

Aus dem Gustav-Emden-Zentrum der Biologischen Chemie
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

**UNTERSUCHUNG VON KARDIALEN NEBENWIRKUNGEN DES
BETA-SYMPATHOMIMETIKUMS TERBUTALIN AM ISOLIERTEN
RATTENHERZEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Fabian Treusch
aus Heidelberg

Frankfurt am Main, 1998

Dekan: Prof. Dr. med. G. von Jagow
Referent: Prof. Dr. med. U. Brandt
Koreferent: PD Dr. med. S. Hader

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.1999

Meinen Eltern
Dr. med. Hannes Treusch
und
Hildegard Treusch

in großer Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Teil A Einleitung

A.1 Chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen.....	1
A.1.1 Chronische Bronchitis.....	1
A.1.2 Obstruktives Lungenemphysem.....	2
A.1.3 Asthma bronchiale.....	3
A.2 Fragestellung.....	5
A.3 Katecholamine.....	5
A.3.1 Biochemische Eigenschaften	6
A.3.2 Funktion im menschlichen Organismus.....	6
A.3.3 Wirkungsmechanismus	8
A.4 Adrenerge Rezeptoren.....	8
A.4.1 Der β -adrenerge Rezeptor.....	9
A.4.2 Der α -adrenerge Rezeptor	12
A.5 Terbutalin.....	12
A.5.1 Pharmakologische Eigenschaften	12
A.5.2 Indikationen zum therapeutischen Einsatz.....	15
A.5.3 Unerwünschte Wirkungen	15
A.5.4 Handelsnamen und Darreichungsformen.....	16
A.6 Mitochondrien	17
A.6.1 Aufbau.....	17
A.6.2 Funktion.....	17
A.6.3 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung.....	18
A.7 Oxidativer Streß	19
A.7.1 Definition	19
A.7.2 Auswirkungen auf den Organismus.....	19
A.7.3 Reoxygenierung.....	20

Teil B Methodik und Materialien

B.1 Einführung	23
B.2 Beschreibung der Versuchsanlage	25
B.2.1 Perfusionsmedium.....	25
B.2.2 Betriebsarten der Versuchsanlage	26
B.3 Versuchsvorbereitung	27
B.3.1 Präparation der Ratte	27
B.3.2 Kanülieren des Herzens.....	27
B.4 Versuchsablauf	28
B.4.1 Phase der Normoxie.....	28
B.4.2 Phase der Hypoxie	28
B.4.3 Phase der Reoxygenierung	29
B.5 Versuchsende.....	29
B.6 Mitochondriale Messungen	30
B.6.1 ATPase.....	30
B.6.2 ATP-Synthese	31
B.6.3 Membranfluidität	31
B.7 Zusatzexperimente.....	31
B.8 Substanzverzeichnis und verwendete Apparaturen	32
B.8.1 Probesubstanz	32
B.8.2 Reagenzien.....	32
B.8.3 Tiere	34
B.8.4 Apparaturen.....	34
B.9 Statistik	35

Teil C Ergebnisse

C.1 Working heart	
C.1.1 Aortenflüsse	37
C.1.2 Herzfrequenzen.....	43
C.1.3 Koronarflüsse.....	47
C.2 Mitochondriale Messungen.....	51
C.2.1 ATPase-Aktivität.....	51
C.2.2 ATP-Synthese-Aktivität.....	53
C.2.3 Membranfluidität	53
C.3 Zusatzexperimente.....	54
C.3.1 Aortenflüsse	54
C.3.2 Koronarflüsse.....	56

Teil D Diskussion

D.1 Einführung	59
D.2 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	59
D.3 Mechanismen der Kardiotoxizität	67
D.4 Fazit	70
Zusammenfassung	73
Literaturverzeichnis.....	77
Anhang.....	87

Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COLD	chronic obstructive lung disease
COLE	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DPH	1,6 Diphenyl,1,3,5 Hexatrien
EGTA	Ethylenglykoltetraazetat
GDP	Guanosindiphosphat
GSH	Glutathionsulfhydryl
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
GTP	Guanosintriphosphat
I	Isoproterenol
i.v.	intravenös
LDH	Laktatdehydrogenase
NA	Noradrenalin
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
p.o.	per os
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	inorganic phosphate (anorganisches Phosphat)
PMK	protonen-motorische Kraft
s.c.	subkutan
SOD	Superoxiddismutase
WHO	World Health Organization

Teil A Einleitung

A.1 Chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen

Für die vorliegende Dissertation wurden die Wirkungen des β_2 -Sympathomimetikums Terbutalin auf das isolierte Rattenherz untersucht. Da Terbutalin therapeutisch vorwiegend gegen chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen eingesetzt wird, soll im folgenden zunächst auf diese Krankheiten eingegangen werden.

Obstruktive Atemwegserkrankungen sind definiert als Erkrankungen der Atemwege, bei denen die Strömungswiderstände der Atemwege durch Verengung des Atemweglumens erhöht sind. Die chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (Synonyme: COLD = chronic obstructive lung disease; COPD = chronic obstructive pulmonary disease) sind die häufigsten Erkrankungen der Atmungsorgane. Die Inzidenz nimmt vom 20. Lebensjahr an bis zum höheren Alter linear zu. Jeder zweite Raucher über 40 Jahre leidet unter einer chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung [34].

A.1.1 Chronische Bronchitis

Allgemeines

Von einer chronischen Bronchitis spricht man, definitionsgemäß (WHO), wenn bei einem Patienten in zwei aufeinander folgenden Jahren während mindestens drei Monaten pro Jahr ein produktiver Husten (mit Auswurf) bestand. Die chronische Bronchitis ist die häufigste Lungenerkrankung. Sie kommt bei Männern dreimal häufiger vor als bei Frauen. Ätiologisch spielen exogene und endogene Faktoren eine Rolle. Zu den exogenen Faktoren zählen in erster Linie das Zigarettenrauchen, Umweltbedingungen wie Luftverschmutzung und ein feuchtkaltes Klima und das Sinobrochiale Syndrom. 90% aller Bronchitiker sind Raucher oder Exraucher [34]. Zu den endogenen Faktoren zählen Antikörpermangelsyndrome, der α_1 -Proteaseninhibitor-Mangel und die primär ziliäre Dyskinesie.

Die chronische Bronchitis entwickelt sich in drei Stufen:

1. Reversible chronische nicht obstruktive Bronchitis

2. Chronisch obstruktive Bronchitis mit Belastungsdyspneu und Leistungsabfall
3. Spätkomplikationen wie obstruktives Emphysem und Cor pulmonale

Therapie

In der Therapie spielt neben der Ausschaltung von Noxen (Nikotin) und der Behandlung vorhandener Infektquellen die von der Deutschen Atemwegsliga vorgegebene 3-Stufentherapie der chronischen Bronchitis eine große Rolle:

- I. Bedarfsweise Inhalation kurz wirksamer β_2 -Sympathomimetika
- II. Zusätzlich ein Theophyllin-Retardpräparat
- III. Zusätzlich orale Glukokortikoide

A.1.2 Obstruktives Lungenemphysem

Allgemeines

Das Lungenemphysem ist eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales infolge Destruktion ihrer Wand. Die Prävalenz beträgt 5%. Männer leiden darunter häufiger als Frauen [34].

Pathogenetisch kommen folgende Ursachen in Frage [34, 64]:

- Verstärkte Granulozyten-Proteasenaktivität durch Infekte, Pneumonien und chronische Bronchitis
- Verminderte Aktivität der α_1 -Proteaseninhibitoren, die entweder angeboren oder erworben sein kann. Für den erworbenen α_1 -Proteaseninhibitor-Mangel sind in erster Linie Oxidanzien des Zigarettenrauchens verantwortlich.
- Obstruktive Ventilationsstörungen mit expiratorischer Einengung der Bronchien. Dazu gehören der altersbedingte Elastizitätsverlust des Lungenparenchyms sowie der Bronchospasmus im Rahmen chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und chronische Bronchitis.
- Pulmonale Hypertonie und Cor pulmonale

Therapie

Therapeutisch wird neben der Meidung exogener Noxen und der Behandlung bronchopulmonaler Infekte ebenfalls die bei der chronischen Bronchitis erwähnte 3-Stufentherapie angewendet (s. A.1.1).

A.1.3 Asthma bronchiale

Allgemeines

Das Asthma bronchiale ist eine reversible Atemwegsstörung, die Folge einer Entzündung oder bronchialer Hyperreaktivität ist. Die Prävalenz beträgt bei Kindern 7-10%, bei Erwachsenen 5%. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen [34].

Ätiologisch unterscheidet man das allergische Asthma (= extrinsic asthma) vom nichtallergischen Asthma (= intrinsic asthma) sowie Mischformen aus beiden. Ferner spielen in der Ätiologie genetische Faktoren eine große Rolle.

Das Asthma bronchiale gehört mit der allergischen Rhinitis und der Neurodermitis zu den sogenannten atopischen Krankheiten, die durch eine autosomal-dominant vererbte Anlage zur überschießenden IgE-Bildung gekennzeichnet sind. Leidet ein Elternteil an einer dieser Krankheiten, findet sich bei den Kindern in 20-25% der Fälle ebenfalls eine atopische Erkrankung. Bei zwei kranken Elternteilen sind die Kinder in 40-50% der Fälle Atopiker [34].

Des Weiteren kommen für die Entstehung des nichtallergischen Asthma Infektionen, Staub, kalte Luft, gastroösophagealer Reflux, körperliche Anstrengung sowie die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika in Frage.

Typisch für das Asthma bronchiale ist eine anfallsweise Atemnot. Bezüglich der Anfallshäufigkeit unterscheidet die Deutsche Atemwegsliga drei Schweregrade (Tab. 1).

Schweregrad	Anfallshäufigkeit
1	häufiger als 3x pro Woche
2	mehrfach täglich und nachts
3	ständig

Tab. 1 Asthmaschweregrade

Therapie

Kausal wird das allergische Asthma bronchiale durch Allergenkarenz oder Hyposensibilisierung, das nichtallergische durch die Therapie respiratorischer Infekte, oft vorhandener Sinusitiden und gastroösophagealen Refluxes behandelt.

Symptomatisch wird mit folgendem von der Deutschen Atemwegsliga festgelegten 3-Stufenschema therapiert [76]:

- I.
 - Inhalation topischer Steroide in mittlerer Dosis
 - Bedarfsweise Inhalation kurzwirksamer β_2 -Sympathomimetika
- II.
 - Inhalation topischer Steroide in höherer Dosis
 - Bedarfsweise Inhalation kurzwirksamer β_2 -Sympathomimetika
 - Zusätzlich orale, retardierte Theophyllinpräparate und langwirksame β_2 -Sympathomimetika
- III.
 - Zusätzlich orale Glukokortikoide

Dieses Stufenschema soll jedoch nur eine therapeutische Orientierungshilfe sein. In jedem Fall muß die Asthmatherapie individuell dem Patienten angepaßt und optimiert sein.

A.2 Fragestellung

Verschiedene β -sympathomimetische Substanzen zur Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen sind derzeit im therapeutischen Einsatz.

Kardiale Nebenwirkungen wie Arrhythmien und Tachykardien gehören zu den wichtigsten unerwünschten Effekten dieser Substanzen. Von den Substanzen Fenoterol und Terbutalin wird sogar angenommen, daß sie zu einem erhöhten Todesrisiko beitragen, welches nicht über arrhythmogene Effekte vermittelt wird [12]. Mit dieser Arbeit sollten die unerwünschten kardialen Wirkungen des Beta-Agonisten Terbutalin, der schon lange therapeutisch eingesetzt wird, untersucht werden. Dazu wurde ein isoliertes Rattenherz unter der Versuchsanordnung des 'working rat heart' (s. Methodikteil **B**) mit einem modifizierten Krebs-Henseleit Puffer perfundiert, während sein aortaler Auswurf dokumentiert wurde. Um ein chronisch hypoxiegeschädigtes Herz eines obstruktiv Lungenkranken zu simulieren, wurde das Herz durch eine fünfzig minütige Hypoxiephase belastet.

Während dieser Hypoxiephase wurde dem Puffer Terbutalin in verschiedenen Dosierungen zugefügt. Nach Ablauf der fünfzig Minuten folgte eine Reoxygenierungsphase. Der aortale Auswurf der mit Terbutalin behandelten Herzen wurde dem Auswurf der nur durch Hypoxie geschädigten Herzen (Kontrolle) gegenübergestellt.

Anschließend wurden die Mitochondrien der Herzmuskelzellen isoliert und deren Membranfluidität, ATP-Synthese- und ATPase-Aktivitäten gemessen, um Informationen über das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung zu erhalten.

Zusätzlich wurden Experimente ohne Hypoxiephase durchgeführt, um die alleinige Wirkung von Terbutalin auf das Herz zu untersuchen.

A.3 Katecholamine

Als Katecholamine werden die physiologisch im menschlichen Körper vorkommenden Hormone Adrenalin und Noradrenalin bezeichnet. Noradrenalin wirkt im Gegensatz zum Adrenalin nicht nur als im Blutkreislauf vorkommendes Hormon, sondern vor allem auch als Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems.

A.3.1 Biochemische Eigenschaften

Chemische Strukturformeln

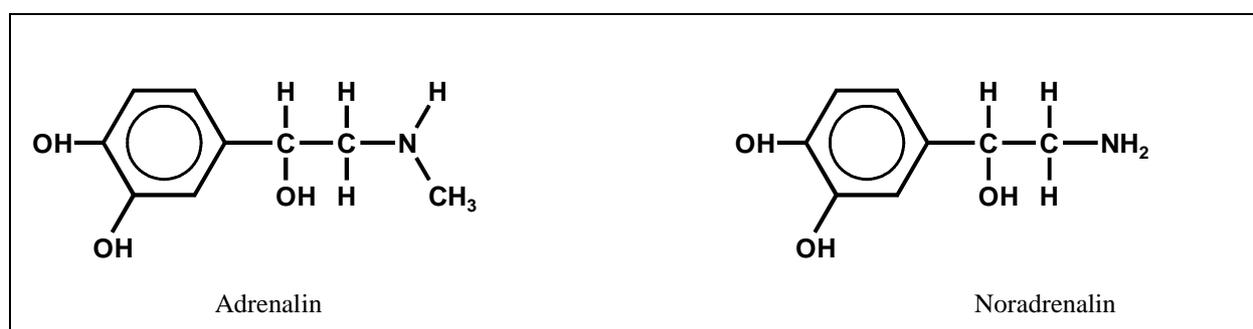


Abb. 1 Adrenalin und Noradrenalin

Synthese

Hauptsyntheseort für die Katecholamine sind die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, wo Adrenalin und Noradrenalin im Verhältnis 4:1 produziert werden [65, 66]. Ausgangsstoff für die Katecholaminsynthese ist das Tyrosin. Über Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und Dopamin entsteht Noradrenalin, das dann zu Adrenalin methyliert werden kann.

Abbau

Die Inaktivierung der beiden Hormone erfolgt durch biochemischen Abbau. Vor allem in Leber und Niere werden die Katecholamine in das Hauptendprodukt Vanillinmandelsäure umgewandelt. Die Ausscheidung der Vanillinmandelsäure geschieht über den Urin, wo sie zu diagnostischen Zwecken bestimmt werden kann.

A.3.2 Funktion im menschlichen Organismus

Im Blut zirkulierendes Adrenalin stammt allein aus dem Nebennierenmark, während zirkulierendes Noradrenalin aus dem Nebennierenmark und vor allem aus sympathischen Nervenendigungen stammt. Noradrenalin wirkt somit sowohl als Neurotransmitter als auch als Hormon. Aus diesem Grund kommt Noradrenalin im Ruhezustand in zwei- bis dreifach höherer Konzentration im Blut vor als Adrenalin [65, 68].

Emotionale Erregung (Streß) und motorische Aktivität (körperliche Arbeit) sind die wesentlichen Reize, die zur Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn führen. Ferner führt eine Hypoglykämie zu selektiver Adrenalinfreisetzung. Leichte körperliche Arbeit führt zunächst nur zu einer Erhöhung des Noradrenalinspiegels infolge der gesteigerten sympathisch gesteuerten Herzleistung. Erst bei schwererer Arbeit wird auch der Adrenalinspiegel erhöht.

Eine Erhöhung der Katecholaminkonzentration im Blut hat Auswirkungen auf den Stoffwechsel, das Herz-Kreislaufsystem und den Respirationstrakt (Tab. 2 u. 3).

	Prozeß	Wirkung	Rezeptor
Glukose	Glukogenolyse (Leber+Muskulatur)	↑	$\alpha+\beta_2>\beta_1$
	Glukoneogenese (Leber)	↑	$\alpha+\beta_2$ (Spezies-abhängig)
Lipide	Lipolyse (Fettgewebe)	↑	$\beta_2(\beta_3)>\beta_1$
		↓	α_2
Hormone	Insulinsekretion	↑	$\beta_2>\beta_1$
		↓	α_2
	Reninsekretion	↑	β_1

Tab. 2 Auswirkungen der Katecholamine auf den Stoffwechsel [19, 65, 68]

	Prozeß	Wirkung	Rezeptor
Herz	Frequenz	pos. chronotrop	β_1
	Kontraktilität	pos. inotrop	β_1
	Erregungsgeschwindigkeit	pos. dromotrop	β_1
	Erregbarkeitsschwelle	pos. bathmotrop	β_1
	Spannungsentwicklung	pos. klinotrop	β_1
Gefäße	Konstriktion	--	$\alpha_1 + \alpha_2$
	Dilatation	--	$\beta_2 > \beta_1$
Bronchien	Konstriktion	--	α_1
	Dilatation	--	$\beta_2 > \beta_1$

Tab. 3 Wirkungen der Katecholamine auf Herz, Gefäße und Bronchien [19, 65, 68]

A.3.3 Wirkungsmechanismus

Die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin sind sogenannte ‚erste Boten‘, die ihre Wirkung über adrenerge Membranrezeptoren indirekt entfalten (s. A.4.1).

Nach Bindung an den Rezeptor führen intrazelluläre ‚zweite Boten‘ (sog. second messenger) zu einer spezifischen Wirkung wie die Aktivierung von Proteinkinasen oder die Regulierung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Man unterscheidet α - und β -Rezeptoren (s. A.4), die wiederum je nach Lokalisation und Funktion in α_1 , α_2 , β_1 , β_2 und β_3 unterteilt werden (Tab. 2. 8). Noradrenalin hat eine größere Affinität zu α -Rezeptoren, während Adrenalin leichter an β -Rezeptoren bindet.

A.4 Adrenerge Rezeptoren

Je nach ihrer Empfindlichkeit auf die drei Substanzen Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und das nicht physiologisch vorkommende Isoproterenol (I) werden α - und β -adrenerge Rezeptoren unterschieden. Man spricht von α -adrenergen Rezeptoren, wenn jede der Substanzen in der folgenden Reihenfolge abnehmende Wirksamkeit zeigen: $NA \geq A > I$. An β -adrenergen Rezeptoren zeigen die Substanzen in der Reihenfolge $I > A \geq NA$ abnehmende Wirkung.

Da es sich bei Terbutalin um einen fast reinen β -Agonisten handelt, sollen im folgenden in erster Linie die β -Rezeptoren beschrieben werden. Die Affinität von Terbutalin zu α -Rezeptoren besitzt keine therapeutische Relevanz [25].

A.4.1 Der β -adrenerge Rezeptor

β_1 - und β_2 -Rezeptoren

Wie oben beschrieben ist die Affinität von Noradrenalin zum β -adrenergen Rezeptor gering im Vergleich zu Adrenalin und Isoproterenol. Dennoch zeigt sich ein großer Unterschied in der Wirksamkeit von Noradrenalin am β -Rezeptor hinsichtlich der Lokalisation des Rezeptors. So werden die β -Rezeptoren des Herzmuskels sehr stark aktiviert im Vergleich zu denjenigen der glatten Gefäßmuskulatur und der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien [65]. Die β -Rezeptoren des Herzmuskels werden daher als β_1 und die β -Rezeptoren der Gefäße und Bronchien als β_2 bezeichnet. Des Weiteren spricht man im Fettgewebe von β_3 -Rezeptoren. Terbutalin gilt als relativ spezifischer β_2 -Agonist, das heißt, seine Wirkung auf β_2 -Rezeptoren ist sehr viel größer als auf kardiale β_1 -Rezeptoren.

Struktur

Der β -Rezeptor ist ein Protein, welches in der doppelipidschichtigen Zellmembran lokalisiert ist (Abb. 2). Bezüglich seiner Quartärstruktur besteht das Rezeptorprotein aus sieben intramembranösen α -helixförmigen Domänen (I-VII), welche durch zytoplasmatische und extrazelluläre Peptidschleifen untereinander verbunden sind [17]. Auf der extrazellulären Seite sind die Domänen II und III, IV und V und VI und VII durch Peptidschleifen verbunden.

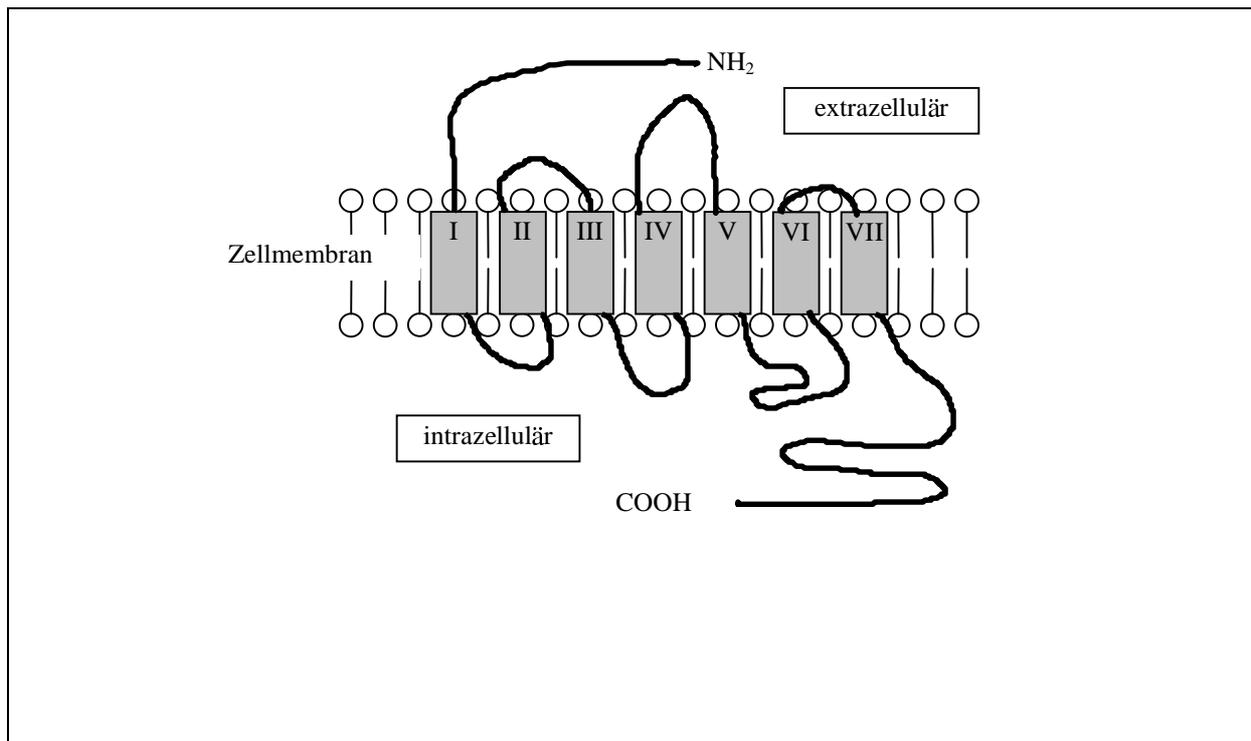


Abb. 2 Schematische Struktur des β -adrenergen Rezeptors [17]

Auf der intrazellulären Seite befinden sich Peptidschleifen zwischen den Domänen I und II, III und IV und V und VI. Das N-terminale Ende des Rezeptorproteins erstreckt sich in einer Peptidkette von der Domäne I auf die extrazelluläre Seite.

Entsprechend erstreckt sich das C-terminale Ende von der Domäne VII ins Zellinnere. Phosphorylierungsreaktionen der C-terminalen Peptidkette sollen eine Rolle bei dem Prozeß der Rezeptorsensibilisierung spielen [17]. Durch die Anordnung der sieben Domänen in der Zellmembran entsteht eine ‚Tasche‘, in der wahrscheinlich die Bindung

des spezifischen Liganden stattfindet. Die extrazellulären Peptidschleifen sind in den Ligandenbindungsprozeß nicht mit einbezogen.

Funktion

Die β -adrenergen Rezeptoren sind, im Gegensatz zu den beispielsweise intrazellulären Steroidrezeptoren, Membranrezeptoren. Der spezifische Ligand, der sogenannte ‚second messenger‘, bindet an den Rezeptor, woraufhin ein intrazellulärer ‚second messenger‘ die eigentliche Wirkung erzielt [19, 65, 68].

Im Falle der β -Rezeptoren ist zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) der ‚second messenger‘.

Für eine cAMP-vermittelte Zellantwort muß in der Zielzelle neben dem Rezeptor sogenannte Guanylnukleotid-regulatorische Proteine (G-Proteine) enthalten. Es gibt stimulierende und inhibierende G-Proteine (G_s - bzw. G_i -Proteine).

Die G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β und γ). Im Ruhezustand ist an die α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Reagiert nun ein spezifischer Ligand mit dem Rezeptor, bindet der Ligand-Rezeptor-Komplex an den G-Protein-GDP-Komplex. Dies hat ein Ersetzen des GDP durch zytosolisches Guanosintriphosphat (GTP) und ein Abspalten sowohl der β - und γ -Untereinheiten als auch des Ligand-Rezeptor-Komplexes zur Folge. Der übrigbleibende α -GTP-Komplex bewirkt nun eine Aktivierung (α_s) beziehungsweise eine Hemmung (α_i) der Adenylatzyklase in Abhängigkeit davon, ob es sich um ein G_s - oder ein G_i -Protein handelt. Die Adenylatzyklase wandelt zytosolisches ATP in den ‚second messenger‘ cAMP um.

Das cAMP wiederum aktiviert die Phosphokinase A, mit deren Hilfe Proteine (Enzyme oder Membranrezeptoren) phosphoryliert werden, wodurch deren Aktivitätszustand reguliert wird.

Durch eine Phosphodiesterase wird das cAMP in 5'-AMP umgewandelt und damit inaktiviert.

Das α -GTP wird durch die GTPase in α -GDP zurückverwandelt, welches sich dann wieder mit den β - und γ -Untereinheiten zu G-GDP vereinigt.

β -Sympathomimetika

β -Sympathomimetika sind synthetisch hergestellte Stoffe, die spezifisch am β -Rezeptor wirken. Therapeutisch eingesetzt werden diese Stoffe vor allem bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (s. A.1), teilweise auch zur Tokolyse. Um über β_1 -Rezeptoren ermittelte unerwünschte Wirkungen am Herzen zu minimieren, werden sogenannte β_2 -selektive Sympathomimetika eingesetzt. Eine vollständige β_2 -Selektivität wird jedoch nicht erreicht. Häufig verwendete β_2 -Agonisten sind: Isoproterenol, Fenoterol, Reproterol, Terbutalin, Salbutamol und Formoterol.

A.4.2 Der α -adrenerge Rezeptor

Die α -adrenergen Rezeptoren werden an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber genannt. Sie sind jedoch nicht relevantes Thema dieser Dissertation. Es werden α_1 - und α_2 -Rezeptoren unterschieden, wobei

Inositoltrisphosphat beziehungsweise cAMP als ‚second messenger‘ fungieren. Auch bei den α -Rezeptoren werden die ‚zweiten Boten‘ über G-Proteine gesteuert [65, 68].

A.5 Terbutalin

A.5.1 Pharmakologische Eigenschaften

Chemische Strukturformel

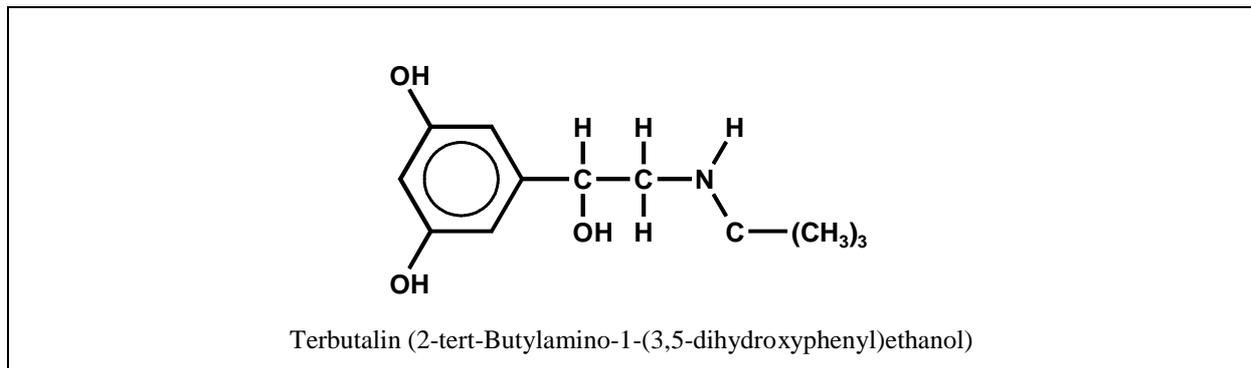


Abb. 3 Terbutalin

Pharmakodynamische Eigenschaften

Terbutalin wurde erstmals Mitte der 60er Jahre von den Chemikern Lands et al. synthetisiert [56]. Es ist ein reines β -Sympathomimetikum mit relativ größerer Affinität zum β_2 -Rezeptor (Bronchien, Gefäße, Uterus) als zum β_1 -Rezeptor (Herz). Im Vergleich zu anderen β_2 -Mimetika (Fenoterol, Salbutamol) ist die β_2 -Selektivität relativ hoch [25].

Auf der Stimulation von β_2 -Rezeptoren und damit verbundenen Relaxation glatter Muskelzellen beruht die bronchospasmolytische Wirkung von Terbutalin. Aufgrund der zwei OH-Gruppen am Benzolring (Abb. 3) ist Terbutalin relativ gut wasserlöslich, wodurch die im Vergleich zu Salbutamol (12 Stunden oder mehr) kurze Wirkdauer (4-6 Stunden) zu erklären ist [43]. In der therapeutischen Anwendung wird Terbutalin als Terbutalinsulfat verabreicht.

Tabelle 4 zeigt einige weitere chemische und physikalische Eigenschaften von Terbutalin.

Molmasse	225,287 g/mol
pK-Wert	8,7
Schmelzpunkt der Base	120°C
Schmelzpunkt der Säure	247°C

Tab. 4 Chemische und physikalische

Eigenschaften von Terbutalin [60]

Pharmakokinetische Eigenschaften [43, 60]

Terbutalinsulfat kann therapeutisch subkutan, per os oder als Dosieraerosol verabreicht werden.

Nach Subkutangabe wird Terbutalin vollständig resorbiert. Nach oraler Gabe werden etwa 50% einer Dosis resorbiert. 80% davon unterliegen einem first-pass-Metabolismus in Darmmukosa und Leber, so daß die orale Bioverfügbarkeit nur etwa 10% beträgt. Nach Gabe als Dosieraerosol werden etwa 10% in der Lunge zurückgehalten. Der größte Teil wird geschluckt und gastrointestinal resorbiert.

Maximale Plasmaspiegel treten bei s.c.-Gabe nach 15 Minuten, bei oraler Anwendung nach 2-3 Stunden auf. Die Plasmaproteinbindung beträgt um 20%.

Bezüglich Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer gibt Tabelle 5 Aufschluß.

	Wirkungs- maximum [min.]	Wirkungs- dauer [h]
s.c.-Gabe	30-60	1,5-4
p.o.-Gabe	60-120	4-8
Dosieraerosol	15-30	4-8

Tab. 5 Wirkungsmaximum und Wirkdauer [60]

Teilweise wird Terbutalin in der Leber metabolisiert und inaktiviert. Nach oraler Gabe werden etwa 60% unverändert über den Urin, 3% über die Galle in die Fäzes und der Rest konjugiert in den Urin ausgeschieden. Nach 72-96 Stunden ist die Ausscheidung von Terbutalinsulfat und seiner Metabolite abgeschlossen.

In Tabelle 6 sind die pharmakokinetischen Eigenschaften von Terbutalin im menschlichen Organismus nochmals kurz zusammengefaßt.

Bioverfügbarkeit (oral)	14%
Bioverfügbarkeit (s.c.)	100%
Clearance	14,4 l/h/70 kg
Effektive Konzentration	2,3 ng/ml
Plasmahalbwertszeit	3,5 h
Plasmaproteinbindung	20%
Renale Elimination	56%
Verteilungsvolumen	125 l/h/70 kg

Tab. 6 Pharmakokinetische Eigenschaften [43]

Dosierung

Terbutalinsulfat wird subkutan (s.c.), oral (p.o.) und als Dosieraerosol verabreicht. In Tabelle 7 sind die

Tagesdosierungen für Kinder und Erwachsene bei unterschiedlichen Verabreichungsformen dargestellt.

	Kinder	Erwachsene
s.c.-Gabe	0,0035-0,005 mg/kg KG	0,25 mg
p.o.-Gabe	3x2,5 mg (max. 7,5 mg)	3x5 mg
Dosieraerosol	1-2 Hübe (max. 6 Hübe)	2 Hübe (ca. 0,4 mg) in zwei- minütigem Abstand alle 4-6 h

Tab. 7 Tagesdosierungen [43, 60]

A.5.2 Indikationen zum therapeutischen Einsatz

Terbutalin hat in Form von Terbutalinsulfat folgende therapeutische Indikationen:

- Obstruktive Lungenerkrankungen
 - Chronisch obstruktive Bronchitis
 - Obstruktives Lungenemphysem
 - Asthma bronchiale
- vorzeitige Wehen

A.5.3 Unerwünschte Wirkungen

Folgende unerwünschte Wirkungen von Terbutalin wurden beobachtet [60]:

- Tachykardie
- geringe Blutdrucksenkung
- in Einzelfällen pektanginöse Beschwerden

- häufig feinschlägiger Muskelzittern, der im Laufe der Behandlung abnimmt
- Nervosität
- Unruhe
- Schlaflosigkeit
- Schwindel
- Kopfschmerzen
- Schläfrigkeit
- Hautrötungen
- Schwitzen
- Übelkeit
- Erbrechen
- selten Bronchospasmus (nach Langzeittherapie)
- Hyperglykämie
- Insulinausschüttung (=> Senkung des Serumkaliumspiegels)

A.5.4 Handelsnamen und Darreichungsformen

Unter folgenden Handelsnamen beziehungsweise Darreichungsformen ist Terbutalin in Deutschland erhältlich [9]:

Handelsname (®)	Darreichungsform	Hersteller
Aerodur Turbohaler	Dosieraerosol	Pharma-stern
Arubendol	Tabletten	Isis Pharma
Asthmo-Kranit mono	Retardkapseln	Krewel Meuselbach
Asthmoprotect	Retardkapseln, Tabletten	Azupharma
Bricanyl	Injektionslösung, Inhalationslösung, Dosieraerosol, Retardtabletten, Elixier	Pharma-stern
Butaliret	Retardkapseln	Fatol
Butalitalb	Tabletten, Retardkapseln	Fatol
Contimit	Dosieraerosol, Retardkapseln, Tabletten	Lindopharm
Terbul	Tabletten, Retardkapseln	Hexal
Terbutalin	Tabletten, Retardkapseln	Trommsdorff
Terbutalin Mundipharma	Retardkapseln	Mundipharma
Terbutalin	Tabletten	Ratiopharm

Terbutalin	Retardkapseln	ct
Terbutalin Stada	Retardkapseln	Stada
Terbuturmant	Retardkapseln	Desitin

Tab. 8 Terbutalin im Handel (nach ‚Rote Liste 1996‘)

A.6 Mitochondrien

A.6.1 Aufbau [17,47]

Die Mitochondrien sind 1-5µm lange Zellorganellen, die von einer zweifachen Membran umgeben sind. Vor allem in energieverbrauchenden Zellen wie Herzmuskelzellen und Epithelzellen der Nierentubuli kommen sie vermehrt vor. Die Zweifachmembran unterteilt das Mitochondrium in einen inneren Matrixraum und in einen schmalen intermembranösen Raum. Beide Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht.

Die äußere Membran ist permeabel und dient dem Schutz des Organells. Die innere Membran ist durch Falten, Röhren und säckchenartige Ausstülpungen stark vergrößert. Man spricht von Cristae, Tubuli und Sacculi. Je nach Aktivität des Mitochondriums vermehren oder verringern sich die Faltungen und Ausstülpungen der inneren Membran. In der inneren Membran sind die Enzymkomplexe der Atmungskette lokalisiert. Die oxidative Phosphorylierung (ATP-Synthese-Reaktion) findet auf der dem Matrixraum zugekehrten Seite der inneren Membran statt.

A.6.2 Funktion [17,47]

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist die Produktion und Bereitstellung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Dies geschieht in der sogenannten oxidativen Phosphorylierung, die den letzten Schritt in der Atmungskette darstellt. Unter A.6.3 wird näher auf diese Prozesse eingegangen.

Des Weiteren finden im Matrixraum katabole Prozesse wie der Zitronensäure-Zyklus und die β -Oxidation statt. Auch in der Kalziumspeicherung liegt eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien.

A.6.3 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Elektronenübertragung

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, die als Elektronencarrier fungieren. Dabei werden Elektronen von NADH oder von Succinat über Reduktion und folgender Oxidation von Ubichinon

(Coenzym Q) und verschiedenen Cytochromen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die jeweiligen Elektronenübertragungen erlaufen stark exergonisch. Die dabei frei werdende Energie wird genutzt um Protonen (H⁺) aus dem Matrixraum in den Intermembranraum zu transportieren. So entsteht zwischen Matrix und Intermembranraum ein pH-Gradient; die Matrix wird alkalisch. Die elektrochemische Energie, die aus dieser Differenz der Protonenkonzentrationen durch Ladungstrennung resultiert, wird protonenmotorische Kraft (PMK) genannt.

ATP-Synthese [17,47]

Die ‚ATP-Synthase‘, der ATP-synthetisierende Enzymkomplex der inneren Mitochondrienmembran, besteht aus zwei Hauptfaktoren: F₀ und F₁. Der F₀-Teil des Enzymkomplexes kann durch Oligomycin wirksam inhibiert werden; daher das tiefgestellte ‚o‘ [47]. Zusammen bilden F₀ und F₁ eine ATP-synthetisierende Einheit. Der F₁-Komplex alleine ist in der Lage, ATP zu ADP und anorganischem Phosphat (P_i) zu hydrolysieren (ATPase). Er besteht wiederum aus fünf Untereinheiten und enthält mehrere Bindungsstellen für ATP und ADP [49]. Über die Wechselwirkung mit F₀ ist der F₁-Komplex an die innere Mitochondrienmembran gebunden. F₀ besteht aus sieben bis neun verschiedenen Polypeptiden, die einen Kanal bilden, durch den Protonen die Membran durchqueren können [49].

Der vollständige F₀F₁-Komplex kann sowohl ATP zu ADP und P_i hydrolysieren als auch aus ADP und P_i energiereiches ATP synthetisieren (‚ATP-Synthase‘).

Durch den in der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten zwischen Intermembranraum und Matrix (s.o.) strömen nun Protonen durch den vom F₀F₁-Komplex gebildeten Protonenkanal in den Matrixraum. Dieser Vorgang liefert die Energie (PMK) für folgende Reaktion:

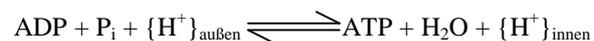


Abb. 4 ATP-Synthese-Reaktion

Der F₀F₁-Komplex kann also je nach Protonengradient sowohl die ATP-Synthese- als auch die ATPase-Reaktion katalysieren. Der genaue Mechanismus der Übertragung der protonenmotorischen Kraft auf den F₀F₁-Komplex ist noch nicht geklärt [47].

A.7 Oxidativer Streß

Da sich im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten auch der Begriff ‚oxidativer Streß‘ anwenden läßt, soll an dieser Stelle kurz erklärend darauf eingegangen werden.

A.7.1 Definition

Physiologischerweise besteht im Organismus ein Gleichgewicht zwischen Prooxidanzien und Antioxidanzien (s. A.7.2). Von oxidativem Streß spricht man definitionsgemäß, wenn dieses Gleichgewicht zugunsten der Prooxidanzien erschoben ist, was sich potentiell schädlich auf Proteine, Lipide sowie Desoxynukleinsäuren auswirken kann [67].

A.7.2 Auswirkungen auf den Organismus

Als Prooxidanzien bezeichnet man vor allem reaktive Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$, das Hydroxylradikal HO^{\cdot} oder das Wasserstoffperoxidmolekül H_2O_2 , die auf unterschiedliche Weise entstehen können.

Beispiele für Entstehungsorte von reaktiven Sauerstoffradikalen sind [5, 67]:

- die Xanthinoxidase aus dem Purinstoffwechsel
- die Cyclooxygenase und Lipoxygenase aus dem Arachidonsäurestoffwechsel
- die mitochondriale Atmungskette (z.B. NADH-Dehydrogenase)
- die Autooxidation von Katecholaminen

Um diese potentiell schädlichen Sauerstoffmetabolite abzufangen, stehen dem Organismus sogenannte Antioxidanzien zur Verfügung [10, 21, 67]:

- die Superoxiddismutase (SOD)
- die Glutathionsysteme (GSH-GSSG)
- Vitamin A- und E-Derivate
- Harnsäure
- Katalasen

In höherer Konzentration, das heißt im Ungleichgewicht mit den Antioxidanzien, können die Prooxidanzien allerdings unter anderem folgende Schäden und Dysfunktionen auf zellulärer und subzellulärer Ebene verursachen:

- *an Membranen:* Lipidperoxydation mit Reduktion der Membranfluidität, was unter anderem zu verändertem Verhalten von Rezeptorproteinen führt [5, 21, 30]
- *am β -Rezeptor:* Hemmung der Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [30]
- *intrazellulär bzw. intramitochondrial:* Kalziumüberladung durch vermehrten Einstrom bzw. durch vermehrte Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, was eine mitochondriale Dysfunktion zur Folge hat [41]

A.7.3 Reoxygenierung

Die Reoxygenierung von über einen gewissen Zeitraum hypoxisch perfundiertem Gewebe ist ein Beispiel für die schädigenden Auswirkungen von oxidativem Streß.

Es ist bekannt, daß es während einer Ischämie sowohl zu Membranpermeabilitätserhöhungen, die einen Einstrom von Na^+ - und Ca^{++} -Ionen ins Zytosol zur Folge haben, als auch zu Schäden am Kalzium speichernden sarkoplasmatischen Retikulum kommt. Die daraus folgende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann in unterschiedlicher Weise Dysfunktionen oder sogar irreversible Schäden an der betroffenen Zelle hervorrufen (s. **D.3**).

Folgt einer ischämischen Phase jedoch eine normoxische Reperfusion (Reoxygenierung), so steigt der Kalziumeinstrom in die Zelle in verstärktem Maße weiter an und führt zu oben beschriebenen irreversiblen mitochondrialen Schäden. Verantwortlich für den verstärkten Ca^{++} -Einstrom während der Reoxygenierung ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen und die daraus folgenden Membranschädigung [1, 2, 16, 20, 21, 22, 41, 61].

Teil B Methodik und Materialien

B.1 Einführung

Um die kardialen Nebenwirkungen von Terbutalin experimentell untersuchen zu können, bietet sich die direkte Perfusion von isolierten Rattenherzen an. Bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus ist die Verwendung von Wistar-Ratten eine allgemein anerkannte Methode.

Bei der Perfusion von isolierten Rattenherzen gibt es einmal die Möglichkeit, das Herz nach Kanülierung der Aorta retrograd zu perfundieren (Langendorff-Methode) [45]. [Um jedoch unterumöglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten, wurde in dieser Arbeit neben der Aorta auch der linke Vorhof kanüliert. Dies ermöglicht eine physiologisch anterograde Perfusion des Herzens (working heart-Methode) [52]. [Auf diese Weise kann neben dem Herzminutenvolumen auch die Perfusion der Herzkranzgefäße quantifiziert werden.

B.2 Beschreibung der Versuchsanlage

B.2.1 Perfusionsmedium

Zur Perfusion des Rattenherzens wurden 2 l eines modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers verwendet, der folgende Zusammensetzung hat:

Substanz	Konz. [μmol]
NaCl	124,0
NaHCO ₃	19,5
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
CaEDTA·2H ₂ O	0,5
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	10,0
CaCl ₂ ·H ₂ O	2,5

Legende zu Abbildung 5

1gefilterter Normoxiepuffer	8Auffanggefäß für Hypoxiepuffer
1aNormoxiepuffer	9Perfusorspritzen für Terbutalin
2Hypoxiepuffer	10justierbarer ‚Windkessel‘
3Pumpe	11130 cm H ₂ O Nachlast
4 Vorlastgefäß (20 cm H ₂ O)	12Aortenfluß
5alinker Vorhof	13Hypoxiedusche
5blinke Kammer	PDruckwandler
6Auffanggefäß für Koronarfluß	FFilter (5 µm)
7Auffanggefäß für Normoxiepuffer	⊕Dreiweghahn

Vor Zugabe des CaCl_2 wurde das Puffergemisch für 3 min. mit Carbogen bzw. Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch begast, um einer Ausfällung vorzubeugen.

Entsprechend den drei Phasen des Experiments wurde der Puffer während der Normoxie und der Reoxygenierung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2), während der Hypoxie mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (95% N_2 , 5% CO_2) begast.

B.2.2 Betriebsarten der Versuchsanlage

Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten Versuchsanlage.

Sie besteht aus 6 doppelwandigen Glasgefäßen (1, 1a, 2, 6, 7, 8), die eine konstante Temperierung des Puffers mittels eines Heizkreislaufs ermöglichen.

Das Rattenherz hängt durch Kanülierung der Lungenvenen (5a) und des Aortastumpfes (5b) im Koronarauffanggefäß (6).

Der zirkulierende Puffer wird während der gesamten Versuchsdauer auf einer Temperatur von $37,0^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von $7,40 \pm 0,05$ gehalten.

Entsprechend den drei Phasen des Experiments, Normoxie, Hypoxie und Reoxygenierung (\cong Normoxie), bestehen zwei Betriebsmöglichkeiten der Anlage.

1) Normoxie bzw. Reoxygenierung (anterograde Perfusion)

Der carbogenbegaste Puffer gelangt vom Auffanggefäß (7) über die Pumpe (3) in das Vorlastgefäß (1a) und von hier wiederum über den Filter F (in das Vorratsgefäß (1)). Der Filter mit einer Porengröße von $5 \mu\text{m}$ soll Koronarembolien durch Gewebestücke oder Blutkoagel verhindern. Über das Vorlastgefäß (4) wird der linke Vorhof mit $20 \text{ cm H}_2\text{O}$ ($\approx 15 \text{ mmHg}$) perfundiert. Der Aortenauswurf (Herzminutenvolumen) kann nach Passage des Windkessels (10) und Überwindung einer $130 \text{ cm H}_2\text{O} \approx 100 \text{ mmHg}$ Nachlast (11) durch eine Volumen-pro-Zeit-Messung (12) bestimmt werden. Ferner kann durch eine Volumen-pro-Zeit-Messung am Koronarflus auffanggefäß (6) die Höhe der Herzkranzgefäßperfusion registriert werden. Über einen Druckwandler (P) kann der systolische und diastolische ‚Blutdruck‘ bestimmt werden.

2) Hypoxie (retrograde Langendorff-Perfusion)

Der N-CO_2 -begaste Puffer gelangt vom Auffanggefäß (8) über die Pumpe (3) in das Vorratsgefäß (2) und benetzt über die Hypoxiedusche (13) die Oberfläche des Herzens, um einerseits vor Luftsauerstoff abzuschirmen und andererseits eine optimale Temperierung (37°C) zu gewährleisten. Vom Auffanggefäß (6) gelangt der Puffer dann wieder in das Auffanggefäß (8). Gleichzeitig gelangt über die Perfusorspritzen (9) ein Terbutalin-Hypoxiepuffer-Gemisch in der zu untersuchenden Terbutalinkonzentration retrograd über die Aorta in die Koronararterien.

B.3 Versuchsvorbereitung

B.3.1 Präparation der Ratte

Die Ratte wurde unter Atemkontrolle mit Diäthylether betäubt. Nach Erreichen des Narkosestadiums III nach Guedel (Toleranzstadium) wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Durch Abtrennen des Lig. falciforme hepatis wurde die Vena cava inferior zugänglich. In die Vena cava inferior wurden nun 0,25 ml Heparin-Natrium injiziert, um Komplikationen durch Blutkoagulation nach Entnahme des Herzens zu vermeiden.

Im nächsten Schritt wurde der Thorax eröffnet um das Herz zu skelettieren. Dabei wurde zuerst die Aorta in Höhe des Aortenbogens durchtrennt. Danach wurden die restlichen zu- und abführenden Gefäße durchtrennt. Nach Entnahme des Herzens wurde dieses unmittelbar durch Kanülieren an der Versuchsanlage befestigt.

B.3.2 Kanülieren des Herzens

Zuerst wurde der Aortenstumpf an der Kanüle 5b (Abb 5) befestigt, um den linken Ventrikel bzw. die Koronararterien mit carbogenbegastem Puffer retrograd zu perfundieren.

Während dieser Langendorff-Perfusion wurden die Lungenvenen an der Kanüle 5a (Abb. 5) befestigt. Die Versuchsanlage wird nun auf anterograde Perfusion umgestellt und das Experiment konnte beginnen.

B.4 Versuchsablauf

Das Experiment setzte sich aus drei Phasen zusammen.

B.4.1 Phase der Normoxie

Die Normoxiephase dauerte 20 min. Das Herz wurde anterograd (s. B.2.2) perfundiert. Die Phase der Normoxie hatte den Zweck, die Konstanz der Ausgangsmesswerte zu überprüfen. Gemessen wurden:

- Aortenfluß [ml/min]
- Herzfrequenz [min^{-1}]
- Koronarfluß [ml/min]
- syst. und diast. Druck [mmHg]

Über den justierbaren ‚Windkessel‘ (10 in Abb.5) wurde der systolische Druck auf Werte zwischen 105 mmHg und 115 mmHg eingestellt, um möglichst konstante Versuchsbedingungen zu erreichen. Für den diastolischen Druck ergaben sich Werte zwischen 80 mmHg und 90 mmHg. Die Konstanz dieser Messwerte nach 5, 10, 15 und 20 min. war Voraussetzung für die Einleitung der Hypoxiephase.

B.4.2 Phase der Hypoxie

Die Hypoxiephase dauerte 50 min. Das Herz wurde retrograd über zwei 50 ml Perfusorspritzen (s. B.2.2) mit Terbutalin-Hypoxiepuffer-Gemisch perfundiert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug also ml/min . Bei retrograder Perfusion über die Aorta konnten in dieser Phase aus technischen Gründen keine Messwerte erhoben werden.

Das Terbutalin-Hypoxiepuffer-Gemisch setzte sich aus 100 ml N-CO₂-begastem Puffer und je nach Versuchsreihe 0,5, 1, 5, 10 und 100 nmol Terbutalin zusammen. Bei einer Molmasse von 225,287 g/mol (s. A.5.1, Tab. 4) wurde dem Rattenherzen also Terbutalin in Konzentrationen zwischen etwa 1,1 ng/ml (bei 0,5 nmol Terbutalin) und 225,3 ng/ml (bei 100 nmol Terbutalin) Puffer zugeführt.

Geht man von erwachsenen Menschen aus, so beträgt die effektive Plasmakonzentration für Terbutalin 2,3 ng/ml (0,012 nmol/ml = 1,2 nmol/100 ml) [43]. Somit war durch die Experimente mit 0,5 nmol bis 100 nmol Terbutalin pro 100 ml Puffer der therapeutische Dosierungsbereich erfaßt.

B.4.3 Phase der Reoxygenierung

Die Reoxygenierungsphase dauerte 70 min. Das Herz wurde wieder anterograd perfundiert und arbeitete unter gleichen Bedingungen wie in der Normoxiephase. Gemessen wurde nach 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 min.

B.5 Versuchsende

Nach Ablauf dieser drei Phasen (140 min. Gesamtversuchsdauer) wurde das Herz in 10 ml eiskaltem Isoliermedium grob mit einer Schere zerkleinert. Das Isoliermedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substanz	Konz. [mol/l]
EGTA	0,001
Mannitol	0,225
Saccharose	0,075

Mit Tris-Puffer wurde das Isoliermedium auf pH 7,4 eingestellt.

Danach folgte die Zerkleinerung de Herzens mittels eines Ultraturrax bei 9500 U7min für 2 Sekunden ~~tem~~ Eiskühlung. Dem Homogenat wurden dann 1 ml 10%ige Albuminlösung und ml DMSO als Kryoadditiva zugefügt. Nach 5 minütigem Equilibrieren erfolgte das Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff, um zu einem späteren Zeitpunkt die mitochondrialen Messungen durchzuführen.

Nach jedem Versuch wurde die gesamte Versuchsanlage (Normoxie- und Hypoxiekreislauf olg~~nder~~maßen gereinigt:

- 2 x 20 min. mit Zitratlösung (1 Spatelspitze in 2 l Wasser) bei 50°C
- 2 x 15 min. mit Leitungswasser
- 2 x 5 min. mit Aqua bidest.

B.6 Mitochondriale Messungen

Nach Auftauen der Probe wurde diese bei 2000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann erneut für 10 min. bei 8000 U/min zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Isoliermedium (s. B.5) durch mehrmaliges Überspülen mit einer Pipette suspendiert.

Mit dieser Suspension erfolgte nun die Proteinbestimmung nach Lowry et al. Dazu werden 10 µl der Suspension mit 990 µl Aqua dest. und 4 ml einer Inkubationslösung (s.u.) 10 min. inkubiert. Als Blindprobe setzte man 1 ml Aqua dest. und 4 ml Inkubationslösung an und inkubierte ebenfalls 10 min. Anschließend wurden jeweils 500 µl Folinlösung (1:2 verdünnt) zugegeben. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Suspension erfolgte nun die Photometrierung bei 492,8 nm.

Die Inkubationslösung ergab sich aus 500 µl 0,07 molarer K-Na-Tatrat-Lösung, 500 µl 0,04 molarer CuSO₄-Lösung, 25 ml 0,38 molarer Na₂CO₃-Lösung und 25 ml 0,2 molarer NaOH-Lösung.

B.6.1 ATPase

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität dienten 15 µg Protein. Angewandt wurde die Methode nach Pulmann et al. Dazu wurden 500 µl Puffer (50 µmol Tris und 1 µmol MgCl₂; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt), 20 µl PEP, 20 µl ATP, 10 µl NADH, 3,2 µl PK, 2,6 µl LDH und eine 15 µg Protein entsprechende Menge Suspension mit Aqua dest. auf 1000 µl aufgefüllt. Die Blindprobe setzte sich aus 500 µl Aqua dest. und 500 µl Puffer zusammen. Es folgte die Photometrierung bei 338 nm.

Als Ergebnis galt das arithmetische Mittel von vier aufeinanderfolgenden Messungen.

B.6.2 ATP-Synthese

Zur Bestimmung der ATP-Synthese-Aktivität dienten 1,5 µg Protein. Angewandt wurde die Methode nach Zimmer et al. Dazu wurden 200 µl Puffer (10 nM Saccharose, 10 nM KH₂PO₄, 5 mM MgCl und 5 mM Succinat; mit Tris auf pH 7,4 eingestellt), 50 µl Monitoring-Reagenz (ATP MR Kit in 10 ml Puffer), 5 µl ADP und eine 1,5 µg Protein entsprechende Menge Suspension im Luminometer gegen eine Blindprobe verglichen.

Die Blindprobe bestand aus 200 µl Puffer, 50 µl Monitoring-Reagenz, 5 µl ATP (10⁻⁵) und 5 µl ADP.

B.6.3 Membranfluidität

Zur Bestimmung der Mitochondrienmembranfluidität dienten 100 µg Protein. Angewandt wurde die Methode nach Shinitzky et al. Dazu wurden eine 100 µg Protein entsprechende Menge Suspension und 1 µl DPH mit Puffer (175 mM KCl, 25 mM Tris) auf 2 ml aufgefüllt. Als Sondenmolekül diente DPH in einer Endkonzentration von 1 nM. nach einer Inkubationszeit von 3 min. wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm im parallelen und antiparallelen Strahlengang gemessen.

Die Anisotropie errechnet sich aus folgender Formel:

$$r = \frac{I(\text{parallel}) - I(\text{antiparallel})}{I(\text{parallel}) + 2I(\text{antiparallel})}$$

Dabei bedeutet eine kleine Anisotropie eine hohe Membranfluidität und umgekehrt. Als Ergebnis galt das arithmetische Mittel von vier aufeinanderfolgenden Messungen.

B.7 Zusatzexperimente

Um die alleinige Wirkung von Terbutalin auf das Herz zu untersuchen, wurden zusätzlich einige Versuche ohne Hypoxiephase durchgeführt. Der Versuchsaufbau entspricht dabei der Phase der Normoxie (s. B.4.1). Nach der zwanzigsten Versuchsminute wurde Terbutalin in den zirkulierenden Normoxiepuffer gegeben, ohne die Hypoxiephase einzuleiten. Die Versuchsdauer betrug ebenfalls 140 Minuten.

B.8 Substanzverzeichnis und verwendete Apparaturen

B.8.1 Probesubstanz

Terbutalin, Hemisulfatsalz (Asta Medica, Frankfurt)

B.8.2 Reagenzien

Für den modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer wurden verwendet:

Substanz	Hersteller
NaCl	Roth, 76185 Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, 64271 Darmstadt
KCl	Merck, 64271 Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, 64271 Darmstadt
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck, 64271 Darmstadt
CaEDTA·2H ₂ O	Merck, 64271 Darmstadt
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	Merck, 64271 Darmstadt
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck, 64271 Darmstadt

Begast wurde mit:

Gas	Hersteller
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Messer-Griesheim, Frankfurt
N ₂ -CO ₂ -Gemisch (95% N ₂ , 5% CO ₂)	Messer-Griesheim, Frankfurt

Für das Isoliermedium wurden verwendet:

Substanz	Hersteller
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Merck, 64271 Darmstadt
C ₆ H ₁₄ O ₆	Merck, 64271 Darmstadt
EGTA	Sigma, 82039 Deisenhofen
Tris Ultrapure	United States Biochemical, Cleveland

Als Kryoadditiva wurden verwendet:

Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 64271 Darmstadt
Rinder-Albumin 10%	Serva, 69115 Heidelberg

Für die mitochondriale Auswertung wurden verwendet:

Substanz	Hersteller
K-Na-Tatrat	Merck, 64271 Darmstadt
CuSO ₄	Merck, 64271 Darmstadt
NaOH	Merck, 64271 Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, 64271 Darmstadt
Succinat	Merck, 64271 Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, 64271 Darmstadt
MgCl	Merck, 64271 Darmstadt
NADH	Merck, 64271 Darmstadt
ATP	Merck, 64271 Darmstadt
LDH	Merck, 64271 Darmstadt
PK	Merck, 64271 Darmstadt
PEP	Merck, 64271 Darmstadt
Substanz	Hersteller
DPH	Merck, 64271 Darmstadt
ATP MR Kit 1243-102	Colora, 73547 Lorch

B.8.3 Tiere

Für unsere Versuche verwendeten wir männliche Wistar Ratten (Hoechst, Frankfurt) mit einem Lebendgewicht von 400-500 g. Ernährt wurden die Ratten mit Standarddiät (Samen-Schmitt, Jakoby, Frankfurt) ad libitum.

Zur Betäubung der Ratten diente Diäthylether DAB 10 (Merck, 64271 Darmstadt).

Zur Koagulationsprophylaxe wurden während der Präparation 0,25 ml Liquemin® (Roche) in die Vena vena inferior injiziert.

B.8.4 Apparaturen

Working-heart-Versuchsanlage (Abb. 5):

Gerät	Hersteller
V-2A-Stahlkanülen, Ø 2,5 mm	--
Membranfilter AE 98, Ø 50 mm, Porengröße 5 µm	Schleicher Schüll, 37582 Dassel
Kleinflußdurchmesser, Serie 10A6100	Fischer & Porter, 37070 Göttingen
Begasungsfritten Porengröße 2	ROBU-Glas
Peristaltische Schlauchpumpe, Modell 2006	Verder, 40225 Düsseldorf
Mikroprozessor-pH-Meter 761	Knick, 14163 Berlin
Perfusor VI, Typ 871222/0	B. Braun AG, 34212 Melsungen
Dreiwegehähne, DICOFIX 3®	B. Braun AG, 34212 Melsungen
Perfusorspritze 50 ml, PROINJEKT®	B. Braun AG, 34212 Melsungen
Kryothermostat, Modell WK 15-1 DS	Colora, 73547 Lorch
Überwachungsgerät zur RR- und Pulsmessung	Siemens

Mitochondriale Messungen:

Gerät	Hersteller
Ultra Turrax, T25	IKA-Labortechnik, 79219 Staufen
Automatic superspeed refrigerated centrifuge, Typ RC-5B	Sorvall, 61352 Bad Homburg
Flachbettschreiber, Modell BD 111/112	Kipp & Zonen, 42653 Solingen
Fluorescence spectrometer LS-3	Perkin-Elmer, 88641 Überlingen

Luminometer 1250LKB	Wallac
UV-visible recording spectrophotometer, Typ UV-160A	Shimadzu Corp., 64271 Darmstadt

Zur Auswertung und grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde in Pentium II 400 MMX-PC sowie die Programme Microsoft Word 97[®] und Excel 97[®] verwendet.

B.9 Statistik

Zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung bei der Ergebnisauswertung wurden

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

folgende Formeln verwendet:

Zur Signifikanzberechnung diente der zweiseitige Student'sche t-Test.

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Abb. 5 Versuchsanlage

Teil C Ergebnisse

C.1 Working heart

Wie unter B.4 beschrieben, wurden während eines Experiments am arbeitenden Rattenherzen der Aortenfluß, Koronarfluß, der systolische und diastolische Druck sowie die Herzfrequenz dokumentiert.

C.1.1 Aortenflüsse

In den folgenden Diagrammen sind jeweils die Aortenflüsse vor und nach der Hypoxiephase, in der eine bestimmte Menge Terbutalin zugegeben wurde, im Vergleich zur Kontrolle (ohne Terbutalinzugabe) dargestellt. Auf der Abszisse ist die Versuchsdauer von 140 Minuten aufgetragen. An der Ordinate sind die dazugehörigen Aortenflüsse abzulesen.

Die Kontrollkurve ergibt sich aus Mittelwerten von sieben Kontrollversuchen (n=7). Die ersten fünf Aortenflußwerte während der Normoxiephase, das heißt die Messungen nach 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten Versuchsdauer, wurden arithmetisch gemittelt und einem Aortenfluß von 100% gleichgesetzt.

Nach der Hypoxiephase folgt für die Kontrolle ein Anstieg des Aortenflusses auf etwa 65% des Ausgangswertes vor der Hypoxie. Der Anstieg setzt sich fort und erreicht nach 100 Minuten Versuchsdauer ein Maximum von 80%. Bis zum Versuchsende (140 Minuten) folgt nun ein leichter, stetiger Abfall des Aortenflusses auf etwa 75% des Ausgangswertes.

Aus den Diagrammlegenden ist die jeweilige Versuchsanzahl (n) für die Terbutalinversuche zu ersehen.

Diagrammbeschreibung

In Abbildung 6 ist zunächst zu erkennen, daß bei Zugabe von $0,5 \text{ mol}$ Terbutalin der Aortenfluß während der gesamten Reoxygenierungsphase unter dem der Kontrolle verläuft.

Zu Beginn der Reoxygenierung steigt der Aortenfluß auf etwa 47% an, liegt also fast 20 Prozentpunkte unter der Kontrolle. Im Gegensatz zur Kontrollkurve ergibt sich kein Maximum während der Reoxygenierung. Die Kurve steigt vielmehr stetig an, um sich dann gegen Versuchsende bei etwa 65% einzupendeln.

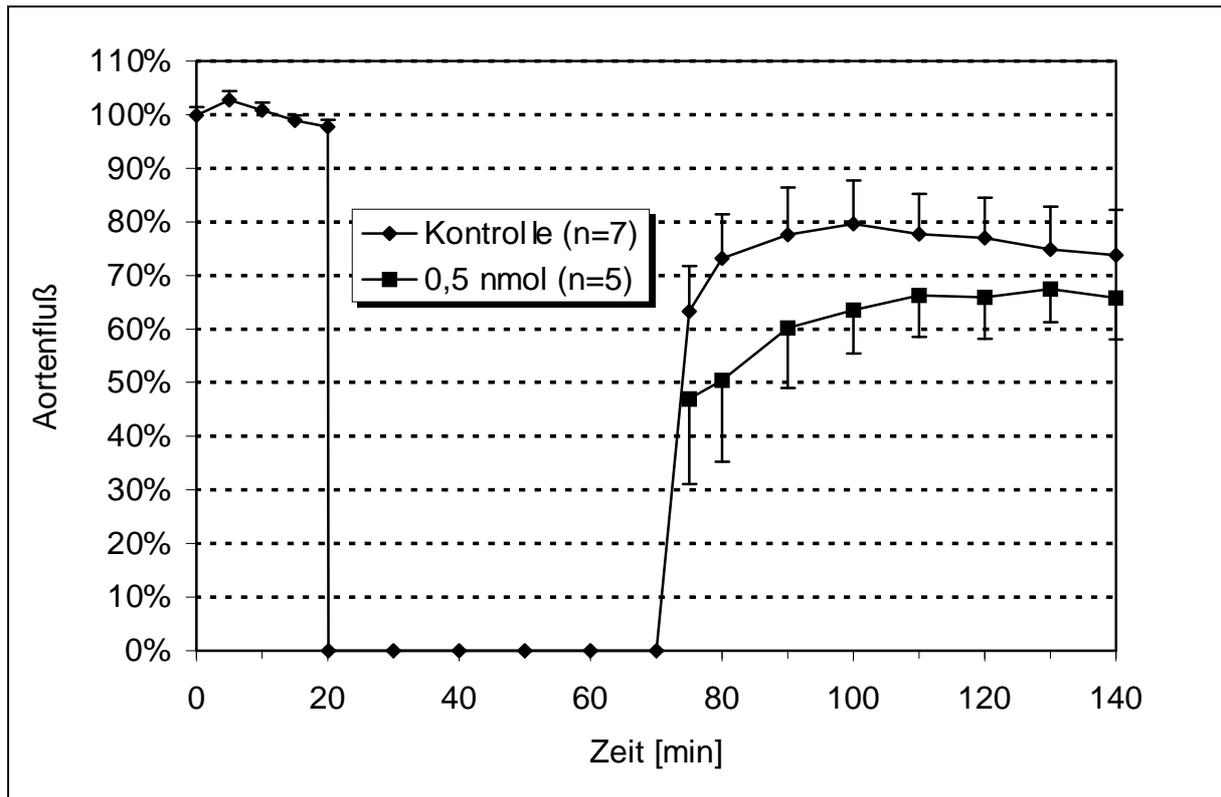


Abb. 6 Aortenfluß bei 0,5 nmol Terbutalin

Abbildung 7 zeigt das Diagramm für 1 nmol Terbutalin.

Im Gegensatz zur vorherigen Kurve werden die Werte erreicht, die über den entsprechenden Kontrollwerten liegen. Der 75 Minuten-Wert der 1 nmol-Kurve liegt mit etwa 75% signifikant ($p < 0,05$) über der Kontrolle. Dieser Wert ist der einzige in der gesamten Versuchsreihe, der sich signifikant von einem entsprechenden Kontrollwert unterscheidet. Nach einer kurzen Plateauphase von der 80. bis zur 100. Versuchsminute bei 80% fällt die Kurve zusammen mit der etwas höher verlaufenden Kontrollkurve auf etwa 70% bei Versuchsende ab.

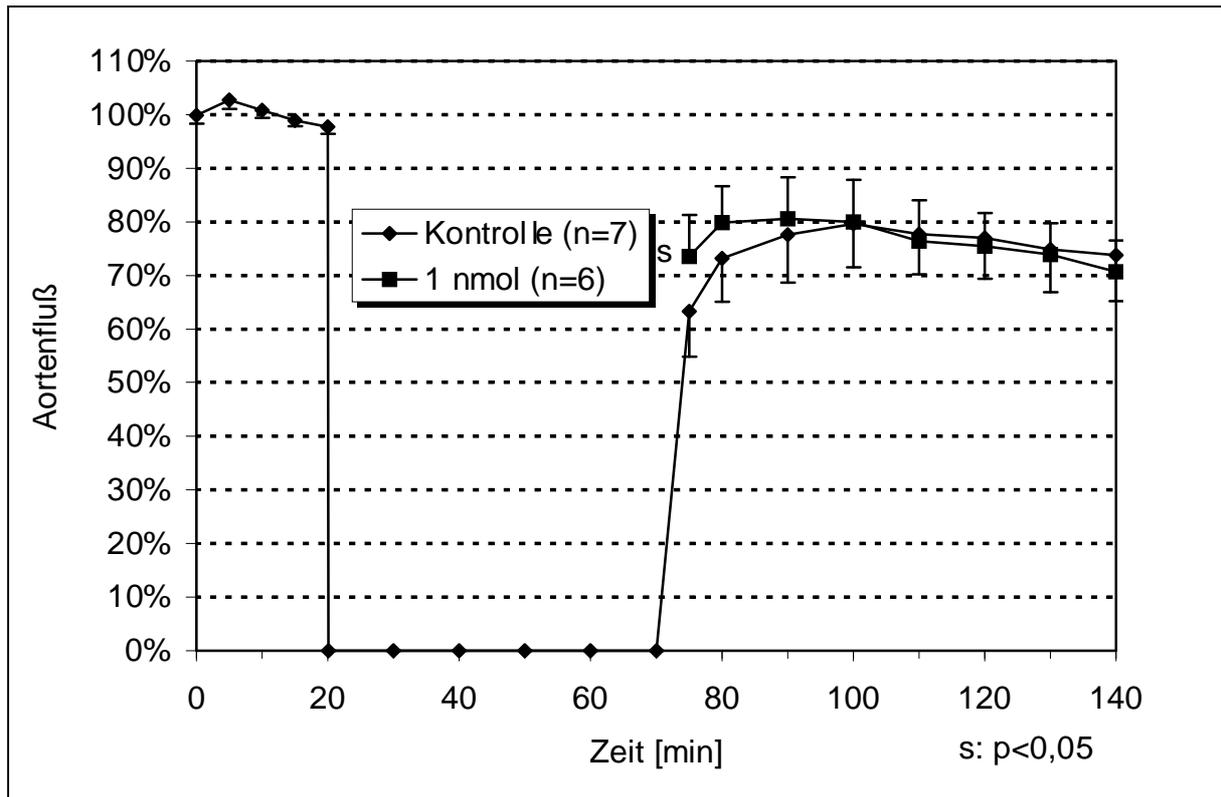


Abb. 7 Aortenfluß bei 1 nmol Terbutalin

Die 5 nmol-Kurve in Abbildung 8 liegt zwar initial mit knapp 70 etwas über der Kontrollkurve, erfährt dann jedoch kein Maximum. Vielmehr fällt die Kurve stetig ab, wobei sie von der 110. Versuchsminute an parallel zur 10 Prozentpunkte oberhalb liegenden Kontrolle verläuft.

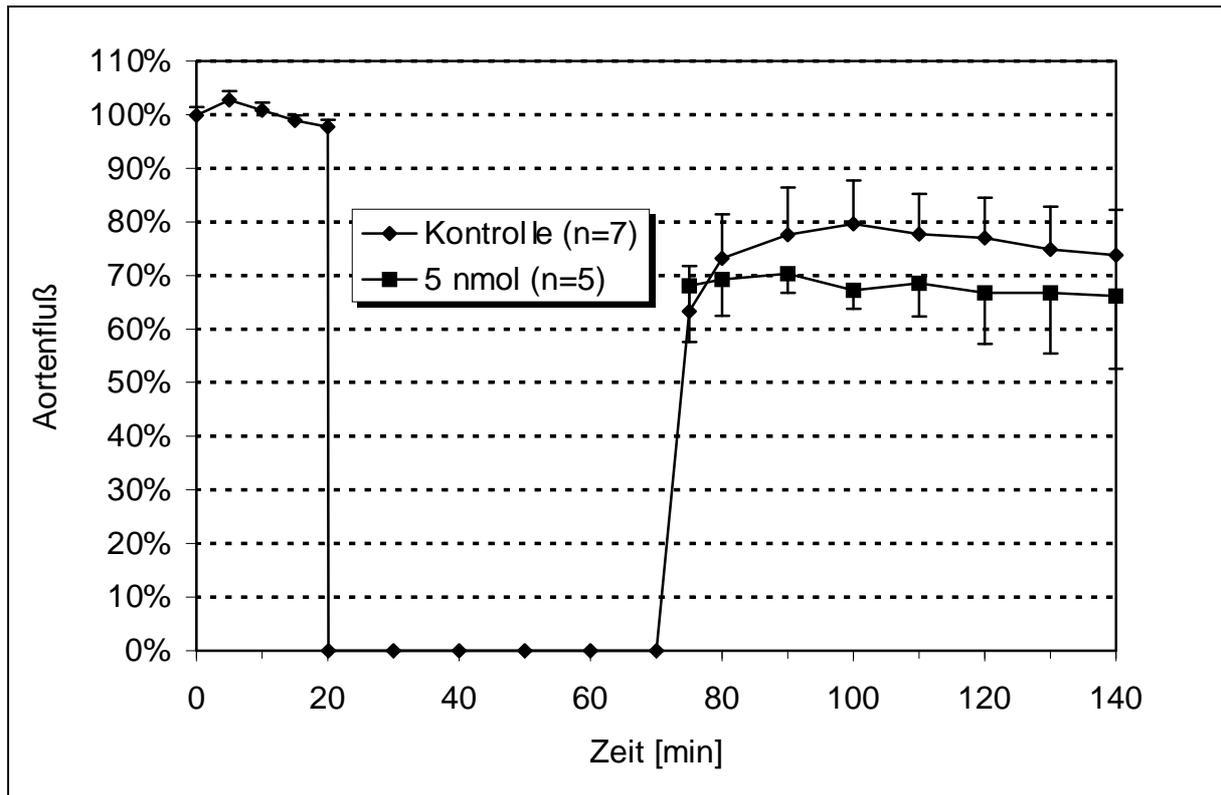


Abb. 8 Aortenfluß bei 5 nmol Terbutalin

Der Aortenfluß bei 10 nmol Terbutalin (Abb. 9) liegt während der gesamten Reoxygenierungsphase deutlich unter den Kontrollwerten. Der erste Wert in der Reoxygenierungsphase (75 min.) ist mit etwa 55% zugleich der höchste. Von hier an fällt die Kurve ab, wobei sie bis zur 100. Versuchsminute nahezu parallel zur 35 Prozentpunkte oberhalb liegenden Kontrollkurve verläuft. Bei Versuchsende werden gerade noch 40% des Ausgangswertes erreicht.

Ferner fallen im Vergleich zu den vorherigen Diagrammen größere Standardabweichungen auf, vor allem gegen Ende der Reoxygenierungsphase.

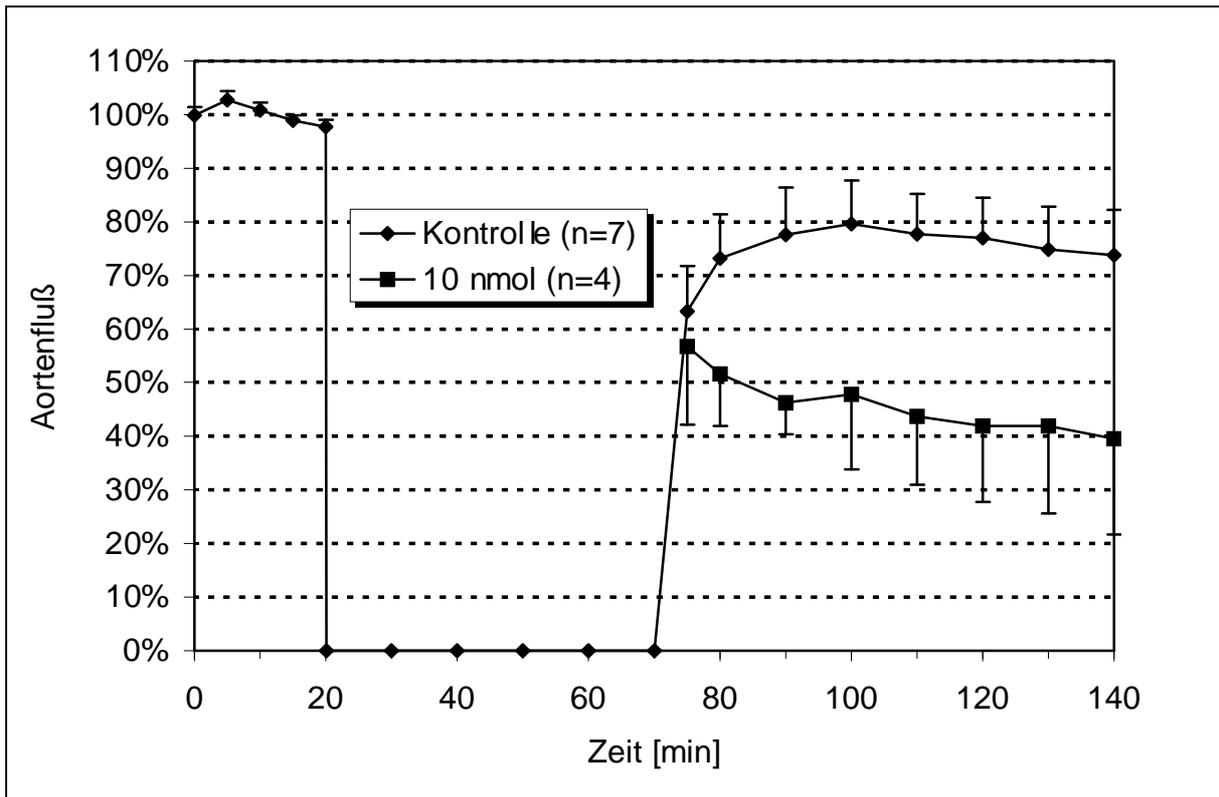


Abb. 9 Aortenfluß bei 10 nmol Terbutalin

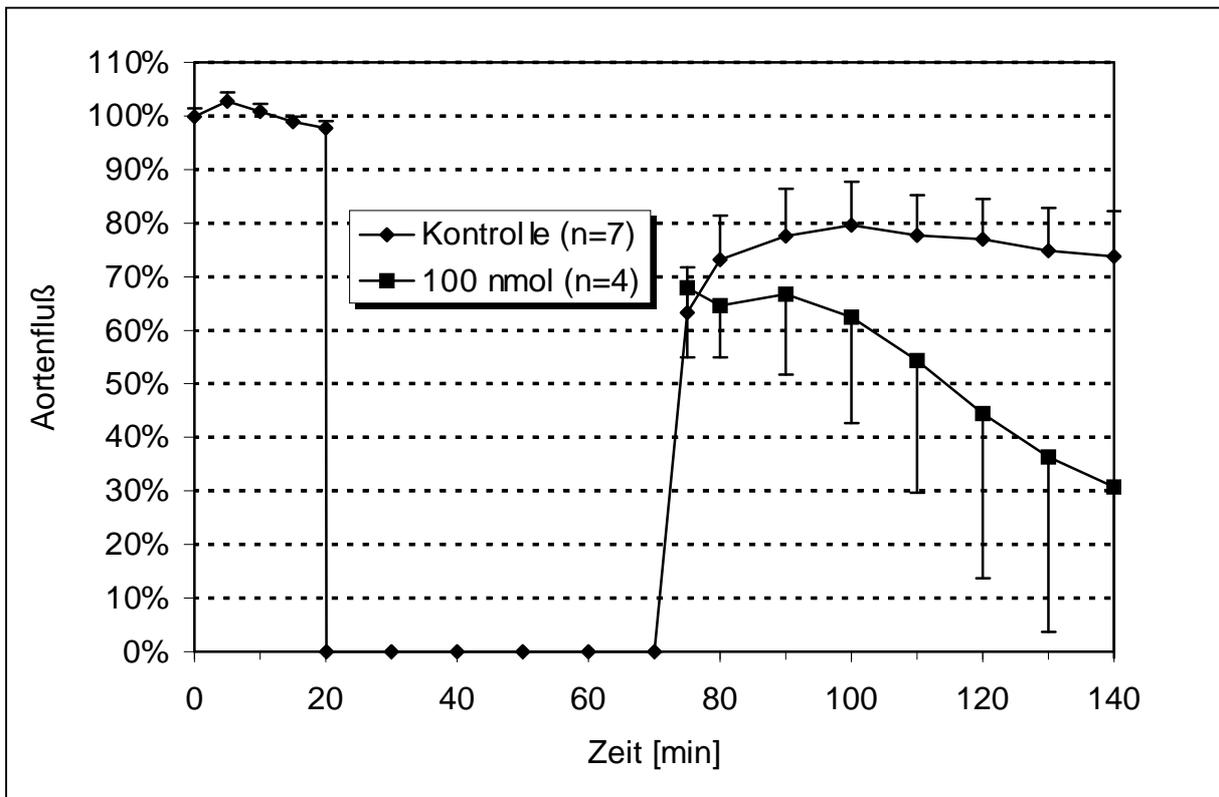


Abb. 10 Aortenfluß bei 100 nmol Terbutalin

Die 100 nmol-Kurve (Abb. 10) ist vom Verlauf her mit der 10-nmol-Kurve (Abb. 9) vergleichbar. Es ist zwar initial ein Wert von fast 70% zu verzeichnen, der somit wenige Prozentpunkte über der Kontrolle liegt. Jedoch ist zum einen der nachfolgende Kurvenabfall bis auf 30% der Ausgangswerte sehr deutlich, zum anderen sind die Standardabweichungen noch höher als im 19 nmol-Versuch. Der Kurvenabfall ist im Vergleich zur Kontrolle deutlich steiler.

Zusammenfassung

Die 0,5 nmol-Kurve ist die einzige, die während der gesamten Reoxygenierungsphase ansteigt. Es kann ein Erholungseffekt nach anfänglich starker Depression durch das Medikament angenommen werden.

Die 1 nmol-Kurve ist die einzige, die signifikant über der Kontrolle liegt, wenn auch nur in der Anfangsphase der Reoxygenierung. Das Maximum wird relativ gleich nach Beginn der Reoxygenierungsphase erreicht, während die Kontrollkurve ihr Maximum erst nach 25 Minuten erreicht.

Die 5 nmol-Kurve liegt abgesehen vom 75 Minuten-Wert zwar während der gesamten Reoxygenierungsphase unter den Kontrollwerten und erreicht kein eindeutiges Maximum, verläuft jedoch relativ konstant parallel zur Kontrollkurve.

Bei der 10 nmol-Kurve ist eine deutliche Verschlechterung des Aortenflusses zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich initial kein Ansteigen, sondern ein deutliches Abfallen der Kurve. Gegen Ende des Versuchs stabilisieren sich die Werte wieder etwas und die beiden Kurven verlaufen parallel.

Noch deutlicher wird die Verschlechterung des Aortenflusses bei Betrachtung der 100 nmol-Kurve. Über die gesamte Versuchsdauer ist ein sehr deutlicher Kurvenabfall, also keine Stabilisierung wie im 10 nmol-Versuch zu erkennen. Eine Überdosierung kann hier angenommen werden.

Ferner fiel bei allen Terbutalinversuchen im Vergleich zu den Kontrollversuchen ein deutlich erhöhtes Auftreten von Arrhythmien auf.

C.1.2 Herzfrequenzen

Entsprechend den Aortenflüssen werden nun die Herzfrequenzen dargestellt.

Für die Kontrolle ist nach der Hypoxiephase ein steiler Anstieg der Herzfrequenz auf 95% zu verzeichnen. Bei 80 Minuten ergibt sich ein Maximum von über 100% der Ausgangsfrequenz (vor der Hypoxie). Bis zum Versuchsende verläuft die Kurve dann leicht abfallend bis auf 95%.

Diagrammbeschreibung

Bei Zugabe von 0,5 nmol Terbutalin (Abb. 11) zeigen sich in der Reoxygenierung anfänglich Werte, die um die Kontrollwerte streuen. Ab der 100. Versuchsminute weichen die Werte dann diskret auseinander, wobei die 0,5 nmol-Kurve sich etwas oberhalb der Kontrollkurve bei 100% einpendelt.

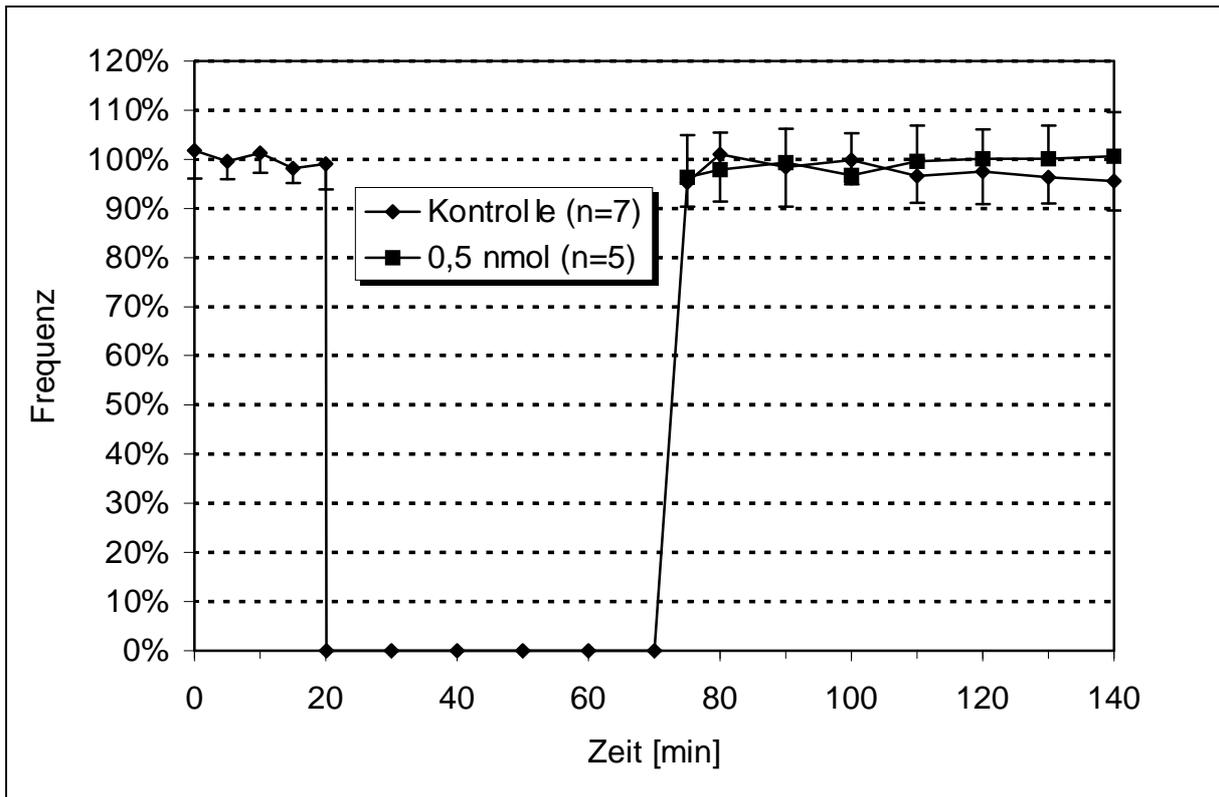


Abb. 11 Herzfrequenz bei 0,5 nmol Terbutalin

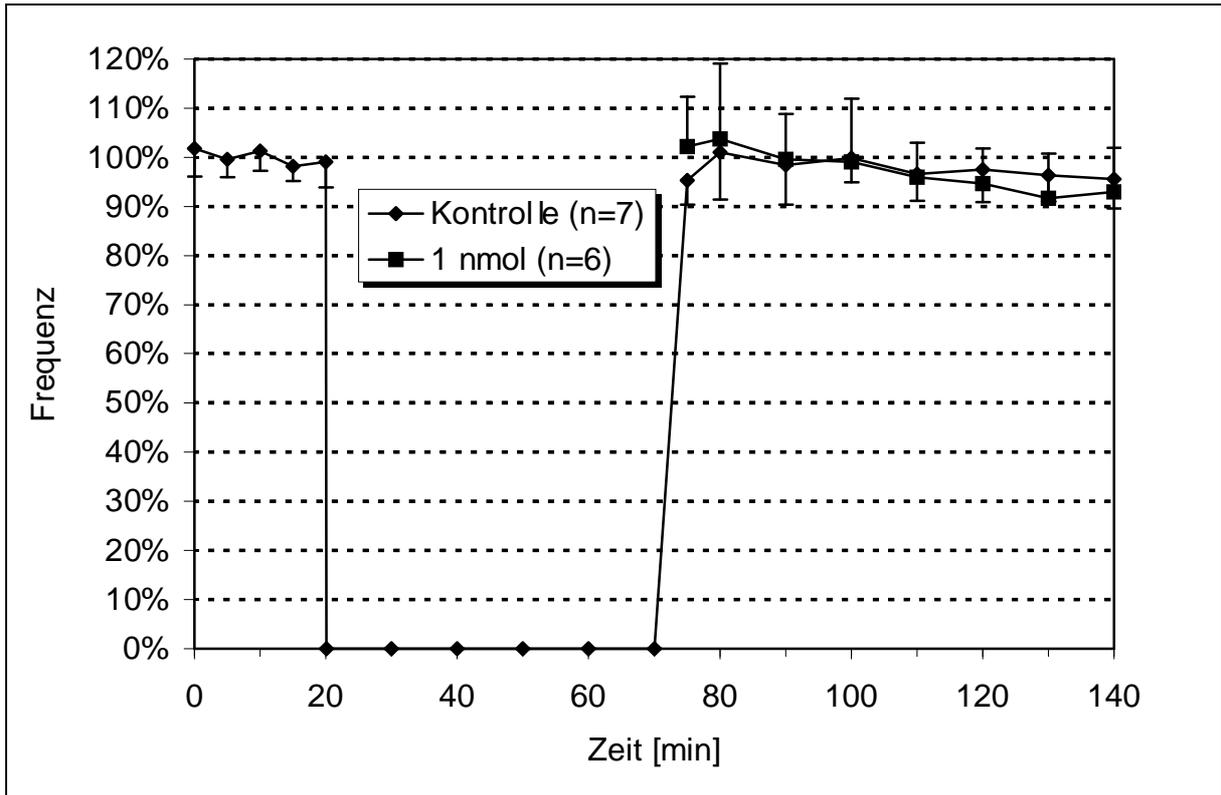


Abb. 12 Herzfrequenz bei 1 nmol Terbutalin

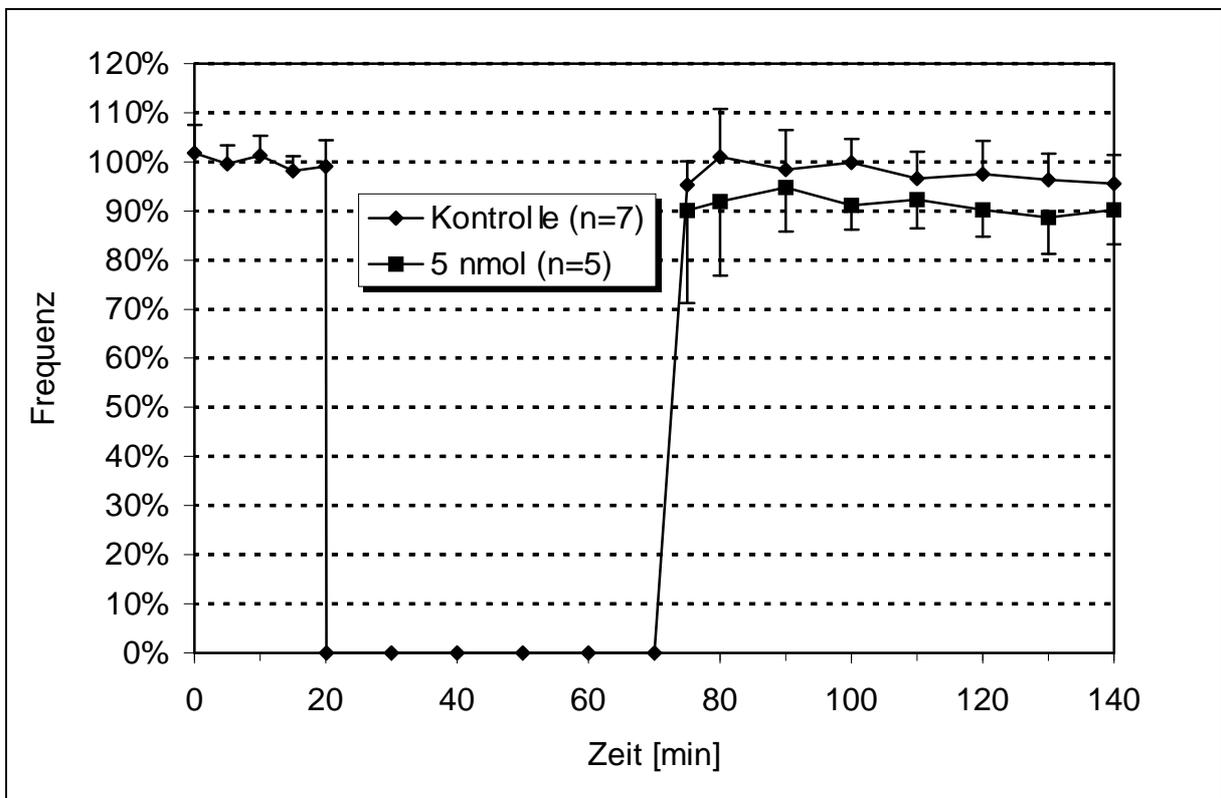


Abb. 13 Herzfrequenz bei 5 nmol Terbutalin

Die *1 mol Kurve* (Abb. 12) liegt in den ersten 10 Minuten der Reoxygenierungsphase bei etwa 105% und damit über der Kontrolle. Nach weiteren 10 Minuten liegen beide Kurven auf 100% und verlaufen von vier bis hin praktisch gemeinsam.

Die *5 mol-Kurve* in Abbildung 13 liegt während der gesamten Reoxygenierungsphase unterhalb der Kontrolle. Vom Verlauf her ist sie mit der Kontrollkurve vergleichbar. Beide Kurven verlaufen in etwa parallel.

Der 75 Minuten-Wert der *10 mol-Kurve* (Abb. 14) liegt mit etwas über 100% oberhalb der Kontrolle. Es folgt dann allerdings innerhalb von 15 Minuten ein Herzfrequenzabfall auf 90%, was 10 Prozentpunkte unter der Kontrolle liegt. Von diesem Minimum an erholt sich die Herzfrequenz im Laufe der Reoxygenierung wieder und nähert sich immer mehr der Kontrollkurve an. Bei Versuchsende (140 min.) liegen schließlich beide Kurven bei 95% des Ausgangswertes.

Beim *100 mol-Versuch* (Abb. 15) fällt zunächst der sehr hohe Einstieg in die Reoxygenierung von fast 110% auf. Im weiteren Verlauf fällt die Kurve relativ steil ab. Schon nach 10 Minuten schneidet sie die Kontrollkurve. Bei Versuchsende findet sich eine Herzfrequenz von gerade noch etwa 75% des Ausgangswertes. Des Weiteren fallen relativ hohe Standardabweichungen auf.

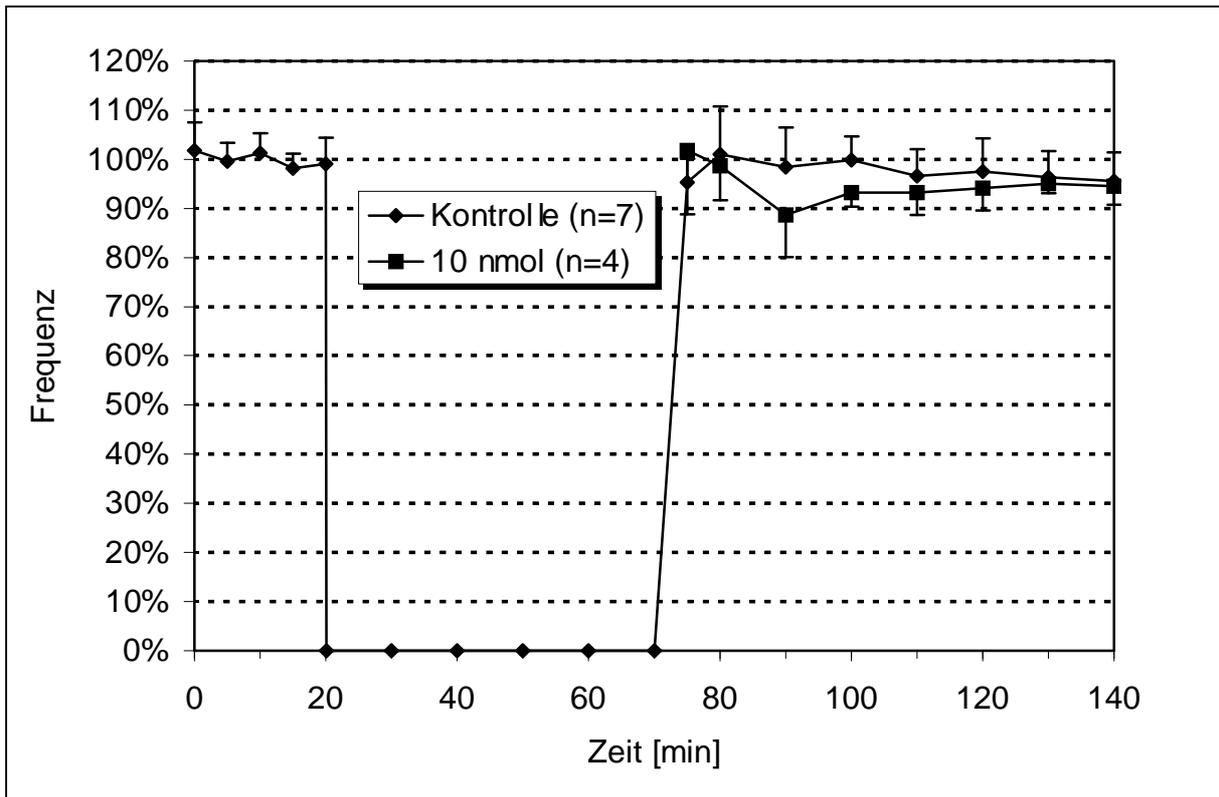


Abb. 14 Herzfrequenz bei 10 nmol Terbutalin

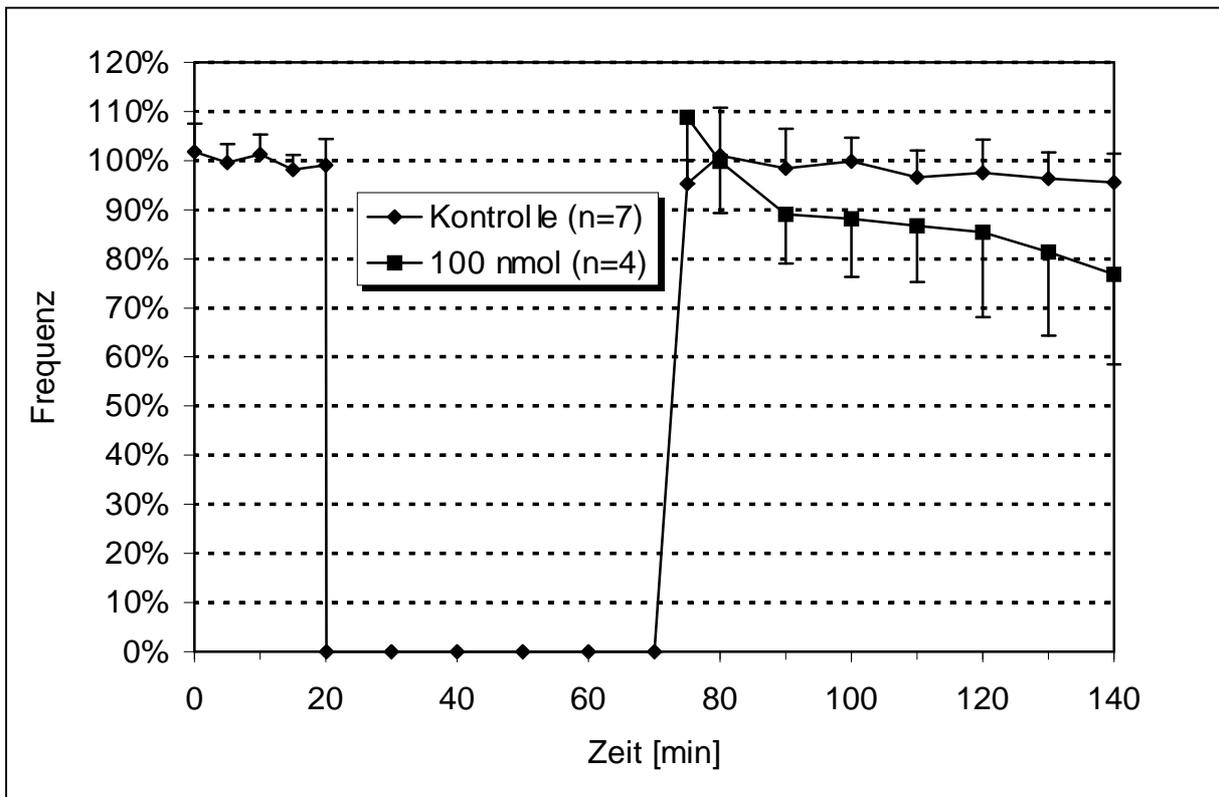


Abb. 15 Herzfrequenz bei 100 nmol Terbutalin

C.1.3 Koronarflüsse

Die Messung der Koronarperfusion ergab die folgenden Ergebnisse.

Im Kontrollversuch wurde zu Beginn der Reoxygenierungsphase in Koronarfluß von etwa 130% des Ausgangsflusses erreicht. Innerhalb der folgenden 15 Versuchsminuten fällt sie auf etwa 105% ab. Von hier an ergeben sich relativ konstante Koronarflußwerte, die bis zum Versuchsende auf etwa 95% der Ausgangswerte sinken.

Diagrammbeschreibung

Sowohl der 0,5 nmol- (Abb. 16) als auch der 1 nmol-Versuch (Abb. 17) verlaufen während der gesamten Reoxygenierungsphase nahezu parallel zu der wenige Prozentpunkte oberhalb verlaufenden Kontrollkurve.

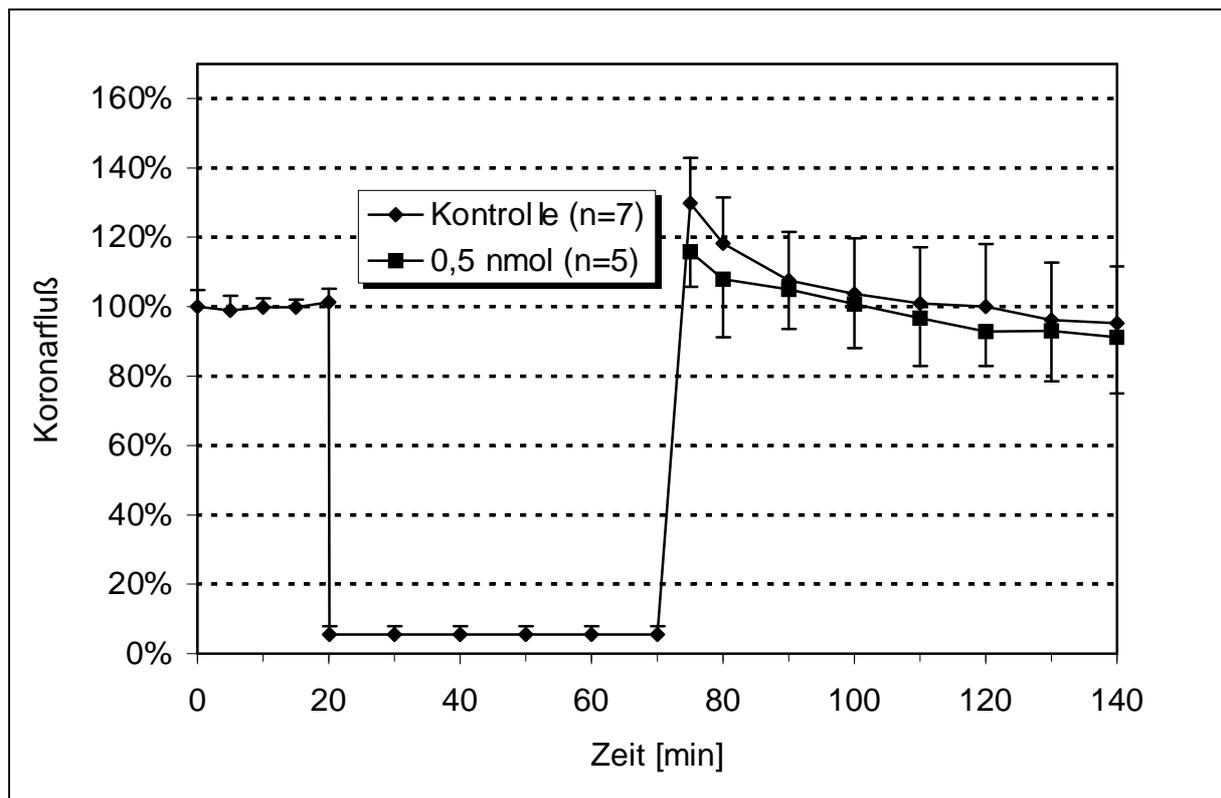


Abb. 16 Koronarfluß bei 0,5 nmol Terbutalin

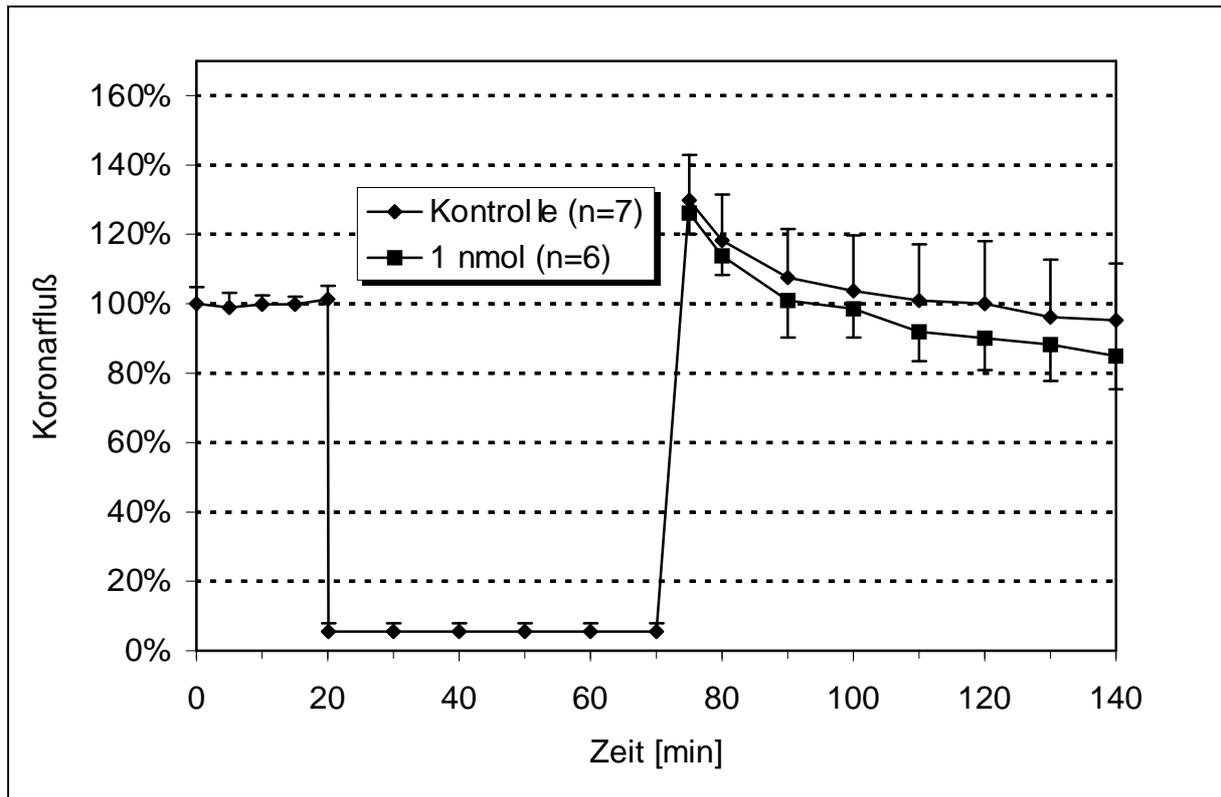


Abb. 17 Koronarfluß bei 1 nmol Terbutalin

In Abbildung 18 ist der 5 *mol*-Versuch dargestellt. Sämtliche Koronarflußwerte liegen über der Kontrolle. Zu Beginn der Reoxygenierung werden fast 140% erreicht. Bis zur 100. Versuchsminute fällt der Koronarfluß ab bis auf 120% der Werte der Normoxiephase und bleibt bis zum Versuchsende relativ konstant. Im Vergleich zu den anderen Versuchen fallen relativ hohe Standardabweichungen auf.

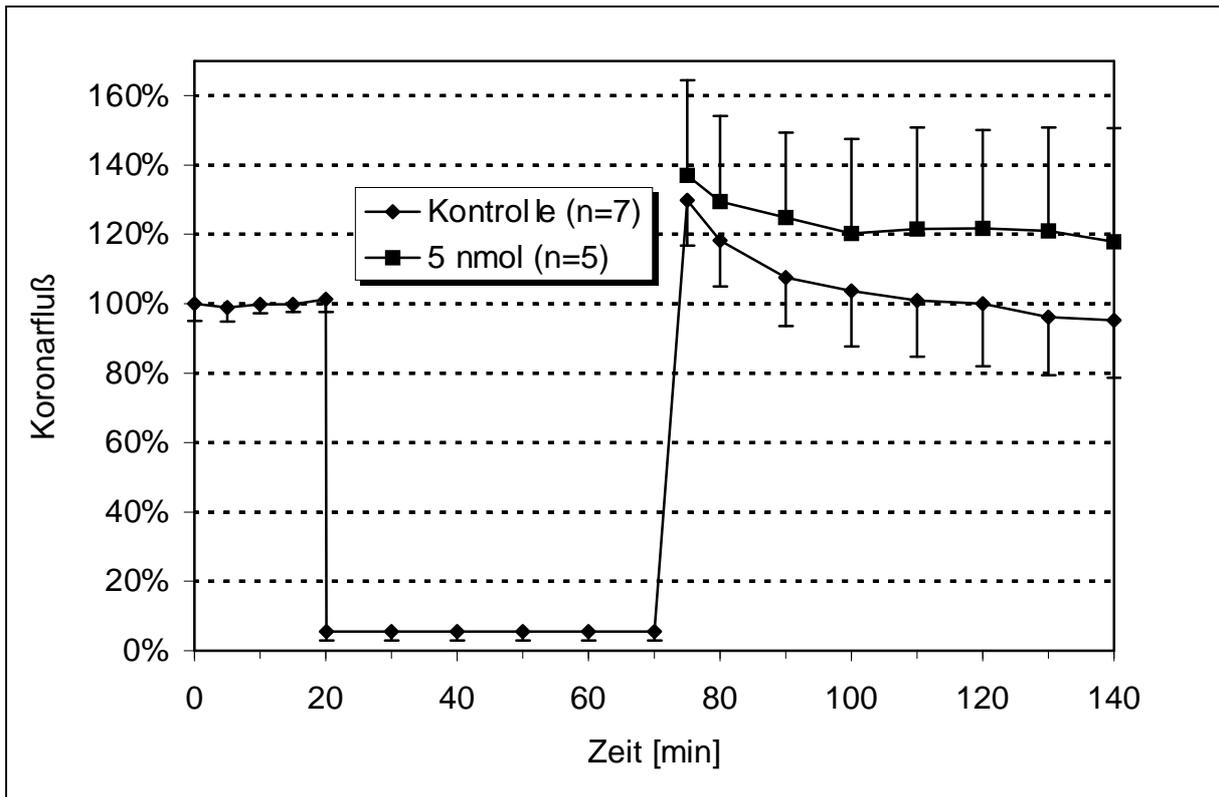


Abb. 18 Koronarfluß bei 5 nmol Terbutalin

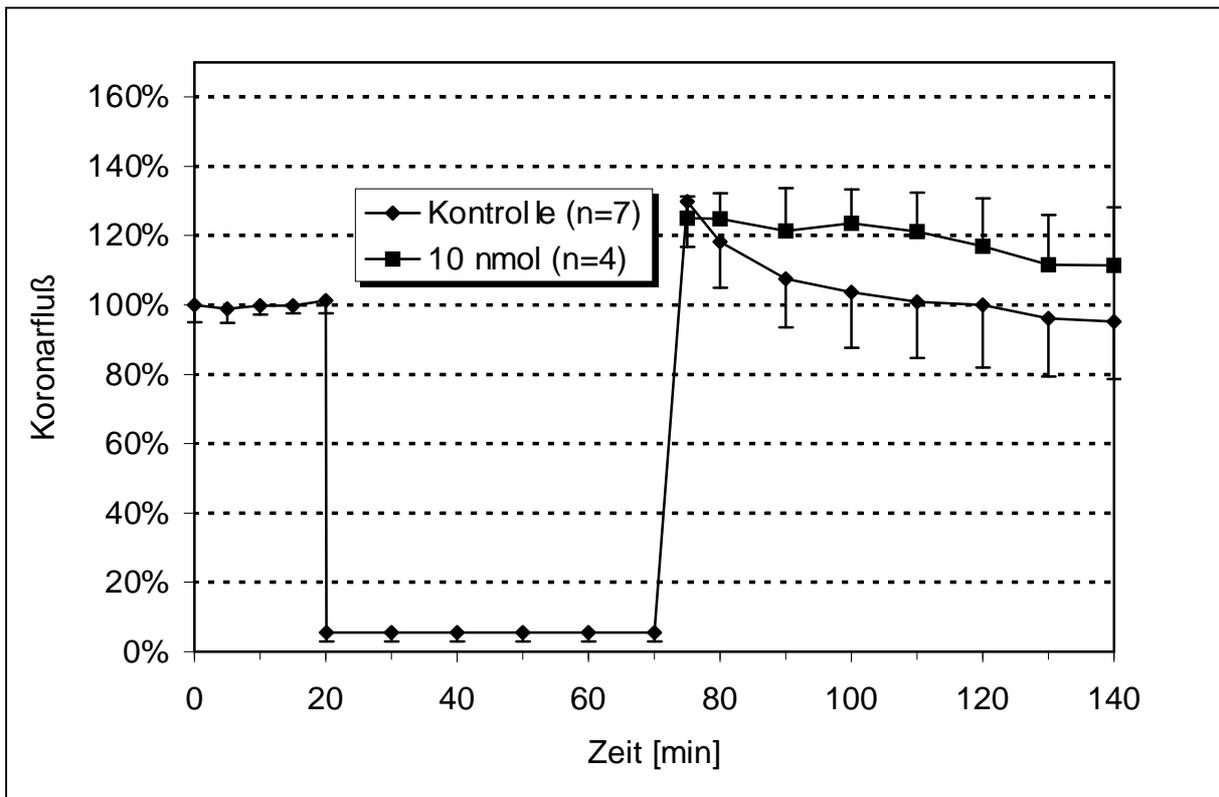


Abb. 19 Koronarfluß bei 10 nmol Terbutalin

Im 10 mol -Versuch (Abb. 19) werden nach der Hypoxiephase nur noch etwa 125% erreicht, was ungefähr dem Kontrollwert entspricht. Im weiteren Verlauf jedoch erfährt die 10 mol -Kurve einen weniger steilen Abfall als die Kontrollkurve und verläuft ab der 100. Versuchsminute stets etwa zehn Prozentpunkte oberhalb der Kontrolle. Bei Versuchsende wird noch ein Koronarfluß von etwa 110% des Ausgangswertes erreicht.

Die 100 mol -Kurve in Abbildung 20 liegt in ihrem Verlauf während der gesamten Reoxygenierung deutlich unterhalb der Kontrollkurve. Die Kurve fällt relativ steil von anfangs etwa 110% auf ungefähr 45% bei Versuchsende ab.

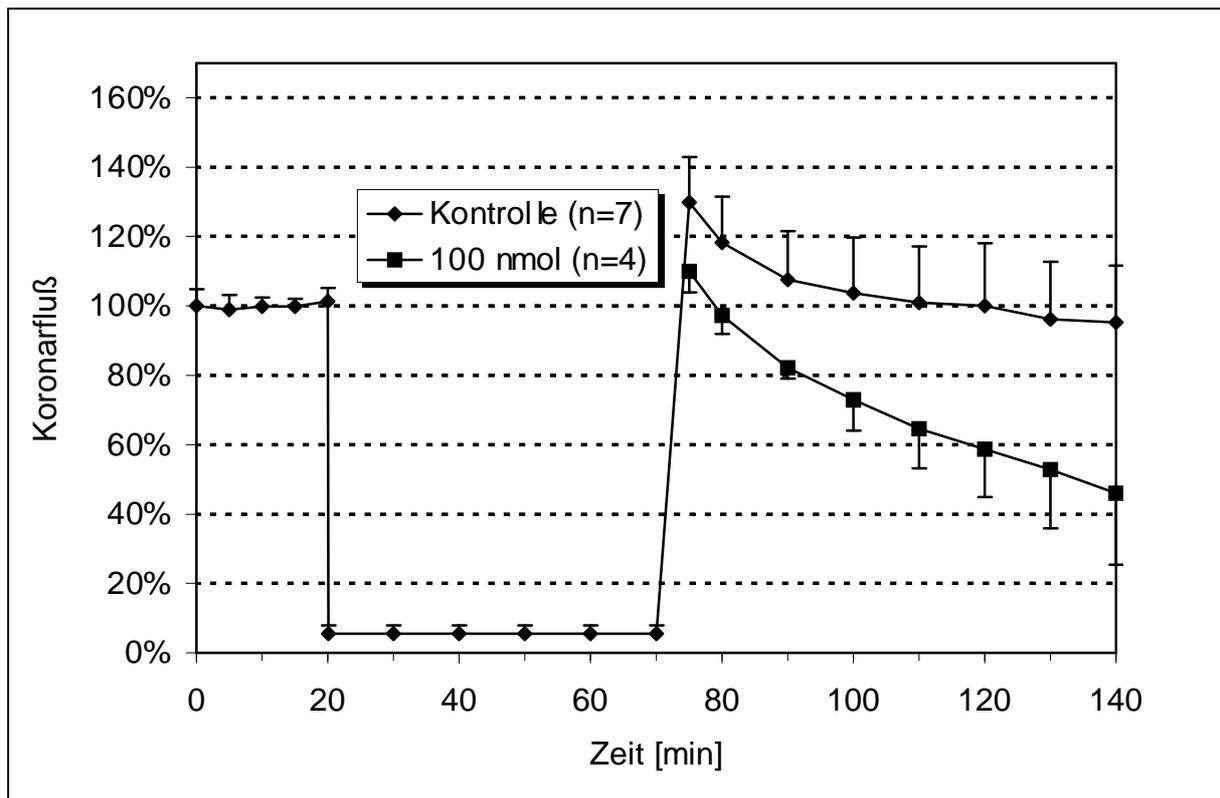


Abb. 20 Koronarfluß bei 100 nmol Terbutalin

C.2 Mitochondriale Messungen

Nach Ablauf der Versuche wurden, wie unter B.5 beschrieben, aus den isolierten Mitochondrien der Herzmuskelzellen die ATPase- und ATP-Synthese-Aktivität sowie die Membranfluidität gemessen.

Im folgenden werden die dabei erhaltenen Ergebnisse beschrieben. Auf der Abszisse ist die jeweils verwendete Terbutalinmenge in μmol , beginnend mit der Kontrolle (ohne Terbutalin), aufgetragen.

Auf der Ordinate sind die ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol ADP/mg/min}$, die ATP-Synthese-Aktivität in $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ und die Membranfluidität (Anisotropie) abzulesen. Da die Anisotropie ein reines Zahlenverhältnis darstellt (s. B.6.3) besitzt sie keine Einheit.

C.2.1 ATPase-Aktivität (Abb.21)

Es fällt zunächst auf, daß die ATPase-Werte für sämtliche Versuche über dem Kontrollwert von etwa $0,6 \mu\text{mol ADP/mg/min}$ liegen. Signifikanzen traten bei $0,5 \text{ nmol}$ und 100 nmol Terbutalin auf.

Vom $0,5 \text{ nmol}$ -Versuch an fällt die ATPase-Aktivität von etwa $1,7 \mu\text{mol ADP/mg/min}$ bis zum 19 nmol -Versuch auf etwa $0,7 \mu\text{mol ADP/mg/min}$ stetig ab. Der 100 nmol -Versuch liegt schließlich mit knapp $1 \mu\text{mol ADP/mg/min}$ wieder über der Kontrolle. Bei Zugabe von 10 nmol Terbutalin ergab sich also ein Tiefpunkt bezüglich der ATPase-Aktivität, der allerdings dennoch oberhalb der Kontrollaktivität liegt.

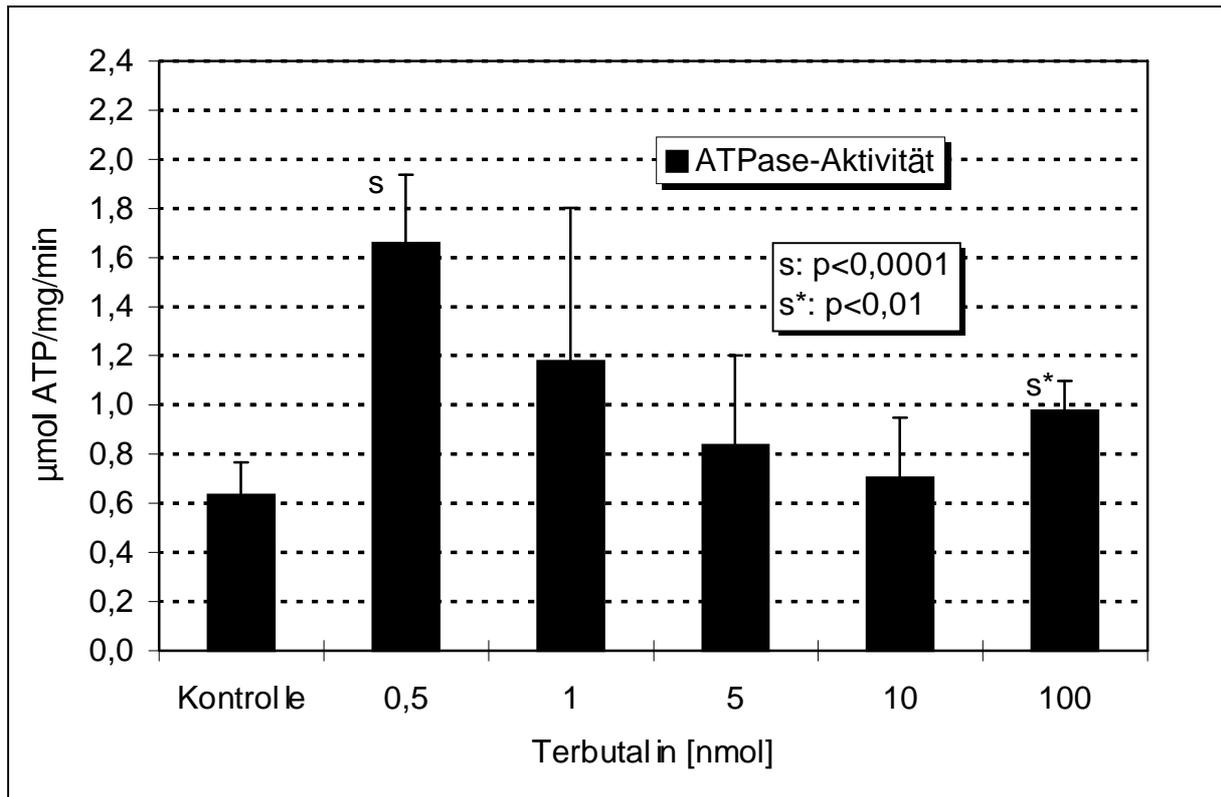


Abb. 21 ATPase-Aktivität

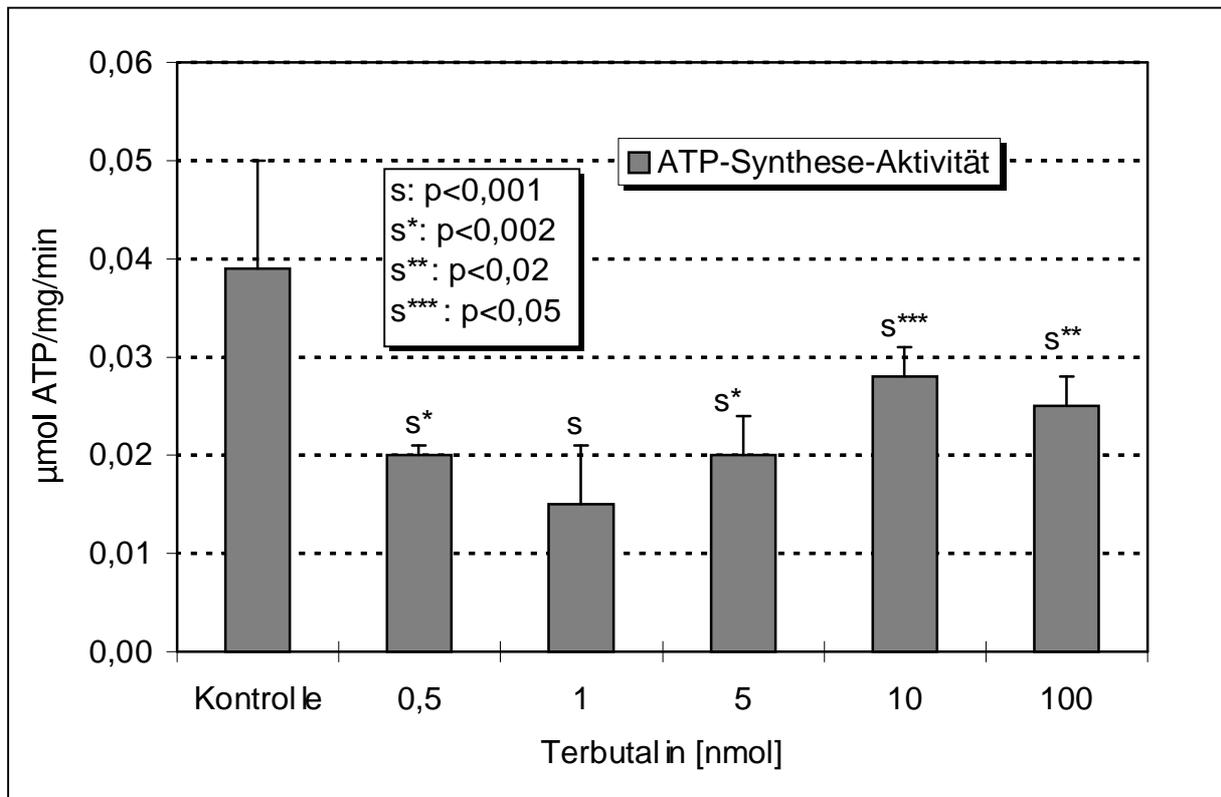


Abb. 22 ATP-Synthese-Aktivität

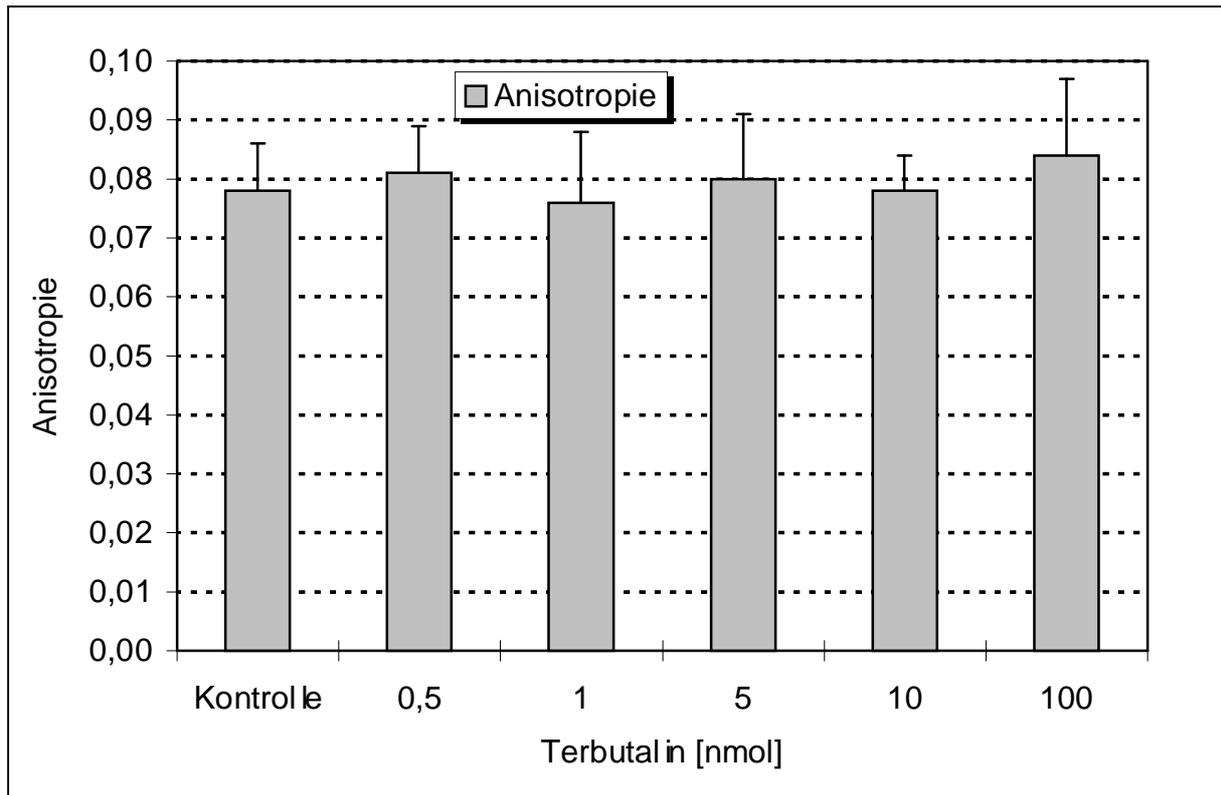


Abb. 23 Membranfluidität

C.2.2 ATP-Synthese-Aktivität (Abb. 22)

Wie die Messung der ATP-Synthese-Aktivität ergab, liegen sämtliche Versuche signifikant unter dem Kontrollwert von 0,04 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$. Ein Tiefpunkt findet sich beim 1 nmol-Versuch. Hier wurden nur etwa 0,015 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ gemessen. Sowohl beim 0,5 nmol- als auch beim 5 nmol-Versuch ergaben sich Werte von etwa 0,02 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$. Die höchsten Aktivitäten waren beim 10 nmol- und beim 100 nmol-Versuch zu messen. Die Werte betragen etwa 0,028 bzw. 0,025 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$.

C.2.3 Membranfluidität (Abb. 23)

Der Kontrollwert für die Anisotropie liegt bei etwa 0,08. Für die Terbutalinversuche ergaben sich kaum Abweichungen von diesem Wert. Der kleinste Anisotropiewert, d.h. die größte Membranfluidität, wurde bei 1 nmol Terbutalin mit etwa 0,075 gefunden. Der 10 nmol-Versuch ergab etwa den gleichen Anisotropiewert wie die Kontrolle. Leicht über der Kontrolle liegen der 0,5 nmol-, der 5 nmol- und der 100 nmol-Versuch, wobei letzterer mit etwa 0,085 am höchsten liegt.

C.3 Zusatzexperimente

Zusätzlich zu den unter C.1 beschriebenen Experimenten wurden drei Versuchsreihen ohne Hypoxiephase durchgeführt. Neben einer Kontrolle (ohne Terbutalin) wurden einmal 1 nmol Terbutalin zugeführt (n=3), da der 1 nmol-Versuch mit Hypoxiephase im Vergleich zu den übrigen Versuchen den besten Aortenfluß aufwies (s. C.1.1).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 10 nmol Terbutalin zugegeben (n=3).

Das Terbutalin wurde wie auch in den Hypoxieversuchen jeweils nach der zwanzigsten Versuchsminute dem Herzen zugeführt (s. B.7).

C.3.1 Aortenflüsse

In Abbildung 24 ist zunächst der 1 nmol-Versuch gegenüber der Kontrolle dargestellt. Bis zur fünfzigsten Versuchsminute verlaufen beide Kurven praktisch miteinander und fallen leicht bis auf etwa 92% der Ausgangswerte ab. Im weiteren Verlauf fällt die Kontrollkurve weiter bis auf 80% ab, während die 1 nmol-Kurve bis zum Versuchsende nahezu konstant bei etwas über 90% verläuft. Bei Terbutalinzugabe nach der zwanzigsten Minute (→) ist praktisch keine Verlaufsänderung der 1 nmol-Kurve im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, verhalten sich die Kurvenverläufe bei Zugabe von 10 nmol Terbutalin deutlich anders.

Wie im 1 nmol -Versuch verlaufen die beiden Kurven bis zur fünfzigsten Versuchsminute zunächst in etwa parallel. Im weiteren Verlauf zeichnet sich nun jedoch ein deutlicher Abfall der 10 nmol -Kurve im Vergleich zur Kontrollkurve ab.

Bei

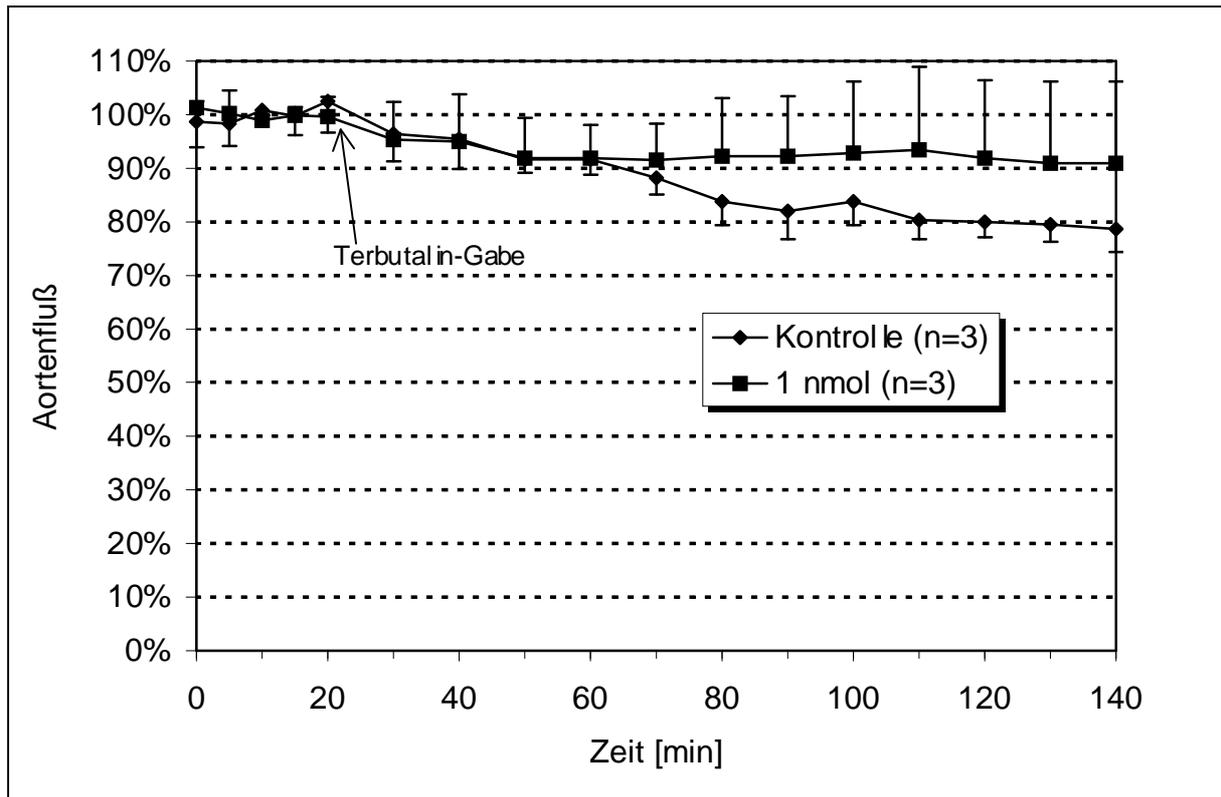


Abb. 24 Aortenfluß bei 1 nmol Terbutalin (ohne Hypoxiephase)

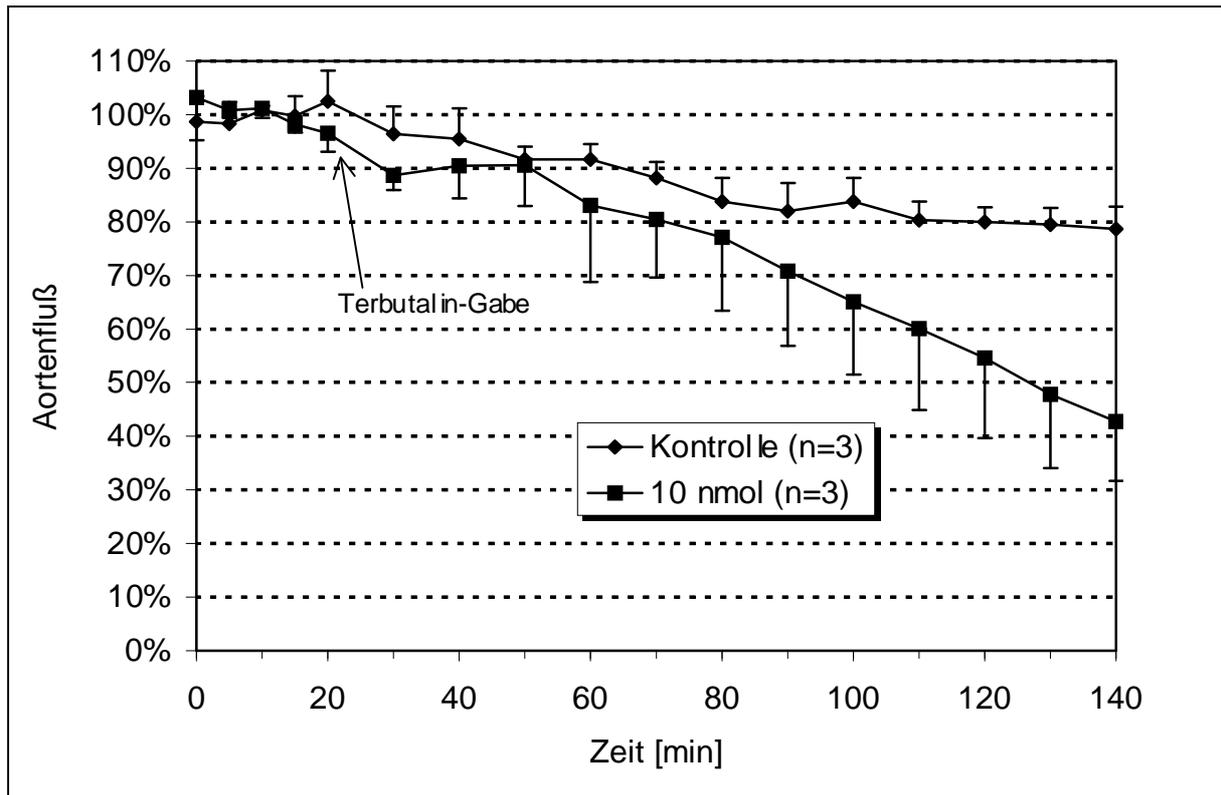


Abb. 25 Aortenfluß bei 10 nmol Terbutalin (ohne Hypoxiephase)

Versuchsende erreicht die immer noch fallende 10 nmol-Kurve gerade noch etwa 43% der Werte vor Terbutalinzugabe.

C.3.2 Koronarflüsse

Die Koronarperfusion ohne Terbutalinzusatz (Kontrolle) bleibt bis zur 70. Versuchsminute relativ konstant bei etwa 100%. Es folgt bis zur 110. Minute ein leichter Abfall der Kurve auf ungefähr 95% des Ausgangswertes. Von hier an erfährt die Kontrollkurve bis zum Versuchsende keine Änderung mehr.

Nach Zugabe von $1 \text{ } \mu\text{mol}$ Terbutalin (Abb. 26) ergibt sich ein diskreter aber kontinuierlicher Anstieg des Koronarflusses bis zum Ende des Versuchs. Nach 140 Versuchsminuten sind ungefähr 105% des Ausgangswertes erreicht.

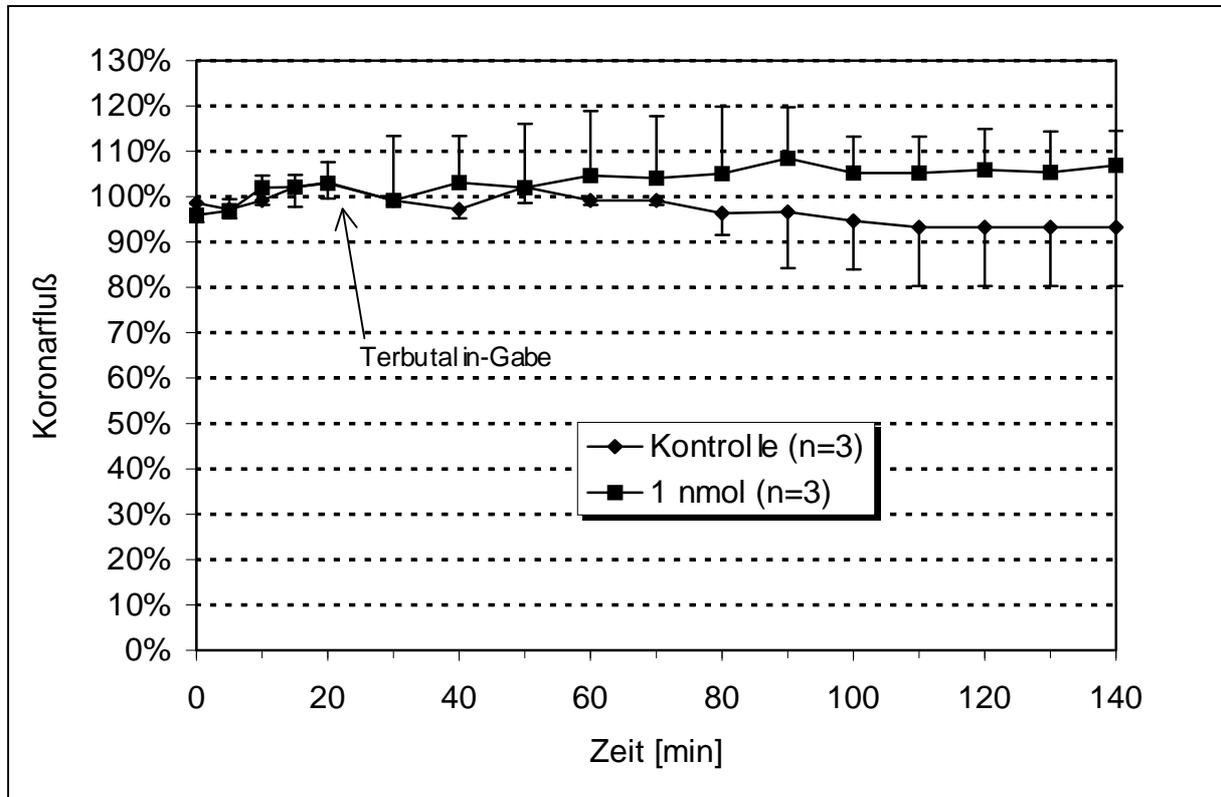
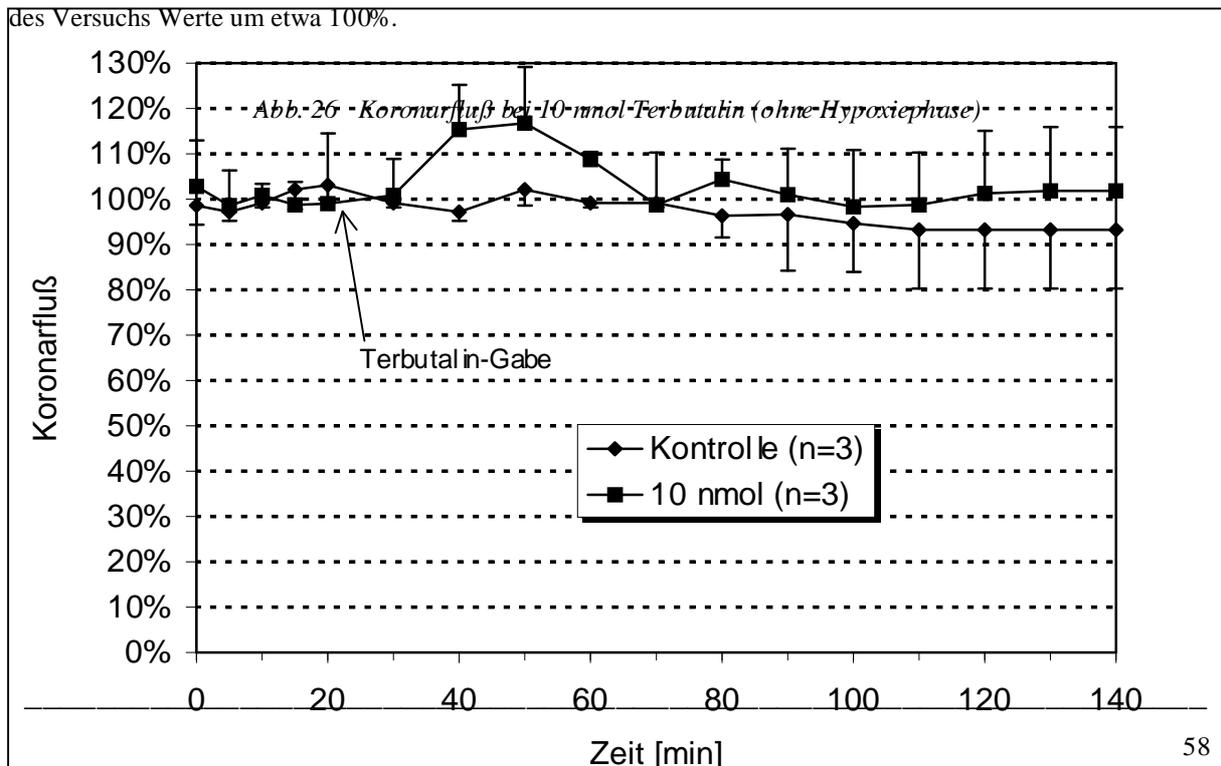


Abb. 26 Koronarfluß bei 1 nmol Terbutalin (ohne Hypoxiephase)

Betrachtet man die Abbildung 27, zeigt sich ein steiler Anstieg des Koronarflusses nach Zugabe von $10 \text{ } \mu\text{mol}$ Terbutalin. Nach der 50. Minute werden etwa 115% des anfänglichen Flusses erreicht. Bis zur 70. Versuchsminute folgt ein ebenso steiler Abfall der Kurve auf etwa 100%. Von hier an ergeben sich bis zum Ende des Versuchs Werte um etwa 100%.



Teil D Diskussion

D.1 Einführung

Seit über zwanzig Jahren ist das β -Sympathomimetikum Terbutalin (2-tert-Butylamino-1-(3,5-dihydroxyphenyl)ethanol) zur Behandlung von obstruktiven Atemwegserkrankungen (chronisch obstruktive Bronchitis, obstruktives Lungenemphysem und Asthma bronchiale) im klinischen Einsatz [8, 57].

Da Patienten, die langjährig an einer dieser Erkrankungen leiden, begleitend zumeist ein chronisch hypoxiegeschädigtes Herz besitzen, sind die kardialen Nebenwirkungen von Terbutalin wie Tachykardien und Arrhythmien von großer klinischer Bedeutung.

Um isoliert die kardialen Wirkungen von Terbutalin zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Experimente durchgeführt.

D.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Vergleicht man die Aortenfluß- und Herzfrequenzdiagramme miteinander, ergibt sich zunächst folgendes:

Bei den Versuchen mit $1 \text{ } \mu\text{mol}$ und 5 nmol Terbutalin fällt eine positive Korrelation zwischen Aortenfluß und Herzfrequenz auf. Das heißt, eine Steigerung bzw. Reduzierung des Aortenflusses ist begleitet von einer Steigerung bzw. Reduzierung der Herzfrequenz. Die signifikante Steigerung des Aortenflusses gegenüber der Kontrolle im 1 nmol -Versuch ist auf eine terbutalinbedingte Stimulierung von kardialen β_1 -Rezeptoren zurückzuführen (s.u.).

Auch im $10 \text{ } \mu\text{mol}$ -Versuch ist eine Korrelation erkennbar. Der anfängliche Absturz des Aortenflusses bis zur 90. Versuchsminute ist von einem entsprechenden Abfall der Schlagfrequenz begleitet. Von da an erholt sich die Herzfrequenz wieder und nähert sich der Kontrollkurve an. Entsprechend verläuft die Aortenflußkurve von der 100. Versuchsminute an parallel zur Kontrollkurve.

Im $100 \text{ } \mu\text{mol}$ -Versuch ist offensichtlich die Schädigung des Herzens so weit fortgeschritten, daß keine Erholung mehr möglich ist. Sowohl Aortenfluß als auch Herzfrequenz fallen stetig über die gesamte

Reoxygenierungsphase. Die hohen Standardabweichungen in beiden Diagrammen sprechen dafür, daß bei einer Dosierung von 100 µmol Terbutalin eine regelmäßigen und vorhersehbaren Reaktionsmechanismen des Herzens mehr erwartet werden können; es kann von einer Überdosierung ausgegangen werden.

Etwas aus der Reihe fällt der 0,5 µmol-Versuch. Die Herzfrequenz weicht kaum von der Kontrolle ab, wogegen der Aortenfluß zumindest zu Beginn der Reoxygenierung deutlich unter der Kontrollkurve liegt.

Der Versuch ist der einzige, bei dem sich das Herz von Beginn an Reoxygenierung an der Hypoxiephase und der terbutalinbedingten Depression zu erholen scheint.

Zusammenfassend ist also eine weitgehende Korrelation zwischen Aortenfluß und Herzfrequenz in der Phase der Reoxygenierung zu erkennen. Es ist anzunehmen, daß die Höhe des Aortenflusses aus der Herzfrequenz resultiert. Das heißt, eine Steigerung der Herzfrequenz hat eine Steigerung des Aortenflusses zur Folge und umgekehrt. Die folgenden vier Abbildungen sollen dies nochmals verdeutlichen.

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen den jeweils ersten (t=75 min.) und letzten (t=140 min.) gemessenen Aortenfluß- bzw. Herzfrequenzwert während der Reoxygenierungsphase.

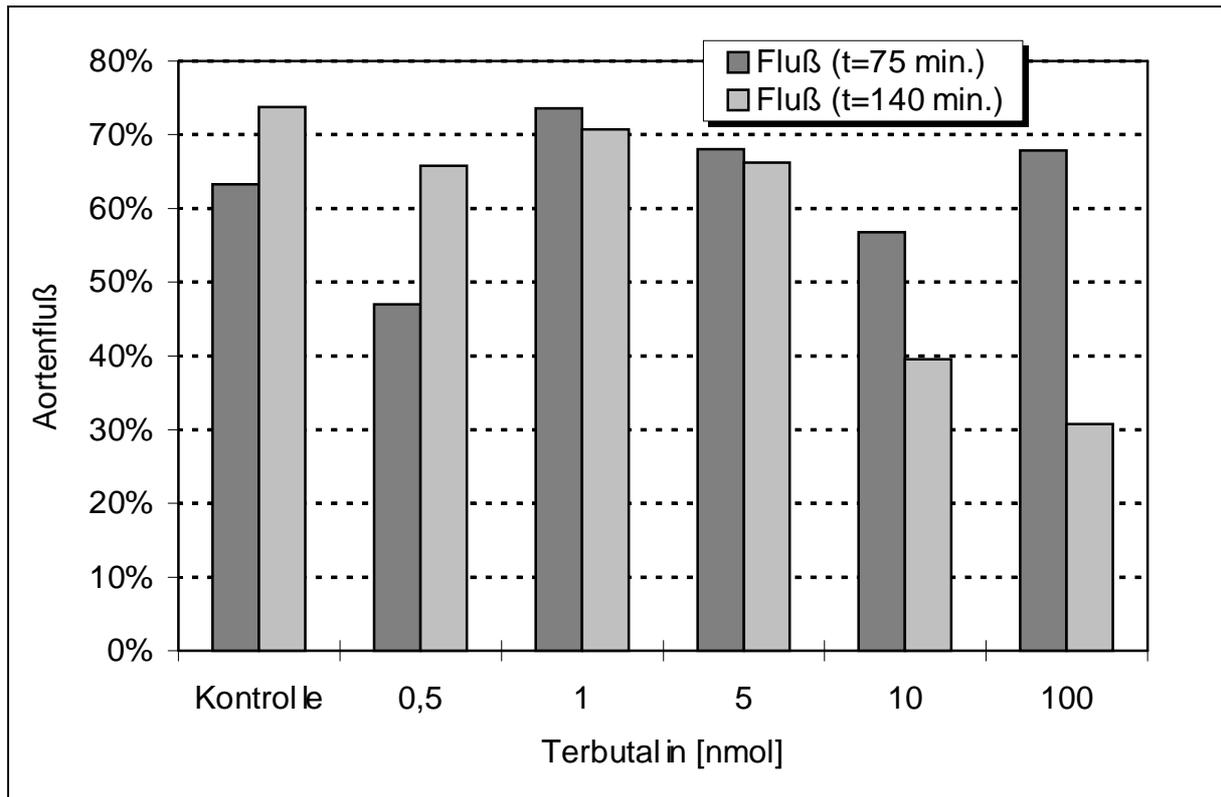


Abb. 28 Erster und letzter gemessener Aortenflußwert

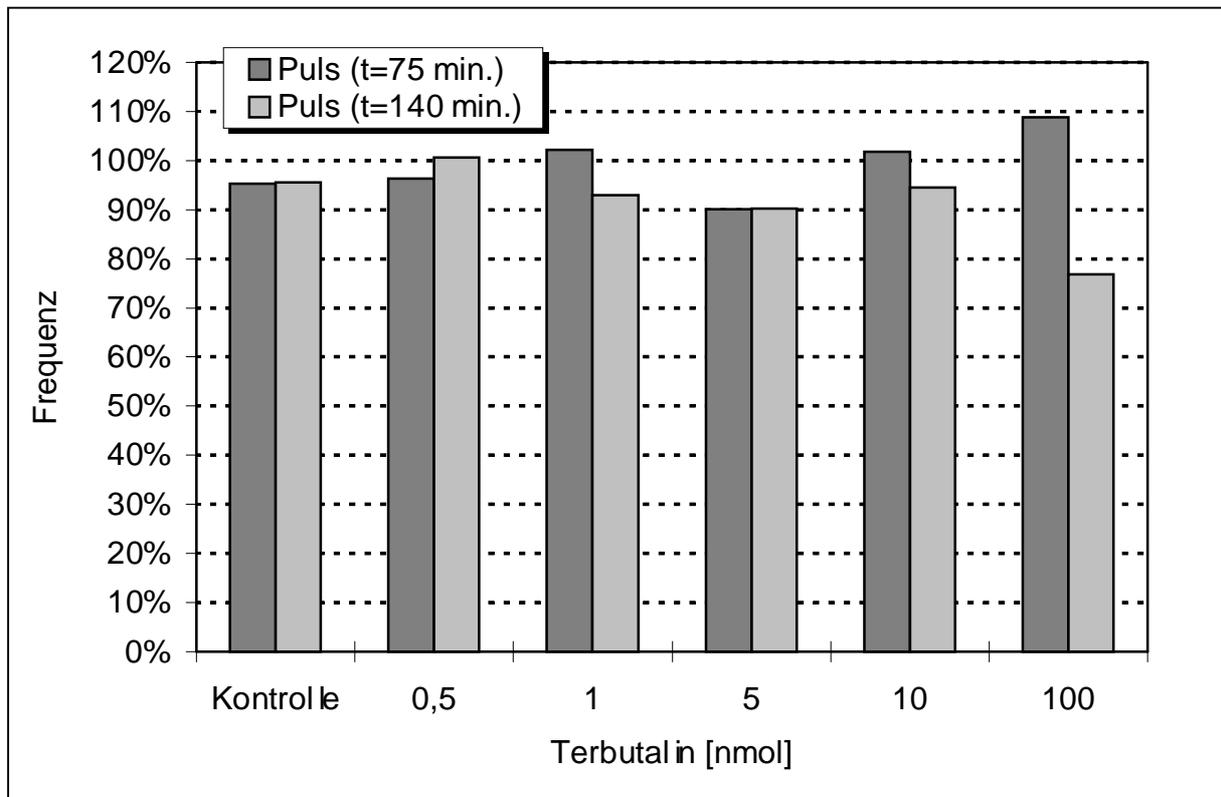


Abb. 29 Erster und letzter gemessener Herzfrequenzwert

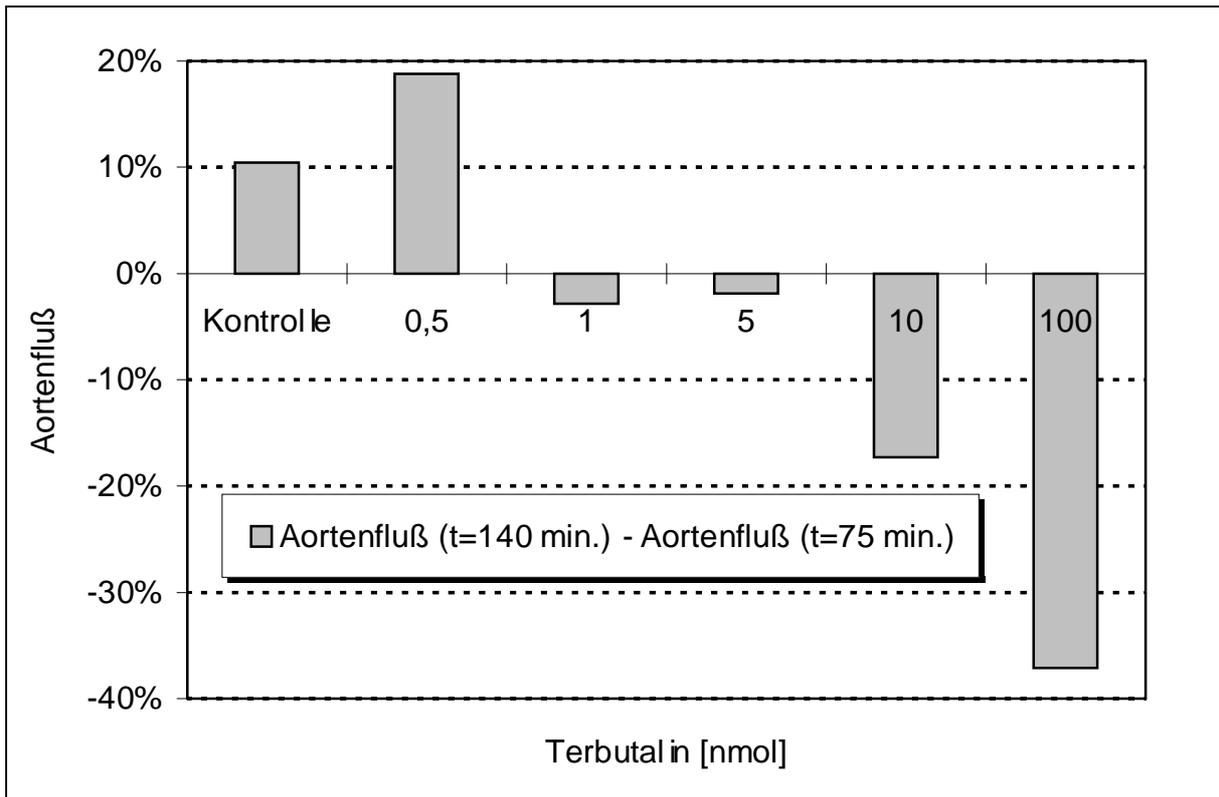


Abb. 30 Differenz zwischen erstem und letztem Aortenflußwert

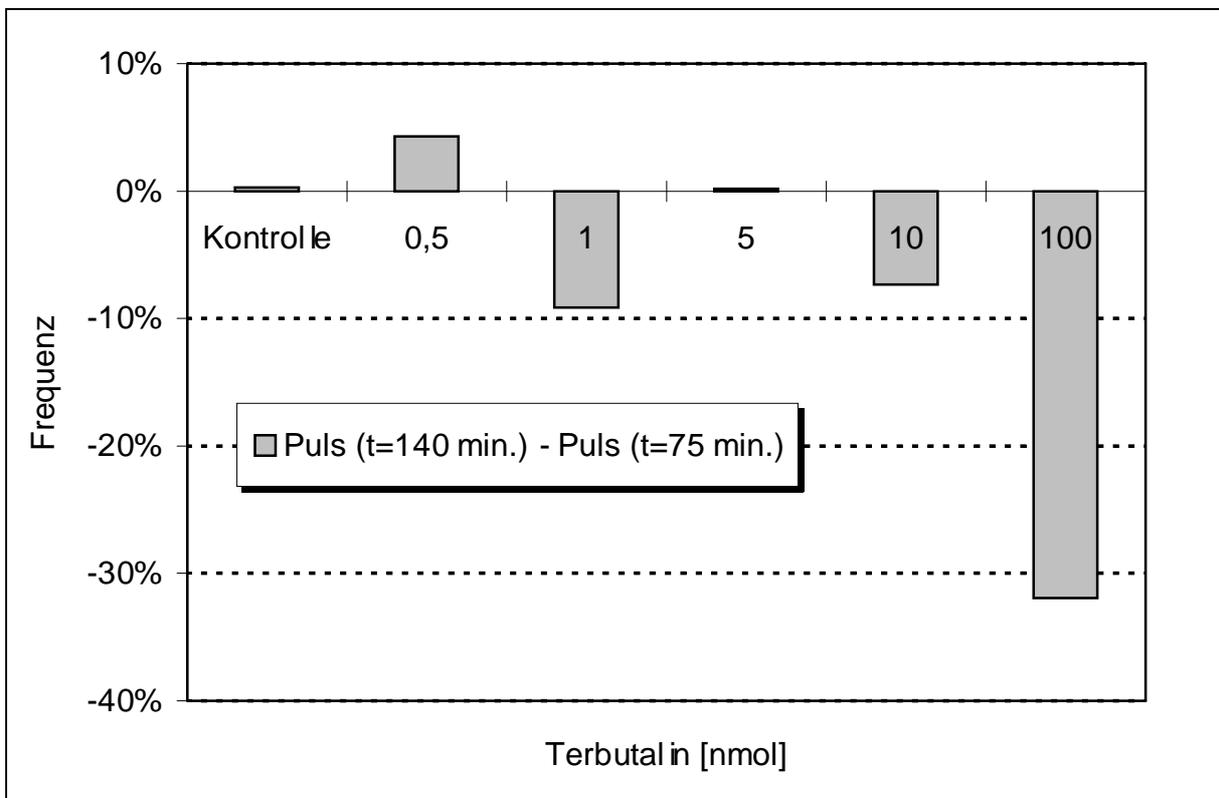


Abb. 31 Differenz zwischen erstem und letztem Herzfrequenzwert

Zur vereinfachten Darstellung werden in den Abbildungen 30 und 31 die Differenzen zwischen erstem und letztem Wert dargestellt. So bedeutet ein positiver Fluß- bzw. Frequenzwert eine Zunahme (Erholung) im Verlauf der Reoxygenierung, ein negativer Wert beschreibt einen abnehmenden Verlauf. Beim Vergleich der beiden Abbildungen ist tendenziell eine Korrelation zwischen Aortenfluß- und Pulsfrequenz zu erkennen.

Des Weiteren ist lediglich im 1 nmol-Versuch eine signifikante Aortenflußsteigerung gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Da sich in allen anderen Versuchen ein Aortenflußabfall zeigte, läßt dies vermuten, daß Terbutalin neben der β -Rezeptor-vermittelten sympathomimetischen Wirkung auch kardiotoxische Wirkungen aufweist, die nicht über β -Rezeptoren vermittelt werden.

Die Ergebnisse der Koronarflußmessungen zeigen den über β_2 -Rezeptoren ermittelten Einfluß von Terbutalin auf die Koronarperfusion. Bekanntlich bewirkt eine Stimulation von β_2 -Rezeptoren eine Vasodilatation (s. A.3.2, Tab. 3). So finden sich in kleinen Dosen wie 0,5 nmol und 1 nmol Terbutalin ohne einen wesentlichen Änderungen des Koronarflusses gegenüber der Kontrolle (Abb. 16 und 17). Im 5 nmol-Versuch (Abb. 18) hingegen zeigt sich eine deutliche Steigerung des Koronarflusses um etwa 10 Prozentpunkte, hervorgerufen durch eine Vasodilatation der Herzkranzgefäße. Die Zugabe von 10 nmol Terbutalin (Abb. 19) bewirkt zwar ebenfalls eine Vasodilatation, die jedoch in ihrem Ausmaß nicht so stark ist wie im 5 nmol-Versuch. Im 100 nmol-Versuch (Abb. 20) findet sich schließlich ein stark reduzierter Koronarfluß, vermutlich als Ausdruck der unter D.3 näher beschriebenen Kardiotoxizität von Terbutalin. Es ist also ein optimaler Wirkungsbereich bezüglich der Koronardilatation festzustellen, der zwischen 1 nmol und 5 nmol liegt.

Bei Betrachtung der Zusatzexperimente ohne Hypoxiephase (Abb. 31 und 32) fällt zunächst auf, daß dem Herzen 10 nmol Terbutalin offensichtlich schlechter bekommen als 1 nmol. Dies entspricht hinsichtlich des Aortenauswurfes den Ergebnissen der Hypoxieversuche (Abb. 7 und 8). Ein Unterschied besteht jedoch darin, daß nach Zugabe von 1 nmol Terbutalin der Aortenfluß in den Versuchen ohne Hypoxiephase bis zum Versuchsende oberhalb der Kontrolle liegt, während in den Versuchen mit Hypoxiephase lediglich zu Beginn der Reoxygenierungsphase der Fall ist. Bei Versuchsende liegt die Terbutalin-Kurve sogar etwas unterhalb der Kontrolle (Abb. 7).

Aus dieser Tatsache läßt sich schließen, daß ein hypoxiegeschädigtes Herz empfindlicher auf die Gabe von Terbutalin reagiert als ein nicht hypoxiegeschädigtes Herz. Daß jedoch auch ohne zusätzliche Hypoxieschädigung eine kardiodepressive Potenz von Terbutalin vorhanden ist, zeigt der starke Aortenflußabfall nach Gabe von 10 nmol (Abb. 32). Die Genese dieser kardiodepressiven Potenz soll unter D.3 erörtert werden.

Die Koronarflußmessungen der Zusatzexperimente zeigen, daß sich die vasodilatatorische Wirkung sowohl nach Zugabe von 1 μ mol Terbutalin (Abb. 26) kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer erstreckt. Hingegen findet sich im 10 μ mol-Versuch nach Terbutalingabe ein deutlicher Anstieg der Koronarperfusion, der allerdings nach 30 Minuten wieder ebenso deutlich auf den Ausgangswert abfällt.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß Terbutalin die Eigenschaft besitzt, die Auswurfleistung vor allem hypoxiegeschädigter Herzen (wie beim chronisch obstruktiv Lungenkranken) wesentlich zu beeinträchtigen.

Um nun die Ergebnisse der Aortenfluß- und Herzfrequenzmessungen in Zusammenhang mit den mitochondrialen Messungen zu bringen, sind in Abbildung 32 die Ergebnisse der letzteren nochmals in einem Diagramm zusammengefaßt.

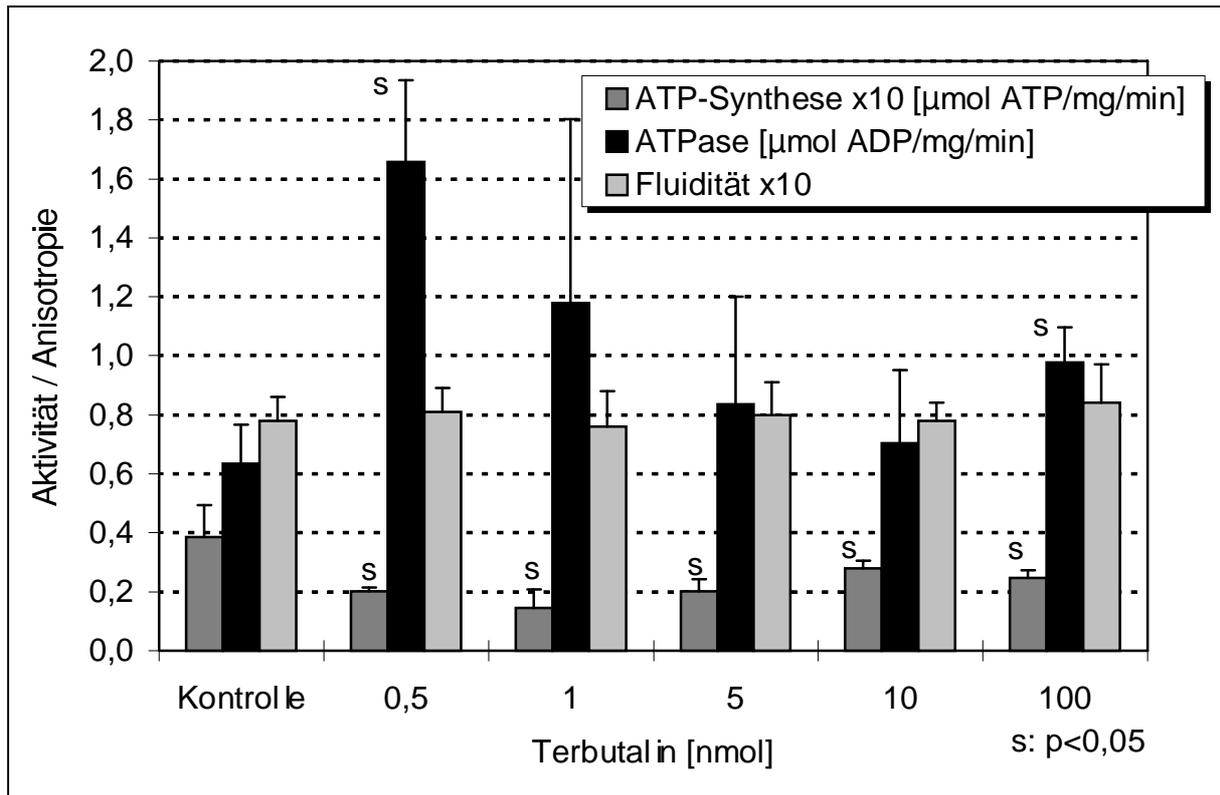


Abb. 32 Ergebniszusammenfassung der mitochondrialen Messungen

Sämtliche ATP-Synthese-Werte liegen signifikant unterhalb des Kontrollwertes von etwa 0,04 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$. Dabei weist der 1 nmol-Versuch, der als einziger einen signifikant höheren Aortenflußanstieg gegenüber der Kontrolle zeigte, die niedrigste Synthese-Aktivität auf.

Die niedrigen Synthese-Aktivitäten gegenüber der Kontrolle sind Ausdruck der kardiotoxischen Wirkkomponente von Terbutalin. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß die mitochondrialen Messungen einen Zustand nach Ablauf des jeweiligen Experiments widerspiegeln. Entsprechend läßt sich auch ein Zusammenhang erstellen zwischen den ATP-Synthese-Aktivitäten (Abb. 32) und endjeweils am Ende der Reoxygenierung gemessenen Aortenflußwerten (Abb. 28). Vergleicht man die Reihe nach den t40Aortenflußwert und die entsprechende ATP-Synthese-Aktivität der Versuche mit 0,5, 1, 5 und 10 nmol Terbutalin, so besteht eine negative Korrelation. Ein erhöhter t40Aortenfluß ist begleitet von einer erniedrigten Synthese-Aktivität und umgekehrt. Es kann also von einem aortenflußabhängigen Energieverbrauch ausgegangen werden, wobei die verbrauchte Energie nicht durch eine erhöhte ATP-Synthese-Aktivität kompensiert werden kann. Die Energiebilanz ist negativ. Als Gründe für die Unfähigkeit der Myokardzellen, einen erhöhten Energiebedarf durch erhöhte ATP-Synthese zu decken, kommen sowohl schädigende Effekte durch die Hypoxie- bzw. Reperusionsphase als auch durch das Terbutalin per se in Frage. Auf beides wird unter D.3 näher eingegangen. Da jedoch sämtliche Synthese-Aktivitäten signifikant unterhalb der Kontrolle, die

den schädigenden Einfluß ausschließlich der Hypoxiephase sind kardiotoxische Effekte der Substanz Terbutalin wohl am wahrscheinlichsten.

Für den 100 mol-Versuch trifft die negative Korrelation zwischen t_{140} -Aortenfluß und ATP-Synthese-Aktivität allerdings nicht zu. Es findet sich bei relativ niedrigem t_{140} -Aortenfluß eine ebenfalls relativ niedrige Synthese-Aktivität. Wahrscheinlich ist dies auf den erhältnismäßig hohen Aortenfluß zu Beginn der Reoxygenierungsphase (t_{75} , Abb. 28) zurückzuführen, wo schon der größte Teil der zur Verfügung stehenden Energie verbraucht wurde.

Betrachtet man die ATPase-Aktivitäten in Abbildung 32, so fallen zunächst relativ hohe Werte auf, was bezüglich der niedrigen ATP-Synthese-Aktivitäten auch zu erwarten ist (s. A.6.3, Abb. 4). Der niedrigste ATP-Wert von etwa 0,7 $\mu\text{mol ADP/mg/min}$ wurde beim 10 mol-Versuch gemessen, wobei dieser Wert immer noch etwas über der Kontrolle liegt. Hier findet sich auch die höchste ATP-Synthese-Aktivität. Es besteht also eine erwartungsgemäß negative Korrelation zwischen den ATP-Synthese- und ATPase-Aktivitäten. Lediglich beim 0,5 mol-Versuch wurde eine unerwartungsgemäß hohe ATPase-Aktivität von etwa 1,65 $\mu\text{mol ADP/mg/min}$ verzeichnet. Später wird hierauf nochmals eingegangen.

Die Tatsache, daß sämtliche ATPase-Werte oberhalb der Kontrolle liegen, bringt zum Ausdruck, daß die Terbutalin-behandelten Herzen einen deutlich erhöhten Energiebedarf aufweisen als die nicht Terbutalin-behandelten Kontrollherzen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Kardiotoxizität von Terbutalin.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen, zeigen sich bezüglich der Membranfluidität keine nennenswerten konzentrationsabhängigen Unterschiede zwischen den Terbutalin-behandelten Herzen und Kontrollherzen. Die hypoxiebedingten Mitochondrienmembrandefekte, die nach fünfzigminütiger Hypoxie sicherlich vorliegen [68], haben sich also unter dem Einfluß von Terbutalin nicht wesentlich verschlechtert. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die schlechtere Leistung der Terbutalin-behandelten Herzen nicht hauptsächlich auf *hypoxiebedingte Mitochondrienmembrandefekte* zurückzuführen ist, sondern viel wahrscheinlicher auf *Terbutalin-bedingte toxische Effekte*, deren Mechanismus diskutiert werden muß.

D.3 Mechanismen der Kardiotoxizität

Wie unter D.2 beschrieben, besitzt Terbutalin offensichtlich eine kardiodepressive Wirkkomponente. Der Mechanismus dieser Wirkkomponente soll im folgenden erörtert werden.

Mögliche Mechanismen sind:

- a) relative Übersimulation von adrenergen β -Rezeptoren
- b) partieller Agonismus von Terbutalin an adrenergen β -Rezeptoren
- c) direkte, nicht über adrenerge Rezeptoren vermittelte Kardiotoxizität

a) *Relative Überstimulation von adrenergen β -Rezeptoren*

Terbutalin ist als β -Sympathomimetikum mit relativer β_2 -Selektivität in therapeutischer Anwendung. Die Selektivität von Terbutalin ist zwar im Vergleich zu anderen Bronchospasmolytika (Salbutamol, Reproterol) relativ hoch [26], dennoch ist eine gewisse Affinität zu β_1 -Rezeptoren noch vorhanden.

Aufgrund dessen werden durch Terbutalin zum einen kardiale β_1 -Rezeptoren stimuliert. Zum anderen befinden sich an den Myokardzellen nicht nur β_1 -, sondern auch β_2 -Rezeptoren, die natürlich aufgrund der Selektivität von Terbutalin bevorzugt erregt werden. Das Verhältnis von β_1 - zu β_2 -Rezeptoren am Myokard beträgt etwa 85% zu 15% [30]. Auch die Stimulierung von kardialen β_2 -Rezeptoren wirkt sich sympathomimetisch (positiv inotrop und chronotrop) auf die Herzaktivität aus [25, 63]. Diese β -Rezeptor-vermittelte Steigerung der Herzaktivität erfordert ein erhöhtes Angebot an Sauerstoff, das unter physiologischen Verhältnissen auch gedeckt wird. In unphysiologisch hohen Mengen eines β -Rezeptoren stimulierenden Mittels kann der nötige Sauerstoffbedarf jedoch nicht gedeckt werden, es liegt eine Überstimulation vor. Wird das Medikament unter Hypoxiebedingungen gegeben, so kann auch in physiologischen Mengen der Sauerstoffbedarf nicht gedeckt werden. Es liegt also eine relative Überstimulation vor. Sowohl eine Überstimulation von β_1 - als auch von β_2 -Rezeptoren kann ursächlich für unerwünschte toxische Wirkungen sein [31, 38].

Der zugrunde liegende Mechanismus soll im folgenden kurz erläutert werden:

Durch den Mangel an Sauerstoff kommt es zunächst zu einer Permeabilitätserhöhung der Myokardzellmembran, die einen gesteigerten Einstrom von Na^+ - und vor allem Ca^{++} -Ionen zur Folge hat [1, 23, 31, 62, 68]. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie H_2O_2 , OH^\bullet , und $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Dafür seien hier zwei Beispiele genannt:

- 1) Die erhöhte Kalziumkonzentration bewirkt eine Konversion der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase, die unter anderem die Entstehung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$ katalysiert [2, 22, 31, 68].
- 2) Es wurde mehrfach beschrieben, daß die Reoxygenierung nach einer Hypoxiephase (oxidativer Streß, s. A.7) zu Schäden an der Myokardzelle führt [2, 22, 23, 51, 62, 68]. Verantwortlich hierfür ist eine nochmalige Steigerung des Kalziumeinstroms in die Zelle. Die exzessiv erhöhte zyttoplasmatische Ca^{++} -Konzentration bewirkt nun einerseits die Aktivierung von Phospholipasen und die mitochondriale Atmungskette hemmenden Proteasen, zum anderen wird die mitochondriale Kalziumspeicherkapazität überlastet, was zum Anschwellen der Mitochondrien und einer irreversiblen Schädigung führt. Die gehemmte Atmungskette in Verbindung mit einer reoxygenierungsbedingten hohen Sauerstoffkonzentration führt zur intramitochondrialen Entstehung von Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [5, 68].

Die hypoxie- bzw. reperfusionsbedingten Sauerstoffradikale wirken sich in unterschiedlicher Weise negativ auf die Zellfunktion aus. So wurde das Auftreten von Arrhythmien und ventrikulären Dysfunktionen beschrieben [5]. Auch führt eine erhöhte Lipidperoxidation zu Permeabilitätsstörungen an Membranen, was einen erhöhten Einstrom von Kalzium in die Zelle und die Mitochondrien zur Folge hat [2, 5, 23, 31, 68].

Ferner bewirken freie radikale die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma [42].

Der auf diese Weise stark erhöhte intrazelluläre Kalziumgehalt führt dann wiederum zu oben beschriebenen Dysfunktionen, wodurch ein Circulus vitiosus geschlossen wird. Es sollte auch hier erwähnt werden, daß

„working hearts“ in Normoxie-Hypoxie-Reoxygenierung-Experimenten etwa die doppelte Menge an Radikalen produzieren als beispielsweise „Langendorff-Herzen“ [13].

Andererseits ist die hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht nur für die Entstehung von Sauerstoffradikalen verantwortlich, sondern auch für eine direkte Hemmung der mitochondrialen ATP-Produktion. Sowohl die ATP-Synthese als auch die intramitochondriale Kalziumhomöostase sind abhängig von einem H^+ -Gradienten an der inneren Mitochondrienmembran. Ist nun die intrazelluläre Kalziumkonzentration sehr hoch, wird mehr Energie für den Transport von Ca^{++} in das Mitochondrium verwendet als für eine Steigerung der ATP-Synthese [23]. Dies würde die signifikant erniedrigte ATP-Synthese-Aktivität der Terbutalinversuche (Abb. 32) erklären.

Die Auswirkungen oxidativen Stresses, bedingt durch relative adrenerge Überstimulation, stellen also durchaus eine mögliche Erklärung für die kardiodepressive Potenz von Terbutalin dar.

b) Partieller Agonismus von Terbutalin an adrenergen β -Rezeptoren

Es wurde mehrfach beschrieben, daß Terbutalin am β -Rezeptor kein voller, sondern nur ein partieller Agonist ist [15, 28, 31, 74]. Das bedeutet, über Terbutalin können auch antagonistische, das heißt kardiodepressive Effekte am β -Rezeptor vermittelt werden, die die Ergebnisse der Terbutalinversuche erklären könnten.

Auch der oben beschriebene oxidative Streß und dessen Auswirkungen können mit dem partiellen Agonismus von Terbutalin in Verbindung gebracht werden.

Die unter oxidativem Streß entstehenden freien Sauerstoffradikale, darunter auch H_2O_2 , bewirken eine Reduktion der Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Es geschieht dies vermutlich durch eine Funktionshemmung des an den β -Rezeptor gekoppelten G_s -Proteins (s. A.4.1 [31]). Diese Funktionshemmung geschieht entweder durch die Radikale direkt oder indirekt durch eine erhöhte Lipidperoxidation.

Daraus läßt sich schließen, daß durch oxidativen Streß der maximal erreichbare β -Rezeptor-vermittelte inotrope Effekt reduziert wird. In einer Arbeit von Haenen [31] wird nun beschrieben, daß oxidativer Streß die maximale Wirksamkeit partieller Agonisten stärker reduziert als die voller Agonisten, was eine weitere mögliche Erklärung für die Kardiotoxizität von Terbutalin darstellt.

c) Direkte, nicht über adrenerge Rezeptoren vermittelte Kardiotoxizität

Vor allem in der Geburtshilfe, wo Terbutalin zur Tokolyse verwendet wird, wurde des öfteren von kardialen Nebenwirkungen berichtet, die in ihrem Ausmaß schwerwiegender waren als bei der Verwendung anderer β_2 -Sympathomimetika [45, 55, 59]. Die beschriebenen Symptome reichen vom pulmonalen Ödem [59] über Kardiomyopathien [45] bis hin zu Brustschmerzen und lebensbedrohlicher myokardialer Ischämie [6, 55, 59].

All diesen Fällen ist gemeinsam, daß die Pathophysiologie der Toxizität unklar bzw. nicht vollständig über die Effekte einer β -adrenergen Stimulation erklärbar ist [43]. Bei der Genese der Toxizität von Terbutalin spielen also sehr wahrscheinlich auch nicht über β -Rezeptoren vermittelte Mechanismen mit eine Rolle.

D.4 Fazit

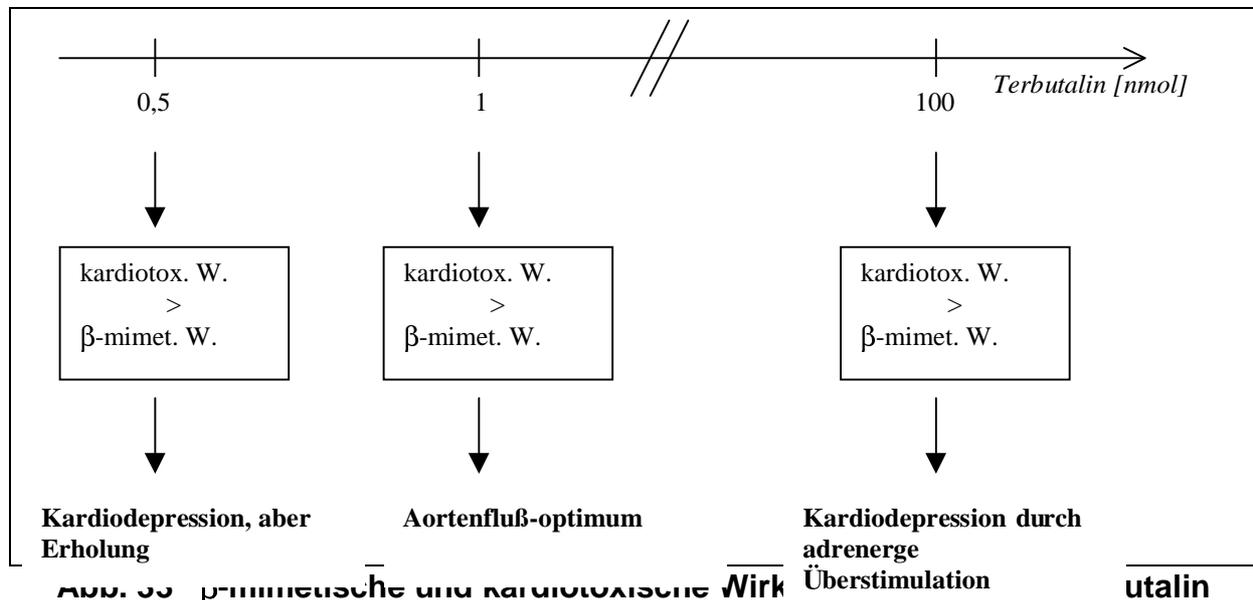
Zusammenfassend ist sicherlich von einer kardiodepressiven oder gar kardiotoxischen Eigenschaft des β_2 -Sympathomimetikums Terbutalin auszugehen. Der genaue Mechanismus dieser Eigenschaft ist durch die vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig zu beschreiben.

Vermutlich muß von zwei unterschiedlichen Wirkkomponenten ausgegangen werden:

- a) β -mimetische Wirkung
- b) kardiotoxische Wirkung

Diese beiden Wirkkomponenten kommen in Abhängigkeit von der verabreichten Terbutalinmenge mehr oder weniger stark zum Tragen.

In Abbildung 33 soll dies grafisch schematisiert zur Darstellung kommen.



Die kardiotoxische Wirkkomponente ist von Grund auf vorhanden, wird jedoch mit steigender Terbutalinkonzentration mehr und mehr von der β -

mimetischen Wirkeigenschaft überdeckt. So werden im 0,5 nmol-Versuch noch nicht genügend β -Rezeptoren stimuliert, so daß die kardiotoxische Wirkung überwiegt. Die Terbutalinkonzentration ist allerdings hier so gering, daß sich das Herz wieder erholen kann (Abb. 6). Die hohe Energie, die dazu aufgebracht werden muß, kommt in der hohen ATPase-Aktivität zum Ausdruck (Abb. 32).

Im 1 μ mol-Versuch ist eine optimale Menge an Terbutalin vorhanden, der Aortenfluß steigt signifikant über die Kontrolle (Abb. 7). Das bedeutet, die kardiotoxische Wirkkomponente wird durch die β -mimetische überspielt. Schließlich findet im 100 μ mol-Versuch (Abb. 10) eine Überstimulierung von β -Rezeptoren statt, die die unter D.3 beschriebenen kardiodepressiven Folgen mit sich bringt. Der Aortenfluß übertrifft anfangs die Kontrolle, stürzt dann aber regelrecht ab. Die Aortenflußergebnisse der Zusatzexperimente ohne Hypoxiephase (Abb. 24 und 25) zeigen die kardiotoxischen Effekte von Terbutalin weniger deutlich. Diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß die kardiotoxischen Wirkeigenschaften von Terbutalin bei zusätzlicher Hypoxieschädigung der Herzmuskelzellen an Bedeutung gewinnen.

Nach den Ergebnissen der in dieser Dissertation beschriebenen Experimente sollte Terbutalin in der Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen nicht ein Medikament erster Wahl sein. Es muß damit gerechnet werden, daß Terbutalin gerade am hypoxiegeschädigten Herzen des chronisch obstruktiv Lungenkranken kardiotoxische Potenz besitzt. Es empfiehlt sich somit, auf andere β -Sympathomimetika auszuweichen.

Zusammenfassung

Zusammen mit anderen β_2 -Sympathomimetika wird Terbutalin schon seit langem in der Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COLE) eingesetzt. Dabei wurde mehrfach von schweren unerwünschten kardialen Wirkungen nach der Anwendung von Terbutalin berichtet.

Die Tatsache, daß die COLE in der Regel mit chronisch hypoxiegeschädigten Herzen assoziiert sind, gab Anlaß, die Auswirkungen von Terbutalin auf hypoxiebelastete isolierte Rattenherzen und deren Mitochondrien zu untersuchen.

Dafür wurde das zunächst für 20 Minuten normoxisch arbeitende Rattenherz (working rat heart) einer fünfzigminütigen Hypoxiephase ausgesetzt, während es mit Terbutalin in Konzentrationen zwischen 1,1 und 225,3 $\mu\text{mol/l}$ perfundiert wurde (0,5, 1, 5, 10 und 100 μmol Terbutalin auf 100 ml Perfusionspuffer). Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 2 ml/min.

Der Hypoxiephase folgte eine siebzugminütige Reoxygenierungsphase, in der in zehnminütigen Abständen das Herzminutenvolumen (HMV), die Herzfrequenz und der Koronarfluß dokumentiert wurden.

Nach Abschluß der Reoxygenierungsphase wurden die myokardialen Mitochondrien isoliert, um die ATP-Synthese- und ATPase-Aktivitäten sowie die Membranfluidität zu messen.

Zusätzlich wurden zwei Versuchsreihen ohne Hypoxiephase durchgeführt (mit 1 und 100 μmol Terbutalin), um die alleinige Wirkung von Terbutalin auf die Rattenherzen zu untersuchen.

Die Aortenflußmessung während der Reoxygenierung ergab eine generelle Reduzierung der Herzleistung im Vergleich zu den Kontrollherzen (ohne Terbutalinzugabe). Lediglich im 1 μmol -Versuch (2,3 ng/ml) war zu Beginn der Reoxygenierungsphase eine signifikante Steigerung des HMV festzustellen. Jedoch hielt auch diese Steigerung nur für etwa zwanzig Minuten an. Alle anderen Versuchsreihen (mit 0,5, 5, 10 und 100 μmol Terbutalin) ergaben eine deutliche Verschlechterung der Herzleistung. Das HMV der Kontrollherzen betrug während der Reoxygenierung durchschnittlich etwa 75% des HMV vor der Hypoxiephase.

Die Terbutalinherzen erreichten abgesehen vom 1 μmol -Versuch, wo ein HMV-Maximum von etwa 80% erreicht wurde, Aortenflußwerte, die zwischen 30% und 70% der Ausgangswerte lagen. Eine Besonderheit ergab sich beim 0,5 μmol -Versuch. Hier fand sich eine Steigerung des Aortenflusses über den gesamten Verlauf der Reoxygenierung von etwa 48% auf 68%. Das Herz schien sich von einer anfangs starken Reduzierung des HMV wieder zu erholen. Bezüglich der Herzfrequenzen war eine weitgehende Korrelation zu den Herzminutenvolumina festzustellen, so daß eine Steigerung des HMV vermutlich Folge einer Herzfrequenzsteigerung ist und umgekehrt.

Die Koronarflußmessungen ergaben eine Steigerung der Koronarperfusion, also eine Vasodilatation, ab einer Dosis von zwischen 1 μmol und 5 μmol Terbutalin. In höheren Dosen (10 μmol und 100 μmol) kam es zu einer deutlichen Reduzierung des Koronarflusses, was vermutlich auf die kardiotoxischen Wirkeigenschaften von Terbutalin zurückzuführen ist. Es zeigte sich also ein optimaler Wirkungsbereich, der zwischen 1 μmol und 5 μmol liegt.

Die mitochondrialen Messungen ergaben eine generelle Reduzierung der ATP-Synthese-Aktivitäten (0,015-0,03 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$) und eine generelle Steigerung der ATPase-Aktivitäten (0,7-1,65 $\mu\text{mol ADP/mg/min}$) im

Vergleich zur Kontrolle (0,04 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ bzw. 0,6 $\mu\text{mol ADP/mg/min}$). Dabei trat das ATP-Synthese-Aktivitätsmaximum bzw. das ATPase-Aktivitätsminimum im 10 μmol -Versuch auf. Die kleinste ATP-Synthese-Aktivität (0,015 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$) wurde beim 1 μmol -Versuch, wobei gleichzeitig das HMV-Maximum erreicht wurde, gemessen. Es kann also von einem erhöhten Energiebedarf, der nicht durch eine gesteigerte ATP-Synthese-Aktivität gedeckt wird, ausgegangen werden. Vermutlich wird die ATP-Synthese durch eine aufgrund hoher intramitochondrialer Kalziumspiegel gesteigerte Aktivität von ebenfalls H^+ -Gradienten-abhängigen Kalziumcarriern 'kompetitiv' gehemmt. Die hohen intramitochondrialen Kalziumspiegel sind dabei eine Folge hypoxie- bzw. reoxygenierungsbedingter Membrandefekte.

Die Messungen der Membranfluidität ergaben keine nennenswerten Abweichungen von der Kontrolle. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die kardiodepressiven Effekte nicht hauptsächlich auf hypoxiebedingte Mitochondrienmembrandefekte zurückzuführen sind, sondern viel wahrscheinlicher auf Terbutalin-bedingte toxische Effekte.

Die Experimente ohne Hypoxiephase ergaben mit 1 μmol Terbutalin (2,3 ng/ml) eine diskrete Steigerung des HMV, mit 10 μmol Terbutalin (22,5 ng/ml) eine deutliche Reduzierung. Dies läßt den Schluß zu, daß die kardiodepressive Potenz von Terbutalin durch zusätzliche Hypoxiebelastung verstärkt wird.

Drei mögliche Mechanismen können für die kardiodepressiven Eigenschaften von Terbutalin verantwortlich gemacht werden. Zum einen führt eine hypoxiebedingte relative Überstimulation von β -Rezeptoren zur Entstehung von Sauerstoffradikalverbindungen, die zum Teil irreversible Zellschädigungen verursachen können. Die Entstehung von Sauerstoffradikalen wird durch die Reoxygenierung (oxidativer Streß) nach der Hypoxiephase noch verstärkt.

Zum zweiten handelt es sich bei Terbutalin um einen partiellen Agonisten am β -Rezeptor. Vor allem in Verbindung mit oxidativem Streß, der durch die Reoxygenierung gegeben ist, wird die maximale Wirksamkeit partieller Agonisten reduziert, was sich auch auf die positiv inotropen Eigenschaften von Terbutalin auswirkt.

Zum dritten kann von nicht über β -Rezeptoren vermittelten kardiotoxischen Effekten ausgegangen werden.

Vermutlich ist eine dosisabhängige Kombination aller drei Mechanismen die Ursache für die Kardiotoxizität von Terbutalin. Es muß also von einer rezeptorvermittelten β -mimetischen durch eine primär kardiotoxische Wirkkomponente ausgegangen werden. In niedriger Dosierung (0,5 μmol) überwiegt die kardiotoxische Wirkkomponente, von deren Auswirkungen sich die Rattenherzen jedoch erholen konnten. Im 1 μmol -Versuch war dann eine optimale Dosierung erreicht (1 $\mu\text{mol}/100\text{ml} \approx 2,3 \text{ ng/ml}$), die gleichzeitig auch der effektiven Plasmakonzentration (beim Menschen) von Terbutalin entspricht. Hier überwiegt die β -mimetische Wirkkomponente. In höherer Dosierung (10 μmol und 100 μmol) kommt es dann zur relativen Überstimulation von β -Rezeptoren, was zu den oben beschriebenen teils irreversiblen Myokardschäden führt.

Literaturverzeichnis

- [1] ALLEN, S. P., DARLEY-USMAR, V. M., MC CORMACK, J. G., STONE, D.: Changes in mitochondrial matrix free calcium in perfused rat hearts subjected to hypoxia-reoxygenation, *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* (1993), 25(8):949-958
- [2] AMBROSIO, G., ZWEIER, J. L., DUILIO, C., KUPPUSAMY, P., SANTORO, G., ELIA, P. P., TRITTO, I., CIRILLO, P., CONDORELLI, M., CHIARIELLO, M.: Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow, *Journal of Biological Chemistry* (1993), 268(25):18532-18541
- [3] ASSADNAZARI, H., ZIMMER, G., FREISLEBEN, H. J., WERK, W.: Cardioprotective efficiency of dihydrolipoic acid in working rat hearts during hypoxia and reoxygenation. ³¹P nuclear magnetic resonance investigations, *Arzneimittel-Forschung* (1993), 43(4):425-432
- [4] AUTERHOFF, H., KNABE, J.: *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 11. Auflage (1983)
- [5] BECKER, B. F., MASSOUDY, P., PERMANETTER, B., RASCHKE, P., ZAHLER, S.: Possible significance of free radicals for reperfusion injury [Review], *Zeitschrift für Kardiologie* (1993), 82 Suppl. 5:49-58
- [6] BENEDETTI, T. J.: Maternal complications of parenteral beta-sympathomimetic therapy for premature labour, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1983), 145/1:1-6
- [7] BJORNERHEIM, R., SIMONSEN, S., GOLF, S.: Increased beta-adrenoceptor-coupled adenylate cyclase response in transplanted human hearts, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* (1987), 47(7):661-665
- [8] BRANDL, M., BEER, S., HAMER, PH.: Perioperative Atemtherapie: Bronchospasmolytische Aktivität und Nebenwirkungen von β -Sympathomimetika der neueren Generation, *Anästh. Intensivther. Notfallmed.* 16 (1981), 197-202
- [9] BUNDESVERBAND DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE E. V.: Rote Liste 1996
- [10] CHANDRA, M., CHANDRA, N., AGRAWAL, R., KUMAR, A., GHATAK, A., PANDEY, V. C.: The free radical system in ischemic heart disease, *International Journal of Cardiology* (1994), 43(2):121-125
- [11] CRAKE, T., POLLE- WILSON, P. A.: Evidence that calcium influx on reoxygenation is not due to cell membrane disruption in the isolated rabbit heart, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 4:31-36

- [12] CRIÉE, C., QUAST, C.-H., LÜDTKE, R., LAIER-GROENEVELD, G., HÜTTEMANN, U.: Use of beta-agonists and mortality in patients with stable COPD, *European Respiration Journal* (1993), 6:426s
- [13] DAMERAU, W., IBEL J., THURICH, T., ASSADNAZARI, H., ZIMMER, G.: Generation of free radicals in Langendorff and working hearts during normoxia, hypoxia, and reoxygenation, *Basic Research in Cardiology* (1993), 88(2):141-149
- [14] DANILO, P., ROSEN, T. S.: Effects of terbutaline on cardiac automaticity and contractility, *Journal of Clinical Pharmacology* (1982), 22(5-6):223-230
- [15] DEISINGER, B., NAWROTH, T., ZWICKER, K., MATUSCHKA, S., JOHN, G., ZIMMER, G., FREISLEBEN, H. J.: Purification of ATP synthase from beef heart mitochondria (F₀F₁) and co-reconstitution with monomeric bacteriorhodopsin into liposomes capable of light-driven ATP synthesis, *European Journal of Biochemistry* (1993), 218(2):377-383
- [16] DEMAISON, L., GRYNBERG, A.: Cellular and mitochondrial energy metabolism in the stunned myocardium, *Basic research in Cardiology* (1994), 89(4):293-307
- [17] DEVLIN, T. M.: *Textbook of Biochemistry*, Wiley-Liss, 3rd Edition (1992)
- [18] DHALLA, N. S., PANAGIA, V., SINGAL, P. K., MAKINO, N., DIXON I. M. C., EYOLFSON D. A.: Alterations in heart membrane calcium transport during the development of ischaemia reperfusion injury, *J Mol Cell Cardiol* (1988), 20 Suppl. 11:3-13
- [19] ESTLER, C. J., *Pharmakologie und Toxikologie*, Schattauer, 4. Auflage (1995)
- [20] FERRARI, R., CECONI C., CURELLO S., CARGNONI, A., MEDICI, D: Oxygen free radicals and reperfusion injury - The effect of of ischaemia and reperfusion on the cellular ability to neutralise oxygen toxicity, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 4:67-69
- [21] FERRARI, R., CECONI, C., CURELLO, S., ALFIERI, O., VISIOLI, O.: Myocardial damage during ischemia and reperfusion [Review], *European Heart Journal* (1993), 14 Suppl. G:25-30
- [22] FERRARI, R., PEDERSINI, P., BONGRAZIO, M., GAIA, G., BERNOCCHI, P., DI LISA, F.: Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischemia and reperfusion [Review], *Basic Research in Cardiology* (1993), 88(5):495-512
- [23] FLAHERTY, J. T.: Reduction in reperfusion injury with recombinant human superoxide dismutase, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 1

- [24] FLATT, A., CRANE, J., PURDIE, G., KWONG, T., BEASLEY, R., BURGESS, C.: The cardiovascular effects of beta adrenergic agonist drugs administered by nebulisation, *Postgraduate Medical Journal* (1990), 66(772):98-101
- [25] FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., STARKE, K.: *Pharmakologie und Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag, 6. Auflage (1992)
- [26] FÜLGRAFF, G., PALM, D.: *Pharmakotherapie-Klinische Pharmakologie*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 7. Auflage (1989)
- [27] GONZALEZ-SICILIA, L., PEREZ-OJEDA, E., LAORDEN, M. L., BRUGGER, A. J., HERNANDEZ, J.: Tulobuterol: a full beta-adrenoceptor agonist or a partial beta-agonist with membrane stabilizing activity?, *General Pharmacology* (1988), 19(1):103-106
- [28] GOODMAN & GILMAN: *The Pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill Health Professions Division, 9th Edition (1995)
- [29] GROSDANOFF, P., KAINDL, F., KRAUPP, O., LEHNERT, T., LICHTLEN, P., SCHUSTER, J., SIEGENTHALER, W.: β -Rezeptoren und β -Rezeptorenblocker, de Gruyter, 1. Auflage (1988)
- [30] HAENEN, G.: *Thiols in oxidative Stress*, 1990
- [31] HAENEN, G., VEERMAN, M., BAST, A.: Reduction in beta-adrenoceptor function by oxidative stress in the heart, *Free Radical Biology and Medicine* (1990), 9(4):279-288
- [32] HANSEN, P. B., WALDORFF, S., HJELMS, E., STEINESS, E., DIAMANT, B.: Beta 2-mediated changes in central haemodynamics, coronary circulation and myocardial metabolism in canine, *Pharmacology & Toxicology* (1988), 63(1):33-36
- [33] HARAMAKI, N., ASSADNAZARI, H., ZIMMER, G., SCHEPKIN, V., PACKER, L.: The influence of vitamin E and dihydrolipoic acid on cardiac energy and glutathione status under hypoxia-reoxygenation, *Biochemistry & Molecular Biology International* (1995), 37(3):591-597
- [34] HEROLD, G.: *Innere Medizin*, 1996
- [35] HESS M. L., EATON L. R., MANSON N. H., ROWE G. T.: Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated neutrophil induced canine myocardial mechanical dysfunction, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 1
- [36] HOFMANN, M., MAINKA, P., TRITSCHLER, H., FUCHS, J., ZIMMER, G.: Decrease of red cell membrane fluidity and -SH groups due to hyperglycemic conditions is counteracted by alpha-lipoic acid, *Archives of*

- [37] HOOPER, W. W., SLUTSKY, R. A., KOCIENSKI, D. E., WITZTUM, K. F., SPRAGG, R. G., ASHBURN, W. L., MOSER, K. M.: Right and left ventricular response to subcutaneous terbutaline in patients with chronic obstructive pulmonary disease: radionuclide angiographic assessment of cardiac size and function, *American Heart Journal* (1982), 104(5 Pt 1):1027-1032
- [38] JOHANSSON, L-H.: Factors behind the functional β_2 -adrenoceptor selectivity of terbutaline, *Pharmacology & Toxicology* (1995), 77. Suppl. 3.21.24
- [39] JOHANSSON, L. H., ELIASSON E. L., PERSSON, H., ROSENGREN E.: An analysis of the beta 2-adrenoceptor selectivity in three series of beta-adrenoceptor agonists, *Pharmacology & Toxicology* (1990), 66(3):203-208
- [40] JUNGERMANN, K., MÖHLER, H.: *Biochemie*, Springer Verlag, 1. Auflage (1980)
- [41] KANEKO, M., MATSUMOTO, Y., HAYASHI, H., KOBAYASCHI, A., YAMAZAKI, N.: Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart, *J Mol Cell Biochem* (1994), 135(1):99-108
- [42] KATZ, M., ROBERTSON, P. A., CREASY, R. K.: Cardiovascular complications associated with terbutaline treatment for preterm labour, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1981), 139/5:605-608
- [43] KATZUNG, B. G.: *Basic & Clinical Pharmacology*, Lange medical book, 6th Edition (1995)
- [44] LAMPERT, M. B., HIBBARD, J., WEINERT, L., BRILLER, J., LINDHEIMER, M., LANG, R. M.: Peripartum heart failure associated with prolonged tocolytic therapy, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1993), 168(2):493-495
- [45] LANGENDORFF, O.: Untersuchungen am lebenden Säugetierherzen, *Arch Ges Physiol* (1895), 61:291-332
- [46] LAORDEN, M. L., HERNANDEZ, J., BRUGGER, A. J.: The beta-agonist drug tulobuterol decreases cardiac automaticity in the rat: comparison with isoproterenol, *General Pharmacology* (1985), 16(1):65-67
- [47] LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M.: *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage (1994)
- [48] LUCCHESI, B. R.: Myokardial reperfusion injury - The role of leukocytes and oxygen free radicals, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 1
- [49] MATUSCHKA, S., ZWICKER, K., NAWROTH, T., ZIMMER G.: ATP synthesis by purified ATP-synthase from beef heart mitochondria after coreconstitution with bacteriorhodopsin, *Archives of Biochemistry &*

Biophysics (1995), 322(1):135-142

- [50] MITREV, Z., BEYERSDORF, F., HALLMANN, R., POLOCZEK, Y., IHNKEN, K., HEROLD, H., UNKELBACH, U., ZIMMER, G., FREISLEBEN, H. J., SATTER, P.: Reperfusion injury in skeletal muscle: controlled limb reperfusion reduces local and systemic complications after prolonged ischaemia, *Cardiovascular Surgery* (1994), 2(6):737-748
- [51] NAYLER, W. G., PANAGIOTOPOULOS, S., ELZ, J. S., DALY, M. J.: Calcium-mediated damage during post-ischaemic reperfusion, *J Mol Cell Cardiol* (1988), 20 Suppl. 11:41-54
- [52] NEELY, J. R., LIEBERMEISTER, H., BATTERSBY, E. J., MORGAN, H. E.: Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart, *Amer J Physiol* (1967), 212:804-814
- [53] PACKER, L., GLAZER, A. N.: *Methods in Enzymology*, Academic press, Volume 186 (1990)
- [54] PERRY, K. G., MORRISON, J. C., RUST, O. A., SULLIVAN C. A., MARTIN, R. W., NAEF, R. W.: Incidence of adverse cardiopulmonary effects with low-dose terbutaline infusion, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (1995), 173(4):1273-1277
- [55] PERSSON, C. G. A.: Astute observers discover anti-asthma drugs, *Pharmacology & Toxycology* (1995), 77. Suppl. 3.7.15
- [56] PERSSON, H.: The research behind terbutaline, *Pharmacology & Toxycology* (1995), 77. Suppl. 3.16.20
- [57] POOLE-WILSON P. A., TONES, M. A.: Sodium exchange during hypoxia and on reoxygenation in the isolated rabbit heart, *J Mol Cell Cardiol* (1988), 20 Suppl. 11:15-22
- [58] ROBERTSON, P. A., HERRON, M., KATZ, M., CREASY, R. K.: Maternal morbidity associated with isoxsuprine and terbutaline tocolysis, *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* (1981), 11/6:371-378
- [59] ROCHE: *Lexikon Medizin*, Urban & Schwarzenberg, 2. Auflage (1987)
- [60] SALLER, R., BERGER, TH., ULMER, E.-M., HELLENBRECHT, D.: *Praktische Pharmakologie - Eigenschaften gebräuchlicher Medikamente*, Schattauer-Verlag, 1. Auflage (1979)
- [61] SARIS, N. E., ERIKSSON, K. O.: Mitochondrial dysfunction in ischemia-reperfusion [Review], *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* (1995), Suppl. 107:171-176
- [62] SCHAFERS, R. F., ADLER, S., DAUL, A., ZEITLER, G., VOGELSANG, M., ZERKOWSKI, H. R., BRODDE, O. E.: Positive inotropic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist terbutaline in the human heart: effects of

- long-term beta 1-adrenoceptor antagonist treatment, *Journal of the American College of Cardiology* (1994), 23(5):1224-1233
- [63] SCHEER, B., ZIMMER, G.: Dihydrolipoic acid prevents hypoxic/reoxygenation and peroxidative damage in rat heart mitochondria *Archives of Biochemistry & Biophysics* (1993), 302(2):385-390
- [64] SCHETTLER, G., GRETEN, H.: *Innere Medizin*, Thieme, 8. Auflage (1990)
- [65] SCHMIDT, R., THEWS, G.: *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, 24. Auflage (1990)
- [66] SIEGENTHALER, W.: *Klinische Pathophysiologie*, Thieme, 7. Auflage (1994)
- [67] SIES, H.: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic press (1991)
- [68] SILBERNAGEL, S., DESPOPOULOS, A.: *Taschenatlas der Physiologie*, Thieme, 4. Auflage (1990)
- [69] SLUTSKY, R.: Hemodynamic effects of inhaled terbutaline in congestive heart failure patients without lung disease: beneficial cardiogenic and vasodilator beta-agonist properties evaluated by ventricular catheterization and radionuclide angiography, *American Heart Journal* (1981), 101(5):556-560
- [70] SUGIYAMA, S.: Biochemical basis for reperfusion arrhythmias, *J Mol Cell Cardiol* (1986), 18 Suppl. 1
- [71] SVENSSON, L-A.: Terbutaline prodrugs and oral β_2 -agonist therapy, *Pharmacology & Toxicology* (1995), 77. Suppl. 3.30.33
- [72] ULLMAN, A.: β -Adrenoceptor agonists in future asthma therapy, *Pharmacology & Toxicology* (1995), 77. Suppl. 3.36.39
- [73] WALDECK, B., JEPPSSON, A. B., WIDMARK, E.: Partial agonism and functional selectivity: a study on beta-adrenoceptor mediated effects in tracheal, cardiac and skeletal muscle, *Acta Pharmacologica et Toxicologica* (1986), 58(3):209-218
- [74] WALDECK, B.: β -adrenoceptor agonists after terbutaline, *Pharmacology & Toxicology* (1995), 77. Suppl. 3.25.29
- [75] WEISS, M., SCHNEIDER, W. M., TARNOW, J., METTLER, S., KRONE, M., TESCHEMACHER, A., LEMOINE, H.: Is inhibition of oxygen radical production of neutrophils by sympathomimetics mediated via beta-2 adrenoceptors?, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1996), 278:1105-1113

- [76] WETTENGEL, R., VOLMER, T.: ASTHMA - Medizinische und ökonomische Bedeutung einer Volkskrankheit, N. Rupp-Verlag, 1. Auflage (1994)
- [77] WETTERLIN, K.: Turbuhaler® drugs involving terbutaline and other compounds, *Pharmacology & Toxicology* (1995), 77. Suppl. 3.34.35
- [78] WONG, C., PAVORD, I. D., WILLIAMS, J., BRITTON, J. R., TATTERSFIELD, A. E.: Bronchodilator, cardiovascular, and hypokalaemic effects of fenoterol, salbutamol, and terbutaline in asthma, *The Lancet* (1990), 336: 1396-99
- [79] ZIMMER, G., BEIKLER, T. K., SCHNEIDER, M., IBEL, J., TRITSCHLER, H.: Dose/response curves of lipoic acid R- and S-forms in the working rat heart during reoxygenation: superiority of the R-enantiomer in enhancement of aortic flow, *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* (1995), 27(9):1895-1903
- [80] ZIMMER, G., MAINKA, L., ULRICH H.: ATP synthesis and ATPase activities in heart mitoplasts under influence of R- and S-enantiomers of lipoic acid, *Methods in Enzymology* (1995), 251:332-340
- [81] ZINK S., RÖSEN, P., LEMOINE H.: Micro- and macrovascular endothelial cells in β -adrenergic regulation of transendothelial permeability, *Am J Physiol* (1995), 269:C1209-C1218

Rohdaten der Working Heart Versuche

Zeit [min]	Kontrolle (n=7)			0,5 nmol Terb. (n=5)		
	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]
0	99,85±1,54	99,93±4,94	101,80±5,76	98,39±4,71	98,85±2,51	99,06±7,45
5	102,74±1,68	98,96±4,11	99,60±3,71	101,40±1,98	99,36±2,84	102,16±5,22
10	100,83±1,41	99,83±2,65	101,28±4,05	99,26±2,74	99,50±3,58	98,12±3,65
15	98,86±1,03	99,91±2,20	98,19±2,96	100,43±2,53	101,81±2,17	98,96±3,13
20	97,72±1,35	101,37±3,84	99,13±5,32	100,51±1,29	100,48±1,72	101,71±5,02
Hypoxie						
75	63,29±8,46	129,84±13,07	95,25±4,89	46,97±15,87	115,90±10,22	96,39±8,49
80	73,19±8,16	118,20±13,24	101,05±9,71	50,43±15,10	107,85±16,70	97,91±7,51
90	77,56±8,87	107,53±13,96	98,40±8,09	60,23±11,22	105,00±11,42	99,39±6,77
100	79,63±8,12	103,67±16,09	99,82±4,88	63,57±8,20	100,67±12,62	96,74±8,59
110	77,71±7,47	100,96±16,26	96,57±5,47	66,20±7,70	96,72±13,91	99,56±7,34
120	76,95±7,54	100,05±18,10	97,55±6,66	65,88±7,69	92,81±9,85	100,06±6,01
130	74,83±7,94	96,06±16,68	96,37±5,35	67,51±6,24	93,02±14,56	100,15±6,78
140	73,72±8,49	95,16±16,49	95,54±5,93	65,77±7,79	91,26±16,32	100,66±8,91
Zeit [min]	1 nmol Terb. (n=6)			5 nmol Terb. (n=5)		
	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]
0	105,25±4,48	104,46±4,68	104,42±5,39	102,78±3,53	97,28±4,98	103,16±3,29
5	101,80±3,15	98,20±1,60	100,26±2,38	101,12±2,63	98,31±4,49	101,43±2,00
10	98,82±1,37	98,16±1,72	99,34±2,28	101,90±1,88	98,66±1,97	99,65±3,18
15	97,72±1,31	99,38±2,21	98,82±1,60	98,31±1,99	101,93±4,85	97,87±2,88
20	96,41±2,25	99,80±3,50	97,15±3,59	95,90±2,68	103,82±3,48	97,89±2,09
Hypoxie						
75	73,57±7,77	126,24±6,14	102,16±10,23	68,07±10,46	137,09±27,44	90,09±18,81
80	79,82±6,78	113,87±5,61	103,70±15,37	69,29±6,89	129,41±24,73	91,90±15,07
90	80,54±7,76	100,89±10,70	99,64±9,15	70,32±3,63	124,83±24,51	94,72±8,93
100	80,02±7,76	98,45±8,24	99,06±12,91	67,22±3,45	120,24±27,32	91,15±5,01
110	76,44±7,64	91,85±8,33	95,96±6,98	68,55±6,22	121,58±29,21	92,26±5,74
120	75,39±6,28	90,04±9,19	94,62±7,17	66,70±9,45	121,72±28,46	90,16±5,40
130	73,91±5,82	88,30±10,66	91,71±9,02	66,75±11,32	121,07±29,78	88,72±7,47
140	70,71±5,76	84,95±9,55	93,00±8,96	66,19±13,68	117,80±32,82	90,25±7,02
Zeit [min]	10 nmol Terb. (n=4)			100 nmol Terb. (n=4)		
	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]	Aortenfluß [%]	Koronarfluß [%]	Puls [%]
0	108,70±1,41	97,20±2,18	100,80±1,35	99,19±1,09	106,61±3,98	100,91±2,95
5	99,60±1,23	97,20±2,18	98,43±2,27	101,92±2,52	98,97±2,62	100,49±3,11
10	99,61±1,80	99,65±1,78	99,42±2,46	100,34±1,57	99,81±2,45	100,10±1,25
15	97,78±0,76	102,56±2,14	100,49±1,82	100,05±1,52	98,14±1,19	99,42±2,64
20	94,94±1,41	103,38±2,45	100,86±2,33	98,50±3,09	96,46±1,18	99,07±3,05
Hypoxie						
75	56,77±14,62	125,05±6,32	101,85±13,09	67,91±12,99	109,97±6,17	108,78±13,43
80	51,59±9,62	124,88±7,45	98,69±7,06	64,63±9,68	97,27±5,34	99,79±10,41
90	46,21±5,77	121,47±12,33	88,62±8,59	66,72±15,03	82,23±3,29	89,07±10,06
100	47,83±13,95	123,65±9,78	93,18±2,76	62,48±19,84	73,00±8,92	88,18±11,88
110	43,69±12,69	121,17±11,34	93,27±4,66	54,35±24,68	64,60±11,39	86,70±11,42
120	41,94±14,11	117,01±13,78	94,08±4,44	44,40±30,74	58,73±13,88	85,36±17,21
130	41,94±16,37	111,61±14,43	95,01±1,96	36,34±32,60	52,85±17,00	81,35±16,94
140	39,52±17,83	111,48±16,66	94,51±3,75	30,79±32,63	46,13±20,80	76,83±18,28

Rohdaten der mitochondrialen Messungen

	ATP-Synthese [$\mu\text{mol ATP/mg/min}$]	ATPase [$\mu\text{mol ADP/mg/min}$]	Fluidität [Anisotropie]
Kontrolle (n=7)	0,039 \pm 0,011	0,636 \pm 0,131	0,078 \pm 0,008
0,5 nmol Terb. (n=5)	0,020 \pm 0,001	1,659 \pm 0,081	0,081 \pm 0,008
1 nmol Terb. (n=6)	0,015 \pm 0,006	1,179 \pm 0,623	0,076 \pm 0,012
5 nmol Terb. (n=5)	0,020 \pm 0,004	0,836 \pm 0,365	0,080 \pm 0,011
10 nmol Terb. (n=4)	0,028 \pm 0,003	0,703 \pm 0,247	0,078 \pm 0,006
100 nmol Terb. (n=4)	0,025 \pm 0,003	0,978 \pm 0,119	0,084 \pm 0,013

Dankesworte

Herrn Professor Dr. med. G. Zimmer gilt mein Dank für die freundliche Überlassung des Themas, für die sehr umfassende Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Experimente sowie für seine Aufgeschlossenheit und Bereitschaft, über auftretende Fragen und Probleme zu diskutieren. Herzlichster Dank gebührt Frau L. Mainka für die überaus freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft während des gesamten experimentellen Teils meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Kommilitonen Tobias Noll, ohne den die mögliche Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen wäre.

Keinesfalls von den Dankesworten ausgeschlossen sein dürfen:

Herr Soltys und Herr Völzing, Johannes Ibel, Dr. Hassan Assadnazari, Dr. Klaus Zwicker,

Dr. h.c. Herbie Hancock, Helge Schneider, selbstverständlich meine Eltern, meine Geschwister Ameli und Marius und Nadja Nold.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel 'Untersuchung von kardialen Nebenwirkungen des Beta-Sympathomimetikums Terbutalin am isolierten Rattenherzen' im Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Abteilung für Mikrobiologische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Guido Zimmer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, den 15. April 1998

Lebenslauf

- 25.03.1972 als erstes von drei Kindern in Heidelberg geboren
Vater: Dr. med. Hannes Treusch
Mutter: Hildegard Treusch, geb. Muschaweckh
- 1978-1982 Kirnbach-Grundschule in Niefern-Öschelbronn
1982-1991 Johannes Reuchlin-Gymnasium in Pforzheim
Abitur im Juni 1991
- 1991-1992 Zivildienst beim Arbeiter Samariter Bund in Pforzheim
- seit Okt. 1992 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
- 23.09.1994 Ärztliche Vorprüfung
29.08.1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept. 1995 vierwöchige Famulatur auf der Gastroenterologie in Pforzheim
März 1996 vierwöchige Famulatur auf der Chirurgie in Bolzano/Italien
Aug./Sep. 1996 achtwöchige Famulatur auf der Anästhesie in Canberra/Australien
März 1997 vierwöchige Famulatur in einer radiologischen Praxis in Dortmund
August 1997 vierwöchige Famulatur auf der Kardiologie in Houston/U.S.A.
08.04.1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Derzeit bin ich Student im Praktischen Jahr an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Frankfurt, den 15. April 1998
