösung jeweils nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). Nicht dargestellt sind sich überlappende Punkte sowie der initiale Abfall nach Prazosin-Injektion.

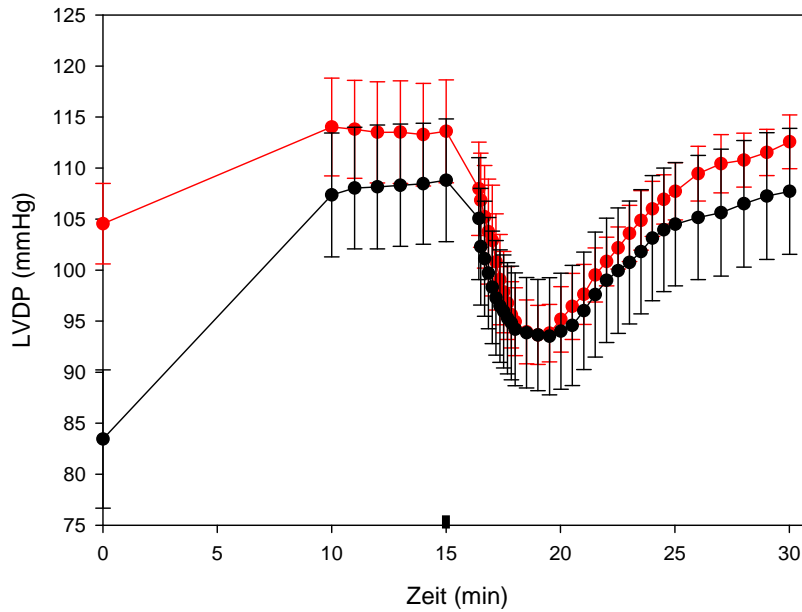


Abb. 51 Verlauf des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) unter Infusion von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung nach Injektion von $1,286 \text{ nmol}$ Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der hypertrophierten Herzen ($n = 4$) in Rot und der Kontrollen ($n = 5$) in Schwarz. Nicht dargestellt ist der initiale Anstieg nach Prazosin-Injektion.

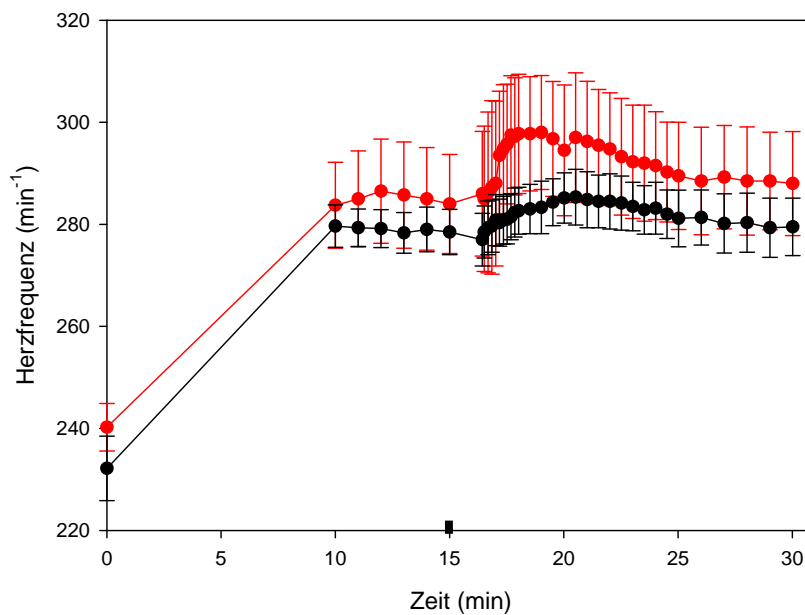


Abb. 52 Verlauf der Herzfrequenz unter Infusion von $12,3 \mu\text{M}$ Phenylephrin-Lösung nach Injektion von $1,286 \text{ nmol}$ Prazosin (■). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der hypertrophierten Herzen ($n = 4$) in Rot und der Kontrollen ($n = 5$) in Schwarz. Nicht dargestellt ist der initiale Abfall nach Prazosin-Injektion.

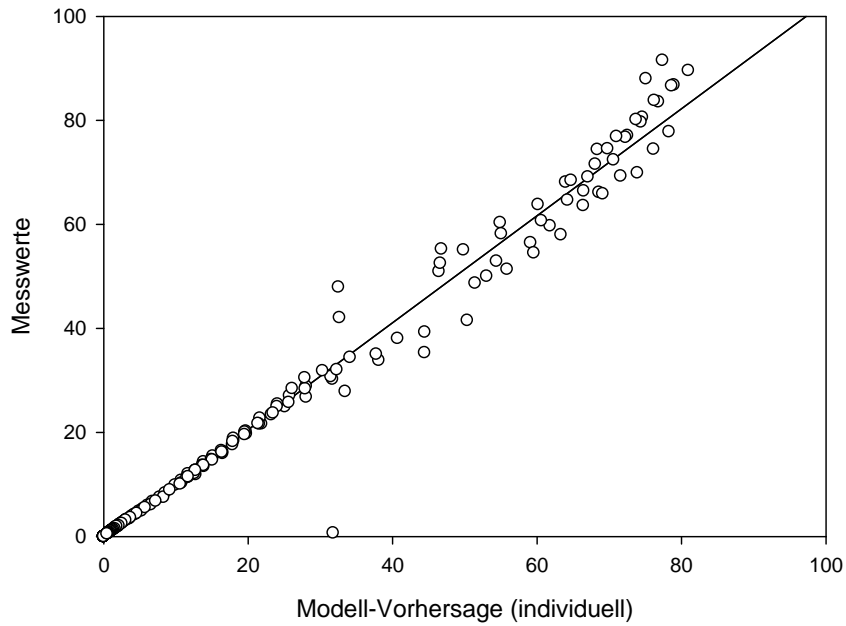


Abb. 53 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration (nM) im Ausfluss bei den hypertrophierten Herzen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

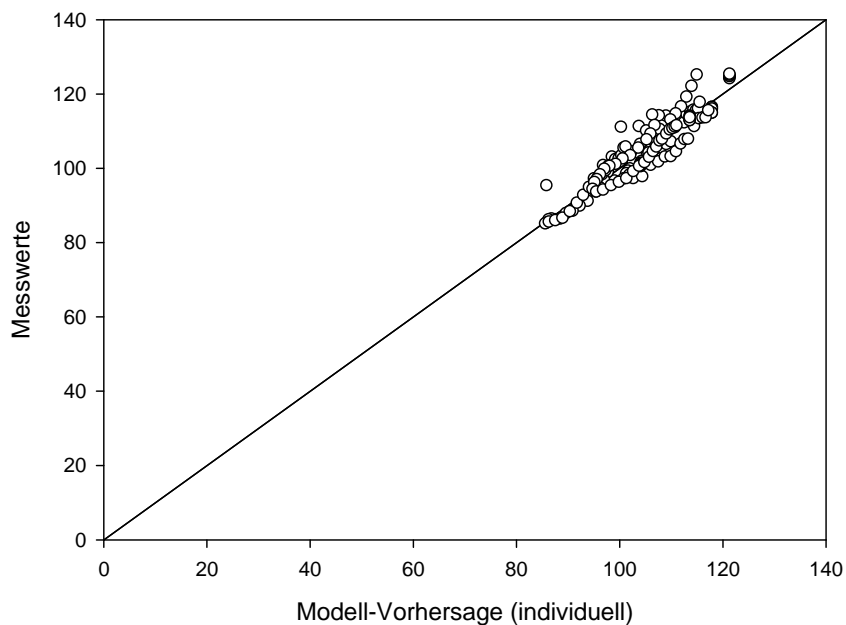


Abb. 54 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP (mmHg) bei den hypertrophierten Herzen nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die individuelle Modell-Vorhersage dar.

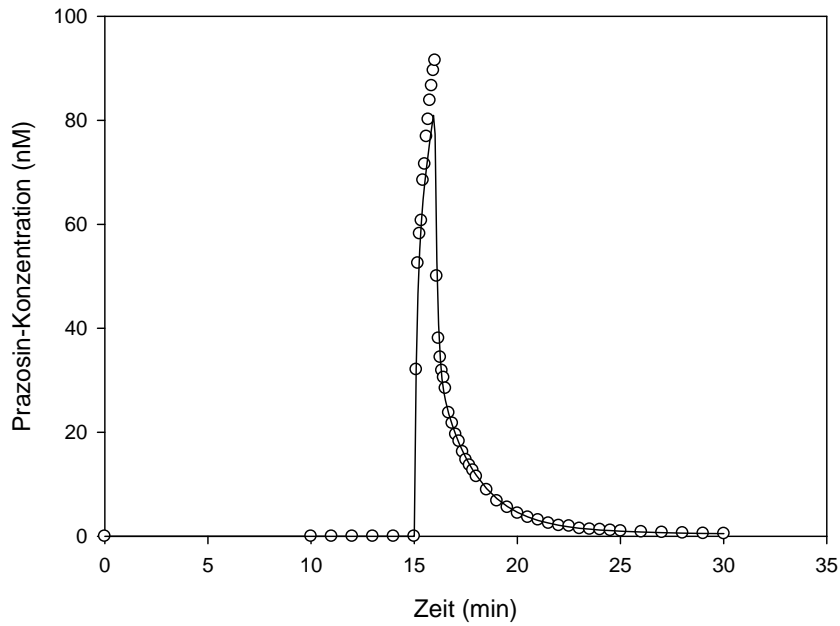


Abb. 55 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf der Prazosin-Konzentration nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin beim hypertrophierten Herzen. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

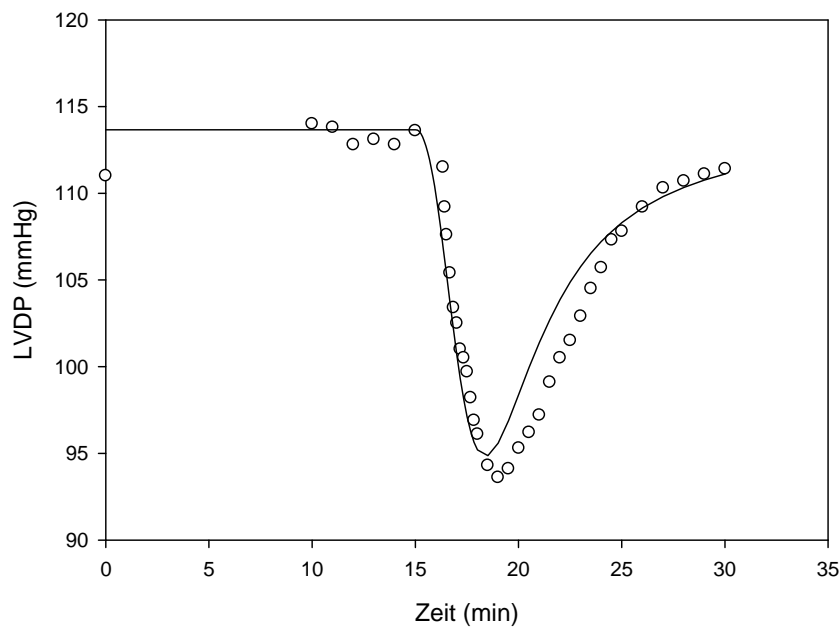


Abb. 56 Güte der Modell-Anpassung für den Verlauf von LVDP nach Injektion von 1,286 nmol Prazosin (15. Minute) in der Anwesenheit von 12,3 μ M Phenylephrin beim hypertrophierten Herzen. Die Kreise (o) stellen die Messwerte, die Linie (-) die Modell-Vorhersage dar.

Tab. 9 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung unter Kontrollbedingungen mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 5).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,102	14,1
k_{vi} (min ⁻¹)	169	10,9
k_{iv} (min ⁻¹)	1,57	10,2
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0289	12,7
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,157	22,2
R_{tot} (pmol)	150,1	15,0
R_{tot}/m (pmol g ⁻¹)	94,97	15,19
K_A (nmol l ⁻¹)	117,4	7,81
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,88	8,28
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	82,5	6,29
K_E (pmol)	8,19	29,3
E_{base} (mmHg)	27,2	42,2
$AR(0)$ (pmol)	22,8	71,5
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	16,5	58,4
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	28,9	57,8

Tab. 10 Durch Fitten der Daten des Prazosin-Ausflusses und der inotropen Wirkung bei den hypertrophierten Herzen mit MLEM ermittelte Mittelwerte und interindividuelle Variabilität (relative Standardabweichung) der Parameter für Distribution, Bindung und Wirkung (n = 4).

Parameter	Mittelwert	Interindividuelle Variabilität (%)
Distribution		
V_{vas} (ml)	0,0955	2,66
k_{vi} (min ⁻¹)	159	2,49
k_{iv} (min ⁻¹)	1,27 **	3,11
Bindung		
K_B (nmol l ⁻¹)	0,0284	0,919
$k_{off,B}$ (min ⁻¹)	0,154	1,77
R_{tot} (pmol)	132,0	13,3
R_{tot}/m (pmol g ⁻¹)	74,6 *	12,67
K_A (nmol l ⁻¹)	119,3	0,965
$k_{off,A}$ (min ⁻¹)	1,86	1,20
Wirkung		
Φ_{max} (mmHg)	92,7 *	7,76
K_E (pmol)	8,49	29,5
E_{base} (mmHg)	27,2	1,03
$AR(0)$ (pmol)	28,0	16,5
$\Delta E_{max,PE}$ (mmHg)	17,8	22,1
$EC_{50,PE}$ (nmol l ⁻¹)	35,3	16,7

* p < 0,05 vs. Kontrolle (ungepaarter t-Test)

** p < 0,01 vs. Kontrolle (ungepaarter t-Test)

5. Diskussion

5.1 Kontrollen der Versuchsreihen

Die Modellvorhersagen zeigen für alle Versuchsreihen eine gute Übereinstimmung mit den ermittelten Messwerten. Alle Messwerte (o), die auf der Identitätslinie (-) liegen, sind mit der Modellvorhersage identisch. Werte (o) oberhalb der Linie sind größer, Werte unterhalb der Linie sind kleiner als der Vorhersagewert (vgl. Abb. 15-22, 27-34, 39-46, 53-56).

Die Verwendung von zwei verschiedenen Phenylephrin-Konzentrationen in den Kontrollen der einstündigen Behandlung mit Phenylephrin bzw. Isoprenalin sowie der Hypertrophie-Herzen diente der Ermittlung größerer Datenmengen zur Verbesserung der Schätzgenauigkeit für die Kontrollen. Für die Versuchsreihe unter partieller Hypoxie bot sich diese Vorgehensweise aufgrund des Versuchsaufbaus nicht an.

Die geschätzten Parameter für die Kontrollen stimmen gut mit bereits publizierten Werten überein. So beträgt die transkapilläre Uptake-Clearance CL_{vi} für Prazosin in den Kontrollen $14,19 \pm 0,90 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $16,18 \pm 1,67 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ bzw. $17,42 \pm 3,29 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Im Vergleich dazu wurde von Sermsappasuk und Weiss (2009) ein Wert von $18 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ für die Prazosin-Clearance ermittelt.

Die Dissoziationskonstante von Prazosin K_B beträgt für die Kontrollen $0,0346 \pm 0,0017 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,0401 \pm 0,0119 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $0,0289 \pm 0,0037 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Diese Werte entsprechen den publizierten Dissoziationskonstanten in Radioliganden-Bindungsstudien an Membranpräparationen von Rattenventrikeln in Höhe von $0,047\text{-}0,052 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Steinfath et al., 1992a), $0,07 \text{ nM}$ (León-Velarde et al., 2001), $0,09 \text{ nM}$ (Butterfield und Chess-Williams, 1990), $0,096 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Mügge et al., 1985), $0,17 \text{ nM}$ (Colucci et al., 1984; Fouad et al., 1985) bzw. $0,18 \text{ nM}$ (Yamada et al., 1980).

Für die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von Prazosin $k_{off,B}$ konnten folgende Werte für die Kontrollen ermittelt werden: $0,200 \pm 0,076 \text{ min}^{-1}$, $0,147 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$ und $0,157 \pm 0,035 \text{ min}^{-1}$. Diese stimmen gut mit bereits publizierten Werten für $k_{off,B}$ von $0,078 \text{ min}^{-1}$ für arterielles Gewebe (Tanaka et al., 2004) sowie $0,116 \text{ min}^{-1}$ für isolierte Rattenmyozyten (Skomedal et al., 1984) und $0,193 \text{ min}^{-1}$ (Sermsappasuk und Weiss, 2009) im isoliert perfundierten Rattenherzen überein.

Für R_{tot} ergaben sich Werte von $108,1 \pm 34,4 \text{ pmol}$, $118,8 \pm 43,4 \text{ pmol}$ und $150,1 \pm 22,5 \text{ pmol}$ in den Kontrollreihen. Diese repräsentieren die Anzahl der funktionellen Rezeptoren. Unter der Annahme, dass das Gewicht des linken Ventrikels circa 80 % des Gesamtherzgewichtes ausmacht, entsprechen diese Werte einer Größenordnung zwischen $85,4$ und $118,7 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht. Bei Untersuchungen im perfundierten Rattenherzen und nachfolgender Homogenisierung des Gewebes wurde eine Dichte von $13,2 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht festgestellt

(Edwards et al., 1988)., mittels Positronen-Emissions-Tomographie konnte ein Wert von $12,2 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht gemessen werden (Law et al., 2000). Im Vergleich dazu konnten in Radioliganden-Bindungsstudien an homogenisiertem ventrikulären Gewebe von Ratten für die Rezeptorendichte Werte zwischen $76 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ und $167 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein ermittelt werden (Mukherjee et al., 1983; Colucci et al., 1984; Mügge et al., 1985; Butterfield und Chess-Williams, 1990; Steinfath et al., 1992a; León-Velarde et al., 2001; Zhang et al., 2002). Diese Werte stimmen bei einem angenommenen Proteingehalt des myokardialen Gewebes von 10 % ($100 \text{ mg Protein}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht) mit den publizierten Werten von $12,2 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht bzw. $13,2 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Nassgewicht überein (Law et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die in der Literatur publizierten niedrigeren Werte im Vergleich zu der in den aktuellen Versuchsreihen ermittelten Anzahl an Rezeptoren könnte der Verlust an rezeptortragenden Membranen durch die Homogenisierung des Materials darstellen (Tanaka et al., 2004).

Ebenfalls ergaben sich mit den von Sermsappasuk und Weiss (2009) mit der gleichen Methode ermittelten Parameter vergleichbare Werte für: K_A $87,7 \pm 3,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $114,8 \pm 8,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $117,4 \pm 9,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ verglichen mit $101 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $k_{off,A}$ $1,10 \pm 0,18 \text{ min}^{-1}$, $1,24 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ und $1,88 \pm 0,16 \text{ min}^{-1}$ verglichen mit $1,001 \text{ min}^{-1}$; Φ_{max} $106,8 \pm 18,1 \text{ mmHg}$, $97,1 \pm 5,0 \text{ mmHg}$ bzw. $82,5 \pm 5,2 \text{ mmHg}$ verglichen mit $98,6 \text{ mmHg}$; K_E $12,3 \pm 6,5 \text{ pmol}$, $9,71 \pm 3,3 \text{ pmol}$ und $8,19 \pm 2,4 \text{ pmol}$ verglichen mit $13,9 \text{ pmol}$; E_{base} $23,3 \pm 4,7 \text{ mmHg}$, $26,7 \pm 4,4 \text{ mmHg}$ bzw. $27,2 \pm 11,5 \text{ mmHg}$ verglichen mit $37,0 \text{ mmHg}$. Die Kontrollen der Versuchsreihe unter partieller Hypoxie ergaben ebenso ähnliche Werte wie die von Sermsappasuk und Weiss (2009) ermittelten Parameter: für $AR(0)$ $22,8 \pm 16,3 \text{ pmol}$ verglichen mit $19,5 \text{ pmol}$; für $\Delta E_{max,PE}$ $16,5 \pm 9,6 \text{ mmHg}$ verglichen mit $24,3 \text{ mmHg}$ sowie für $EC_{50,PE}$ $28,9 \pm 16,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ verglichen mit $57,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Basierend auf den Werten für K_A und K_B ergibt sich damit für Prazosin eine im Vergleich zu Phenylephrin deutlich höhere Affinität für die α_1 -ARs.

Die große Variabilität der sekundären Parameter bei den Versuchsreihen mit einstündiger Phenylephrin- bzw. Isoprenalin-Infusion lässt sich möglicherweise auf den Einfluss äußerer Bedingungen, wie z.B. jahreszeitlichen Schwankungen in der Versuchsdurchführung, zurückführen. Das Verhalten der Herzfrequenz auf die initiale viertelstündige Phenylephrin-Infusion unterscheidet sich bei den Kontrollen zwischen den beiden genannten Versuchsreihen, bei denen keine Änderung der Herzfrequenz festzustellen war, und den Reihen unter partieller Hypoxie bzw. Hypertrophie mit signifikanter Steigerung der Herzfrequenz. Hier zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Herzfrequenz und der Inotropiesteigerung. Der Einsatz von gepackten Herzen hätte hierbei konstante Bedingungen ermöglicht, diese standen jedoch für die Versuchsdurchführung nicht zur Verfügung.

Der triphasische Verlauf der inotropen Reaktion auf Phenylephrin wird durch ein Zusammenspiel von α_{1A} -ARs und α_{1B} -ARs erklärt. So sind beide Rezeptorsubtypen für den anhaltenden positiv inotropen Effekt verantwortlich, während α_{1B} -ARs den kurzzeitigen negativ

inotropen Effekt vermitteln (Williamson et al., 1994). Vor allem unter pathologischen Bedingungen scheint diesem Zusammenwirken zwischen diesen beiden Rezeptorsubtypen eine wichtige Funktion zuzukommen (Michel et al., 1994).

Das Absinken des LVDP nach den einminütigen Prazosin-Infusionen auf Werte unterhalb der Baseline lässt sich auf die Besetzung der Rezeptoren mit endogenen Liganden (Noradrenalin) zurückführen.

5.2 Einfluss der Behandlungen

5.2.1 Effekt einer einstündigen Behandlung mit Phenylephrin bzw. Isoprenalin

Für die einstündige Infusion einer 12,3 μM Phenylephrin-Lösung ließ sich eine signifikante Verstärkung des maximalen Effekts der einminütigen Prazosin-Infusion auf den LVDP (Abfall um $16,26 \pm 2,88\%$ vs. $25,34 \pm 4,11\%$, $p < 0,05$) nachweisen. Dies deutet auf einen verstärkten durch Stimulation mittels eines Agonisten vermittelten Effekt an den α_1 -ARs hin, wenn der Agonist über einen kurz- bis mittelfristigen Zeitraum zugeführt wird.

Die Unterschiede hinsichtlich der Dissoziationskonstanten K_A und K_B zeigten sich signifikant, waren jedoch so gering, dass diesen Änderungen in der Affinität keine physiologische Bedeutung zukommt. Um die signifikante Änderung von k_{iv} einzuordnen, ist dessen Einfluss zur Berechnung des Verteilungsvolumens $V_{app,iv}$ zu beachten. Auch hier ergaben sich keine biologisch relevanten Veränderungen.

Darüber hinaus zeigten sich keine weiteren signifikanten Parameteränderungen. In der Literatur wurden dahingegen Änderungen hinsichtlich der Rezeptoranzahl und -affinität beschrieben. So konnten Gengo et al. (1988) zeigen, dass eine sechstägige Infusion von $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ Phenylephrin zu einer Abnahme der [^3H]Prazosin-Bindungsstellen um 39 % führte, während sich sowohl die Affinität als auch die inotrope Wirkung auf Phenylephrin nicht änderte. Ebenfalls sank die Dichte der β -ARs um 31 %. Bei Hunden wurde nach Vorbehandlung mit dem α_1 -Agonisten Amidephrin an Aortenpräparationen keine Änderung der α_1 -AR-Dichte, jedoch eine Erhöhung der Dissoziationskonstante K_B von 0,14 nM auf 0,29 nM festgestellt, die einer Reduktion der Rezeptoraffinität entspricht (Kiuchi et al., 1992).

Bei der einstündigen Behandlung mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verstärkung des maximalen Effekts der einminütigen Prazosin-Infusion mit einem Abfall des LVDP nach Prazosin-Infusion um $16,84 \pm 4,27\%$ vs. $27,36 \pm 9,56\%$ ($p < 0,05$). Auch hier konnten neben Änderungen von K_A und k_{iv} , die ebenfalls keine biologische Signifikanz zeigten, keine weiteren signifikanten Parameteränderungen festgestellt werden.

Im Vergleich dazu konnten Chang et al. (1982) nachweisen, dass eine zweistündige Isoprenalin-Infusion ($400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) über eine implantierte Pumpe im Nacken der Ratten in vivo zu einer

Reduktion der Sensitivität der kardialen β -ARs führt. Dort zeigten sich ebenfalls weder Änderungen in der Affinität noch in der Dichte der α_1 -ARs. Butterfield und Chess-Williams (1993) untersuchten den Effekt einer 3-tägigen Isoprenalin-Infusion über implantierte Pumpen an Ratten und wiesen ebenfalls eine Abnahme der Dichte an β -AR-Bindungsstellen nach. Jedoch zeigte sich außerdem eine verstärkte α_1 -vermittelte Reaktion auf Phenylephrin, während sich auch hier die Dichte an α_1 -ARs nicht signifikant änderte.

Der Zeitraum von einer bis zwei Stunden für die anhaltende Infusion von Phenylephrin-Lösung bzw. Isoprenalin-Lösung erscheint aktuell nicht ausreichend, um eine Änderung der Bindungs- oder Transduktionsparameter hervorzurufen.

5.2.2 Einfluss einer partiellen Hypoxie

Unter 20-minütiger partieller Hypoxie zeigte sich eine signifikante Reduktion von Φ_{max} um etwa die Hälfte von 82,5 mmHg auf 40,3 mmHg ($p < 0,001$). Dies entspricht einer Herabsetzung des maximal erreichbaren Effekts durch Stimulation der α_1 -ARs unter einer partiellen Hypoxie. Diese spiegelt sich auch in der um $36,14 \pm 3,28$ % reduzierten Höhe der Grundlinie des LVDP nach 20-minütiger Umstellung auf das Gasgemisch wider ($p < 0,001$).

Es zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung hinsichtlich der Rezeptoranzahl, während diese bei diversen Studien unter akuter Hypoxie beschrieben wurde. So konnten Heathers et al. (1987) unter der Einwirkung einer 30-minütigen Hypoxie auf adulte Kardiomyozyten einen zwei- bis dreifachen Anstieg der α_1 -AR-Anzahl feststellen. Auch Butterfield und Chess-Williams (1990) konnten nachweisen, dass eine 30-minütige Ischämie im isoliert perfundierten Rattenherzen zu einem signifikanten Anstieg der [3 H]-Prazosin-Bindungsstellen von $123,6 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein auf $177,9 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein führte. In der aktuellen Studie konnte jedoch keine signifikante Änderung der α_1 -AR-Anzahl festgestellt werden. Vermutlich ist der Zeitraum von 20 Minuten für eine partielle Hypoxie zu kurz, um bereits eine Änderung in der Rezeptordichte hervorzurufen, obwohl es schon zu Änderungen in der Signaltransduktion kommt.

In anderen Studien wurde im Gegensatz zur reinen Hypoxie bzw. der aktuell untersuchten partiellen Hypoxie ein Präkonditionierungseffekt durch gezielten Einsatz einer kurzzeitigen Hypoxie mit nachfolgender Reperfusion untersucht. Für die ischämische Präkonditionierung wird dabei über zwei verschiedene Typen berichtet: eine frühe und eine verzögerte Präkonditionierung. Die frühe Präkonditionierung zeichnet sich durch den Schutz des Herzens vor Schaden durch Ischämie unmittelbar nach einem präkonditionierendem Reiz aus und hält für eine Stunde an. Die verzögerte Präkonditionierung schützt das Herz zwischen 24 Stunden und 72 Stunden nach dem präkonditionierenden Reiz (Baxter und Ferdinandy, 2001).

Aktuell lagen jedoch keine Studien vor, die Aussagen über die Auswirkung einer ischämischen Präkonditionierung auf Rezeptorebene getroffen haben.

Eine partielle Hypoxie kann im Herzen auch auftreten, ohne dass ein Ast bzw. eine komplette Koronararterie zu 100 % verlegt werden. Zunehmende Gefäßstenosen, die nicht das gesamte Lumen ausfüllen, können dazu führen, dass es in den Gebieten, die am weitesten von dem versorgenden Ast entfernt liegen, zu einer Sauerstoffminderversorgung kommt, jedoch weiterhin ein geringe Zufuhr von Sauerstoff erhalten bleibt. Betroffen davon sind vor allem die inneren subendothelialen Schichten des Myokards, man spricht hier auch vom "Prinzip der letzten Wiese". Nach den vorliegenden Daten scheint sich dabei zunächst die positiv inotrope Wirkung endogener Katecholamine an den α_1 -ARs zu vermindern, indem die Signaltransduktionseffizienz der α_1 -ARs sinkt. Bei langanhaltender und stärker ausgeprägter Ischämie kann es später auch zu Veränderungen in der Rezeptordichte kommen.

5.2.3 Einfluss einer Myokardhypertrophie

Die erfolgreiche Induktion der Hypertrophie wurde bei den für 7 Tage mit Isoprenalin (5 mg/kg) vorbehandelten Ratten über die Änderung von absolutem und relativem Herzgewicht evaluiert. Beide Größen zeigten sich signifikant erhöht. Král'ová et al. (2008) bestätigten mittels elektrokardiografischer Messungen ebenfalls die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie nach 7-tägiger Vorbehandlung mit Isoprenalin-Injektionen (5 mg/kg). Auch Chang et al. (1982) und Hayes et al. (1984) konnten eine signifikante Zunahme des Herzgewichtes nach 7-tägiger bzw. bereits nach 4-tägiger Isoprenalin-Infusion feststellen. León-Velarde et al. (2001) konnten zeigen, dass bei Ratten eine Infusion von Noradrenalin über 21 Tage zur Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie führt. Es wurde vermutet, dass die Erhöhung der Nachlast durch α_1 -vermittelte Vasokonstriktion sowie die Steigerung der myokardialen Kontraktilität über die Aktivierung von β -ARs die Entwicklung der Hypertrophie vermitteln. Die Effekte der Hypertrophie wären somit durch die Desensitivierung bedingt.

Bei den hypertrophierten Herzen wurde eine Abnahme der Rezeptordichte um 21,45 % ($p < 0,05$) ermittelt, jedoch begleitet von einer signifikanten Zunahme von Φ_{max} um 12,35 % ($p < 0,05$). Dabei bezieht sich die Rezeptordichte auf das Gesamtherzgewicht der hypertrophierten Herzen bzw. der Herzen der Kontrollreihe. Da sich mit der Entwicklung einer Hypertrophie auch der Anteil des linken Ventrikels am Gesamtherzgewicht verändert (Olivetti et al. 1994), dieser in der aktuellen Studie jedoch nicht näher klassifiziert werden konnte, wurde diese Vorgehensweise zum Vergleich der Rezeptordichte gewählt. Für die Änderung von k_{iv} ergab sich hier ebenfalls keine biologische Signifikanz.

Auch Fouad et al. (1985) konnten eine signifikante Reduktion der Rezeptordichte bei Ratten nachweisen, bei denen eine linksventrikuläre Hypertrophie durch Induktion einer renalen

Hypertension hervorgerufen wurde. Begleitet wurde dies durch eine Abnahme der inotropen Wirkung auf Phenylephrin. Es wurde vermutet, dass in früheren Stadien einer kompensatorischen Hypertrophie die Ansprechempfindlichkeit auf eine α -Stimulation zunächst steigt, um die reduzierte Wirkung auf eine β -Stimulation zu kompensieren. Da die zugrundeliegenden Versuche 8 Wochen nach operativer Induktion der Hypertension durchgeführt wurden, könnte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen mit einer durch einwöchige Isoprenalin-Injektionen hervorgerufenen Hypertrophie um so ein frühes Stadium handeln.

Die Grundlinie von LVDP zeigte sich in der aktuellen Versuchsreihe im Vergleich zur Kontrolle erhöht, jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen. Ebenfalls konnte keine signifikante Änderung der Herzfrequenz ermittelt werden. Dies entspricht den ermittelten Daten an isoliert perfundierten Rattenherzen, die 10 Tage lang täglich mit intraperitonealen Isoprenalin-Injektionen ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) vorbehandelt wurden (Silva et al., 2001). Im Gegensatz zu der dort publizierten Erhöhung der Sensitivität auf Phenylephrin unterscheidet sich der Effekt auf die erste 15-minütige Phenylephrin-Infusion in der aktuellen Studie nicht signifikant zwischen den hypertrophierten Herzen und den Kontrollen.

Ebenfalls wurde von Silva et al. (2001) festgestellt, dass die 10-tägigen Isoprenalin-Injektionen zu einer Desensitivierung von kardialen β -ARs führen. Ebenso konnten Chang et al. (1982) nach 7-tägigen Isoprenalin-Infusionen bei in-vivo-Experimenten an Ratten eine signifikante Reduktion der β -AR-Dichte nachweisen. Auch diese Ergebnisse stützen in Verbindung mit der verstärkten inotropen Wirkung auf Phenylephrin die Hypothese, dass α_1 -ARs als Reservemechanismus fungieren könnten, wenn die Funktion der β -ARs reduziert ist. Im menschlichen Herzen konnte ebenfalls sowohl bei primärer als auch sekundärer Hypertrophie eine Abnahme der β -AR-Dichte nachgewiesen werden (Choudhury et al., 1996).

Zwar sinkt sowohl in der aktuellen Studie als auch in den genannten Vergleichsdaten aus der Literatur die Rezeptordichte bei hypertrophierten Herzen für die α_1 - und β -ARs, jedoch zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten der erhaltenen inotropen Wirkung auf Phenylephrin. Dieses könnte durch die Abhängigkeit vom Stadium der Hypertrophie (frühes bzw. späteres Stadium) erklärt werden. In der aktuellen Arbeit ergab sich dahingehend ein signifikanter Anstieg des maximal erreichbaren Effekts (Φ_{max}) durch Stimulation der α_1 -ARs, auch wenn sich für die Reaktion auf die Phenylephrin- bzw. Prazosin-Infusionen in der Versuchsreihe keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollreihe zeigten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Osadchii et al. (2007), die mittels Dosis-Wirkungs-Kurven eine Steigerung der maximalen inotropen Wirkung auf Phenylephrin bei unverändertem EC_{50} feststellen konnten. Aus dieser Studie ging jedoch nicht hervor, ob dieses Ergebnis durch eine Änderung in der Rezeptorbindung oder der Signaltransduktion bedingt war. In der aktuellen Untersuchung

konnte nun, nach aktueller Studienlage zum ersten Mal, der beteiligte Parameter (Φ_{max}) ermittelt werden.

Da Ratten mit einer Herzinsuffizienz ein signifikant erhöhtes Herzgewicht aufweisen, könnten sich hier Parallelen zu der veränderten Pharmakokinetik in hypertrophierten Herzen zeigen. Bei herzinsuffizienten Ratten ändert sich die inotrope Reaktion auf die Stimulation von α_1 -ARs im Vergleich zum gesunden Herzen nicht, bleibt jedoch im Gegensatz zum abnehmenden Effekt auf β -Stimulation erhalten (Sjaastad et al., 2003). Die β -AR-Dichte nimmt mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz ab (Fowler et al., 1986). Für herzinsuffiziente Menschen konnte festgestellt werden, dass der endogene Agonist Noradrenalin über die Aktivierung von α_1 -ARs eine vergleichbare inotrope Reaktion hervorruft wie durch die Stimulation von β -ARs. Dies hebt die Bedeutung der α_1 -ARs für das insuffiziente menschliche Herz hervor (Scholz et al., 1996; Skomedal et al., 1997). Änderungen in der Anzahl und Affinität von α_1 -ARs wurden ebenfalls beschrieben. So konnte in menschlichen insuffizienten Herzen eine Abnahme der β -AR-Dichte auf $29,9 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein im Vergleich zum gesunden Herzen mit $70,4 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein festgestellt werden. Die Dichte der α_1 -ARs stieg dagegen auf $10,3 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein an, während im gesunden Herzen eine Dichte von $3,9 \text{ fmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein ermittelt wurde. Dabei änderte sich auch die Dissoziationskonstante des Prazosins, die im gesunden Herzen $0,34 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ betrug, auf $0,47 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Steinfath et al., 1992b). Sowohl das gesunde als auch das insuffiziente menschliche Herz reagieren in vivo auf eine Stimulation der α_1 -ARs mit einer Steigerung der Kontraktilität (Landzberg et al., 1991). Beim insuffizienten Herzen ändert sich zudem die Verteilung der α_1 -ARs und β -ARs (Grigore et al., 2005), diese normalisiert sich jedoch nach Einbau eines Left Ventricular Assist Devices durch die Unterstützung der Herztätigkeit (Schnee et al., 2008).

Der Einsatz von β -Blockern begrenzt das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz und reduziert die Mortalität (Packer et al., 1996). Eine sechswöchige orale Vorbehandlung von Ratten mit $0,125 \%$ Propranolol führte zu keiner Änderung von Körper- und Herzgewicht, jedoch zur signifikanten Erhöhung der α_1 -AR-Dichte (Mügge et al., 1985). Dies unterstützt die Vermutung, dass α_1 -ARs eine kompensatorische Rolle zukommt, sobald die über β -ARs vermittelten Effekte kompromittiert werden.

5.2.4 Methodendiskussion

Die vorliegenden Daten heben die Bedeutung der pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Modellierung zur Ermittlung der Veränderungen von Eigenschaften des α_1 -Adrenorezeptors unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen hervor. Über die Änderungen der ermittelten Parameter lassen sich langfristig Konsequenzen für die Therapiemöglichkeiten von Erkrankungen des Herzens ableiten.

Die Verwendung dieser Methode bietet den Vorteil, dass bereits ein Experiment die Erstellung einer vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurve sowie Aussagen zur Wirkstoff-Rezeptorinteraktion ermöglicht. Dadurch reduziert sich auch die Anzahl der benötigten tierexperimentellen Versuche. Sowohl die Bindungs- als auch die Transduktionsparameter können in einem Experiment untersucht werden. Außerdem gelingt es, die Bindungsparameter ohne Veränderung am Gewebe (z.B. durch Homogenisierung) zu ermitteln. Die Agonisten-Parameter können auf Grundlage der kompetitiven Interaktion zwischen dem α_1 -Agonisten Phenylephrin und dem α_1 -Antagonisten Prazosin aus der Ausflusskonzentration des Antagonisten geschätzt werden.

Dies wäre grundsätzlich auch auf Basis von Dosis-Wirkungs-Kurven möglich, es könnten jedoch keine genauen Aussagen sowohl über die Rezeptor- als auch über die Postrezeptorebene getroffen werden. Hier bietet das "operational model" den einzigartigen Vorteil, die beiden Parameter K_A (die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, die die Affinität für den Agonisten widerspiegelt) und τ (die intrinsische Wirksamkeit des Agonisten und Sensitivität des Rezeptors zum Agonisten) zu schätzen. Die Parameter K_E und Φ_{max} sind Pharmakon-unabhängige Maßgrößen des Agonismus und dienen der Quantifizierung der Signaltransduktion (Kenakin, 2012).

Für die Interpretation der Daten ist zu beachten, dass auch die Lage der α_1 -ARs innerhalb der Zellen kontrovers diskutiert wird. Konventionell wird von einer Lokalisation der α_1 -ARs an der Zellmembran ausgegangen, die eine Aktivierung der Signalkaskade zur Folge hat, so dass die Signale von "außen nach innen" vermittelt werden. In Studien an adulten Mauskardiomyozyten konnte nun gezeigt werden, dass sich die α_1 -ARs vornehmlich (mindestens 80 %) an der Membran des Nukleus bzw. perinukleär befinden und nur ein kleiner Teil der α_1 -ARs nicht-nukleär lokalisiert ist. Dieses Ergebnis impliziert die postrezeptionale Signalübermittlung an die Plasmamembran sowie die Notwendigkeit eines Agonisten-Transports an die nukleäre Membran (Huang et al., 2007; Wright et al., 2008, 2012). Die funktionelle Relevanz dieser nukleären Rezeptoren ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Da die Details über die genaue Lokalisation der α_1 -ARs noch nicht vollständig geklärt sind, wurde für das zugrundeliegende Modell zunächst angenommen, dass sich die α_1 -ARs an der Plasmamembran befinden. Jedoch zeigt sich das Modell auch für eine nukleäre Lokalisation der Rezeptoren kompatibel; dann würde die Uptake-Clearance CL_{vi} der Aufnahme in die Zelle und nicht in den interstitiellen Raum entsprechen.

Darüber hinaus ergeben sich verschiedene Überlegungen zum Einsatz des genutzten α_1 -Agonisten Phenylephrin bzw. des α_1 -Antagonisten Prazosin. Prazosin ist ein inverser Agonist (Rossier et al., 1999), wirkt jedoch in einem System ohne konstitutive Aktivität wie ein neutraler kompetitiver Antagonist. Dieser kompetitive Charakter ist für die mathematische Modellierung entscheidend, bei der das "operational model" die Möglichkeit bietet, den

zeitlichen Verlauf des negativ inotropen Effekts von Prazosin zu beschreiben (Sermsappasuk und Weiss, 2009; Weiss et al., 2009).

Über Phenylephrin wurde berichtet, dass es neben der agonistischen Wirkung auf α_1 -ARs auch einen geringen Effekt auf kardiale β -ARs zeigt, der bei hohen Konzentrationen auftritt. Auf die Verwendung eines β -Blockers wie Propranolol wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch verzichtet. Gründe dafür liegen zum einen darin, dass Prazosin als spezifischer Antagonist an α_1 -ARs wirkt und zum anderen auch eine Interaktion zwischen dem β -Blocker und den α_1 -ARs nicht ausgeschlossen werden konnte (Dzimiri, 2002; Brahmadevara et al., 2003; Xiao et al., 2006).

Für die Einordnung der Ergebnisse der Versuchsreihe mit Myokardhypertrophie muss ebenfalls beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Kontrollreihe durchgeführt wurde, die exakt den Haltungsbedingungen der vorbehandelten Ratten entsprach. Da vorangegangene Versuche gezeigt haben, dass eine Scheinbehandlung die Parameter nicht beeinflusste, wurde hier auf die Durchführung einer Vorbehandlung mit NaCl verzichtet.

Natürlich stellt das Modell nur eine Vereinfachung der Realität dar. Unter in vivo Bedingungen würde es versagen, weil die α_1 -AR-Stimulation einen systemischen vasokonstriktiven Einfluss hätte, der hämodynamische Veränderungen nach sich ziehen würde (White et al., 1999).

Andere Herangehensweisen zur funktionellen Analyse der kardialen α_1 -ARs im intakten Herzen müssen entwickelt werden. Zahlreiche Fragestellungen können mit biochemischen bzw. molekularbiologischen Methoden besser gelöst werden, jedoch ergibt sich dabei der Nachteil, dass ein Informationsgewinn über die Funktion fehlt. Die pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung bietet hier den Vorteil, dass sie nicht nur Informationen über den Wirkmechanismus eines Stoffes, sondern auch über die physiologische Rolle der Modellkompartimente und die pharmakokinetischen Prozesse vermittelt (Weiss, 2011).

In großen klinischen Studien, der ALLHAT ("The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial") und der V-HeFT ("Vasodilator-Heart Failure Trials"), zeigte sich, dass der Einsatz eines nicht-selektiven α_1 -Antagonisten (Doxazosin bzw. Prazosin) die Inzidenz einer Herzinsuffizienz erhöht sowie eine Tendenz zum Anstieg der Mortalität aufzeigt (Cohn, 1993; ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2000). Langfristig wäre der Einsatz kardio- bzw. subtypenselektiver α_1 -Agonisten bzw. Antagonisten als sinnvolle Therapieoption denkbar, um unerwünschte Wirkungen an den kardialen bzw. vaskulären Rezeptoren zu vermeiden. Dahingehend besteht weiterer Forschungsbedarf. Die Quantitative Pharmakologie kann durch ein besseres Verständnis der kardialen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik dabei helfen, den sicheren und effizienten Einsatz von Pharmaka in der klinischen Praxis zu fördern (Zhang et al., 2008; Weiss, 2011).

5.2.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedliche Änderungen in den Bindungs- und Signaltransduktionsparametern der α_1 -ARs unter dem Einfluss pathophysiologischer Zustände ermittelt werden. So zeigte sich für die akuten Infusionen von 12,3 μ M Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung eine Verstärkung des maximalen Effekts der einminütigen Prazosin-Infusion auf den LVDP, ohne dass es bereits zu einer signifikanten Änderung der Transduktionsparameter kam. Unter dem Einfluss einer 20-minütigen partiellen Hypoxie zeigte sich der positiv inotrope Effekt durch Phenylephrin reduziert, bedingt durch eine Abnahme der α_1 -Signaltransduktionseffizienz. Die Induktion einer Hypertrophie führte zu einer signifikanten Reduktion der α_1 -Rezeptorendichte unter gleichzeitiger Steigerung der maximalen inotropen Wirkung auf Phenylephrin, wobei die am System mögliche maximale Wirkung Φ_{max} als der bestimmende Parameter identifiziert werden konnte. Die mechanismusbasierte pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung erweist sich hier als ein wertvolles Instrument, das zum besseren Verständnis der Wirkstoff-Rezeptor-Interaktion und Signaltransduktion beiträgt (Danhof et al., 2007). Dabei zeigen sowohl die aktuelle als auch vorhergehende Studien, dass die pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung ein geeignetes Mittel ist, um die α_1 -AR-Bindungs- und Signaltransduktionsparameter unter physiologischen und pathophysiologischen Einflüssen am isoliert perfundierten Rattenherzen zu bestimmen (Sermasappasuk und Weiss, 2009; Weiss et al., 2009).

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der Entwicklung von Arzneimitteln sind Kenntnisse über die kardiale Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Wirkstoffen wichtig, um Therapien hinsichtlich ihrer Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit zu optimieren. Hier bieten Versuche am isoliert perfundierten Herzen die Möglichkeit, mathematische Modelle von der Aufnahme, Metabolisierung bis zum erzeugten Effekt des Wirkstoffes zu etablieren, die Aussagen über die Bindungskinetik treffen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bindungs- und Signaltransduktionsparameter der α_1 -ARs auf der Grundlage eines bereits etablierten pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Modells (Sermsappasuk und Weiss, 2009) unter dem Einfluss verschiedener pathophysiologischer Zustände untersucht. Dabei standen die Effekte einer einstündigen Infusion mit 12,3 μM Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung, einer 20-minütigen partiellen Hypoxie sowie einer Myokardhypertrophie im Mittelpunkt der Untersuchung.

Hier konnte erstmals die maximal mögliche Wirkung im System (Φ_{max}) als der bestimmende Parameter identifiziert werden, der bei einer Hypertrophie die Steigerung der maximalen inotropen Wirkung von Phenylephrin widerspiegelt. Dabei lassen sich außerdem Parallelen zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz finden.

Auch der Einfluss einer partiellen Hypoxie konnte mit einer Änderung von Φ_{max} beschrieben werden, wo der Parameter eine Abnahme der α_1 -Signaltransduktionseffizienz vermittelt und damit den positiv inotropen Effekt durch Phenylephrin reduziert.

Einstündige Infusionen von 12,3 μM Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung führten zu keinen biologisch signifikanten Parameteränderungen, während bei langfristiger Einwirkung über Veränderungen berichtet wurde. Hier könnten nähere Untersuchungen zu eventuellen mittelfristigen Auswirkungen auf die Signaltransduktions- und Bindungsparameter erfolgen, um Aufschlüsse über die ablaufenden Mechanismen zu gewinnen.

Desgleichen wären weiterführende Studien zum Einfluss einer partiellen Hypoxie zur ischämischen Präkonditionierung wünschenswert. Ebenso könnten weitere Daten zu einer langfristigen Einwirkung einer partiellen Hypoxie Aufschlüsse darüber geben, ob es mit einer längeren Latenz zu weiteren Parameteränderungen käme.

Ebenfalls wären weitere Untersuchungen zur Lokalisation der α_1 -ARs, z.B. mittels Herstellung und Einsatz eines Transporthemmers, denkbar und könnten dazu beitragen, Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung von nukleär lokalisierten α_1 -ARs zu gewinnen.

7. Literaturverzeichnis

- ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group (2000) Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: The antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *Jama - J Am Med Assoc* 283:1967-1975.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-20249.
- Andersen GØ, Qvigstad E, Schiander I, Aass H, Osnes J, Skomedal T (2002) α_1 -AR-induced positive inotropic response in heart is dependent on myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1471-H1480.
- Baxter GF, Ferdinandy P (2001) Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. *Basic Res Cardiol* 96:329-344.
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
- Black JW, Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220:141-162.
- Black J, Leff P, Shankley N, Wood J (1985) An operational model of pharmacological agonism: the effect of E/[A] curve shape on agonist dissociation constant estimation. *Br J Pharmacol* 84:561-571.
- Böhm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, Erdmann E (1988) Alpha-adrenoceptors and alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in failing human myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 12:357-364.
- Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A (2003) Evidence against β_3 -adrenoceptors or low affinity state of β_1 -adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 138:99-106.
- Breimer D (2008) PK/PD modelling and beyond: impact on drug development. *Pharmaceut Res* 25:2720-2722.
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S (1986) Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59:297-309.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *New Engl J Med* 307:205-211.
- Brodde O (1993) Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Therapeut* 60:405-430.
- Brückner R, Meyer W, Mügge A, Schmitz W, Scholz H (1984) α -Adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of phenylephrine in isolated human ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 99:345-347.
- Butterfield MC, Chess-Williams R (1990) Enhanced α -adrenoceptor responsiveness and receptor number during global ischaemia in the langendorff perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 100:641-645.
- Butterfield MC, Chess-Williams R (1993) Potentiation of α -adrenoceptor-mediated responses following chronic β -adrenoceptor stimulation in the rat heart. *Br J Pharmacol* 108:658-662.
- Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau JL (1991) Dysfunction of the beta- and alpha-adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ Res* 69:332-343.

- Chang DJ, Chang TK, Yamanishi SS, Salazar FHR, Kosaka AH, Khare R, Bhakta S, Jasper JR, Shieh I, Lesnick JD, Ford APDW, Daniels DV, Eglen RM, Clarke DE, Bach C, Chan HW (1998) Molecular cloning, genomic characterization and expression of novel human α_{1A} -adrenoceptor isoforms. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 422:279-283.
- Chang HY, Klein RM, Kunos G (1982) Selective desensitization of cardiac beta adrenoceptors by prolonged in vivo infusion of catecholamines in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 221:784-789.
- Chaulet H, Lin F, Guo J, Owens WA, Michalick J, Kesteven SH, Guan Z, Prall OW, Mearns BM, Feneley MP, Steinberg SF, Graham RM (2006) Sustained augmentation of cardiac α_{1A} -adrenergic drive results in pathological remodeling with contractile dysfunction, progressive fibrosis and reactivation of matricellular protein genes. *J Mol Cell Cardiol* 40:540-552.
- Chen S, Lin F, Iismaa S, Lee KN, Birckbichler PJ, Graham RM (1996) α_1 -Adrenergic receptor signaling via G_h is subtype specific and independent of its transglutaminase activity. *J Biol Chem* 271:32385-32391.
- Choudhury L, Rosen SD, Lefroy DC, Nihoyannopoulos P, Oakley CM, Camici PG (1996) Myocardial beta adrenoceptor density in primary and secondary left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J* 17:1703-1709.
- Cogé F, Guenin SP, Renouard-Try A, Rique H, Ouvry C, Fabry N, Beauverger P, Nicolas JP, Galizzi JP, Boutin JA, Canet E (1999) Truncated isoforms inhibit [3 H]prazosin binding and cellular trafficking of native human α_{1A} -adrenoceptors. *Biochem J* 343:231-239.
- Cohn JN (1993) The Vasodilator-Heart Failure Trials (V-HeFT). Mechanistic data from the VA Cooperative Studies. Introduction. *Circulation* 87:VII-4.
- Colucci WS, Gimbrone MA, Alexander RW (1984) Regulation of myocardial and vascular alpha-adrenergic receptor affinity. Effects of guanine nucleotides, cations, estrogen, and catecholamine depletion. *Circ Res* 55:78-88.
- D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X: ADAPT 5 user's guide: Pharmacokinetic/pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 2009, pp. 9-60.
- Danhof M, de Jongh J, de Lange ECM, Della Pasqua O, Ploeger BA, Voskuyl RA (2007) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling: biophase distribution, receptor theory, and dynamical systems analysis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:357-400.
- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 272:19125-19132.
- Dhein S: The Langendorff Heart. In: Dhein S, Mohr F und Delmar M (Eds): Practical Methods in Cardiovascular Research. Springer, Berlin-Heidelberg, 2005, pp. 155-172.
- Döring H (1996) Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff – Geschichte und Gegenwart, Modifikationen und Applikationen. *Acta Chir Austriaca* 28:328-333.
- Dzimiri N (2002) Receptor crosstalk. Implications for cardiovascular function, disease and therapy. *Eur J Biochem* 269:4713-4730.
- Edwards SJ, Rattigan S, Colquhoun EQ, Woodcock EA, Clark MG (1988) Characterization of α_1 -adrenergic receptors in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 20:1025-1034.
- Fawzi AB: The Langendorff Heart. In: McNeill JH (Ed): Measurement of cardiac Function. CRC Press, Boca Raton, 1997, pp. 1-9.
- Fischer Y, Thomas J, Holman GD, Rose H, Kammermeier H (1996) Contraction-independent effects of catecholamines on glucose transport in isolated rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 270:C1204-C1210.

- Fouad FM, Shimamatsu K, Hanna MM, Khairallah PA, Tarazi RC (1985) Impaired inotropic responses to alpha-adrenergic stimulation in experimental left ventricular hypertrophy. *Circulation* 71:1023-1028.
- Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR (1986) Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 74:1290-1302.
- Gabrielsson J, Green AR (2009) Quantitative pharmacology or pharmacokinetic pharmacodynamic integration should be a vital component in integrative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 331:767-774.
- Gallego M, Setién R, Puebla L, Boyano-Adánez MdC, Arilla E, Casis O (2005) α_1 -Adrenoceptors stimulate a G_{as} protein and reduce the transient outward K^+ current via a cAMP/PKA-mediated pathway in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C577-C585.
- Gengo PJ, Bowling N, Wyss VL, Hayes JS (1988) Effects of prolonged phenylephrine infusion on cardiac adrenoceptors and calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 244:100-105.
- Ghosh S, Standen NB, Galiñanes M (2000) Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia: studies on the early and delayed protection. *Cardiovasc Res* 45:339-350.
- Gonzalez-Cabrera PJ, Shi T, Yun J, McCune DF, Rorabaugh BR, Perez DM (2004) Differential regulation of the cell cycle by α_1 -adrenergic receptor subtypes. *Endocrinology* 145:5157-5167.
- Gorostiza P, Guarner V, Cárdenas M, Valenzuela F (1995) Effects of alpha adrenergic stimulation on time independent potassium current of isolated ventricular myocytes. *Life Sci* 56:1407-1414.
- Grigore A, Poindexter B, Vaughn WK, Nussmeier N, Frazier OH, Cooper JR, Gregoric ID, Maximilian Buja L, Bick RJ (2005) Alterations in alpha adrenoreceptor density and localization after mechanical left ventricular unloading with the Jarvik flowmaker left ventricular assist device. *J Heart Lung Transpl* 24:609-613.
- Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Cogé F, Guénin S, Schwinn DA (2004) Update on human α_1 -adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci* 25:449-455.
- Hayes JS, Pollock GD, Fuller RW (1984) In vivo cardiovascular responses to isoproterenol, dopamine and tyramine after prolonged infusion of isoproterenol. *J Pharmacol Exp Ther* 231:633-639.
- Heathers GP, Yamada KA, Kanter EM, Corr PB (1987) Long-chain acylcarnitines mediate the hypoxia-induced increase in alpha 1-adrenergic receptors on adult canine myocytes. *Circ Res* 61:735-746.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47:267-270.
- Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH (1998) The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273:7725-7730.
- Hu K, Nattel S (1995) Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. *Circulation* 92:2259-2265.
- Huang Y, Wright CD, Merkwand CL, Baye NL, Liang Q, Simpson PC, O'Connell TD (2007) An α_{1A} -adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation* 115:763-772.
- Hwang K, Gray CD, Sweet WE, Moravec CS, Im M (1996) α_1 -Adrenergic receptor coupling with G_h in the failing human heart. *Circulation* 94:718-726.

- Jensen BC, Swigart PM, DeMarco T, Hoopes C, Simpson PC (2009) α_1 -Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circ Heart Fail* 2:654-663.
- Jensen BC, Swigart PM, Laden M, DeMarco T, Hoopes C, Simpson PC (2009) The alpha-1D is the predominant alpha-1-adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 54:1137-1145.
- Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25:186-192.
- Kenakin T (2012) The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling. *BMC Pharmacol Toxicol* 13:1-8.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245-248.
- Kiuchi K, Vatner DE, Uemura N, Bigaud M, Hasebe N, Hempel DM, Graham RM, Vatner SF (1992) Mechanisms of alpha 1-adrenergic vascular desensitization in conscious dogs. *Circ Res* 71:1185-1199.
- Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR (1993) The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 268:15374-15380.
- Král'ová E, Mokráň T, Murín J, Stankovičová T (2008) Electrocardiography in two models of isoproterenol-induced left ventricular remodeling. *Physiol Res* 57:83-89.
- Kusakari Y, Hongo K, Kawai M, Konishi M, Kurihara S (2002) The mechanism of increasing Ca^{2+} responsiveness by α_1 -adrenoceptor stimulation in rat ventricular myocytes. *JPN J Physiol* 52:531-539.
- Landzberg JS, Parker JD, Gauthier DF, Colucci WS (1991) Effects of myocardial alpha 1-adrenergic receptor stimulation and blockade on contractility in humans. *Circulation* 84:1608-1614.
- Law MP, Osman S, Pike VW, Davenport RJ, Cunningham VJ, Rimoldi O, Rhodes CG, Giardinà D, Camici PG (2000) Evaluation of [^{11}C]GB67, a novel radioligand for imaging myocardial α_1 -adrenoceptors with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 27:7-17.
- Lee JH, Rosen MR (1994) Alpha1-adrenergic receptor modulation of repolarization in canine purkinje fibers. *J Cardiovasc Electr* 5:232-240.
- Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14:303-307.
- León-Velarde F, Bourin M, Germack R, Mohammadi K, Crozatier B, Richalet J (2001) Differential alterations in cardiac adrenergic signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R274-R281.
- Leszczynski D, Zhao Y, Luokkamäki M, Foegh ML (1994) Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 145:1265-1270.
- Liang Z, Xu N, Guan Y, Xu M, He Q, Han Q, Zhang Y, Zhao X (2007) The transport of α_{1A} -adrenergic receptor with 33-nm step size in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353:231-237.
- Loubani M, Galiñanes M (2001) α_1 -Adrenoceptors during simulated ischemia and reoxygenation of the human myocardium: effect of the dose and time of administration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122:103-112.
- Maier LS, Bers DM (2007) Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73:631-640.

- McWhinney C, Wenham D, Kanwal S, Kalman V, Hansen C, Robishaw JD (2000) Constitutively active mutants of the α_{1a} - and the α_{1b} -adrenergic receptor subtypes reveal coupling to different signaling pathways and physiological responses in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275:2087-2097.
- Meibohm B: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of biotech Drugs: Principles and Case Studies in Drug Development. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, pp. 3-13.
- Menard S (2000) Coefficients of determination for multiple logistic regression analysis. *Am Stat* 54:17-24.
- Michel MC, Hanft G, Groß G (1994) Functional studies on α_1 -adrenoceptor subtypes mediating inotropic effects in rat right ventricle. *Br J Pharmacol* 111:539-546.
- Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA (2000) α_1 -Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Therapeut* 88:281-309.
- Minneman KP, Esbenshade TA (1994) α_1 -Adrenergic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:117-133.
- Mügge A, Reupcke C, Scholz H (1985) Increased myocardial α_1 adrenoceptor density in rats chronically treated with propranolol. *Eur J Pharmacol* 112:249-252.
- Mukherjee A, Haghani Z, Brady J, Bush L, McBride W, Buja LM, Willerson JT (1983) Differences in myocardial alpha- and beta-adrenergic receptor numbers in different species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 245:H957-H961.
- Muramatsu I, Morishima S, Suzuki F, Yoshiki H, Anisuzzaman ASM, Tanaka T, Rodrigo MC, Myagmar BE, Simpson PC (2008) Identification of α_{1L} -adrenoceptor in mice and its abolition by α_{1A} -adrenoceptor gene knockout. *Br J Pharmacol* 155:1224-1234.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.
- O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E, Simpson PC (2003) The $\alpha_{1A/C}$ - and α_{1B} -adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* 111:1783-1791.
- Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick EH, Anversa P (1994) Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodelling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res* 28:1199-1208.
- Osadchii OE, Norton GR, McKechnie R, Deftereos D, Woodiwiss AJ (2007) Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic β -adrenoreceptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1898-H1905.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996) The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *New Engl J Med* 334:1349-1355.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183.
- Perez DM, DeYoung MB, Graham RM (1993) Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol* 44:784-795.

- Perez DM, Piascik MT, Malik N, Gaivin R, Graham RM (1994) Cloning, expression, and tissue distribution of the rat homolog of the bovine α_{1C} -adrenergic receptor provide evidence for its classification as the α_{1A} -subtype. *Mol Pharmacol* 46:823-831.
- Qi M, Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118:3569-3572.
- Rehring TF, Shapiro JI, Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, Harken AH, Banerjee A (1998) Mechanisms of pH preservation during global ischemia in preconditioned rat heart: roles for PKC and NHE. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275:H805-H813.
- Rokosh DG, Stewart AFR, Chang KC, Bailey BA, Karlner JS, Camacho SA, Long CS, Simpson PC (1996) α_1 -Adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by α_1 -adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. *J Biol Chem* 271:5839-5843.
- Rorabaugh BR, Ross SA, Gaivin RJ, Papay RS, McCune DF, Simpson PC, Perez DM (2005) α_{1A} - but not α_{1B} -adrenergic receptors precondition the ischemic heart by a staurosporine-sensitive, chelerythrine-insensitive mechanism. *Cardiovasc Res* 65:436-445.
- Rossier O, Abuin L, Fanelli F, Leonardi A, Cotecchia S (1999) Inverse agonism and neutral antagonism at α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 56:858-866.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268:4625-4636.
- Schmidt R, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 28. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 2000, S. 474-476.
- Schnee PM, Shah N, Bergheim M, Poindexter BJ, Buja LM, Gemmato C, Radovancevic B, Letsou GV, Frazier OH, Bick RJ (2008) Location and density of α - and β -adrenoceptor subtypes in myocardium after mechanical left ventricular unloading. *J Heart Lung Transpl* 27:710-717.
- Scholz H, Eschenhagen T, Neumann J, Stein B: Receptor-mediated Regulation of cardiac Contractility: Inotropic Effects of alpha-Adrenoceptor Stimulation with Phenylephrine and Noradrenaline in failing Human Hearts. In: Endoh M, Morad M, Scholz H und Iijima T (Eds): *Molecular and cellular Mechanisms of cardiovascular Regulation*. Springer-Verlag, Tokyo, 1996, pp. 317–325.
- Sermasappasuk P, Weiss M (2009) Modelling of α_1 -adrenoceptor-mediated temporal dynamics of inotropic response in rat heart to assess ligand binding and signal transduction parameters. *Br J Pharmacol* 156:764-773.
- Shinoura H, Shibata K, Hirasawa A, Tanoue A, Hashimoto K, Tsujimoto G (2002) Key amino acids for differential coupling of α_1 -adrenergic receptor subtypes to Gs. *Biochem Biophys Res Commun* 299:142-147.
- Silva CO, Monteiro-Filho WO, Duarte GP, Lahlou S (2001) Effects of long-term pretreatment with isoproterenol on inotropic responsiveness to α -adrenoceptor stimulation: study in isolated perfused rat hearts. *J Pharm Pharmacol* 53:233-242.
- Simpson PC: The α_1 -adrenergic Receptors: Lessons from Knockouts. In: Perez DM (Ed): *The adrenergic Receptors: in the 21st Century*. Humana Press Inc., Totowa, 2006, pp. 207-240.
- Sjaastad I, Schiander I, Sjetnan A, Qvigstad E, Bøkenes J, Sandnes D, Osnes J, Sejersted OM, Skomedal T (2003) Increased contribution of α_1 - vs. β -adrenoceptor-mediated inotropic response in rats with congestive heart failure. *Acta Physiol Scand* 177:449-458.
- Skomedal T, Aass H, Osnes J (1984) Specific binding of [3 H]prazosin to myocardial cells isolated from adult rats. *Biochem Pharmacol* 33:1897-1906.

- Skomedal T, Borthne K, Aass H, Geiran O, Osnes J (1997) Comparison between alpha-1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 280:721-729.
- Steinfath M, Chen Y, Lavický J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H (1992) Cardiac α_1 -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* 107:185-188.
- Steinfath M, Danielsen W, von der Leyen H, Mende U, Meyer W, Neumann J, Nose M, Reich T, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmar P, Haverich A (1992) Reduced α_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in human end-stage heart failure. *Br J Pharmacol* 105:463-469.
- Stengl M, Mubagwa K, Carmeliet E, Flameng W (1998) Phenylephrine-induced stimulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 38:703-710.
- Summers RJ, McMartin LR (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60:10-23.
- Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Muramatsu I (2004) Alpha-1 adrenoceptors: evaluation of receptor subtype-binding kinetics in intact arterial tissues and comparison with membrane binding. *Br J Pharmacol* 141:468-476.
- Taniguchi T, Inagaki R, Murata S, Akiba I, Muramatsu I (1999) Microphysiometric analysis of human α_{1a} -adrenoceptor expressed in chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 127:962-968.
- Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, Frati G, Guelfi D, Trimarco V, Mulvany MJ, Agabiti-Rosei E, Trimarco B, Cotecchia S, Lembo G (2002) Cardiovascular influences of α_{1b} -adrenergic receptor defect in mice. *Circulation* 105:1700-1707.
- Wagner J, Brodde O (1978) On the presence and distribution of α -adrenoceptors in the heart of various mammalian species. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 302:239-254.
- Walker S (1996) An EM algorithm for nonlinear random effects models. *Biometrics* 52:934-944.
- Wang G, McCloskey DT, Turcato S, Swigart PM, Simpson PC, Baker AJ (2006) Contrasting inotropic responses to α_1 -adrenergic receptor stimulation in left versus right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2013-H2017.
- Weiss M (2011) Functional characterization of drug uptake and metabolism in the heart. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:1295-1306.
- Weiss M, Hassna R, Sermsappasuk P, Bednarek T (2009) Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of the effect of propofol on α_1 -adrenoceptor-mediated positive inotropy in rat heart. *Eur J Pharm Sci* 38:389-394.
- Wenham D, Rahmatullah RJ, Rahmatullah M, Hansen CA, Robishaw JD (1997) Differential coupling of α_1 -adrenoreceptor subtypes to phospholipase C and mitogen activated protein kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 339:77-86.
- White M, Fournay A, Mikes E, Leenen FH (1999) Effects of age and hypertension on cardiac responses to the α_1 -agonist phenylephrine in humans. *Am J Hypertens* 12:151-158.
- Wier WG, Balke CW (1999) Ca^{2+} release mechanisms, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res* 85:770-776.
- Williamson AP, Seifen E, Lindemann JP, Kennedy RH (1994) Effects of WB4101 and chloroethylclonidine on the positive and negative inotropic actions of phenylephrine in rat cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1174-1182.
- Wist AD, Berger SI, Iyengar R (2009) Systems pharmacology and genome medicine: a future perspective. *Genome Med* 1:1-9.

- Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Jeffries WB, Scofield MA (1998) Distribution of α_1 -adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J Cardiovasc Pharm* 32:117-122.
- Wright CD, Chen Q, Baye NL, Huang Y, Healy CL, Kasinathan S, O'Connell TD (2008) Nuclear α_1 -adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes. *Circ Res* 103:992-1000.
- Wright CD, Wu SC, Dahl EF, Sazama AJ, O'Connell TD (2012) Nuclear localization drives α_1 -adrenergic receptor oligomerization and signaling in cardiac myocytes. *Cell Signal* 24:794-802.
- Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of G_q family. *J Biol Chem* 267:25798-25802.
- Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG (1999) Recent advances in cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ Res* 85:1092-1100.
- Xiao R, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q (2006) Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* 27:330-337.
- Xu N, Liang Z, Xu M, Guan Y, He Q, Han Q, Zhao X, Zhang Y (2007) Real-time detection of α_{1A} -AR movement stimulated by phenylephrine in single living cells. *Acta Pharmacol Sin* 28:796-802.
- Yamada S, Yamamura HI, Roeske WR (1980) Characterization of alpha-1 adrenergic receptors in the heart using [3 H]WB4101: effect of 6-hydroxydopamine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 215:176-185.
- Yokoyama H, Yasutake M, Avkiran M (1998) α_1 -Adrenergic stimulation of sarcolemmal Na^+ - H^+ exchanger activity in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 82:1078-1085.
- Zhang H, Cotecchia S, Thomas SA, Tanoue A, Tsujimoto G, Faber JE (2004) Gene deletion of dopamine β -hydroxylase and α_1 -adrenoceptors demonstrates involvement of catecholamines in vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2106-H2114.
- Zhang L, Taniguchi T, Tanaka T, Shinozuka K, Kunitomo M, Nishiyama M, Kamata K, Muramatsu I (2002) Alpha-1 adrenoceptor up-regulation induced by prazosin but not KMD-3213 or reserpine in rats. *Br J Pharmacol* 135:1757-1764.
- Zhang L, Pfister M, Meibohm B (2008) Concepts and challenges in quantitative pharmacology and model-based drug development. *AAPS J* 10:552-559.
- Zhang L, Sinha V, Forgue ST, Callies S, Ni L, Peck R, Allerheiligen SB (2006) Model-based drug development: the road to quantitative pharmacology. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 33:369-393.
- Zink R, Heiny O, Steiert H: Bedienungsanleitung für die Versuchs-Apparatur Isoliertes Herz Größe 3 Typ 830. Version 1.3. HSE Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, 2007, S. 6-16.

8. Thesen

1. Die kinetische Modellierung der Rezeptor-vermittelten Pharmakokinetik und Pharmakodynamik am isoliert perfundierten Rattenherzen liefert quantitative Informationen über den Einfluss experimenteller pathophysiologischer Zustände auf Parameter der Rezeptorbindung und des Signaltransduktionsprozesses.
2. Für die Untersuchung kardialer α_1 -Adrenozeptoren mit dieser Methode ist Prazosin ein geeigneter Ligand, da Prazosin eine hohe spezifische Bindung aufweist.
3. Die einstündigen Infusionen von 12,3 μM Phenylephrin- bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ M Isoprenalin-Lösung führten zu geringen Änderungen der Rezeptoraffinitäten, aber zu keinen signifikanten Parameteränderungen, die die Vermutung einer Rezeptordesensitivierung stützen würden.
4. Die 20-minütige partielle Hypoxie beeinflusste nur den Signaltransduktionsprozess; es kam zu einer Reduktion der maximalen am System möglichen inotropen Wirkung, die durch α_1 -Adrenozeptoren induzierbar ist.
5. Bei der Isoprenalin-induzierten Myokardhypertrophie kam es trotz einer signifikanten Abnahme der Rezeptordichte, aufgrund einer verbesserten Transducer-Funktion (Zunahme des maximal erreichbaren Effekts), zu einer Erhöhung des durch α_1 -Adrenozeptoren vermittelten positiv inotropen Effekts.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petra Arendt

Anschrift: Höhenstrasse Ost 67
4600 Olten
Schweiz

Geburtsdatum: 9. Juli 1986

Geburtsort: Halle (Saale)

Familienstand: ledig

Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulische Ausbildung

09/1997 – 07/2006 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium
"Georg Cantor", Halle
Abschluss: Abitur mit der Note „sehr gut“ (1,0)

Hochschulausbildung

10/2006 – 11/2012 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Abschluss mit der Note „sehr gut“ (1,5)

Praktische Erfahrung

Praktisches Jahr:

08/2011 – 12/2011 Innere Medizin am Spital Uster, Schweiz
12/2011 – 03/2012 Augenheilkunde am Universitätsklinikum, Halle
03/2012 – 07/2012 Chirurgie am Helios Klinikum, Sangerhausen

Beruflicher Werdegang:

ab 04/2013 Assistenzärztin für Ophthalmologie, Pallas Klinik Olten, Schweiz

Halle, den 21.02.2013

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 21.02.2013

Petra Arendt

Erklärung über vorherige Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 21.02.2013

Petra Arendt

Danksagung

Herrn Prof. Weiss danke ich für die Ermöglichung der Promotion sowie für seine konstruktive Kritik und die gute Zusammenarbeit.

Ebenso gilt mein Dank dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Neumann sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Günther, Frau Niebisch und Susann Elitzer für ihre Hilfsbereitschaft und ihren stetigen Zuspruch sowie bei Tobias Bednarek und Rana Hassna für die Hilfe bei der Einarbeitung in die experimentelle Methode bedanken.

Weiterhin danke ich meinen Freunden und meiner Familie dafür, dass sie mich immer unterstützt und motiviert haben.