

Zur Pharmakologie von meta-Iodbenzylguanidin

Dissertation zur Erlangen des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Franz Bossle
aus Schweinfurt

Würzburg 2002

eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis Dezember 1998 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Graefe erarbeitet und anschließend während meiner Arbeit in der Hubertus Apotheke Schweinfurt ausgearbeitet.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Graefe danke ich für die immer sehr hilfsbereite und enge Betreuung während der Arbeit am Institut, die auch durch eine Explosion und einer damit verbundenen Verlagerung der Arbeitsräume nicht gestört werden konnte. Auch anschließend stand er mir mit seinem Wissen und seiner Erfahrung stets zur Seite.

Herrn Dr. R. Wölfel danke ich des weiteren für seine sehr herzliche und freundliche, aber auch geduldige Vermittlung der von ihm mit erarbeiteten Methoden bei der Tierpräparation und der Analytik von Catecholaminen. Er stand mir stets mit konstruktiver Kritik und Vorschlägen zur Seite und sorgte mit Hilfe seiner doch stets guten Laune für ein Arbeitsklima, wie man es sich nur wünschen kann.

Frau M. Babl und Frau G. Wolz-Curtaz danke ich für ihren wertvollen Beitrag zum Gelingen der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Ebel möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Übernahme des Koreferats und der Durchsicht der Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	17
2	Methoden	25
2.1	Synthese von meta-Iodbenzylguanidin (MIBG)	25
2.1.1	Allgemeine Herstellungsbeschreibung	25
2.1.2	Arbeitsvorschrift	26
2.1.3	Ergebnis	27
2.1.4	Prüfungen	27
2.1.4.1	Schmelzpunkt	27
2.1.4.2	HPLC-Prüfung	28
2.1.4.3	Protonenresonanzspektroskopie (¹ H-NMR)	29
2.1.4.4	Massenspektrometrie (MS)	31
2.1.4.5	Zusammenfassung	33
2.2	Synthese von radioaktiv markiertem meta-Iodbenzylguanidin	33
2.3	Versuche mit humanen Neuroblastomzellen	34
2.3.1	Substanzen	34
2.3.2	Versuchstechnik	34
2.3.3	Datenanalyse und Statistik	36
2.4	Versuche am perfundierten Kaninchenherz	37
2.4.1	Substanzen	37
2.4.2	Versuchstechnik	38
2.4.3	Versuchsprotokoll zur Ermittlung sympathomimetischer Wirkungen	40

2.4.4	Versuchsprotokoll zur Ermittlung der adrenergen Neuronenblockierenden Wirkung	41
2.4.5	Versuchsprotokoll zur Ermittlung der Hemmung der neuronalen MAO-A	42
2.4.6	Analytik	43
2.4.7	Datenanalyse und Statistik	45
2.5	Versuche am narkotisierten Kaninchen	47
2.5.1	Narkose	47
2.5.2	Chirurgische Präparation	48
2.5.3	Bestimmung der Kreislaufparameter	49
2.5.4	Versuchsprotokoll und Analytik	50
2.5.4.1	Vorversuch zur Bestimmung der sympathomimetischen Wirkungen von MIBG und Tyramin	50
2.5.4.2	Versuch zur Bestimmung der sympathomimetischen Wirkungen von 10 und 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG und 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin	51
2.5.4.3	Versuch zur Bestimmung der Wirkung von Methylatropin auf die kardiovaskulären Effekte von 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder Tyramin	51
2.6	Inkubationsversuche in Homogenaten von Rattenorganen	52
2.6.1	Substanzen	52
2.6.2	Hemmung der Monoaminoxidase-A im Homogenat des Rattenherzens	52
2.6.2.1	Versuchsbeschreibung	52
2.6.2.2	Analytik	54
2.6.2.3	Auswertung	54
2.6.3	Hemmung der Monoaminoxidase-B im Homogenat der Rattenleber	56
2.6.3.1	Versuchsbeschreibung	56
2.6.3.2	Analytik	57
2.6.3.3	Auswertung	57
2.6.4	Hemmung der Monoaminoxidase-B bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Homogenat der Rattenleber	58

3	Ergebnisse	59
3.1	Vergleich von MIBG und Tyramin als Substrate von Uptake ₁ in SK-N-SH Zellen	59
3.2	Versuche am perfundierten Kaninchenherzen	61
3.2.1	Vergleich von MIBG und Tyramin als Sympathomimetika	61
3.2.2	Kardiodepressive Effekte von MIBG	66
3.2.3	Die adrenerge Neuronen-blockierende Wirkung von MIBG	68
3.2.4	Einfluß von MIBG auf die Aktivität der neuronalen MAO-A	73
3.3	Versuche am narkotisierten Kaninchen	77
3.3.1	Vergleich der Wirkung von 10 µmol/kg MIBG und Tyramin	77
3.3.2	Vergleich der Wirkungen von 10 und 50 µmol/kg MIBG und 50 µmol/kg Tyramin	79
3.3.3	Wirkung von Methyldatrin auf die kardiovaskulären Effekte von 50 µmol/10 min MIBG oder Tyramin	84
3.4	Versuche in Homogenaten von Rattenorganen	86
3.4.1	Hemmung von Monoaminoxidase-A	86
3.4.2	Hemmung von Monoaminoxidase-B	89
4	Diskussion	93
4.1	Sympathomimetische Effekte von MIBG und Tyramin	93
4.2	Adrenerge Neuronen-blockierende Wirkung von MIBG	100
4.3	Hemmung der Monoaminoxidase durch MIBG	103
5	Zusammenfassung	107
6	Abstract	109
	Literaturverzeichnis	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Chemische Struktur von Guanethidin, Bretylium und meta-Iodobenzylguanidin (MIBG).	19
2.1	Reaktionsmechanismus	25
2.2	HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum für das Synthese-Endprodukt MIBG	28
2.3	¹ H-NMR-Spektrum der Prüfsubstanz	30
2.4	Signalzuordnung ¹ H-NMR-Spektrum	31
2.5	+EI-Massenspektrum der Prüfsubstanz	32
2.6	Hauptfragmente der Prüfsubstanz	32
2.7	Versuchsaufbau eines perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff.	38
2.8	Versuchsdurchführung zur Bestimmung der adrenergen Neuronenblockierenden Wirkung von MIBG	42
3.1	Spezifische und nicht-spezifische Aufnahme von Noradrenalin (NA), Tyramin und MIBG in SK-N-SH Zellen	60
3.2	Herzfrequenzanstieg nach Gabe von MIBG oder Tyramin	63
3.3	Noradrenalin-Overflow induziert durch die Gabe von MIBG oder Tyramin	64
3.4	Dopamin-Overflow induziert durch die Gabe von MIBG oder Tyramin	65
3.5	Zeitverlauf für den Anstieg der Herzfrequenz und des Noradrenalin (NA)-Overflows, der durch MIBG und Tyramin ausgelöst wurde	67

3.6	Beispiel für den kardiodepressiven Effekt von MIBG	69
3.7	Elektrisch-induzierter Noradrenalin-Overflow	72
3.8	spontaner Noradrenalin-Overflow	74
3.9	Zeitabhängigkeit der MIBG Wirkung auf den elektrisch-induzierten Noradrenalin-Overflows.	75
3.10	Zunahme der Herzfrequenz	76
3.11	Effekte von MIBG auf die Herzfrequenz und den spontanen Over- flow von Noradrenalin (NA) und DOPEG im spontan schlagenden, isoliert-perfundierten Kaninchenherzen	78
3.12	Einfluß einer 1-min Infusion von 10 µmol/kg MIBG, Tyramin oder Vehikel auf den Kreislauf narkotisierter Kaninchen	80
3.13	Noradrenalin- und Dopamin-Plasmaspiegel nach Gabe von 10 µmol/kg MIBG oder Tyramin	81
3.14	Kardiovaskuläre Effekte von MIBG und Tyramin.	83
3.15	Noradrenalin- und DOPEG-Plasmaspiegel während und nach Ga- be von MIBG oder Tyramin.	85
3.16	Kardiovaskulären Effekte von 50 µmol/kg MIBG oder Tyramin in mit Methylatropin behandelten Tieren	87
3.17	Hemmung der MAO-A durch MIBG	88
3.18	Hemmung der MAO-B durch MIBG	90
3.19	Kompetitive Hemmung der MAO-B durch MIBG	91
4.1	Wirkmechanismus indirekt wirkender Sympathomimetika am Bei- spiel von Tyramin.	96
4.2	Synaptischer Abbau von Noradrenalin.	101

Symbolverzeichnis

A	Adrenalin
AUC	Fläche unter der Wirkungs-Zeit-Kurve (Area under the curve)
c_{CA}	Konzentration des Catecholamines im venösen Perfusat korrigiert mit dem 0-Wert
CA	Catecholamine
CO	Herzminutenvolumen (cardiac output)
COMT	Catechol-O-methyltransferase
ct	registrierte radioaktive Zerfälle (counts)
D	Dosis
DA	Dopamin
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
DMI	Desipramin
DOMA	3,4-Dihydroxymandelsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure

DOPEG	3,4-Dihydroxyphenylglykol
E	Effekt
E_{max}	maximaler Effekt
HMV	Herzminutenvolumen
HR	Herzfrequenz (heart rate)
IC ₅₀	Dosis, die den halbmaximalen Effekt ergibt
K_m	Michaelis-Menten Konstante
KRS	HEPES-gepufferte Krebs-Ringer-Lösung
LVP	linksventrikulärer Druck
LVPP	linksventrikuläre Druckamplitude
MAO	Monoaminoxidase
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MIBG	meta-Iodbenzylguanidin
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n_H	scheinbare Hill-Koeffizient (Steigung am Wendepunkt der Kurve)
NA	Noradrenalin
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
R	elektrische Reizung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)

t	Zeit
TPR	totale periphere Widerstand
V	Aufnahmegeschwindigkeit über Uptake ₁
V_{max}	maximale Aufnahmegeschwindigkeit

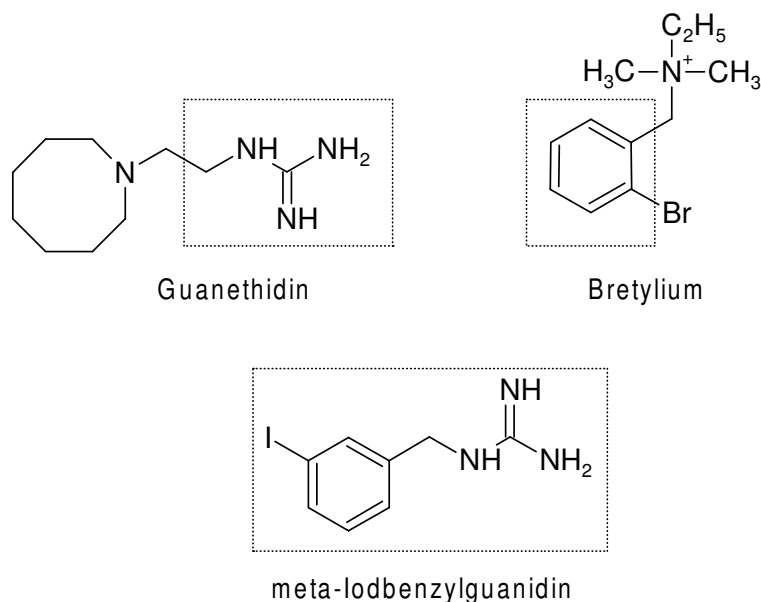
1 Einleitung

Meta-Iodbenzylguanidin (MIBG, Abb. 1.1) wurde 1980 zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe um Wieland [WIELAND et al. 1980] verwendet, um das Nebennierenmark bei Hunden mit einem bildgebenden Verfahren darzustellen. Zu diesem Zweck wurde ^{125}I -markiertes MIBG synthetisiert und Hunden injiziert. Dabei beobachtete man eine auffallende Affinität zum und eine hohe Verweildauer (> 8 d) im Nebennierenmark. Ebenso fiel eine gute Darstellung des Myokards kurz nach Injektion (~ 2 h) von radioaktiv markiertem MIBG auf. Die Idee für die verwendete chemische Struktur entwickelte sich aus Untersuchungen in den 60iger Jahren. An der Universität in Michigan verwendete Morales und Mitarbeiter ^{14}C -markierte Catecholamine, um das Nebennierenmark von Hunden darzustellen [MORALES et al. 1967]. Dabei stellte sich ^{14}C -Dopamin mit dem besten Verhältnis zwischen der Nebennierenmark- und der Plasmakonzentration heraus. In der folgenden Zeit benutzte man dieses Wissen, um radioaktiv markierte Substanzen in menschliche Neuroblastom- und Phaeochromocytom-Zellen einzuschleusen [LIEBERMAN et al. 1969, ANDERSON et al. 1973]. Mit Hilfe dieser wichtigen Beobachtungen wurde versucht, eine Substanz zu entwickeln, die eine geeignete γ -emittierende Strahlung besitzt und so für ein bildgebendes Verfahren verwendet werden konnte. Als erstes kam ^{125}I -ortho-Ioddopamin zur Anwendung, das ähnliche Eigenschaften wie ^{14}C -Dopamin hatte, aber zur Abbildung des Nebennierenmarks nicht geeignet war [FOWLER et al. 1976]. Einen anderen Weg ging die Arbeitsgruppe um Korn, der begann radioaktiv-markierte Bretylium-Analoga zu synthetisieren [KORN et al. 1977]. Er verwendete ^{125}I -para-Bretylium und zeigte dessen Affinität zum Nebennierenmark von Ratten und Hunden. Ebenso fand

er, daß das quartäre Stickstoff-Atom im Bretylium-Molekül für die Aufnahme in das Nebennierenmark notwendig war. Wieland verwendete diese Erkenntnisse und synthetisierte ^{131}I -para-Iodbenzylguanidin, das eine gute Darstellung des Nebennierenmarks des Hundes lieferte [WIELAND et al. 1979]. Nach der schon oben erwähnten ersten Arbeit über MIBG und der damit gezeigten Überlegenheit über o-Ioddopamin und p-Iodbretylium, untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe radioaktiv markiertes MIBG am Herzen verschiedener Tiere im Vergleich zu anderen radioaktiv markierten Substanzen und stellte fest, daß MIBG den anderen Substanzen hinsichtlich Selektivität und Affinität überlegen war. Ebenso zeigte Wieland, daß Reserpin, ein Hemmer des vesikulären Monoamin-Transporters im synaptischen Nervenende, die Darstellung des Myokards verschlechterte [WIELAND et al. 1981a]. Aufgrund der Lokalisation von ^{125}I -MIBG in denjenigen Organen, die ebenfalls dicht sympathomimetisch innerviert sind, und der Beobachtung, daß die Aufnahme von ^{125}I -MIBG in das Myokard nicht sensitiv auf verschieden hohe „loading“ Dosen reagierte, schlossen die Autoren auf eine neuronale Aufnahme von ^{125}I -MIBG. Dies wurde kurze Zeit später bestätigt. Dazu wurde das Nebennierenmark behandelter Hunde homogenisiert und die subzelluläre Verteilung von MIBG bestimmt. Es wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, daß weder der β -Rezeptorantagonist Propranolol noch der α -Rezeptorantagonist Phenoxybenzamin einen Einfluß auf die MIBG-Aufnahme ins Nebennierenmark haben [WIELAND et al. 1981b].

Diese Untersuchungen waren die Grundlage dafür, radioaktiv markiertes MIBG für die Diagnose und Therapie von Tumoren zu verwenden, die aus dem sympathischen Nervensystem entstehen (z. B. Neuroblastom [KIMMIG et al. 1984], Phaeochromozytom [SISSON et al. 1981, SISSON et al. 1984]). Die radioaktive Markierung von MIBG mit dem γ -emittierenden Nuklid ^{125}I oder ^{131}I wurde erfolgreich bei der Darstellung Catecholamin-speichernder Tumore [SISSON et al. 1981] des Nebennierenmarks [VALK et al. 1981] und anderer sympathisch innervierter Organe [KLINE et al. 1981] verwendet. In letzter Zeit wurde ^{131}I -MIBG auch für die Diagnose und die Therapie von Karzinoid-Tumoren verwendet [HOEFNAGEL et al. 1987, TAAL et al. 1996a]. Diese Tumore, die aus dem enterochromaffinen Zellsystem der Magendarmschleimhaut entstehen, setzen unter anderem

Abb. 1.1: Chemische Struktur von Guanethidin, Bretylium und meta-Iodbenzylguanidin (MIBG).



den Botenstoff Serotonin frei und bilden oft Lebermetastasen. Dadurch kommt es während der Erkrankung oft zu Phasen von Diarrhoen, Hitzegefühlen, Asthma-Anfällen, Übelkeiten und Herzklopfen. In der Arbeitsgruppe von Taal wurde nun versucht, durch Gabe von nicht radioaktiv-markiertem MIBG die Aufnahme und die Verweilzeit von ¹³¹I-MIBG im Tumorgewebe zu verbessern [TAAL et al. 1996b]. Bei diesen Versuchen zeigte sich auch, daß nicht radioaktiv-markiertes MIBG einen lang anhaltenden palliativen Effekt beim Karzinoid-Syndrom hatte [TAAL et al. 1996a]. Trotz dieser Verbesserung der Symptomatik kam es nicht zu einem Rückgang des Tumors, und es kam zu keiner meßbaren Reduktion der renalen Ausscheidung des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß nicht radioaktiv-markiertes MIBG bei der palliativen Behandlung des Karzinoid-Syndrom dem radioaktiv-markiertem MIBG überlegen ist. Somit sollte besonders bei älteren und geschwächten Patienten das nicht radioaktiv-markierte MIBG verwendet werden. Der pharmakologische Mechanismus dieser Wirkung ist unbekannt. Man vermutet, daß MIBG einen Einfluß auf die Speicherung oder Freisetzung von Serotonin hat. Eine andere Erklärung für die Wirkung von nicht radioaktiv-markiertem MIBG wäre die in verschie-

denen Zellmodellen beobachtete Zytotoxizität [BRUCHELT et al. 1988, SMETS et al. 1988]. Bei der weiteren Untersuchung dieser Zytotoxizität wurden verschiedene Mechanismen entdeckt, wie MIBG innerhalb der Zelle zytotoxisch wirkt. So hemmt MIBG die mitochondriale Atmung in vitro [LOESBERG et al. 1990b] und in vivo [KUIN et al. 1994], hemmt die NO-Synthase in vitro [KUIN et al. 1998] und antagonisiert innerhalb der Zelle die mono(ADP-ribosyl)-Transferase [LOESBERG et al. 1990a].

Abgesehen von den geschilderten Eigenschaften, die für die nuklearmedizinische Anwendung wichtig sind, besitzt radioaktiv-markiertes MIBG einen hohen Stellenwert als Hilfsmittel bei der Darstellung von Organen, die dicht sympathisch innerviert sind, wie z. B. das Herz und die Speicheldrüsen [NAKAJO et al. 1984]. MIBG kann somit verwendet werden, um verschiedene Herzkrankheiten zu diagnostizieren, die durch Veränderungen in der sympathischen Innervation zustande kommen [WIELAND et al. 1981b].

Einige pharmakologische Eigenschaften von MIBG wurden schon untersucht und in mehreren Arbeiten zusammengefaßt [SHAPIRO und GROSS 1987, WAFELMAN et al. 1994a, FARAHATI et al. 1995]. MIBG verhält sich wie ein alternatives Substrat des neuronalen Noradrenalin-Transporters (nach Iversen als Uptake₁ bezeichnet [IVERSEN 1967]) und wird deshalb leicht in postganglionäre sympathische Neurone aufgenommen [WIELAND et al. 1981a, NAKAJO et al. 1986]. Diese Aufnahme erfolgt kompetitiv zu endogen vorhandenen Catecholaminen [NAKAJO et al. 1983], da die Intensität der Herz-Abbildung durch MIBG nach 24 bzw. 48 h umgekehrt proportional zur Höhe der Catecholamin-Plasmakonzentration war. Ebenso ist eine passive Diffusion durch die Zellmembran möglich, die jedoch erst bei hohen MIBG-Konzentrationen und somit nach Sättigung von Uptake₁ an Bedeutung gewinnt [TOBES et al. 1985]. Diese Aufnahmemechanismen treten auch in anderen Zellen auf, die vom sympathischen Nervensystem abstammen, wie z. B. chromaffine Zellen des Nebennierenmarks [JAQUES et al. 1984, TOBES et al. 1985], menschliche Neuroblastom-Zellen (SK-N-SH) [BUCK et al. 1985] und Phäochromozytom-Zellen aus der Ratte (PC 12) [SMETS et al. 1990], da diese Zellen ebenfalls den neuronalen Noradrenalin-Transporter Uptake₁ exprimieren. Nach der Aufnahme ins Neuron wird MIBG in die Transmitter-Speichervesikel

aufgenommen und gespeichert, da es nicht nur ein Substrat von Uptake_1 , sondern auch ein Substrat des Reserpin-sensitiven, vesikulären Monoamin-Transporters ist, der in der Membran der synaptischen Vesikel lokalisiert ist und für die Speicherung von Noradrenalin in diesen Organellen verantwortlich ist [GASNIER et al. 1986]. Auch andere membran-assoziierte Amin-Transporter tragen zur Verteilung von MIBG im Körper bei. Zum Beispiel ist der extraneuronale Monoamin-Transporter (nach Iversen als Uptake_2 bezeichnet [IVERSEN 1967]) für die Aufnahme von MIBG in nicht-neuronale Zellen im Ratten-Herzen verantwortlich [DEGRADO et al. 1995]. Für die Aufnahme von MIBG in Endothelzellen des Lungenkreislaufes [SLOSMAN et al. 1988] und in Thrombozyten [RUTGERS et al. 1993] sind ein Noradrenalin- und ein Serotonin-Transporter in den Plasmamembranen dieser Zellen verantwortlich.

MIBG scheint keinen direkten Einfluß auf α - und β -Rezeptoren zu haben und, wie aus der chemische Struktur zu schließen ist, wird es weder durch die Monoaminoxidase (MAO) noch durch die Catechol-O-methyltransferase (COMT) metabolisiert [WIELAND et al. 1981b, MANGNER et al. 1986].

Andere pharmakologische Eigenschaften von MIBG sind nicht beschrieben worden. Trotz der Tatsache, daß MIBG und indirekt wirkende Sympathomimetika einige Eigenschaften gemeinsam haben (z. B. beide sind gute Substrate für Uptake_1 und hemmen den Reserpin-empfindlichen vesikulären Monoamin-Transporter), wurde bis jetzt die Möglichkeit noch nicht näher untersucht, ob MIBG Noradrenalin freisetzt und somit eine indirekt sympathomimetische Wirkung besitzt. Dies waren die Gründe für die Durchführung einer Versuchsserie am spontan schlagenden, isoliert-perfundierten Kaninchenherzen. An diesem Modell wurde MIBG mit Tyramin verglichen, dem Prototyp eines indirekt wirkenden Sympathomimetikums. Um zu prüfen, ob sich sympathomimetische Wirkungen auch in vivo zeigen lassen, wurden die kardiovaskulären Effekte von MIBG mit denen von Tyramin am narkotisierten Kaninchen verglichen. Dies schien auch notwendig, da mehrfach aus der Klinik über sympathomimetische Effekte nach der Verabreichung von MIBG berichtet wurde. In den Untersuchungen am narkotisierten Kaninchen wurden hämodynamische Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, peripherer Widerstand) und Plasma-Catecholamine gemessen. Ebenso untersuchten

wir an einem Zellmodell mit SK-N-SH Zellen, die Uptake₁ stabil exprimieren, die Sättigungskinetik von MIBG und Tyramin für Uptake₁, da diese die indirekte sympathomimetische Wirkung mitbestimmt [STARKE und PALM 1996].

In der Literatur wurde MIBG von Anfang an als adrenerger Neuronenblocker bezeichnet, obwohl bis zum heutigen Zeitpunkt kein direkter Nachweis dafür erbracht wurde [WIELAND et al. 1980]. Wieland und Mitarbeiter entwickelten diese Theorie aus der chemischen Struktur von MIBG (Abb. 1.1). Betrachtet man sich die Strukturformel von MIBG, so kann man erkennen, daß es sich aus dem Guanidin-Teil von Guanethidin und dem Benzyl-Rest von Bretylium zusammensetzt. Sowohl Guanethidin als auch Bretylium sind wohl bekannt als adrenerge Neuronenblocker [MAXWELL und WASTILA 1977]. Die Annahme, daß MIBG ein adrenerger Neuronenblocker ist, wird durch eine Arbeit von Short und Darby unterstützt, in der strukturverwandte Substanzen, wie z. B. ortho- und para-Iodbenzylguanidin, an der Nickhaut der Katze in vivo untersucht wurden [SHORT und DARBY 1967]. In dieser Arbeit zeigte sich, daß nur das para-Isomer im Gegensatz zum ortho-Isomer eine adrenerge Neuronen-blockierende Wirkung besitzt. MIBG an sich wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Substanz meta-Chlorbenzylguanidin z. B. zeigte keine Neuronen-blockierende Aktivität. Somit läßt sich aus der Arbeit von Short und Darby (1967) keine Schlußfolgerung ziehen, ob MIBG ein adrenerger Neuronenblocker ist oder nicht.

Ebenso schien es wichtig zu sein, die Möglichkeit zu untersuchen, ob MIBG die MAO, ein wichtiges Enzym für den Abbau von Noradrenalin, hemmt. In einer Arbeit von Kuntzman und Jacobson wurden verschiedene Substanzen untersucht, die sich, vergleichbar mit MIBG, von Guanethidin und Bretylium ableiten lassen [KUNTZMAN und JACOBSON 1963]. Dabei zeigte ortho-Brombenzylguanidin eine hemmende Wirkung auf die MAO. Die beiden Substanzen Guanethidin und Bretylium zeigten in dieser Versuchserie ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Hemmung des Enzyms MAO. Bretylium hemmte die MAO, wo hingegen Guanethidin keine Wirkung auf das Enzym hatte. MIBG wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einige der bis heute offenen Fragen hinsichtlich der pharmakologischen Eigenschaften von MIBG näher zu untersuchen. Für

ein Arzneimittel, daß schon seit vielen Jahren in der Diagnostik und Therapie von Tumoren (s. oben) verwendet wird, ist im Vergleich zu vielen anderen heute zugelassenen Arzneimitteln erstaunlich wenig zur Pharmakologie und Toxikologie bekannt. Aus dieser Sicht heraus ist es für die klinische Anwendung dieser Substanz, die jetzt auch in nicht radioaktiv-markierter Form verwendet wird, wichtig zu wissen, ob MIBG eine indirekt sympathomimetische Wirkung besitzt, die Reizbildung und -ausbreitung in adrenergen Neuronen blockiert und das für die enzymatische Inaktivierung von Noradrenalin wichtige Enzym MAO hemmt.

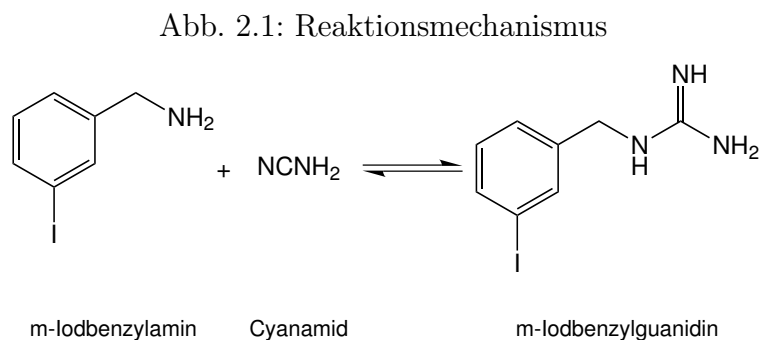
2 Methoden

2.1 Synthese von meta-Iodbenzylguanidin (MIBG)

Die Synthese wurde in den Laborräumen der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg durchgeführt.

2.1.1 Allgemeine Herstellungsbeschreibung

Die Synthese von MIBG wurde gemäß der Reaktionsgleichung in Abbildung 2.1 durch Umsetzung von m-Iodbenzylamin mit Cyanamid durchgeführt.



Nach der Reaktion wurde das Reaktionsprodukt durch Umkristallisation gereinigt und im Vakuum getrocknet. MIBG lag als Hydrogencarbonat-Salz vor.

Tab. 2.1: Ausgangsstoffe für die Synthese von MIBG

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit	M_r	Einwaage/Volumen
Cyanamid	Aldrich	>99 %	42,04	0,843 g
3-Iodobenzylamin HCl	Aldrich	97 %	269,51	2,616 g
NaHCO ₃	Fluka	>99 %	84,01	2,010 g/10 ml
Wasser	Delta-Pharm	Injectabilia	-	-

2.1.2 Arbeitsvorschrift

In Tabelle 2.1 aufgeführten Ausgangsstoffe wurden für die Synthese verwendet. Die Hersteller lieferten zu den Substanzen ein Prüfprotokoll mit, die den intern festgelegten Anforderungen entsprachen.

Die folgende Vorschrift wurde in abgewandelter Form aus der Originalarbeit von Wieland [WIELAND et al. 1980] entnommen:

20 mmol Cyanamid wurden mit 10 mmol Iodobenzylamin in einen 50 ml Einhalskolben überführt und gut durchmischt. Der Kolben wurde mit einem Rückflußkühler versehen und 10 Stunden bei 105 °C unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Ölbad es erhitzt. Als der Kolben Raumtemperatur erreicht hatte, wurden zunächst die eventuellen Rückstände an der Kolbenwand in etwa 5 ml Wasser gelöst (potentielle Verunreinigungen) und die Spühhlösung verworfen. Der glasartige Rückstand wurde anschließend in 5 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde sehr langsam tropfenweise 5 ml einer 20%igen NaHCO₃-Lösung hinzugegeben. Das Produkt fiel als Hydrogencarbonat aus.

Der Niederschlag wurde abfiltriert und der Rückstand mit 5 ml kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Produkt im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

Für die Versuche wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM hergestellt. Um MIBG in dieser Konzentration in Lösung zu bekommen, mußte zuerst das Hydrogencarbonat-Salz in ein Acetat-Salz umgewandelt werden. Dazu wurde das synthetisierte MIBG-Hydrogencarbonat mit konzentrierter Essigsäure versetzt, wodurch das Hydrogencarbonat-Ion in das flüchtige CO₂ umgewandelt

wurde. Der Überschuß Essigsäure wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgezogen, bis kein Geruch mehr nach Essigsäure wahrnehmbar war. Der Rückstand wurde in der berechneten Menge Wasser gelöst. Diese MIBG-Acetat Stammlösung (100 nM) wurde bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

2.1.3 Ergebnis

Das Reaktionsgemisch löste sich schnell unter Rühren bei 105 °C zu einer klaren gelb-gefärbten Lösung. Nach dem Abkühlen konnten die Reste der Ausgangsverbindungen gut mit Wasser gelöst werden und es blieb eine feste glasige Substanz zurück. Diese löste sich langsam in Wasser. Nach dem Ausfällen mit NaHCO₃-Lösung und Abfiltrieren, erhielt man eine weiße kristalline Substanz, die umkristallisiert wurde. Die Ausbeute betrug 52 %.

2.1.4 Prüfungen

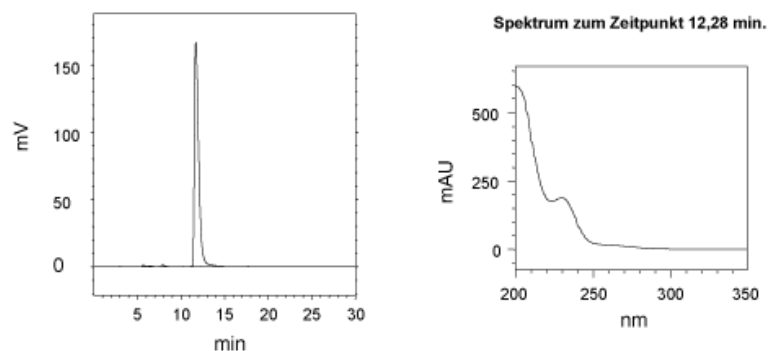
Die Prüfungen erfolgten gegen einen Vergleich mit gekauftem MIBG-Hemisulfat der Firma Sigma, Deisenhofen (Deutschland).

2.1.4.1 Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt des getrockneten MIBG-Hydrogencarbonats wurde nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches¹ bestimmt. Dieser Wert wurde mit der Literaturangabe von 124 – 126 °C [WIELAND et al. 1980] verglichen. Für die Prüfsubstanz wurde ein Schmelzpunkt von 141 °C gemessen, der den Literaturwert übertraf. Dieser Unterschied läßt sich durch die höhere Reinheit der Ausgangssubstanzen im Gegensatz zu denen von Wieland 1980 verwendeten und folglich mit einer höheren Reinheit des Endproduktes erklären.

¹siehe Kapitel 2.2.14 Schmelztemperatur – Kapillarmethode auf Seite 22 im Europäischen Arzneibuch 3. Ausgabe 1997

Abb. 2.2: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum für das Synthese-Endprodukt MIBG



2.1.4.2 HPLC-Prüfung

Die HPLC-Analyse erfolgte mit einer Anlage der Firma Shimadzu unter folgenden Bedingungen:

Säule : Merck Purospher RP-18 5 μm (250 x 3 mm i.D.)

Eluent : Acetonitril/0,01 M NaH_2PO_4 90/10 (v/v)

Fluß : 1,0 ml/min

Detektion: UV bei 230 nm

Mit Hilfe der Chromatographie-Software der Firma Shimadzu erfolgte die Auswertung über die Peakflächen des Haupt- und der Nebenpeaks. Die Fläche des Hauptpeaks mußte mindestens 95 % der Gesamtfläche, ausgenommen der Peaks im Totvolumen, ausmachen.

Die Auswertung des Chromatogramms (vgl. Abbildung 2.2) ergab eine Entsprechung der Anforderung mit einem Wert von 98,9 %. Als Vergleich diente der gekaufte MIBG-Standard von Sigma, der ebenfalls der Anforderung entsprach. Als Reinheitskontrolle wurde ein Spektrum zum Zeitpunkt des Peakmaximums gemessen und mit dem Spektrum des gekauften MIBG-Standards verglichen. Die bei-

den Spektren waren identisch und somit war der gemessene Hauptpeak (MIBG-Peak) nicht verunreinigt.

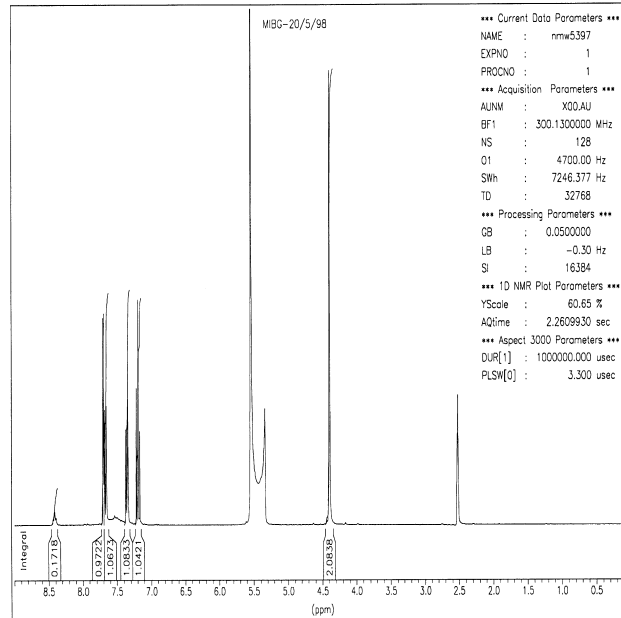
2.1.4.3 Protonenresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$)

Eine Probe von etwa 20 mg MIBG-Hydrogencarbonat wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ in D_2O von der Firma Spectral Service in Köln untersucht und interpretiert. Als Gerät wurden verwendet:

- NMR-Spektrometer AC-P 300 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland), magnetische Flußdichte 7,05 Tesla
- QNP-Messkopf für die Kerne ^1H , ^{13}C , ^{19}F und ^{31}P ; automatischer Probengeber
- ASPECT 3000 Computer unter Original Bruker Software DISNMR89 Version 891101.0

Zur Charakterisierung der Prüfsubstanz wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erstellt. Circa 10 mg der Prüfsubstanz wurde in 0,6 ml DMSO-d_6 unter Zugabe eines Tropfens DCl gelöst. Folgende Parameter wurden verwendet:

- Frequenz (SF) 300,135 MHz
- Frequenzbereich (SW) 7246,38 Hz
- Pulswinkel (PW/P0) 3,3 μsec
- Relaxationsdelay (RD/D1) 1,0 sec
- Akquisitionszeit (AQ) 2,261 sec
- Anzahl der Scans (NS) 128
- Datenpunkte (SI) 32k

Abb. 2.3: ^1H -NMR-Spektrum der Prüfsubstanz

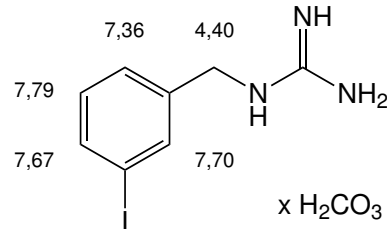
Als ^1H -NMR-Spektrum ergab sich die Abbildung 2.3

Die Firma interpretierte das erhaltene Spektrum und lieferte die Auswertung in Tabelle 2.2 mit:

Nicht zur Substanz gehörende Signale wurden folgendermaßen zugeordnet: 0,0 ppm (Singulett von Tetramethylsilan); 2,50 ppm (Multipllett von DMSO-d_5 in DMSO-d_6) und 5,3/5,5 ppm (Singulett von Wasser). In Abbildung 2.4 wurden die gemessenen Signale den entsprechenden Protonen zugeordnet. Die Art und

Tab. 2.2: Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums der Prüfsubstanz

Chem. Verschiebung δ [ppm]	Multiplizität	Anzahl H
4,40	Singulett	2
7,19	Tripllett	1
7,36	Duplett	1
7,67	Duplett	1
7,70	Singulett	1

Abb. 2.4: Signalzuordnung ^1H -NMR-Spektrum

Lage der ^1H -NMR-Signale stehen im Einklang mit der angegebenen Struktur für MIBG.

2.1.4.4 Massenspektrometrie (MS)

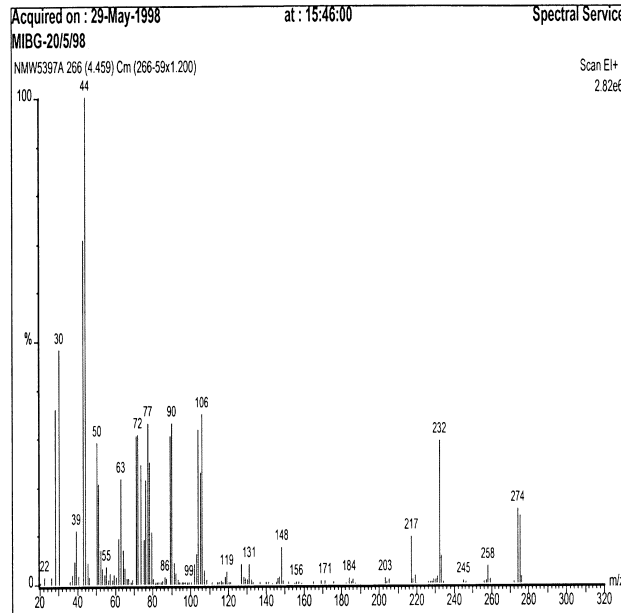
Eine Probe von etwa 20 mg MIBG-Hydrogencarbonat wurde mittels Massenspektrometrie von der Firma Spectral Service in Köln untersucht und interpretiert. Als Gerät wurden verwendet:

- MS-Spektrometer VG QUATTRO I (Micromass, Manchester, Great Britan) gekoppelt mit
- Gaschromatograph 5890 II (Hewlett Pachard, Böblingen, Deutschland)
- Computer 486DX2-66MHz unter Windows 3.11 und Micromass Software MASSLYNX 2.1
- \pm EI/CI-Ionenquelle, Direkteinlaß

Zur Charakterisierung der Prüfsubstanz wurde ein positives Elektronenstoß-Massenspektrum erstellt. Die Probe wurde über Direkteinlaß zugeführt. Folgende Parameter wurden verwendet:

- Scanparameter 15-650 amu in 0,9 sec; Interscan-Delay 0,1 sec
- Verdampfungstemperatur 160 °C

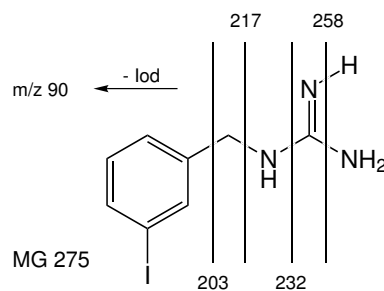
Abb. 2.5: +EI-Massenspektrum der Prüfsubstanz



- Temperaturprogramm 60 °C bis 280 °C mit 10 °C pro min

Die beauftragte Firma lieferte das Massenspektrum in Abbildung 2.5. Das Massenspektrum zeigt ein Molekülion bei m/z 275. Das Molekülion zeigt eine starke Wasserstoffabspaltung (m/z 274). Das intensive Signal bei m/z 44 repräsentiert das aus der Kohlensäure entstandene CO_2 . Die Signale wurden den Hauptfragmenten zugeordnet (vgl. Abbildung 2.6).

Abb. 2.6: Hauptfragmente der Prüfsubstanz



2.1.4.5 Zusammenfassung

Die Synthese-Substanz wurde auf Identität und Reinheit untersucht. Die angenommene Struktur (vgl. Abbildung 2.1) wurde durch das ^1H -NMR- und das Massenspektrum bestätigt (durchgeführt von der Firma Spectral Service GmbH). Die erhaltenen Daten stehen im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Werten für MS und HNMR [WAFELMAN et al. 1995]. Die geforderte Reinheit von $> 95\%$ wurde mittels HPLC-Prüfung kontrolliert und bestätigt.

Somit entsprach die hergestellte Substanz allen Anforderungen hinsichtlich Identität und Reinheit.

2.2 Synthese von radioaktiv markiertem meta-Iodbenzylguanidin

Die Synthese von ^{125}I -MIBG wurde von Herrn Dr. Klaus Dutschka – Nuklearmedizin der Universität Essen – durchgeführt. Die Synthese erfolgte durch einen nicht-isotopen, Cu(I)-assistierten Halogenaustausch und wurde wie folgt durchgeführt [DUTSCHKA und COENEN 1994]. Zu 400–1000 MBq ^{125}I (Reinheit $> 99\%$), das in 0,01 M NaOH aufbewahrt wurde, wurde Natriumdisulfit zugesetzt und die Lösung zur Trockene eingeeengt. Meta-Brombenzylguanidin (MBBG) (Reinheit $> 99\%$) und CuCl, beide in Essigsäure gelöst, wurden zugesetzt und die erhaltene Mischung für 10 min auf $180\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Danach wurde die Essigsäure abgezogen, der Rückstand in mobiler Phase aufgenommen und mittels HPLC gereinigt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer Purospher Säule RP-18 ($5\text{ }\mu\text{m}$; $250 \times 4\text{ mm}$), die mit 0,01 M NaH_2PO_4 /Acetonitril (950/50; v/v) als mobile Phase betrieben wurde. Die Fraktion mit ^{125}I -MIBG wurde aufgefangen, die mobile Phase abgezogen und das Produkt in isotonischem Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst. Die spezifische Aktivität von ^{125}I -MIBG wurde zu $2,17\text{ Ci}/\mu\text{mol}$ bestimmt.

2.3 Versuche mit humanen Neuroblastomzellen

2.3.1 Substanzen

Verwendete Substanzen waren:

- Nisoxetin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Pargylin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (Geschenck von Herrn Prof. Dr. Bö-nisch, Universität Bonn, Deutschland)
- ¹²⁵I-MIBG, MIBG (vgl. Kapitel 2.1 und 2.2)
- ¹⁴C-Tyramin (NEN Life Science Products, Boston, USA)
- ³H-Noradrenalin, (-)-Noradrenalin (NEN Life Science Products, Boston, USA)
- HEPES-gepufferte Krebs-Ringer-Lösung mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl	125,0	mM	- KCl	4,8	mM
- KH ₂ PO ₄	1,2	mM	- MgSO ₄	1,2	mM
- CaCl ₂	1,3	mM	- HEPES	25,0	mM
- Glucose	5,6	mM	- Ascorbinsäure	1,0	mM

2.3.2 Versuchstechnik

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH (Subtyp SY5Y; bezogen von American Type Culture Collection) wurde verwendet, um die Sättigungskinetik der MIBG-, Tyramin- und Noradrenalin-Aufnahme, die durch Uptake₁ vermittelt wird, zu untersuchen. Die Zellen wurden in Gewebe-Kulturschalen (mit einem Durchmesser von 60 mm) bei 37 °C unter 5 % CO₂ gezüchtet. Als Nährmedium diente „Eagel's minimum essential“ Medium, dem 10 % fötales Kälberserum zu-

gesetzt wurde. Die Zellen wurden 3 bis 5 Tage vor dem Versuch mit Mg^{2+} und Ca^{2+} -freier phosphatgepufferter 0,9%iger Kochsalz-Lösung im Verhältnis 1:3 bis 1:4 vorinkubiert. Dazu wurden Multischalen mit 12 Vertiefungen verwendet. Die initiale Aufnahme für ^{125}I -MIBG, ^{14}C -Tyramin und 3H -Noradrenalin wurde für die Versuche selbst bei 37 °C in HEPES-gepufferter Krebs-Ringer-Lösung (KRS) bestimmt. Die Catechol-O-methyltransferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO) wurden durch die Anwesenheit von 10 μM 3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiofenon und 1 μM Pargylin gehemmt. Nach einer Inkubation von 1 min mit den radioaktiv-markierten Testsubstanzen, wurden die Zellen dreimal mit 2 ml eisgekühlter KRS gewaschen und in 1,5 ml Counting-Medium bei 37 °C 60 min lysiert. Als Counting-Medium wurden entsprechend für jede Substanz folgende Lösung verwendet:

Substanz	^{125}I -MIBG	^{14}C -Tyramin	3H -Noradrenalin
Counting-Medium	0,3 M NaOH	0,1 % TritonX100	0,1 % TritonX100

Die Menge Radioaktivität, die in 1 ml gelösten Zellen vorhanden war, wurde entweder in einem Gamma-Counter (^{125}I -MIBG) oder in einem Flüssigkeits-Szintillator (^{14}C -Tyramin und 3H -Noradrenalin) gemessen. Der Proteingehalt der lysierten Zellen wurde nach der Methode von Lowry [LOWRY et al. 1951] bestimmt. Um die Konzentration von MIBG und Noradrenalin im Inkubationsmedium zu erhöhen, wurde entsprechend nicht radioaktiv-markierte Substanz zu den markierten Substanzen gegeben, und damit die spezifische Aktivität erniedrigt. Auf der anderen Seite wurde die Konzentration von ^{14}C -Tyramin durch Zusatz von weiterem ^{14}C -Tyramin erhöht. Die spezifische Aktivität änderte sich folglich nicht. Die Konzentrationen in nachfolgender Tabelle wurden jeweils untersucht.

^{125}I -MIBG	0,10	0,2	0,5	1,5	5,0	10,0 μM
^{14}C -Tyramin	0,50	1,0	1,5	3,0	6,0	10,0 μM
3H -Noradrenalin	0,03	0,1	0,3	1,0	3,0	10,0 μM

Die Initialaufnahme von ^{125}I -MIBG, ^{14}C -Tyramin und 3H -Noradrenalin wurde entweder in Abwesenheit (Gesamtaufnahme) oder in Gegenwart (nicht Uptake₁-vermittelte Aufnahme) von 10 μM Nisoxetin (selektiver Uptake₁-Blocker) be-

stimmt und die sättigbare, über Uptake₁ vermittelte Aufnahme wurde aus der Differenz zwischen Gesamt- und vermittelter Aufnahme berechnet.

2.3.3 Datenanalyse und Statistik

Die Michaelis-Menten Gleichung wurde an die Sättigungskurven für die Initialaufnahme (Uptake₁-vermittelte Aufnahme) von radioaktiv markiertem MIBG, Tyramin oder Noradrenalin über nicht-lineare Regressionsanalyse angepaßt. Über diese Berechnung wurden V_{max} und K_m bestimmt:

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

V : Aufnahmegeschwindigkeit über Uptake₁

V_{max} : maximale Aufnahmegeschwindigkeit

K_m : Michaelis-Menten Konstante

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der durchgeführten Versuche an.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für die nicht Uptake₁-vermittelte Aufnahme von MIBG, Tyramin oder Noradrenalin wurden die Daten aus den Versuchen mit 10 μ M Nisoxetin mit Hilfe der Software Prism 2.01 (Graphpad; San Diego; USA) einer linearen Regression unterzogen. Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden statistisch mit Hilfe einer Varianzanalyse gefolgt durch den Bonferroni-Test für multiple Vergleiche auf Signifikanz untersucht. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.4 Versuche am perfundierten Kaninchenherz

2.4.1 Substanzen

Meta-Iodbenzylguanidin (MIBG) wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben hergestellt.

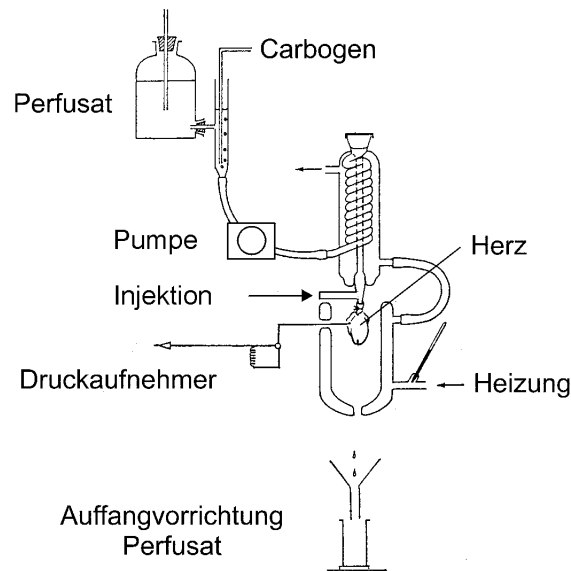
Die anderen Substanzen in diesen Versuchen waren:

- Desipramin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 3,4-Dihydroxybenzylaminhydrobromid (DOPEG)(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- (\pm)3,4-Dihydroxyphenylglykol (DHBA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Heparin (Liquemin[®]; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- MIBG-Acetat-Stammlösung 100 mM in Wasser (Verdünnung mit 0,9%iger NaCl-Lösung)
- (-)Noradrenalinbitartrat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Tyramin-Stammlösung 300 mM in Wasser (Verdünnung mit 0,9%iger NaCl-Lösung)
- modifizierte mit Carbogen (Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) gesättigte Tyrode-Lösung (resultierender pH 7,4) mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl	118,0	mM	- KCl	25,0	mM
- NaH ₂ PO ₄	1,4	mM	- MgSO ₄	1,2	mM
- CaCl ₂	1,4	mM	- Glucose	11,0	mM

Alle anderen Substanzen wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Abb. 2.7: Versuchsaufbau eines perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff.



2.4.2 Versuchstechnik

Die verwendeten Kaninchen stammten von verschiedenen Rassen ab und waren beiderlei Geschlechts. Ihre Gewichtsspanne lag zwischen 1,8 und 2,3 kg. Nach der i.v. Verabreichung von 500 I.E. Heparin in die linke Ohrvene wurden die Tiere durch einen Schlag auf den Kopf (Bolzenpistole) getötet und über die Karotiden entblutet. Anschließend wurden Thorax und Herzbeutel eröffnet, das Herz entfernt und in ein mit eiskalter Tyrodelösung gefülltes Becherglas überführt. Durch mehrfach leichtes Drücken der Präparation wurde möglichst viel Blut entfernt. Anschließend wurde der Aortenstumpf frei präpariert und mittels eines Baumwollfadens an die Aortenkanüle eines Dreiwegehahnes gebunden und in eine temperierte (37°C), feuchte Kammer gehalten. Der Hahn wurde mit der Perfusionsapparatur verbunden und sofort nach der Befestigung mit Hilfe einer Schlauchpumpe volumenkonstant mit 26 ml/min perfundiert. Dabei war genaustens darauf zu achten, daß keine Luftblase in die Aorta gelang. Die Perfusionsrate wurde gravimetrisch überprüft. Als Perfusat wurde Tyrode-Lösung, die mittels Liebig-Kühler

und Wasserbad auf 37 °C temperiert und mit Carbogen begast wurde, verwendet. Der Druck des Perfusionsmediums schloß die Aortenklappe, so daß das Perfusat nur durch die Koronargefäße floß und über den rechten Vorhof und die Ateria pulmonalis abfloß und über die Herzspitze abtropfte (Langendorff Technik, vergleiche Abbildung 2.7 nach [PERRY 1970]). Mit einer Federschere wurde der linke Vorhof geöffnet und ein Latexballon bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Der so positionierte Latexballon wurde mit physiologischer Kochsalz-Lösung gefüllt. Der koronare Perfusionsdruck und der linksventrikuläre Druck (LVP „left ventricular pressure“) wurden über zwei Druckaufnehmer, die mit einem Seitenarm der Aortenkanüle und dem linksventrikulär positionierten Ballon verbunden waren, aufgezeichnet. Die Herzfrequenz (HR „heart rate“) und die linksventrikuläre Druckamplitude (LVPP „left ventricular pulse pressure“) wurden mittels eines Computer-Systems (MacLab; Chart Programm) aus dem LVP-Signal abgeleitet. Nach einer Equilibriationsperiode von mindestens 30 min wurde MIBG, Tyramin oder Vehikel in Form einer Bolus-Injektion (100 µl) in die Aortenkanüle verabreicht. In einigen Versuchen enthielt die Perfusionslösung 2 µM Desipramin (Inhibitor von Uptake₁).

Für die Versuche zur Bestimmung der adrenergen Neuronenblockade wurde MIBG in verschiedenen Konzentrationen oder Vehikel in die Aortenkanüle infundiert. An der elektrisch leitenden Aortenkanüle wurde eine Reizelektrode und an der elektrisch leitenden Halterung des Latexballons eine Referenzelektrode befestigt. Die beiden Elektroden wurden an einen Stimulator (Typ 215/II der Firma Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen, der bei einer Spannung von 8-10 V Rechtecksimpulse von 3 ms Dauer mit einer Frequenz von 5 Hz lieferte (Feldstimulation).

Bei den Versuchen zur Bestimmung der spontanen Abgabe von Noradrenalin und DOPEG in das Perfusat wurde Vehikel (physiologische Kochsalz-Lösung) oder MIBG in steigenden Konzentrationen in die Aortenkanüle infundiert. DOPEG ist der wichtigste primäre Noradrenalin-Metabolit der MAO präsynaptischen Ursprungs. Die spontane DOPEG-Abgabe ist damit ein Maß für die Aktivität der neuronalen MAO-A.

Nach Versuchsende wurde das Herz von der Apparatur abgeschnitten, mit Filter-

papier getrocknet und gewogen.

2.4.3 Versuchsprotokoll zur Ermittlung sympathomimetischer Wirkungen

Drei verschiedene Gruppen von Versuchen wurde durchgeführt. In *Gruppe 1* wurden die Dosis-Wirkungskurven für die Herzfrequenz-steigernde Wirkung als auch für die Noradrenalin- und Dopamin-freisetzenden Effekte von MIBG und Tyramin bestimmt. Dazu wurde entweder MIBG oder Tyramin in steigenden Dosen von 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, und 10 μmol aufeinanderfolgend in Intervallen von 10 bis 35 min verabreicht. Herzfrequenz und LVPP wurden kontinuierlich gemessen. Um den „Overflow“ d. h. den Übertritt von endogenem Noradrenalin und Dopamin in das Perfusat zu bestimmen, wurden während des gesamten Versuchs jeweils 5 min lang Proben des venösen Perfusats (vom Herzen abtropfende Flüssigkeit) aufgefangen und die Konzentration der enthaltenen Catecholamine bestimmt. Nach Verabreichung steigender Dosen von MIBG oder Tyramin wurde folgende Anzahl von 5-min Proben aufgefangen:

Dosis (μmol)	0,03	0,10	0,30	1,00	3,00	10,00
Anzahl aufgefangener Proben	2	3	4	5	7	9

Das Auffangen des Perfusats vor der ersten Gabe von MIBG oder Tyramin diente zur Bestimmung des Ausgangswertes (0-Wert) für den Catecholamine-Overflow. Der durch MIBG oder Tyramin verursachte Overflow von Noradrenalin und Dopamin wurde mit den entsprechenden 0-Werten korrigiert. Die maximal-verabreichte Dosis (10 μmol) wurde durch die Löslichkeit von MIBG nach oben begrenzt (100 μl der MIBG-Stammlösung).

Gruppe 2 diente zur Bestimmung der Wirkung einer einzelnen Dosis von 10 μmol MIBG oder Tyramin in Ab- bzw. Anwesenheit von 2 μM Desipramin im Perfusat. Bei diesem Typ von Versuch betrug der Beobachtungszeitraum 60 min (entsprechend zwölf 5-min-Auffangperioden).

Die Versuche der *Gruppe 3* dienten zur Bestimmung der Effekte von 100 μl Vehi-

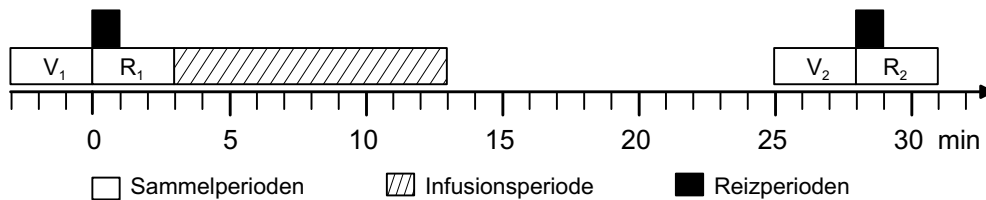
kel (verwendet wurde destilliertes Wasser, 0,9%ige Kochsalzlösung oder 100 mM Natriumacetat-Lösung). Der Effekt von 100 μ l 100 mM Natriumacetat-Lösung wurde ebenfalls am mit 300 Schlägen pro min elektrisch gereiztem Herzen untersucht (Feldstimulation).

2.4.4 Versuchsprotokoll zur Ermittlung der adrenergen Neuronen-blockierenden Wirkung

Um festzustellen, ob MIBG Eigenschaften eines adrenergen Neuronenblockers besitzt, wurde die Antwort des perfundierten Herzens auf eine Feldstimulation nach Infusion verschiedener Konzentrationen von MIBG untersucht. Das Versuchsprotokoll wurde deshalb wie folgt gewählt (Abb. 2.8). Nach Auffangen des venösen Perfusats für 3 min (V_1 ; V =Vorwert) wurde das Herz für 1 min einer Feldstimulation ausgesetzt. Gleichzeitig mit Beginn der Reizung wurde das Perfusat für 3 min aufgefangen (R_1). Anschließend wurde MIBG für 10 min so in die Aortenkanüle infundiert, daß das arterielle Perfusat eine Konzentration von 0,3, 1, 3, 10 bzw. 30 μ M MIBG enthielt. Als Kontrolle wurde eine 0,9%ige NaCl-Lösung (Vehikel) verwendet, die ebenfalls in die Aortenkanüle infundiert wurde. Nach einer Auswaschphase von 12 min wurde wiederum für 3 min das venöse Perfusat aufgefangen (V_2), das Herz für 1 min gereizt und beginnend mit der Stimulation das Perfusat nochmals für 3 min aufgefangen (R_2).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Wirkung von MIBG nach dessen Infusion verschiedener Dauer untersucht. Dazu wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie in der Versuchsreihe zuvor verwendet; nur im Unterschied dazu wurde in das arterielle Perfusat, welches das Herz versorgte, für 5, 10 oder 20 min eine MIBG-Lösung infundiert, so daß sich in der Perfusionslösung eine Konzentration von 10 μ M MIBG ergab. Als Vergleich wurde in das Perfusat 20 min lang Tyramin infundiert, so daß sich eine Konzentration von 10 μ M Tyramin ergab.

Abb. 2.8: Versuchsdurchführung zur Bestimmung der adrenergen Neuronen-blockierenden Wirkung von MIBG



Das vom Herzen abtropfende venöse Perfusat wurde für 3 min aufgefangen (V_1) und anschließend wurde das Herz für 1 min gereizt. Beginnend mit der Reizung wurde ebenfalls für 3 min das abtropfende Perfusat gesammelt (R_1). Danach wurde das Herz durch Infusion in die Aortenkanüle für eine definierte Zeit (5, 10 oder 20 min) mit verschiedenen Konzentrationen von MIBG (0,3, 1, 3, 10 und 30 μM), Tyramin (10 μM) oder Vehikel versorgt. Es schloß sich eine Auswaschperiode an, an deren Ende wieder das venöse Perfusat für 3 min aufgefangen wurde (V_2). Mit Beginn der 2. Reizung (Dauer 1 min) wurde das Perfusat erneut für 3 min aufgefangen (R_2). Die im venösen Perfusat enthaltenen Konzentration an Noradrenalin wurde mittels HPLC bestimmt.

2.4.5 Versuchsprotokoll zur Ermittlung der Hemmung der neuronalen MAO-A

Um festzustellen, ob MIBG die neuronale MAO-A hemmt, wurden spontan schlagende, perfundierte Kaninchenherzen untersucht. Nach einer Äquibrierungsperiode von 30 min wurden in die Aortenkanüle dieser Herzen von 0 bis 45 min entweder 0,9%ige NaCl-Lösung (Kontrolle) oder ansteigende Konzentrationen von MIBG infundiert (0,01 μM MIBG von 0-15 min; 0,1 μM MIBG von 15-30 min; 1 μM MIBG von 30-45 min). Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich gemessen. Vor der Infusion mit MIBG bzw. 0,9%ige NaCl-Lösung wurde das Perfusat für 1 min aufgefangen und die Ausgangswerte für den „Overflow“ von Noradrenalin und DO-PEG, dem wichtigsten präsynaptischen MAO-A-Metaboliten von Noradrenalin, bestimmt. Dies wurde zum Ende jedes 15 min Versuchsintervalls wiederholt.

2.4.6 Analytik

Jede Probe wurde immer am gleichen Tag sofort nach dem Versuch aufbereitet und mit Hilfe chromatographischer Trenntechniken und „elektrochemischer“ Detektion quantifiziert. Für die Versuche zur Bestimmung der sympathomimetischen Effekte von MIBG wurden vor der chemischen Analyse von Noradrenalin und Dopamin je 2 gleiche 10 ml Proben Perfusatlösung (Doppelbestimmung) einer Probenvorbereitung unterzogen. Für die Versuche zur Bestimmung der adrenergen Neuronen-blockierenden Wirkung von MIBG wurden zur Bestimmung von Noradrenalin je 2 gleiche 1 ml Proben venöses Perfusat (Doppelbestimmung) aufbereitet. Für die Versuche zur Ermittlung der Hemmung der neuronalen MAO-A wurden zur Bestimmung von Noradrenalin und DOPEG je 2 gleiche 1 ml Proben venösen Perfusats (Doppelbestimmung) aufbereitet. Die einzelnen Perfusatproben wurden bis zur eigentlichen Aufbereitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. 10 ml bzw. 1 ml Perfusat wurde in ein verschließbares Gefäß pipettiert und 100 µl einer 10 nM Stammlösung Dihydroxybenzylamin (DHBA) als interner Standard, 500 µl TRIS-HCl Puffer (2 M, pH 7,8) und 40 mg bzw. 20 mg Al₂O₃ zugesetzt. Die Gefäße wurden verschlossen und 5 min mit Hilfe eines Überkopfschüttlers langsam gemischt. Danach wurden die Proben in einer auf 4 °C temperierten Zentrifuge bei 1000 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und der Rückstand mit Hilfe von 1 ml Wasser in spezielle Filtrierapparate (Greiner, Nürtingen) quantitativ überführt. Der Boden dieser Gefäße bestand aus einem Glasfaser-Filter (GF 52, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Diese Reaktionsgefäße wurden in Umhüllen eingehängt und bei 660 g für 1 min zentrifugiert. Der auf dem Filter befindliche Al₂O₃-Rückstand wurde nochmals mit 1 ml Wasser gewaschen. Danach wurde die Umhülle gewechselt und die Catecholamine zweimal mit je 100 µl 0,1 M HClO₄ desorbiert. Jeder Wasch- und Desorptionsschritt wurde durch eine Zentrifugation (vergleiche oben) abgeschlossen. Die beiden 100 µl Filtrate des Desorptionsschrittes wurden gemischt und in Vials für die Analyse abgefüllt [FRIEDGEN et al. 1996]. Zur chromatographischen Trennung und Quantifizierung diente eine HPLC-Anlage mit „elektrochemischer“ Detektion (amperometrischer Detektor). Das System bestand aus einer Zweikolben-Pumpe Typ 515, einem automatischen Probengeber WISP 717 (Waters, Eschborn) und

einem amperometrischen Detektor (Coulchem II) bestehend aus einem dreifachen Elektrodensystem (Zellmodell 5021 und 5011; ESA, Bedford, Mss., USA). Die Daten wurden durch den Millennium 2010 Chromatographie-Manager (Waters, Eschborn) aufgezeichnet und ausgewertet. Für die chromatographische Trennung von Noradrenalin, DOPEG, Dopamin und DHBA wurde eine Nucleosil 100 C18 Säule (5 μm ; 125 x 3 mm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), die mit Hilfe eines Säulenofens auf 20 °C temperiert wurde, verwendet. Die mobile Phase bestand aus:

- KH_2PO_4	50,0	mM
- $\text{Na}_2\text{-EDTA}$	0,1	mM
- Na-Octansulfonat	0,3	mM
- Methanol (v/v)	2,0	%

und wurde mit Wasser, das Milli-Q-Qualität aufwies, hergestellt. Der pH-Wert war auf 3,0 eingestellt und die Lösung wurde sterilfiltriert und entgast. Der Fluß der mobilen Phase lag bei 0,8 ml/min, der daraus resultierende Druck bei 160 bar. Das Oxidationspotential an der „Guard-Zelle“ (1. Zelle vor dem Probengeber, um die mobile Phase „elektrochemisch“ zu reinigen) wurde auf 350 mV, an der coulometrischen Zelle (2. Zelle nach der Trennsäule, um die Catecholamine vollständig zu oxidieren) auf 160 mV und an der analytischen Zelle (3. Zelle direkt nach der 2. Zelle, um die oxidierten Catecholamine über Reduktion zu quantifizieren) auf -350 mV eingestellt (Potentiale gemessen gegen die Palladium-Referenzelektrode). Der durch den Eluenten erzeugte Grundstrom lag bei 1 nA. Die mittlere Wiederfindungsquote für DHBA lag bei 72 %; dieser Mittelwert besaß einen Variationskoeffizienten von 4 % an einem Tag und einen Variationskoeffizienten von 7 % zwischen den Tagen. Die erhaltenen Ergebnisse für Noradrenalin, DOPEG und Dopamin wurden mit der Wiederfindungsquote für DHBA korrigiert.

2.4.7 Datenanalyse und Statistik

Die Menge an Noradrenalin, die im venösen Perfusat nach der Äquilibrierungsphase spontan erschien (Overflow), wurde bei den Versuchen aus Abschnitt 2.4.4 aus der im Perfusat bestimmten Konzentration an Noradrenalin bzw. DOPEG, der Perfusionsrate und dem Herzgewicht berechnet. Dies entspricht dem Ausgangswert (0-Wert).

$$Overflow_{spontan} = \frac{c_{CA} \cdot Perfusionsrate}{Herzgewicht} \quad (2.2)$$

Overflow : Erscheinungsmenge des Catecholamins im venösen Perfusat [pmol·g⁻¹·min⁻¹]

c_{CA} : Konzentration des Catecholamins im venösen Perfusat korrigiert mit dem 0-Wert [pmol·ml⁻¹]

Perfusionsrate : Perfusionsgeschwindigkeit [ml/min]

Herzgewicht : Herzgewicht [g]

Die gleiche Berechnung wurde benutzt, um den Overflow während der Stimulation (entweder durch Reizung oder durch MIBG) zu berechnen. Daraus wurde der induzierte Overflow wie folgt berechnet:

$$Overflow_{induziert} = Overflow_{Stimulation} - Overflow_{spontan} \quad (2.3)$$

Die Dosis-Wirkungskurven für die sympathomimetischen Effekte von MIBG wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung analysiert. Dazu wurden die Daten mit Hilfe der Software Prism 2.01 (Graphpad; San Diego; USA) einer nicht-linearen Regression unterzogen, die mit der Methode der kleinsten Quadrate arbeitete. Zur Analyse der Konzentrations-Wirkungskurven wurde für jeden Versuch einzeln die folgende Form der Hill-Gleichung angewendet:

$$E = \frac{E_{max} \cdot D^{n_H}}{ED_{50}^{n_H} + D^{n_H}} \quad (2.4)$$

E_{max} : maximaler Effekt

ED_{50} : MIBG- oder Tyramin-Dosis, die den halbmaximalen Effekt ergab

n_H : scheinbarer Hill-Koeffizient (Steigung am Wendepunkt der Kurve)

D : Dosis von MIBG oder Tyramin

E : Effekt (Anstieg der Herzfrequenz bzw. des Catecholamin-Overflows)

Die Konzentrations-Wirkungskurven für die Bestimmung der adrenergen Neuronenblockierenden Wirkung, d.h. der Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung wurden ebenfalls mit Hilfe der Hill-Gleichung analysiert. Zur Analyse der Dosis-Wirkungskurven wurde für alle Versuche zusammen die folgende Form der Hill-Gleichung angewendet:

$$E = \frac{E_{max} \cdot c^{n_H}}{IC_{50}^{n_H} + c^{n_H}} \quad (2.5)$$

E_{max} : maximaler Effekt

IC_{50} : Konzentration von MIBG, die den halbmaximalen Effekt ergab

n_H : scheinbarer Hill-Koeffizient (Steigung am Wendepunkt der Kurve)

D : Konzentration von MIBG

E : Effekt (Hemmung des reizbedingten Noradrenalin-Overflows)

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Hemmung der neuronalen MAO-A, d.h. der DOPEG-Abgabe, wurde die IC_{50} durch lineare Interpolation der log Konzentrations-Wirkungskurve für den Abfall des Quotienten DOPEG/Noradrenalin unter Berücksichtigung der MIBG-Konzentrationen 0,01 und 0,1 μM in jedem einzelnen Experiment berechnet.

Die Ergebnisse werden entweder als arithmetische Mittelwerte \pm SEM oder als geometrische Mittelwerte mit 95 % Konfidenzintervalle angegeben; n gibt die Anzahl der durchgeführten Versuche an. Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden statistisch mit Hilfe des Student t-Test oder mit Varianzanalyse gefolgt durch

den Bonferroni-Test für multiple Vergleiche auf Signifikanz untersucht. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.5 Versuche am narkotisierten Kaninchen

Für die Versuche wurden männliche Chinchilla Bastard-Kaninchen mit einem Körpergewicht zwischen 1,8 und 2,5 kg verwendet, die von der Firma Charles River, Sulzfeld (Deutschland) bezogen wurden. Nach dem Transport mußten die Tiere mindestens zwei Tage im eigenen Tierstall verbringen, um sich vom Streß des Transportes zu erholen. Während dieser Zeit erhielten sie Nahrung und Trinkwasser ad libitum. Am Versuchstag wurden das Körpergewicht bestimmt, auf das alle verwendeten Substanzen bezogen wurden. Bis zur Operation verbrachten die Tiere diese Zeit abgeschirmt in einem Käfig.

2.5.1 Narkose

Die Narkose wurde über einen Bolus von 9 mg/kg Saffan[®] (1:3 Gemisch aus Alfadolon und Alfaxolon, Mallinckrodt Veterinary Ltd, Harefield, England), der über eine Kanüle in die rechte Ohrvene verabreicht wurde eingeleitet. Ebenfalls über diese Kanüle erhielt das Tier 10-15 µg/kg Fentanyl zur Analgesie. Danach wurde eine Infusion von Saffan[®] angeschlossen, die während der Präparation des Tiers auf eine Infusionsrate von $0,43 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt wurde, um das für die chirurgischen Maßnahmen erforderliche Toleranzstadium zu erreichen und aufrecht zu erhalten. Die Rate wurde dann stufenweise, je nach Tiefe der Narkose, erniedrigt, bis in der Regel ein Wert von $0,17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ erreicht wurde. Im Anschluß an die Präparation wurde eine halbstündige Erholungsphase bis zum eigentlichen Versuchsbeginn abgewartet. Die aufgezeichneten Kreislaufparameter Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) wurden verwendet, um die Stabilität und Tiefe der Narkose zu bewerten. Bei Veränderungen der Parameter wurde die Infusionsgeschwindigkeit den Bedürfnissen angepaßt (modifiziert nach [SZABO et al. 1989]). Die Narkose konnte so bei den Versuchen nahezu konstant und angemessen tief gehalten werden. Diese Beobachtungen wurden durch

die nachfolgenden Bestimmungen der Noradrenalin- und Adrenalin-Plasmaspiegel bestätigt.

2.5.2 Chirurgische Präparation

Die Operation fand auf einer Platte statt, die auf 39°C temperiert wurde. Die Körpertemperatur wurde über eine Meßsonde überwacht, die über die rechte Arteria carotis in die Aorta ascendens eingeführt (siehe weiter unten) und über die Anzeige des angeschlossenen „Cardiac Output Computers“ angezeigt wurde. Nach Einleitung der Narkose wurde zunächst die Trachea kanüliert und mit Hilfe des „Animal Respirators“ der Firma TSE, Bad Homburg (Deutschland), die künstliche Beatmung durchgeführt. Das Gerät beatmete die Tiere mit 0,8 l/min O₂ und 1,5 l/min Raumluft, bei einem Beatmungsdruck zwischen 7 und 12 mbar und einer Beatmungsfrequenz von 35 Zyklen pro min. Die richtige Beatmung wurde mit Hilfe eines Blutgasanalysators überprüft.

Nach der Kanülierung der Trachea wurde die rechte Arteria carotis freipräpariert und kanüliert. Dazu wurde eine Brauniüle[®] MT und einem hämostatischen Ventil mit einem ableitenden Schlauch verwendet, an dem die Blutdruckregistrierung angeschlossen wurde. Anschließend wurde die Thermosonde des „Cardiac Output Computers“ über das hämostatische Ventil in die Aorta ascendens vorgeschoben. Der rechte Herzvorhof wurde über die Vena jugularis externa mit einem Cavafix[®] MT Katheter (0,5 x 0,9 mm, Braun Melsungen, Deutschland) kanüliert. Diese Kanüle wurde später für die Messung des Herzzeitvolumens und die Rückgabe der abgenommenen Blutzellen verwendet. Die linke Arteria femoralis wurde im Anschluß mit einem Polyethylen-Schlauch (äußerer Durchmesser 0,8 mm) kanüliert, um während des Versuchs arterielles Blut abnehmen zu können, ohne die Blutdruckaufzeichnung unterbrechen zu müssen. Die gesamte Prozedur der Kanülierung der Arteria carotis, der Vena jugularis externa und der Arteria femoralis dauerte ca. 15 min.

Danach erhielt das Tier über die Vena jugularis 1000 I.E./kg Heparin (Liquemin[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und 5 mg/kg Gallamin als Muskelrelaxans (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), das in Form einer

Stammlösung von 20 mg/ml in Ringer-Lösung vorlag. Dann wurde das Tier in Ruhelage auf die linke Seite gelegt, um eine obstruktive Verlegung der Atemwege zu vermeiden. Danach hatte das Tier mindestens eine halbe Stunde Zeit, um seinen Kreislauf zu stabilisieren und einen definierten Ausgangswert für die Kreislaufparameter zu erhalten. Zum Zeitpunkt 0 min begann der Versuch mit der Infusion der zu untersuchenden Substanz (0,9%iger Kochsalz-Lösung, MIBG oder Tyramin) in die linke Ohrvene.

2.5.3 Bestimmung der Kreislaufparameter

Blutdruck und Herzfrequenz wurden mit Hilfe eines Isotec Druckaufnehmers aus der rechten Arteria carotis abgeleitet und mit Hilfe eines Brückenverstärkers und einer Rechneinheit mit Software (MacLab; Chart Programm) aufgezeichnet. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde während des Versuchs aus dem gemessenen Blutdruck-Signal berechnet.

Zur Bestimmung des Herzminutenvolumens (HMV) wurden 300 µl einer auf 1 bis 3 °C gekühlten Ringer-Lösung zügig in den rechten Vorhof injiziert und die Temperaturänderung über die Thermosonde in der Aorta gemessen. Aus dem Injektionsvolumen (dem „Cardiac Output Computers“ vorgegeben), der Injektat-Temperatur, der Bluttemperatur und dem Temperaturzeitverlauf nach der Injektion der kalten Ringerlösung (kontinuierliche Messung über Sonden des „Cardiac Output Computers“) berechnete der Computer (HMV 7905, Hoyer, Bremen) das Herzminutenvolumen für Blut. Der totale periphere Widerstand (TPR) wurde aus den Meßgrößen Herzminutenvolumen und mittlerer arterieller Blutdruck, der zum Zeitpunkt der Herzminutenvolumen-Messung bestimmt wurde, nach folgender Gleichung errechnet:

$$TPR = \frac{MAP}{HMV} \quad (2.6)$$

TPR : totaler peripherer Widerstand [mmHg·min/ml]

MAP : mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]

HMV : Herzminutenvolumen [ml/min]

2.5.4 Versuchsprotokoll und Analytik

MIBG-Acetat lag in Form einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM vor (vgl. Abschnitt 2.1.2). Diese wurde am Versuchstag mit Ringer-Lösung auf die entsprechende Endkonzentration für die Infusion verdünnt.

Arteriell Blut wurde über die Arteria femoralis langsam entnommen, um den Einfluß auf die Blutdruckaufzeichnung zu minimieren. Das entnommene Volumen betrug pro Abnahmezeitpunkt (siehe unten) 2 ml und wurde durch eine Mischung aus gleichen Teilen Dextran 40 Lösung (Rheomacrodex[®] 10 %, Pharma Reusch GmbH, Bonn, Deutschland) und Ringer-Lösung substituiert. Die Blutproben wurden sofort in eisgekühlte Polystyrol-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge bei 2600 g 10 min lang zentrifugiert. 1 ml Plasmaüberstand wurden abpipettiert und mit 0,5 ml Stabilisatorlösung, die 1 % Na₂EDTA und 1,25 % Na₂SO₃ enthielt, versetzt. Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlschrank bis zum Versuchsende aufbewahrt, dann sofort wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben aufbereitet und später zur Bestimmung von Noradrenalin und DOPEG analysiert. Das bei der Zentrifugation erhaltene Blutzell-Sediment wurde mit 1 ml Dextran/Ringer-Lösung aufgeschwemmt und über die Vena jugularis langsam dem Tier zurückgegeben.

2.5.4.1 Vorversuch zur Bestimmung der sympathomimetischen Wirkungen von MIBG und Tyramin

Nach der Präparation und einer Stabilisierungsphase von mindestens 30 min erhielt das Tier über die linke Ohrvene für 1 min eine Kurzinfusion von 10 µmol/kg MIBG, Tyramin oder Vehikel. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurden der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich aufgezeichnet. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 10, 20 und 30 min wurde dem Tier Blut entnommen und auf Noradrenalin und Dopamin hin untersucht. Die einzelnen Daten der Versuche für die Kreislaufaufzeichnung wurden mittels des Compu-

terprogrammes Igor[®] 3.0 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) gemittelt und graphisch dargestellt.

2.5.4.2 Versuch zur Bestimmung der sympathomimetischen Wirkungen von 10 und 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG und 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin

Nach der Präparation und einer Stabilisierungsphase von mindestens 30 min erhielt das Tier über die linke Ohrvene für 10 min eine Infusion von 10 bzw. 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG, 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin oder Vehikel. Alle 5 min wurden die Kreislaufparameter Herzfrequenz, mittlerer arterielle Blutdruck und totaler peripherer Widerstand für 40 min ermittelt. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 40 min wurde dem Tier Blut entnommen und die Konzentration von Noradrenalin und DOPEG im Plasma bestimmt. Die Werte wurden als Prozent des Ausgangswertes dargestellt.

2.5.4.3 Versuch zur Bestimmung der Wirkung von Methylnatropin auf die kardiovaskulären Effekte von 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder Tyramin

Nach der Präparation erhielt das Tier über die Vena jugularis einen Bolus von 1 mg/kg Methylnatropin und über die gesamte Versuchsdauer eine Infusion von 33 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ Methylnatropin über die rechte Ohrvene. Nach dem Bolus folgte eine Stabilisierungsphase von mindestens 30 min, an deren Anschluß sich eine 10 minütige Infusion von 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder Tyramin über die linke Ohrvene anschloß. Während des Beobachtungszeitraums von Beginn der Infusion (Zeitpunkt 0 min) bis 40 min wurde alle 5 min die Kreislaufparameter mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz bestimmt.

2.6 Inkubationsversuche in Homogenaten von Rattenorganen

2.6.1 Substanzen

Die verwendeten Substanzen in diesen Versuchen waren:

- Chloroglylin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Dopamin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC)
- $^3\text{H}(-)$ -Noradrenalin (NEN Life Science Products, Boston, USA)
- Selegelin·HCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Tolcapone (Geschenk von Hoffmann-La Roche, Deutschland)

Alle anderen Substanzen wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.6.2 Hemmung der Monoaminoxidase-A im Homogenat des Rattenherzens

2.6.2.1 Versuchsbeschreibung

Für die Versuche wurden Ratten mit einem Gewicht zwischen 275 und 300 g verwendet. Vor Versuchsbeginn erhielt das Tier eine Injektion von 100 I.E Heparin intraperitoneal, und eine Wartephase von 10 min wurde eingehalten. Anschließend wurde die Ratte durch einen Schlag auf den Kopf betäubt, durch Genickbruch getötet und über die Karotiden entblutet. Thorax und Herzbeutel wurden schnell eröffnet, das Herz entfernt, anhängendes Gewebe entfernt und das Herz in ein mit eiskaltem Phosphat-Puffer gefülltes Becherglas überführt (Versuchsdurchführung

in Anlehnung an Trendelenburg [TRENDELENBURG und GROHMANN 1983]). Der Phosphat-Puffer hatte einen pH von 7,4 mit folgender Zusammensetzung:

- NaH ₂ PO ₄	20	mM	- Na ₂ HPO ₄	30	mM
- Na ₂ EDTA	40	µM	- Na-Ascorbat	100	µM
- Tolcapone	10	µM	- Selegilin	1	µM

Durch Zusatz des Catechol-O-methyltransferase-Hemmers (COMT-Hemmer) Tolcapone und des Monoaminoxidase-B-Hemmers (MAO-B-Hemmer) Selegelin wurde sichergestellt, daß die Aktivität der Monoaminoxidase A (MAO-A) bestimmt wurde. Das Herz wurde mit kaltem Phosphat-Puffer über die Aorta perfundiert und blutfrei gewaschen. Anschließend wurde das Herz mit einem Fließpapier getrocknet und mit 4 ml Phosphat-Puffer je g Herzgewebe versetzt. Mit Hilfe eines Ultra Turrax wurde das Gewebe unter Eiskühlung homogenisiert und 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. 4/5 des Überstandes wurden abpipettiert, geschüttelt und 10 min bei 37 °C unter Begasung mit 100 % Sauerstoff vorinkubiert. 100 µl des Homogenats wurden zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet [LOWRY et al. 1951].

Das Volumen des Inkubationsansatzes betrug 1,5 ml. Es enthielt 250 µl Homogenat und 1250 µl Phosphat-Puffer, in dem verschiedene MIBG-Konzentrationen oder Vehikel, ³H-Noradrenalin- und Noradrenalin enthalten war, so daß sich eine Endkonzentration von 150 nM und eine spezifische Aktivität von 4,5 Ci/mmol im Inkubationsansatz ergab. 6 verschiedene MIBG-Konzentrationen wurden untersucht: 1, 3, 10, 30, 100 und 300 µM. Als Kontrollen wurden ein Inkubationsansatz ohne Homogenat und MIBG-Zusatz (Nullkontrolle), ein Inkubationsansatz ohne MIBG-Zusatz (Positivkontrolle) und ein Inkubationsansatz ohne MIBG-Zusatz, aber mit 50 µM des MAO-A-Hemmers Clorgylin (Negativkontrolle) verwendet. Die Lösungen einer Versuchsserie wurden anschließend für 30 min im Schüttelbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml 0,8 M HClO₄ und durch Eiskühlung beendet. Das denaturierte Protein wurde bei 4 °C und 3000 g für 10 min abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wurde für die HPLC-Bestimmung von ³H-Noradrenalin, ³H-3,4-Dihydroxyphenylglykol (³H-DOPEG) und ³H-3,4-Dihydroxymandelsäure (³H-DOMA) verwendet.

2.6.2.2 Analytik

Die Bestimmung von ^3H -Noradrenalin, ^3H -DOPEG und ^3H -DOMA wurde mittels HPLC und Durchflußzähler durchgeführt. Als HPLC wurden die in Kapitel 2.4.6 beschriebene Anlage und Bedingungen verwendet. Statt des elektrochemischen Detektors wurde der Durchflußzähler Ramona 2000[®] der Firma Raytest (Straubenhardt, Deutschland) mit einer 1 ml Durchflußzelle verwendet. Als Cocktail wurde Lumasafe Plus[®] der Firma Lumac LSC (Groningen, Niederlande) benutzt, der mit einer Geschwindigkeit von 1,6 ml/min vor dem Detektor zur mobilen Phase hinzu gemischt wurde. Die Nullkontrolle diente als Standard. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Peakfläche, die ein Maß für die registrierten Zerfälle ist und mit Hilfe des Programms Winnie32[®] der Firma Raytest bestimmt wurde. Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate für das radioaktiv markierte ^3H -Noradrenalin bei der Messung im Durchflußzähler wurde eine definierte Menge Radioaktivität in das System injiziert. Die vom Durchflußzähler detektierte Radioaktivität wurde ins Verhältnis zur injizierten Radioaktivität gesetzt. Dieser Quotient entsprach der Wiederfindungsrate für die Messung von Radioaktivität mit Hilfe des verwendeten Durchflußzählers.

2.6.2.3 Auswertung

Zur Bestimmung der Hemmung des Enzyms MAO-A wurden die radioaktiven Zerfälle im Peak (Peakfläche) für ^3H -Noradrenalin und ^3H -DOPEG in der Negativ- und der Positivkontrolle ermittelt und jeweils voneinander subtrahiert. Diese Differenz wurde als 100 % Hemmung des Enzyms definiert. Diese Hemmung entsprach somit der Hemmung der MAO-A, die durch 50 μM Clorgylin erreicht wurde. Die bestimmten Peakflächen in den Proben mit MIBG-Zusatz wurden dann jeweils in eine prozentuale Hemmung umgerechnet.

Die Umsatzrate der MAO-A für ^3H -Noradrenalin wurde mit Hilfe der spezifischen Aktivität für ^3H -Noradrenalin bestimmt. Dazu wurden die gemessenen radioaktiven Zerfälle im Peak von ^3H -Noradrenalin in der Negativkontrolle von denen in der Positivkontrolle voneinander subtrahiert und mit der vorher bestimmten Wiederfindungsrate des Durchflußzählers korrigiert. Die erhaltenen dpm-Werte

wurden mit Hilfe der spezifischen Aktivität und der Flußgeschwindigkeit in der Durchflußzelle in eine Konzentration umgerechnet. Mit Hilfe dieser Konzentration, der Inkubationsdauer und der Proteinmenge im Ansatz wurde die Umsatzrate für ^3H -Noradrenalin [$\text{pmol}/(\text{g Protein} \cdot \text{min})$] berechnet.

Ebenso wurde die Bildungsrate für ^3H -DOPEG (Metabolit von ^3H -Noradrenalin) bestimmt. Dazu wurden die gemessenen radioaktiven Zerfälle im Peak von ^3H -DOPEG in der Positivkontrolle von denen in der Negativkontrolle voneinander subtrahiert und, wie zuvor beschrieben, in eine Umsatzrate umgerechnet.

Konzentrations-Wirkungskurven für die Hemmung der MAO-A durch MIBG wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung analysiert. Dazu wurden die prozentualen Hemmungen, die durch die verschiedenen MIBG Konzentrationen erreicht wurden, einer nicht-linearen Regression unterzogen (Prism 2.01, Graphpad Software, San Diego, USA), die mit der Methode der kleinsten Abstandsquadrate arbeitete. Zur Analyse der Konzentrations-Wirkungskurven wurde folgende Form der Hill-Gleichung angewendet:

$$E = \frac{E_{max} \cdot c^{n_H}}{IC_{50}^{n_H} + c^{n_H}} \quad (2.7)$$

E_{max} : maximaler Hemmeffekt

IC_{50} : MIBG-Konzentration bei halbmaximalen Hemmeffekt

n_H : scheinbarer Hill-Koeffizient (Steigung am Wendepunkt der Kurve)

c : Konzentration von MIBG

E : Effekt (prozentuale Hemmung der MAO-A)

2.6.3 Hemmung der Monoaminoxidase-B im Homogenat der Rattenleber

2.6.3.1 Versuchsbeschreibung

Für die Versuche wurden Ratten mit einem Gewicht zwischen 275 und 300 g verwendet. Die Vorbereitungen entsprachen denen im Abschnitt 2.6.2. Der verwendete Phosphat-Puffer hatte einen pH von 7,4 mit folgender Zusammensetzung:

- NaH ₂ PO ₄	20	mM	- Na ₂ HPO ₄	30	mM
- Na ₂ ETDA	40	µM	- Na-Ascorbat	100	µM
- Tolcapone	10	µM	- Clorgylin	300	nM

Durch Zusatz des COMT-Hemmers Tolcapone und des MAO-A-Hemmers Clorgylin wurde sichergestellt, daß allein die MAO-B Aktivität bestimmt wurde. Die Leber wurde mit kaltem Phosphat-Puffer über die Aorta perfundiert und blutfrei gewaschen. Anschließend wurde die Leber mit einem Fliespapier getrocknet und mit 2 ml Phosphat-Puffer je g Lebergewebe versetzt. Mit Hilfe eines Ultra Turrax wurde das Gewebe unter Eiskühlung homogenisiert und 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. 4/5 Überstand wurden abpipettiert, geschüttelt und 10 min bei 37 °C unter Begasung mit 100 % Sauerstoff vorinkubiert. 100 µl des Homogenats wurden zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet [LOWRY et al. 1951].

Das Volumen des Inkubationsansatzes betrug 1,5 ml. Es enthielt 650 µl Homogenat und 850 µl Phosphat-Puffer, in dem verschiedene MIBG-Konzentrationen oder Vehikel und Dopamin enthalten war, so daß sich eine Endkonzentration von 300 nM Dopamin im Inkubationsansatz ergab. 8 verschiedene MIBG-Konzentrationen wurden untersucht: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und 3000 µM. Als Kontrollen wurden ein Inkubationsansatz ohne Homogenat und MIBG-Zusatz (Nullkontrolle), ein Inkubationsansatz ohne MIBG-Zusatz (Positivkontrolle) und ein Inkubationsansatz ohne MIBG-Zusatz, aber mit 1 mM des MAO-B-Hemmers Selegelin (Negativkontrolle) verwendet. Die Inkubationsansätze einer Versuchsserie wurden anschließend für 60 min im Schüttelbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml 0,8 M HClO₄ und durch Eiskühlung beendet. Das de-

naturierte Protein wurde bei 4 °C und 3000 g für 10 min abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wurde für die HPLC-Bestimmung von Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) verwendet.

2.6.3.2 Analytik

Die Bestimmung von Dopamin und DOPAC wurde nach einer Festphasenextraktion mittels HPLC mit amperometrischer Detektion durchgeführt. Dieser Arbeitsschritt wurde bereits im Kapitel 2.4.6 beschrieben. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Peakhöhe im Chromatogramm. Als Standard wurde die Nullkontrolle verwendet.

2.6.3.3 Auswertung

Zur Bestimmung der Hemmung des Enzyms MAO-B wurden die Peakhöhen für Dopamin und DOPAC in der Negativ- und der Positivkontrolle ermittelt und jeweils voneinander subtrahiert. Diese Differenz wurde als 100 % Hemmung des Enzyms definiert. Diese Hemmung entsprach somit der Hemmung der MAO-B, die durch 1 mM Selegelin erreicht wurde. Die bestimmten Peakhöhen für Dopamin und DOPAC in den Proben mit MIBG-Zusatz wurden dann jeweils in eine prozentuale Hemmung umgerechnet.

Die Umsatzrate der MAO-B für Dopamin wurde mit Hilfe der Differenz zwischen der Peakhöhe für Dopamin in der Negativ- und der Positivkontrolle, der Inkubationsdauer und der Proteinmenge im Ansatz berechnet.

Ebenso wurde die Bildungsrate für DOPAC (Metabolit von Dopamin) bestimmt. Dazu wurde die Peakhöhe von DOPAC in der Positivkontrolle von der in der Negativkontrolle subtrahiert und in eine Umsatzrate umgerechnet.

Konzentrations-Wirkungskurven für die Hemmung der MAO-B durch MIBG wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung analysiert. Dazu wurden die prozentualen Hemmungen der MIBG-Proben einer nicht-linearen Regression unterzogen (Prism 2.01, Graphpad Software, San Diego, USA), die mit der Methode der kleinsten

Abstandsquadrate arbeitete. Zur Analyse der Konzentrations-Wirkungskurven wurde folgende Form der Hill-Gleichung angewendet:

$$E = \frac{E_{max} \cdot c^{n_H}}{IC_{50}^{n_H} + c^{n_H}} \quad (2.8)$$

E_{max} : maximaler Hemmeffekt

IC_{50} : MIBG-Konzentration bei halbmaximalen Hemmeffekt

n_H : scheinbarer Hill-Koeffizient (Steigung am Wendepunkt der Kurve)

c : Konzentration von MIBG

E : Effekt (prozentuale Hemmung der MAO-B)

2.6.4 Hemmung der Monoaminoxidase-B bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Homogenat der Rattenleber

Um die kompetitive Hemmung des Enzyms MAO-B durch MIBG zu zeigen, wurde der Versuch wie im Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt, wobei parallel zwei verschiedene Substratkonzentrationen von Dopamin mit identischem Homogenat-Zusatz untersucht wurden. In der Gruppe A betrug die Endkonzentration für Dopamin 100 nM und in der Gruppe B 400 μ M. Zur kompletten Hemmung der MAO-A waren in allen Proben der Gruppe A 0,3 und denen der Gruppe B 1 μ M Clorgylin enthalten. Zur Bestimmung der maximalen Hemmung (Negativkontrolle) wurden den Proben aus der Gruppe A 1 mM Selegelin zugesetzt, denen in der Gruppe B 10 mM Selegelin. Die Durchführung entsprach ansonsten den oben beschriebenen Bedingungen.

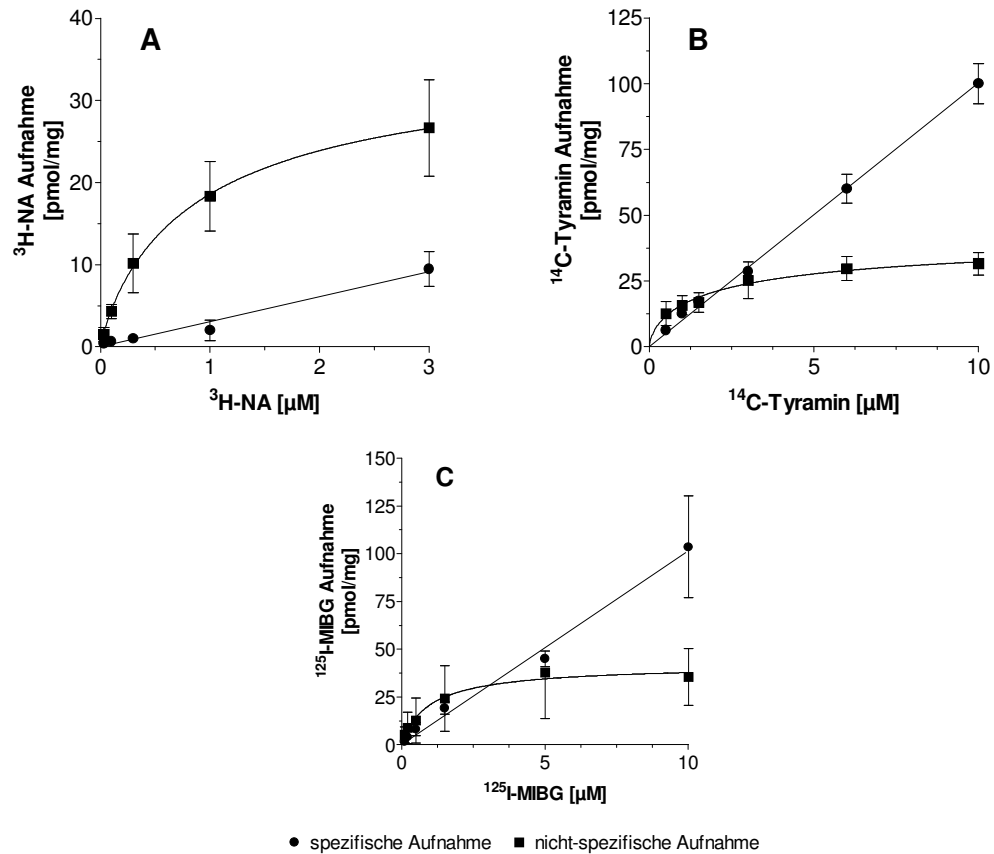
Zur Bestimmung der prozentualen Hemmung von MAO-B wurde die jeweilige Hemmung der DOPAC-Bildung in Gegenwart steigender MIBG Konzentration gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von MIBG und Tyramin als Substrate von Uptake₁ in SK-N-SH Zellen

SK-N-SH Zellen (d. h. Zellen einer Neuroblastom-Zelllinie) wurden verwendet, um die Substrate MIBG, Tyramin und Noradrenalin hinsichtlich der Sättigungskinetik ihrer Aufnahme über Uptake₁ zu differenzieren und die Frage zu klären, ob MIBG mit ähnlicher Geschwindigkeit wie Noradrenalin und Tyramin in SK-N-SH Zellen transportiert wird. Die Nisoxetin-empfindliche Aufnahme in diese Zellen spiegelt den Teil des Transports wieder, der durch Uptake₁ vermittelt wird (Abb. 3.1). Die Analyse der kinetischen Parameter für die Sättigung von Uptake₁ durch die untersuchten Substrate zeigte, daß MIBG, Tyramin und Noradrenalin ähnliche K_m und V_{max} Werte besitzen (Tab. 3.1). Folglich findet der Transport in die Zelle bei gleicher Konzentration der untersuchten Substanzen mit vergleichbaren Aufnahmeraten statt. Als einziger Unterschied wurde in den Versuchen gefunden, daß der k Wert für die nicht-sättigbare Komponente der Aufnahme (Nisoxetin-unempfindliche Aufnahme), die wahrscheinlich durch Diffusion zustande kommt, für MIBG und Tyramin höher lag als für Noradrenalin. Der k Wert entspricht der Steigung der Regressionsgeraden, die die Abhängigkeit der 1-min-Aufnahme von der Substratkonzentration in Anwesenheit von 10 μM Nisoxetin widerspiegelt, und ist ein Maß für die Lipophilie der untersuchten Substanzen.

Abb. 3.1: Spezifische und nicht-spezifische Aufnahme von Noradrenalin (NA), Tyramin und MIBG in SK-N-SH Zellen



Dargestellt ist die Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen und der nicht-spezifischen Aufnahme von ^3H -Noradrenalin (A), ^{14}C -Tyramin (B) und ^{125}I -MIBG (C) in die menschlichen Neuroblastomzellen SK-N-SH. Die Aufnahme der radioaktiv markierten Substanzen innerhalb einer Minute wurde jeweils in Abwesenheit (Gesamtaufnahme) und in Gegenwart von $10\ \mu\text{M}$ Nisoxetin (nicht-spezifische Aufnahme) bestimmt. Die spezifische Aufnahme wurde aus der Differenz zwischen Gesamtaufnahme und nicht-spezifischer Aufnahme berechnet. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus je 3 Doppelbestimmungen für die spezifische (■) und die unspezifische Aufnahme (●) der drei radioaktiv-markierten Substanzen.

Tab. 3.1: Sättigungskonstanten für die spezifische Aufnahme und Transportkonstante für die nicht-spezifische Aufnahme von ^{125}I -MIBG, ^{14}C -Tyramin und ^3H -Noradrenalin in SK-N-SH Zellen

Substanz	K_m	V_{max}	nicht spezifische Aufnahme (k-Wert)
	μM	$\text{pmol}/\text{mg Protein}$	$\text{pmol}/(\text{mg protein}\cdot\mu\text{M})$
^{125}I -MIBG	$1,56 \pm 0,80$	$43,44 \pm 10,06$	$10,19 \pm 1,14$
^{14}C -Tyramin	$1,66 \pm 0,48$	$36,64 \pm 2,92$	$9,93 \pm 0,66$
^3H -Noradrenalin	$0,99 \pm 0,20$	$35,61 \pm 3,65$	$3,16 \pm 0,65^*$

Die zelluläre Aufnahme der radioaktiv markierten Substanzen wurde innerhalb 1 min in Abwesenheit (Gesamtaufnahme) und in Gegenwart (nicht-spezifische Aufnahme) von 10 μM Nisoxetine (ein hochselektiver Uptake₁-Blocker) bestimmt und die sättigbare spezifische Aufnahme, die durch Uptake₁ vermittelt wird, wurde aus der Differenz zwischen Gesamt- und nicht-spezifischer Aufnahme berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 Doppelversuchen.

* zeigt $P < 0,05$ für einen globalen Unterschied zwischen den untersuchten Substraten (Varianzanalyse für multiple Vergleiche).

3.2 Versuche am perfundierten Kaninchenherzen

3.2.1 Vergleich von MIBG und Tyramin als Sympathomimetika

Am spontan schlagenden Kaninchenherz riefen sowohl MIBG als auch Tyramin einen Anstieg der Herzfrequenz hervor. Jedoch war der Anstieg der Herzfrequenz durch MIBG nicht so stark ausgeprägt wie der durch Tyramin (Abb. 3.2). Die Analyse der Daten mit Hilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse zur Anpassung an die Hill-Gleichung ergab für MIBG einen wesentlich geringer ausgeprägten Maximaleffekt (59 ± 14 Schläge/min; $n = 6$) als für Tyramin (156 ± 14 Schläge/min; $n = 6$; $P < 0,01$). Die positiven chronotropen Effekte von 10 μmol MIBG und Tyramin, die am Ende der Dosis-Wirkungs-Versuche in Abb. 3.2 A beobachtet wurden, unterschieden sich nicht von denen, die an Herzen bestimmt wurden, die nur 10 μmol MIBG oder Tyramin erhalten hatten (Abb. 3.2 B). In Abb. 3.2 B kann man erkennen, daß der Herzfrequenz-Anstieg, der durch MIBG oder Tyr-

amin hervorgerufen wurde, durch den Uptake₁-Blocker Desipramin (DMI; 2 µM) stark gehemmt wurde.

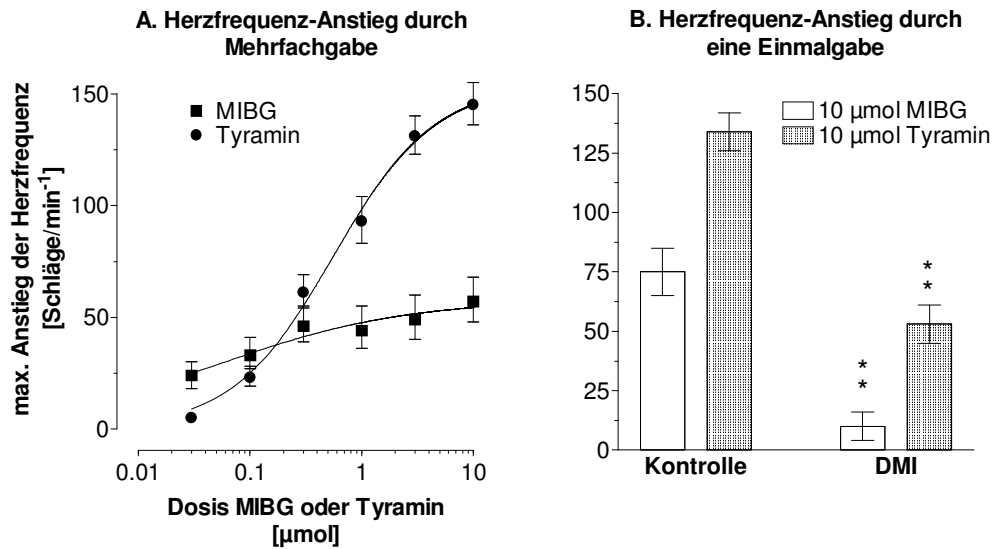
MIBG und Tyramin sorgten auch für eine dosisabhängige Freisetzung („Overflow“) von Noradrenalin (Abb. 3.3). Aber genauso wie bei der Wirkung auf die Herzfrequenz war der Anstieg für den Noradrenalin-Overflow nach Gabe von MIBG wesentlich schwächer ausgeprägt als nach Gabe von Tyramin. Der berechnete maximale Noradrenalin-Overflow, der durch MIBG hervorgerufen wurde, betrug $35 \pm 8 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n = 6$) und der durch Tyramin hervorgerufene $218 \pm 33 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n = 6$; $P < 0,01$). Dieser durch MIBG induzierte Noradrenalin-Overflow reagierte sehr empfindlich auf die Hemmung von Uptake₁ durch 2 µM Desipramin (Abb. 3.3 B).

Die gleichen Bestimmungen wie für Noradrenalin wurden auch für Dopamin durchgeführt. In diesen Versuchen ergab sich qualitativ das gleiche Bild wie für die Noradrenalin (Abb. 3.4). Das Verhältnis für Dopamin zu Noradrenalin stieg nach Applikation von steigenden Dosen an Tyramin von $0,037 \pm 0,015$ bei 0,3 µmol auf $0,134 \pm 0,011$ bei 10 µmol an ($n = 6$ für jeden Quotienten; $P < 0,01$). Die gleiche Analyse war für MIBG aufgrund des inkonsistenten und geringfügigen Anstiegs des Dopamin-Overflows nicht möglich.

MIBG und Tyramin unterschieden sich nicht im Ausmaß der registrierten sympathomimetischen Effekte, sondern auch im Zeitverlauf der beobachteten Parameter. Betrachtet man den Herzfrequenz-Anstieg nach Gabe von MIBG oder Tyramin, kann man eine dosisabhängige Zunahme der Zeit bis zum Erreichen des maximalen Herzfrequenz-Anstiegs und eine Zunahme der Wirkdauer, d.h. der Zeit, die benötigt wurde, um wieder den Ausgangswert zu erreichen, beobachten. Dieser beobachtete Zeiteffekt war für MIBG wesentlich stärker ausgeprägt als für Tyramin (Tab. 3.3 und Tab. 3.4).

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Wirkung von 10 µmol MIBG und Tyramin über 60 min verfolgt (Abb. 3.5). Es zeigt sich sehr deutlich, daß die Herzfrequenz-steigernde Wirkung von MIBG länger als 60 min anhielt. Die Wirkung von Tyramin war schon nach ca. 20 min beendet (Abb. 3.5 A). Ähnlich verhielt es sich für den Noradrenalin-Overflow, der durch MIBG und Tyramin

Abb. 3.2: Herzfrequenzanstieg nach Gabe von MIBG oder Tyramin



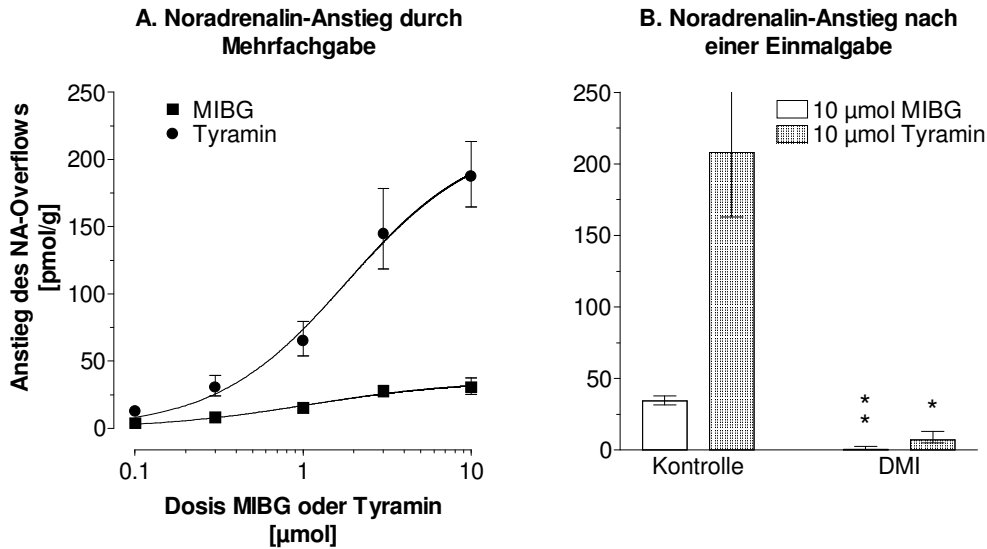
Der maximale Herzfrequenz-Anstieg vom Ausgangswert wurde in einer Serie von aufeinander folgenden Injektionen von ansteigenden Dosen von MIBG oder Tyramin (0,03 bis 10 µmol) bestimmt (A). Ebenso wurde die Herzfrequenz-Antwort nach einer einzelnen Dosis von 10 µmol MIBG oder Tyramin in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Gegenwart von 2 µM Desipramin (DMI) gemessen (B). Die Durchführung und die Auswertung der Versuche sind im Abschnitt 2.4 genau beschrieben worden. Der Ausgangswert für die Herzfrequenz betrug 164 ± 4 Schläge/min ($n = 39$). Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus je 6 Versuchen. Die Anpassung der Hill-Gleichung an die Werte ergab folgende Parameter: $E_{max}(\text{MIBG})$ 59 Schläge/min und $E_{max}(\text{Tyramin})$ 156 Schläge/min; $ED_{50}(\text{MIBG})$ 0,1 µM und $ED_{50}(\text{Tyramin})$ 0,6 µM; $n_H(\text{MIBG})$ 0,5 und $n_H(\text{Tyramin})$ 0,9. Die Anpassungskurven in der Abb. A wurden mit diesen Parametern gezeichnet.

** zeigt $P < 0,01$ für den Effekt von Desipramin.

Tab. 3.3: Zeit bis zum maximalen Herzfrequenz-Anstieg nach Gabe von verschiedenen Dosen von MIBG oder Tyramin (Mittelwerte \pm SEM; $n = 6$)

Dosis	0,03	0,1	0,3	1	3	10	µmol
MIBG	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	3,6 \pm 0,6	8,6 \pm 1,0	min
Tyramin	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	min

Abb. 3.3: Noradrenalin-Overflow induziert durch die Gabe von MIBG oder Tyramin



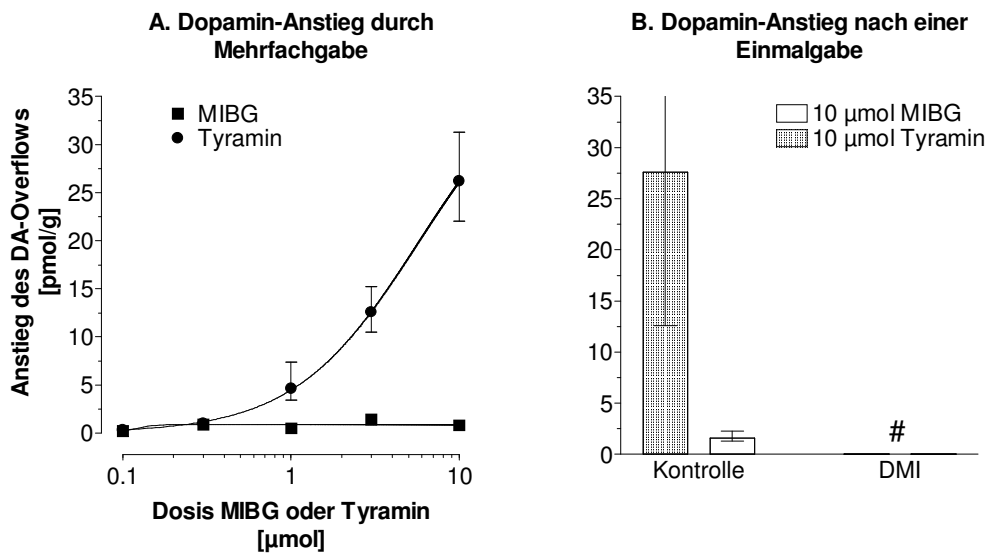
Der Gesamtanstieg des Noradrenalin (NA)-Overflows wurde als Antwort auf die aufeinanderfolgende Gabe von steigenden MIBG- oder Tyramin-Dosen beginnend von 0,1 bis 10 μmol (Abb. A) und als Antwort auf eine einzelne Dosis von 10 μmol MIBG oder Tyramin in Abwesenheit oder in Gegenwart von 2 μM Desipramin (DMI; Abb. B) bestimmt. Die Versuche entsprechen den gleichen wie in Abb. 3.2. Der Ausgangswert für den spontanen Noradrenalin-Overflow betrug $0,50 \pm 0,11 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ($n = 39$). Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus je 6 Versuchen. Die Anpassung der Hill-Gleichung an die Daten ergab folgende Parameter (vgl. Abschnitt 2.4): $E_{max}(\text{MIBG})$ $35 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ und $E_{max}(\text{Tyramin})$ $218 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$; $ED_{50}(\text{MIBG})$ $1,1 \mu\text{M}$ und $ED_{50}(\text{Tyramin})$ $1,8 \mu\text{M}$; $n_H(\text{MIBG})$ $1,0$ und $n_H(\text{Tyramin})$ $1,1$. Die Anpassungskurven in der Abb. A wurden mit diesen Parametern gezeichnet.

* zeigt $P < 0,05$ und ** zeigt $P < 0,01$ für den Effekt von DMI.

Tab. 3.4: Zeit, die nach Gabe von verschiedenen Dosen an MIBG oder Tyramin benötigt wurde, um den Ausgangswert für die Herzfrequenz wieder zu erreichen (Mittelwerte \pm SEM; $n = 6$)

Dosis	0,03	0,1	0,3	1	3	10	μmol
MIBG	$1,4 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,4$	$9,2 \pm 3,1$	$17,1 \pm 3,5$	> 35	> 45	min
Tyramin	$1,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,8$	$6,9 \pm 1,7$	$12,4 \pm 0,5$	$18,0 \pm 0,5$	min

Abb. 3.4: Dopamin-Overflow induziert durch die Gabe von MIBG oder Tyramin



Die Versuche entsprechen den gleichen wie in Abb. 3.2 und 3.3. Der Ausgangswert für den spontanen Dopamin (DA)-Overflow betrug $0,08 \pm 0,02 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($n = 39$). Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus je 6 Versuchen. Die Anpassung der Daten an die Hill-Gleichung ergab folgende Parameter (vgl. Abschnitt 2.4): $E_{max}(\text{Tyramin}) 40 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1}$; $ED_{50}(\text{Tyramin}) 5,7 \text{ }\mu\text{M}$; $n_H(\text{Tyramin}) 1,2$. Die Anpassungskurve in der Abb. A wurden mit diesen Parametern gezeichnet. Die Anpassung der Daten für die MIBG-Versuche konnte nicht durchgeführt werden.

kein detektierbarer Anstieg des Dopamin-Overflows in Gegenwart von $2 \text{ }\mu\text{M}$ Desipramin (DMI).

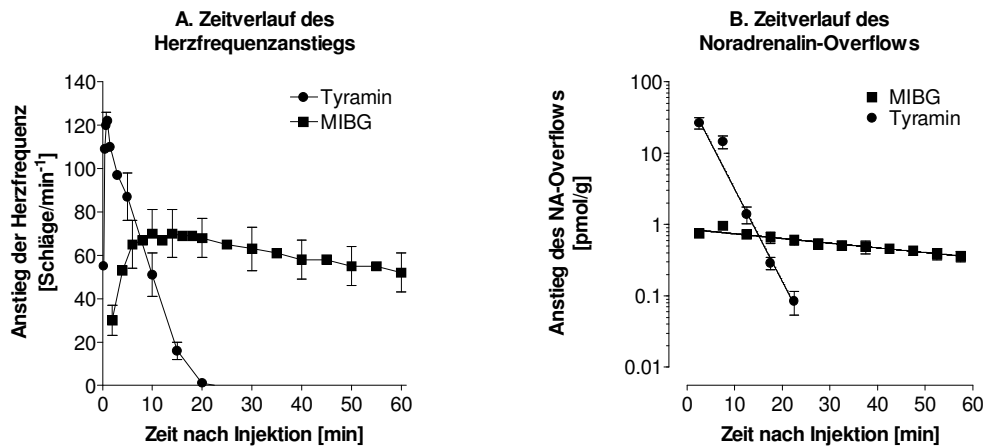
ausgelöst wurde. Für MIBG ergab sich eine Halbwertszeit von $57,8 \pm 13,4$ min und für Tyramin eine von $2,2 \pm 0,1$ min (Abb. 3.5 B). Aus diesen Ergebnissen wurde der gesamte Noradrenalin-Overflow ausgelöst durch MIBG zu 79 ± 19 pmol·g⁻¹ berechnet. Dieser Wert ergibt sich aus der Bestimmung der „Area under the curve“ (AUC; $t_{0 \rightarrow \infty}$ in Abb. 3.5 B). Der entsprechende Wert für Tyramin betrug 259 ± 44 pmol·g⁻¹. Dieser Wert für Tyramin stimmt mit den Werten aus den Abb. 3.3 A und B gut überein. Der Noradrenalin-Overflow in den Abb. 3.3 A und B ist für MIBG kleiner als der oben angegebene Noradrenalin-Overflow, der für den Zeitraum 0 bis Unendlich min berechnet wurde. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich mit der Tatsache erklären, daß MIBG bei hohen Dosen einen sehr lang anhaltenden Noradrenalin-Overflow auslöste, der bei den in Abb. 3.3 A und B gewählten Beobachtungszeiten von 45 bis 60 min nicht vollständig erfaßt wurde.

3.2.2 Kardiodepressive Effekte von MIBG

MIBG zeigte bei den Herzperfusionsversuchen eine kardiodepressive Wirkkomponente. Eine Dosis von 10 µmol reduzierte die Herzfrequenz, und noch stärker ausgeprägt, die linksventrikuläre Druckamplitude (LVPP; Abb. 3.6). Diese kardiiale Reaktion trat kurz nach der Bolusgabe von Dosen ab 0,3 µmol MIBG auf, war dosisabhängig und dauerte nur sehr kurz (Tab. 3.5). Ein Abfall der LVPP zwischen 61 und 88 % wurde nach der Injektion von 10 µmol MIBG auch an zwei Herzen beobachtet, die mit 5 Hz gereizt wurden.

Die Injektion von 100 µl destilliertem Wasser oder 0,9%iger Kochsalz-Lösung, die als Vehikel verwendet wurden, zeigten keine Änderung in Herzfrequenz und LVPP. Aber die Injektion von 100 µl einer 100 mM Natriumacetat-Lösung (entspricht der Stoffmenge an Acetat, die im 10 µmol MIBG-Bolus vorhanden war) rief einen leichten Abfall in der Herzfrequenz und der LVPP hervor (Tab. 3.6). Trotzdem ist zu erkennen, daß der kardiodepressive Effekt von 10 µmol MIBG-Acetat wesentlich stärker ausgeprägt war als der von 10 µmol Natriumacetat. Aber weder destilliertes Wasser, 0,9%ige Kochsalzlösung noch 10 mM Natriumacetat riefen nach der Injektion von 100 µl einen Anstieg des Noradrenalin- oder

Abb. 3.5: Zeitverlauf für den Anstieg der Herzfrequenz und des Noradrenalin (NA)-Overflows, der durch MIBG und Tyramin ausgelöst wurde



Der Zeitverlauf für den Herzfrequenz-Anstieg (Abb. A) und den Noradrenalin (NA)-Overflow (Abb. B) wurde nach einer Bolus-Injektion von 10 μmol MIBG oder Tyramin am isoliert, spontan schlagendem Kaninchenherz bestimmt (für die Methode vgl. Abschnitt 2.4). Der Ausgangswert für die Herzfrequenz betrug 165 ± 7 Schläge/min, und der spontane Noradrenalin-Overflow wurde mit $0,36 \pm 0,07 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($n = 16$) bestimmt. Gezeigt werden das arithmetische (Abb. A) bzw. das geometrische Mittel (Abb. B) \pm SEM von je 8 Beobachtungen. Die Regressionsgerade im Abb. B wurde nach Transformation an folgende Gleichung angepaßt: $\log y = a + bx$. Für die Parameter ergaben sich folgende Werte: $a(\text{MIBG}) -0,0793$ und $a(\text{Tyramin}) 1,864$; $b(\text{MIBG}) -0,00726$ und $b(\text{Tyramin}) -0,141$.

Dopamin-Overflows hervor.

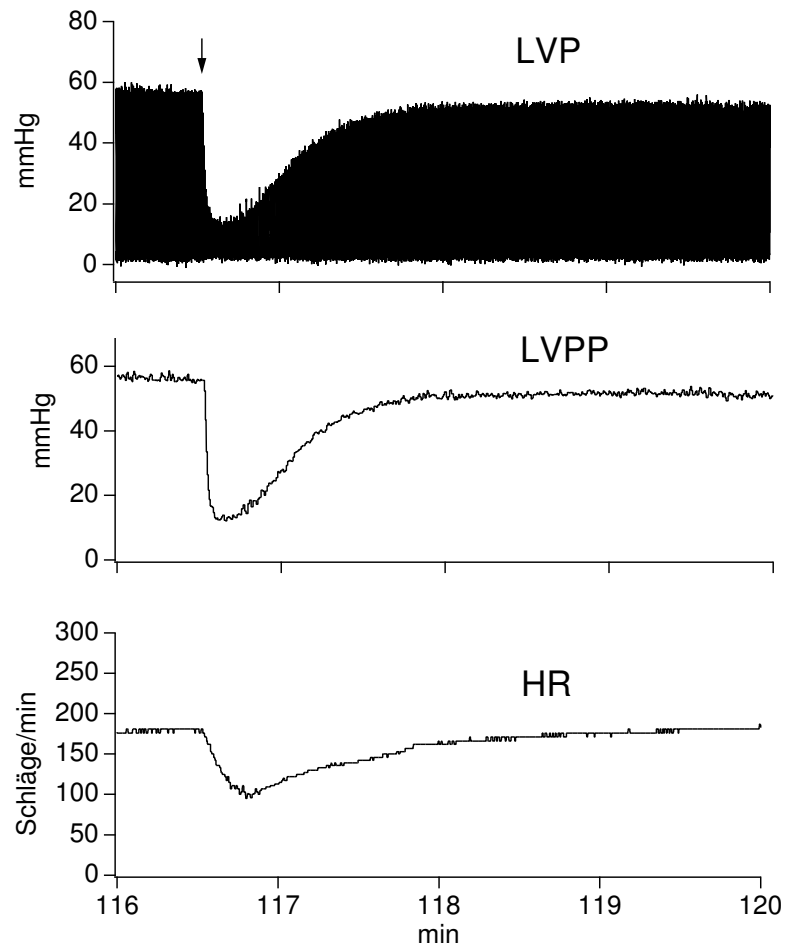
In den Herzen, die Desipramin erhalten hatten, war der Abfall der Herzfrequenz, der durch 10 μmol MIBG hervorgerufen wurde, wesentlich stärker ausgeprägt und hielt auch länger an. Auf der anderen Seite wurde der MIBG-induzierte Abfall der LVPP durch die Anwesenheit von Desipramin abgeschwächt. Desipramin per se hatte keinen Einfluß auf die Herzfrequenz, aber senkte die LVPP um ca. 40 % (Tab. 3.6).

3.2.3 Die adrenerge Neuronen-blockierende Wirkung von MIBG

Das spontan schlagende, isoliert perfundierte Kaninchenherz wurde auch verwendet, um die vermutete Wirkung von MIBG als adrenerger Neuronenblocker zu untersuchen. Die Antwort auf die Feldstimulation hinsichtlich des Noradrenalin-Overflows wurde vor (R_1) und nach einer Infusion von Vehikel oder verschiedenen Konzentrationen von MIBG in die Aortenkanüle (R_2) ermittelt. Der Noradrenalin-Overflow als Antwort auf die 1. Reizung betrug 175 ± 11 pmol/g Herzgewicht ($n = 63$). In der Vehikel-Gruppe wurde ein Verhältnis R_2/R_1 für den Noradrenalin-Overflow von $0,75 \pm 0,03$ ($n = 13$) gefunden. Dieses Verhältnis wurde ebenfalls für die Herzen bestimmt, die für 10 min mit MIBG Konzentrationen von 0,3, 1, 3, 10 oder 30 μM infundiert wurden; dabei wurde ein Abfall des Quotienten mit steigenden Konzentrationen von MIBG beobachtet (Abb. 3.7). Diesen Daten wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung angepaßt. Dabei ergaben sich folgende Parameter ($n = 43$): $E_{max} = 61,4 \pm 2,8$ %, $EC_{50} = 4,3 \pm 0,6$ μM und $n_H = -0,93 \pm 0,085$.

Bei diesen Versuchen wurde ebenfalls der spontane Noradrenalin-Overflow bestimmt, d.h. der Overflow direkt vor den Reizungen. Für die Auswertung wurde die MIBG-bedingte Änderung des spontanen Noradrenalin-Overflows bestimmt, in dem jeweils der Wert vor der zweiten Reizung vom Wert vor der ersten Reizung abgezogen wurde. Dabei wurde ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet (Abb. 3.8), der nach Anpassung der Daten an die Hill-Gleichung folgende

Abb. 3.6: Beispiel für den kardiodepressiven Effekt von MIBG



In dem gezeigten repräsentativen Beispiel für den transienten kardiodepressiven Effekt von MIBG am isoliert perfundierten, spontan schlagenden Kaninchenherz wurde zu einem definierten Zeitpunkt (Pfeil) 10 μmol MIBG als Bolus in die Aortenkanüle injiziert und während des gesamten Versuches kontinuierlich der linksventrikuläre Druck (LVP), die linksventrikuläre Druckamplitude (LVPP) und die Herzfrequenz (HR) aufgezeichnet. Die Durchführung des Versuches ist im Abschnitt 2.4 genauer beschrieben.

Tab. 3.5: Dosisabhängige kardiodepressive Effekte von MIBG im isolierten perfundierten, spontan schlagenden Kaninchenherzen

MIBG Dosis	Herzfrequenz				linksventikuläre Druckamplitude			
	Vorwert	Abfall	Zeit bis Minimum ^{a)}	Zeit bis Ausgang ^{b)}	Vorwert	Abfall	Zeit bis Minimum ^{a)}	Zeit bis Ausgang ^{b)}
µmol	Schläge/min	%	s	s	mmHg	%	s	s
0,3	162 ± 14	7 ± 2	2,7 ± 0,7	7 ± 2	76 ± 6	7 ± 2	4,7 ± 1,1	11 ± 3
1	166 ± 15	6 ± 1	3,5 ± 0,9	11 ± 4	76 ± 7	15 ± 3	5,7 ± 0,7	14 ± 1
3	172 ± 15	9 ± 2	7,7 ± 1,2	30 ± 8	73 ± 7	32 ± 4	4,9 ± 0,4	39 ± 14
10	185 ± 14**	19 ± 4	18,6 ± 3,5**	115 ± 13**	69 ± 7	64 ± 3**	5,8 ± 0,7	95 ± 28**

Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM aus 7 Beobachtungen. In die Aortenkanüle des perfundierten Kaninchenherzens wurden vier 100 µl Boli, die 0,3 bis 10 µmol MIBG enthielten, nacheinander in Intervallen zwischen 20 und 35 min injiziert. Herzfrequenz und linksventrikuläre Druckamplitude (LVPP) wurden vor (Vorwert) und nach jeder MIBG-Dosis aufgezeichnet.

** zeigt $P < 0,01$ für den globalen Unterschied und einen linearen Trend zwischen den vier Dosis-Gruppen, der einen dosisabhängigen Effekt von MIBG auf die Herzfrequenz und die LVPP nahelegt (Varianzanalyse für multiple Vergleiche).

a) Zeit bis zum Erreichen der maximalen Wirkung

b) Zeit bis zum Wiedererreichen des Vorwertes

Tab. 3.6: Einfluß von Desipramin auf die kardiodepressiven Effekte von MIBG im isolierten perfundierten, spontan schlagenden Kaninchenherzen

MIBG Dosis	DMI	n	Herzfrequenz				linksventrikuläre Druckamplitude			
			Vorwert	Abfall	Zeit bis Minimum ^{a)}	Zeit bis Ausgang ^{b)}	Vorwert	Abfall	Zeit bis Minimum ^{a)}	Zeit bis Ausgang ^{b)}
µmol	µM		Schläge/min	%	s	s	mmHg	%	s	s
0	0	6	157 ± 7	6 ± 2	9,2 ± 1,9	33 ± 8	75 ± 5	14 ± 3	3,7 ± 0,2	13 ± 1
10	0	9	173 ± 11	11 ± 1*	12,3 ± 2,8	58 ± 15	68 ± 4	80 ± 2**	5,4 ± 0,4	152 ± 43*
10	2	5	168 ± 12	21 ± 1##	21,6 ± 2,4#	242 ± 33##	41 ± 7##	60 ± 2##	10,0 ± 1,9##	115 ± 38

Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM aus n Beobachtungen. In die Aortenkanüle des perfundierten Kaninchenherzens wurde entweder 10 µmol Natriumacetat (MIBG-Dosis 0, Vehikel) oder 10 µmol MIBG in Gegenwart oder in Abwesenheit von Desipramin (DMI) injiziert. Herzfrequenz und linksventrikuläre Druckamplitude wurden vor (Vorwert) und nach der Bolus-Injektion von Vehikel oder MIBG aufgezeichnet. In einigen Versuchen wurde Desipramin der Perfusionslösung mit einer Endkonzentration von 2 µM zugesetzt.

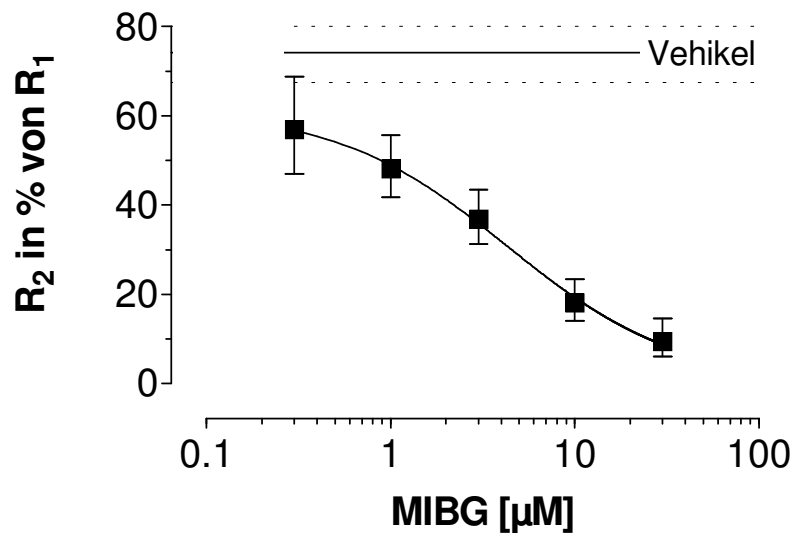
* zeigt $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ für den Vergleich zwischen Vehikel und MIBG ohne DMI-Zusatz im Perfusionsmedium.

zeigt $P < 0,05$ und ## $P < 0,01$ für den Vergleich zwischen MIBG ohne und MIBG mit DMI-Zusatz im Perfusionsmedium (ANOVA gefolgt vom Bonferroni-Test für multiple Vergleiche).

a) Zeit bis zum Erreichen der maximalen Wirkung

b) Zeit bis zum Wiedererreichen des Vorwertes

Abb. 3.7: Elektrisch-induzierter Noradrenalin-Overflow



Zur Bestimmung des elektrisch-induzierten Noradrenalin-Overflows wurde das vom Herzen abtropfende venöse Perfusat für 3 min aufgefangen und das Herz anschließend für 1 min gereizt (R_1). Beginnend mit der Reizung wurde ebenfalls für 3 min das abtropfende Perfusat gesammelt. Danach wurde das Herz durch Infusion in die Aortenkanüle für 10 min mit 0,3, 1, 3, 10 oder 30 μM MIBG oder Vehikel versorgt. Es schloß sich eine Auswaschperiode von 15 min Dauer an, an deren Ende das venöse Perfusat wieder für 3 min aufgefangen wurde. Mit Beginn der 2. Reizung (Dauer 1 min) wurde das Perfusat erneut für 3 min aufgefangen (R_2). Das reizfreie Intervall zwischen R_1 und R_2 betrug 27 min. Die in den Proben R_1 und R_2 enthaltene Konzentration an Noradrenalin abzüglich der Basalwerte vor der Reizung wurde mittels HPLC bestimmt (vgl. Abb. 2.8). Gezeigt werden Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereich aus 7 Versuchen. Die Daten wurden an die Hill-Gleichung angepaßt und es ergaben sich folgende Parameter: $E_{max} = 61,4 \pm 2,8 \%$, $EC_{50} = 4,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und $n_H = -0,93 \pm 0,085$.

Parameter lieferte ($n = 43$): $E_{max} = 4,9 \pm 1,5 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $EC_{50} = 5,4 \pm 5,1 \text{ }\mu\text{M}$ und $n_H = 0,80 \pm 0,30$.

Um die Zeitabhängigkeit der Freisetzung-hemmenden Wirkung von MIBG zu zeigen, wurden die Kaninchenherzen zwischen R_1 und R_2 jeweils 5, 10 oder 20 min lang mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ MIBG perfundiert. Als Kontrolle dienten eine 5, 10 oder 20-minütige Perfusion mit Vehikel oder eine 20-minütige Perfusion mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ Tyramin (Abb. 3.9). Dabei trat nur bei den Perfusionen mit MIBG eine zeitabhängige Abnahme des Quotienten R_2/R_1 auf ($P < 0,01$ für einen zeitabhängigen Effekt).

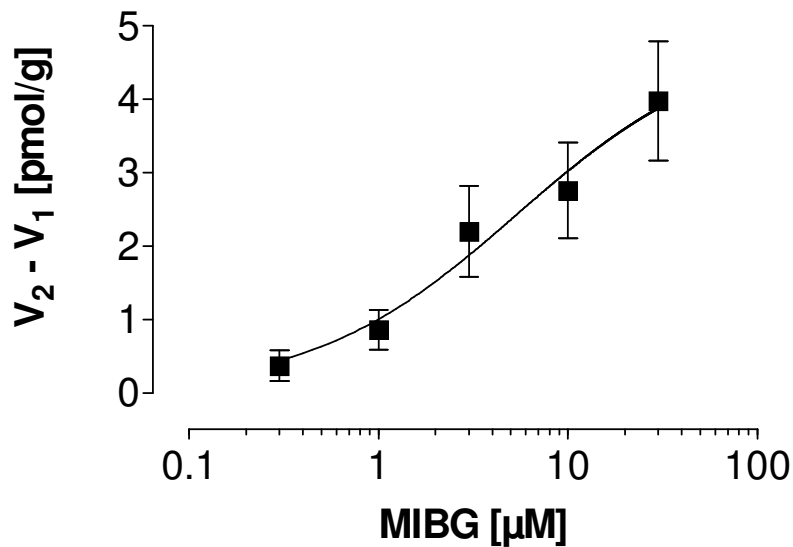
Die Versuchsserie mit den verschiedenen Konzentrationen von MIBG (Abb. 3.7) wurde ebenfalls verwendet, um die Konzentrationsabhängigkeit der indirekt sympathomimetischen Wirkung von MIBG anhand der Änderung der Herzfrequenz des spontan schlagenden Herzens zu bestimmen. Dabei wurde die Zunahme der Herzfrequenz, die jeweils am Ende der 10-min Infusion mit den verschiedenen MIBG Konzentrationen gemessen wurde, berücksichtigt. Die an die Hill-Gleichung angepaßten Daten sind in der Abb. 3.10 dargestellt. Folgende Parameter beschreiben den Graphen ($n = 43$): $E_{max} = 58,2 \pm 7,7 \text{ Schläge/min}$, $EC_{50} = 2,5 \pm 1,0 \text{ }\mu\text{M}$ und $n_H = -1,2 \pm 0,43$.

3.2.4 Einfluß von MIBG auf die Aktivität der neuronalen MAO-A

Am spontan schlagenden Kaninchenherz wurde die Abgabe von DOPEG (dem wichtigsten primären Noradrenalin-Metaboliten präsynaptischen Ursprungs) ins Perfusat als Maß für die Aktivität der neuronalen MAO-A verwendet. In der Kontrollgruppe kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums von 45 min zu keiner Änderung der Herzfrequenz und des DOPEG/Noradrenalin-Quotienten. Im Gegensatz dazu fiel in der Kontrollgruppe sowohl der spontane Noradrenalin-Overflow auf 39% als auch der spontane DOPEG-Overflow auf 53% des Ausgangswertes ab (Abb. 3.11).

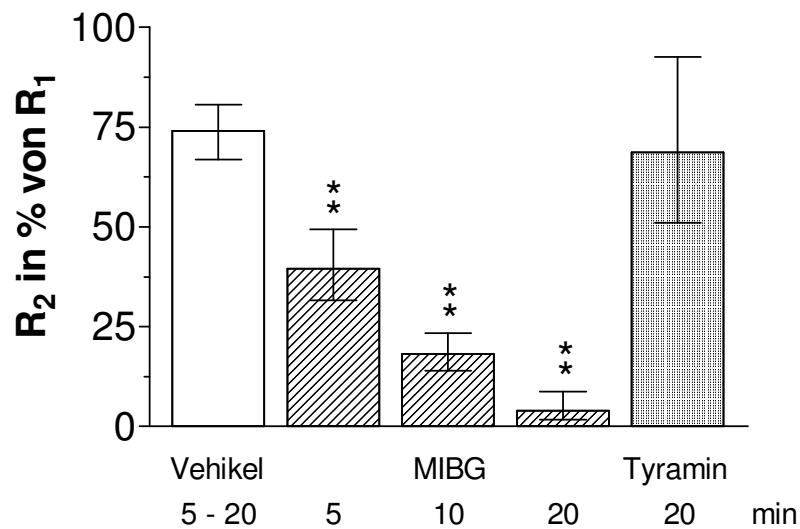
MIBG erhöhte erst ab einer Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{M}$ die Herzfrequenz um 14% über die Kontrolle an. Die Noradrenalin-Freisetzung wurde bei einer Konzentra-

Abb. 3.8: spontaner Noradrenalin-Overflow



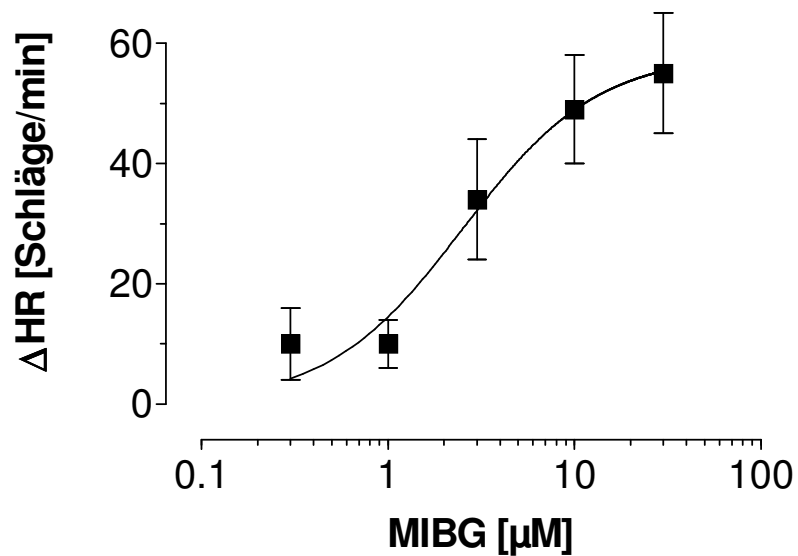
Zur Bestimmung des spontanen Noradrenalin-Overflows wurde das vom Herzen abtropfende venöse Perfusat für 3 min aufgefangen (V_1) und das Herz anschließend für 1 min gereizt. Beginnend mit der Reizung wurde ebenfalls für 3 min das abtropfende Perfusat gesammelt. Danach wurde das Herz durch Infusion in die Aortenkanüle für 10 min mit 0,3, 1, 3, 10 und 30 μM MIBG oder Vehikel versorgt. Es schloß sich eine Auswaschperiode von 15 min an, an deren Ende wieder das venöse Perfusat für 3 min aufgefangen wurde (V_2). Mit Beginn der 2. Reizung (Dauer 1 min) wurde das Perfusat erneut für 3 min aufgefangen. Die in den Proben V_1 und V_2 enthaltenen Konzentrationen an Noradrenalin wurden mittels HPLC bestimmt (vgl. Abb. 2.8). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 7 Versuchen. Die Daten wurden an die Hill-Gleichung angepaßt und es ergaben sich folgende Parameter: $E_{max} = 4,9 \pm 1,5 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1}$, $EC_{50} = 5,4 \text{ } \mu\text{M}$ und $n_H = 0,80$.

Abb. 3.9: Zeitabhängigkeit der MIBG Wirkung auf den elektrisch-induzierten Noradrenalin-Overflows.



Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der MIBG Wirkung auf den elektrisch-induzierten Noradrenalin-Overflow wurde das vom Herzen abtropfende venöse Perfusat für 3 min aufgefangen und das Herz anschließend für 1 min gereizt. Beginnend mit der Reizung wurde das abtropfende Perfusat ebenfalls für 3 min gesammelt (R_1). Danach wurde das Herz durch Infusion in die Aortenkanüle für 5, 10 oder 20 min mit 10 μ M MIBG, Vehikel oder für 20 min mit 10 μ M Tyramin versorgt. Es schloß sich eine Auswaschperiode an, an deren Ende wieder das venöse Perfusat für 3 min aufgefangen wurde. Mit Beginn der 2. Reizung von 1 min Dauer (28 min nach der 1. Reizung) wurde das Perfusat erneut für 3 min aufgefangen (R_2). Die in den Proben R_1 und R_2 enthaltene Konzentration an Noradrenalin (NA) abzüglich der Basalwerte vor der Reizung wurde mittels HPLC bestimmt (vgl. Abb. 2.8). Gezeigt werden Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereich aus 6 Versuchen (MIBG und Tyramin) bzw. 13 Versuchen (Vehikel). Der Noradrenalin-Overflow bei der 1. Reizung (R_1) betrug 175 ± 11 pmol/g ($n = 63$). ** zeigt $P < 0,01$ für einen Unterschied zum Vehikel (Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni Test für multiple Vergleiche).

Abb. 3.10: Zunahme der Herzfrequenz



Zur Bestimmung des MIBG-induzierten Herzfrequenzanstiegs im perfundierten Kaninchenherzen wurde die Herzfrequenz (HR) vor und am Ende der 10-min Infusion mit 0,3, 1, 3, 10 und 30 μM MIBG gemessen. Es handelt sich um die gleichen Versuche die in Abb. 3.7 besprochen sind. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM aus 7 Versuchen. Die Hill-Gleichung wurde an die Daten angepaßt, und es ergaben sich folgende Parameter: $E_{max} = 58,2 \pm 7,7$ Schläge/min, $EC_{50} = 2,5 \pm 1,0$ μM und $n_H = 1,2 \pm 0,43$. Die mittlere Herzfrequenz vor der 1. Reizung betrug 156 ± 2 Schläge/min.

tion von 0,01 μM MIBG nicht verändert, aber bei einer Konzentration von 0,1 μM MIBG um 530 % und einer Konzentration von 1 μM MIBG um 2611 % über die Werte der Kontrollen erhöht (Abb. 3.11 A und B).

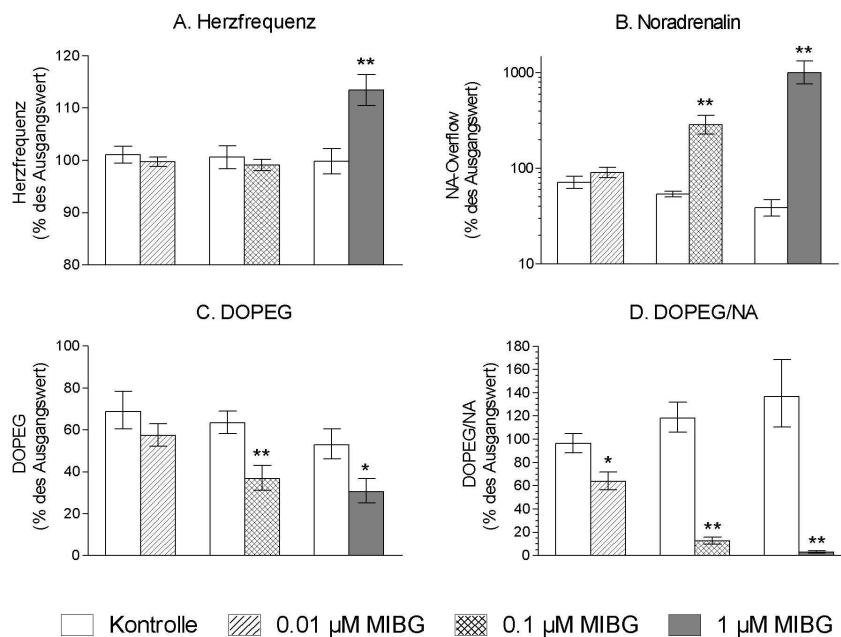
Im Gegensatz dazu senkten 0,01, 0,1 und 1 μM MIBG die DOPEG-Abgabe ins Perfusat um jeweils 17, 42 und 43 % und den Quotienten DOPEG/Noradrenalin um jeweils 36, 87 und 97 % unter die Kontroll-Werte. Als Maß für die Hemmung der MAO-A wurde der Quotient DOPEG/Noradrenalin verwendet, da MIBG Noradrenalin aus den Speichervesikeln mobilisiert und es somit zu einem starken Anstieg des Substrates Noradrenalin kam. Aus dem konzentrationsabhängigen Abfall des DOPEG/Noradrenalin Quotienten, der durch MIBG ausgelöst wurde, konnte eine IC_{50} für die Hemmung der MAO-A von 17 nM (95% Vertrauensgrenzen; 9 und 35 nM; $n = 10$) berechnet werden. Diese Berechnung basiert auf der linearen Interpolation der Konzentrationswirkungsbeziehung für die beiden MIBG Konzentrationen 0,01 und 0,1 μM (nach log-Transformation dieser Konzentrationen).

3.3 Versuche am narkotisierten Kaninchen

3.3.1 Vergleich der Wirkung von 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG und Tyramin

Zur Bestimmung der sympathomimetischen Wirkungen von MIBG und Tyramin *in vivo*, wurden narkotisierten Kaninchen für 1 min 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG, Tyramin oder Vehikel (Natriumacetat) infundiert und die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) kontinuierlich aufgezeichnet. Die Mittelwertskurven aus 5 Versuchen sind in Abb. 3.12 dargestellt. Die Infusion von Vehikel hatte keinen Einfluß auf die aufgezeichneten Parameter, wohingegen MIBG und Tyramin ein Abfall der Herzfrequenz und ein Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks verursachten. Quantitativ unterschied sich die Wirkung von MIBG von der von Tyramin durch einen geringer ausgeprägten, dafür aber länger anhaltenden Einfluß auf die Herzfrequenz und auf den mittleren arteriellen Blutdruck.

Abb. 3.11: Effekte von MIBG auf die Herzfrequenz und den spontanen Overflow von Noradrenalin (NA) und DOPEG im spontan schlagenden, isoliert-perfundierten Kaninchenherzen



Um festzustellen, in welchem Ausmaß MIBG die MAO-A-Aktivität im Axoplasma noradrenerger Neurone hemmt, wurden die perfundierten Herzen von 0 bis 45 min entweder mit 0,9%iger NaCl-Lösung (Kontrolle) oder mit steigenden Konzentrationen von 0,01 (0-15 min), 0,1 (15-30 min) und 1 µM (30-45 min) MIBG aufeinanderfolgend in Intervallen von je 15 min perfundiert. Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich gemessen. Zu Beginn wurde vor Gabe von MIBG bzw. 0,9%ige NaCl-Lösung das Perfusat für 1 min aufgefangen und die Ausgangswerte für den „Overflow“ von Noradrenalin und Dihydroxyphenylglykol (DOPEG), dem wichtigsten präsynaptischen Metaboliten von Noradrenalin, bestimmt. Dies wurde zum Ende jedes 15 min Versuchsintervalls wiederholt. Der Ausgangswert für die Herzfrequenz betrug 151 ± 5 Schläge/min und die Ausgangswerte für den Noradrenalin-Overflow, DOPEG-Overflow und den Quotienten DOPEG/NA betragen $0,39 \pm 0,12$ pmol·g⁻¹·min⁻¹, $6,83 \pm 0,44$ pmol·g⁻¹·min⁻¹ und 42 ± 7 ($n = 20$). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM aus 10 Versuchen.

Der maximale Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks nach Tyramin betrug 71 mmHg, und die blutdrucksteigernde Wirkung von Tyramin hielt ca. 4 min an. Der Blutdruck fiel nach der Infusion auf ein tieferes Niveau im Vergleich zum Ausgangswert ab und blieb dann bis zum Ende des Versuches stabil. Für MIBG ergab sich im Gegensatz dazu nur ein maximaler Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks von 23 mmHg. Die Wirkung von MIBG auf den Blutdruck hielt jedoch länger als 30 min an (Abb. 3.12).

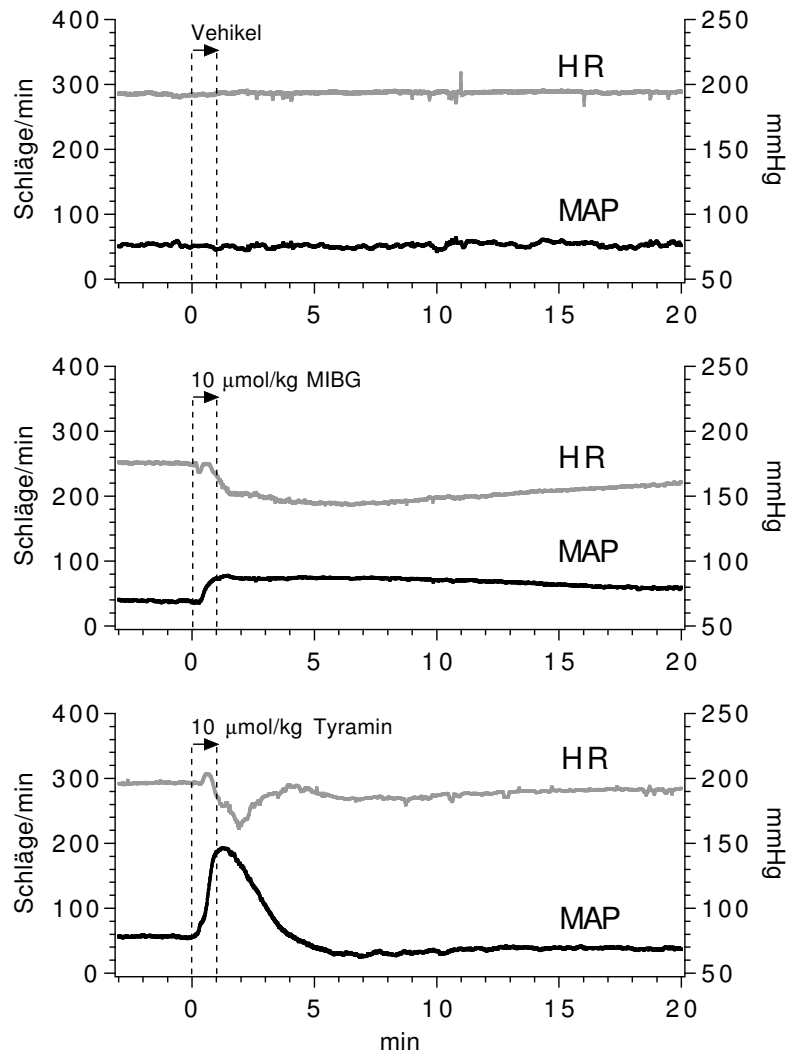
Die Herzfrequenz wurde durch die Infusion von MIBG deutlich abgesenkt (ca. 50 Schläge/min). Diese Wirkung hielt länger als die beobachteten 30 min an. Bei Tyramin konnte nur ein kurzdauernder Herzfrequenz-Abfall beobachtet werden (Abb. 3.12), ansonsten hatte aber Tyramin keinen Einfluß auf die Herzfrequenz.

In weiteren Versuchen ($n = 7$) wurde den Tieren zu festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen und die Plasmaspiegel von Noradrenalin und Dopamin bestimmt. Die Daten wurden als prozentuale Veränderung vom jeweiligen Ausgangswert dargestellt, wobei sich letzterer für MIBG und Tyramin nicht signifikant unterschied (Abb. 3.13). Der Ausgangswert für die Noradrenalin-Plasmaspiegel betrug bei den MIBG-Versuchen $2,20 \pm 0,56$ nM und bei den Tyramin-Versuchen $1,89 \pm 0,33$ nM. Für die Dopamin-Plasmaspiegel ergab sich für die MIBG-Versuche ein Ausgangswert von $1,52 \pm 0,53$ nM und für die Tyramin-Versuche einer von $1,27 \pm 0,54$ nM. Nur bei den Versuchen mit Tyramin kam es zu einem starken Anstieg der Noradrenalin- (444 ± 65 %) und der Dopamin-Plasmaspiegel (269 ± 64 %), der aber nur kurze Zeit anhielt. Bei den Versuchen mit MIBG konnte kein signifikanter Anstieg der Plasmaspiegel von Noradrenalin und Dopamin beobachtet werden.

3.3.2 Vergleich der Wirkungen von 10 und 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG und 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin

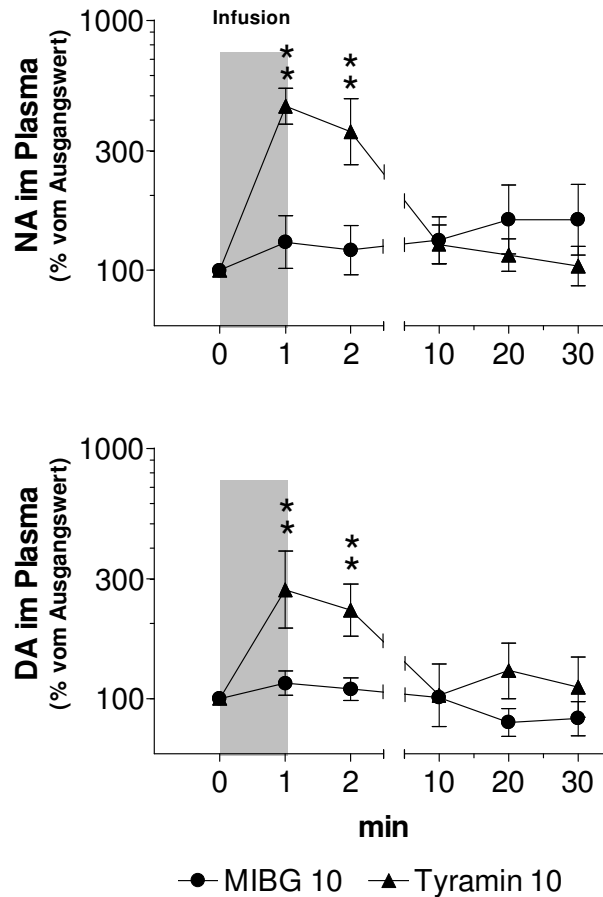
Im narkotisierten Kaninchen riefen sowohl MIBG (Infusion von 50 $\mu\text{mol/kg}$ in 10 min) als auch Tyramin (Infusion von 50 $\mu\text{mol/kg}$ in 10 min) im Vergleich zu Vehikel (Infusion von 50 $\mu\text{mol/kg}$ Natriumacetat in 10 min) eine Steige-

Abb. 3.12: Einfluß einer 1-min Infusion von 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG, Tyramin oder Vehikel auf den Kreislauf narkotisierter Kaninchen



Narkotisierte Kaninchen wurden vom Zeitpunkt 0 bis 1 min mit Vehikel, 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder 10 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin infundiert und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HR) wurden während und nach der Infusion kontinuierlich aufgezeichnet. Gezeigt sind Mittelwertskurven aus jeweils 5 Versuchen.

Abb. 3.13: Noradrenalin- und Dopamin-Plasmaspiegel nach Gabe von 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder Tyramin



Narkotisierte Kaninchen wurden vom Zeitpunkt 0 bis 1 min mit 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder 10 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin infundiert (gekennzeichnet durch den grau unterlegten Bereich) und die Plasmaspiegel für Noradrenalin (NA) und Dopamin (DA) wurden vor und nach der Infusion zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Gezeigt werden die prozentualen Veränderungen bezogen auf die jeweiligen Ausgangswerte mit 95% Vertrauensgrenzen aus je 7 Versuchen. Der Ausgangswert für die Noradrenalin-Plasmaspiegel betrug bei den MIBG-Versuchen $2,20 \pm 0,56$ nM und bei den Tyramin-Versuchen $1,89 \pm 0,33$ nM. Für die Dopamin-Plasmaspiegel ergab sich für die MIBG-Versuche ein Ausgangswert von $1,52 \pm 0,53$ nM und bei den Versuchen mit Tyramin ein Ausgangswert von $1,27 \pm 0,54$ nM.

** zeigt $P < 0,01$ für einen Unterschied zum Ausgangswert

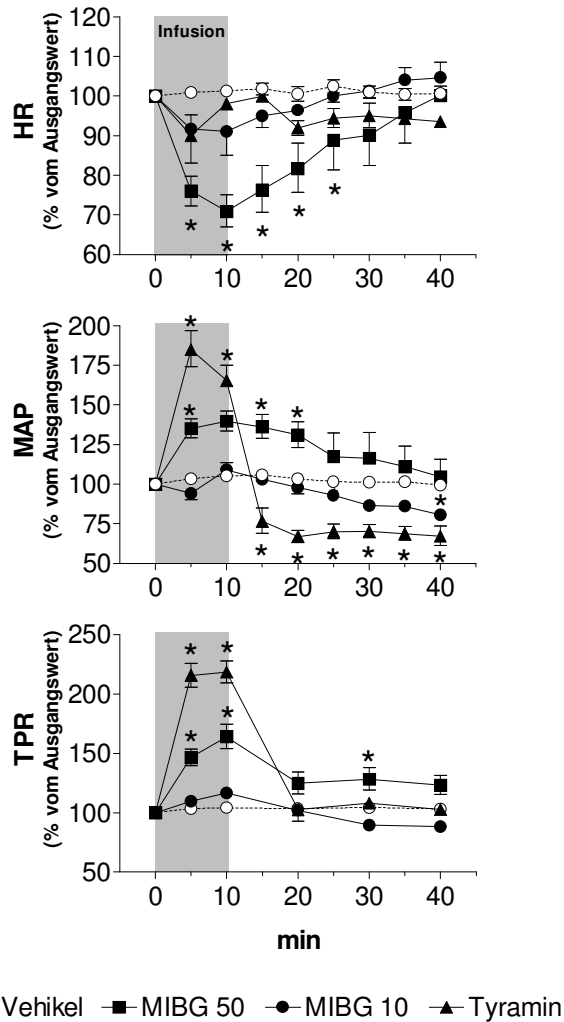
zung des Blutdrucks hervor. Die Daten wurden als prozentuale Veränderung vom jeweiligen Ausgangswert dargestellt (Abb. 3.14), wobei sich der Ausgangswert der vier beobachteten Gruppen nicht unterschied. Für den mittleren arteriellen Blutdruck betrug der Ausgangswert 72 ± 1 mmHg ($n = 32$), für die Herzfrequenz 284 ± 5 Schläge/min ($n = 32$) und für den totalen peripheren Widerstand $0,208 \pm 0,006$ mmHg·min/ml ($n = 31$). Der Maximalanstieg des Blutdrucks war nach $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG (23 ± 6 mmHg; $n = 7$) wesentlich schwächer ausgeprägt als nach $50 \mu\text{mol/kg}$ Tyramin (71 ± 8 mmHg; $n = 6$). Im Gegensatz dazu hielt die Wirkung nach $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG (mindestens 20 min) länger an als diejenige nach Tyramin (ca. 4 min). Nach Infusionsende fiel der mittlere arterielle Blutdruck bei der Tyramin-Gruppe bis zum Versuchsende unter die Werte der Vehikel-Gruppe ab. Die Verabreichung von $10 \mu\text{mol}$ MIBG verursachte im Vergleich zu den Vehikel-Versuchen keine Veränderung des Blutdrucks (Abb. 3.14).

Die Herzfrequenz wurde durch $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG deutlich gegenüber Vehikel abgesenkt (50 Schläge/min). Diese negativ chronotrope Wirkung hielt mehr als 25 min an (Abb. 3.14). Die anderen Gruppen zeigten kaum einen Einfluß auf die Herzfrequenz.

Der totale periphere Widerstand, berechnet aus dem Verhältnis mittlerer arterieller Blutdruck zum Herzminutenvolumen, wurde durch $50 \mu\text{mol}$ MIBG (bei 10 min 166 ± 10 %; $n = 6$) und $50 \mu\text{M}$ Tyramin (bei 10 min 220 ± 10 %; $n = 6$) deutlich erhöht. Nach Beendigung der Infusion wurde nur noch bei $50 \mu\text{mol}$ MIBG ein Anstieg für den totalen peripheren Widerstand beobachtet. Für $10 \mu\text{mol}$ MIBG zeigte sich wiederum kein Unterschied zu den Vehikel-Versuchen.

In den Versuchen von Abb. 3.14 wurde ebenfalls zu definierten Zeitpunkten Blut abgenommen und die Plasmaspiegel für Noradrenalin und DOPEG bestimmt. Im Falle des Plasma-Noradrenalins kam es durch die 10-min Infusion von $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG bzw. Tyramin im Vergleich zu Vehikel zu einem Anstieg der Plasmaspiegel, der nach Tyramin zum Zeitpunkt 20 min beendet war, nach MIBG jedoch länger als 40 min anhielt (Abb. 3.15). Bei der Infusion von $10 \mu\text{mol/kg}$ MIBG konnte kein Anstieg des Noradrenalin-Plasmaspiegels gegenüber der Vehikel-Gruppe beobachtet werden. Die Daten in Abb. 3.15 zeigen jeweils die prozentualen Veränderungen vom Ausgangswert, der bei 32 Versuchen für den Plasmaspiegel für

Abb. 3.14: Kardiovaskuläre Effekte von MIBG und Tyramin.



Narkotisierte Kaninchen wurden vom Zeitpunkt 0 bis 10 min mit Vehikel, 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG, 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin infundiert (gekennzeichnet durch den grau unterlegten Bereich) und die Kreislaufparameter Herzfrequenz (HR), mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und totaler peripherer Widerstand (TPR) wurden während und nach der Infusion aufgezeichnet. Gezeigt sind die prozentualen Veränderungen bezogen auf die Ausgangswerte \pm SEM ($n = 6 - 11$ pro Gruppe). Die Ausgangswerte betragen für HR 281 ± 5 Schläge \cdot min $^{-1}$ ($n = 32$), MAP 72 ± 1 mmHg ($n = 32$) und TPR $0,208 \pm 0,006$ mmHg \cdot min/ml ($n = 31$).

* zeigt $P < 0,05$ für einen Unterschied zum Vehikel (Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Test auf multiple Vergleiche)

Noradrenalin $2,81 \pm 0,20$ nM betrug.

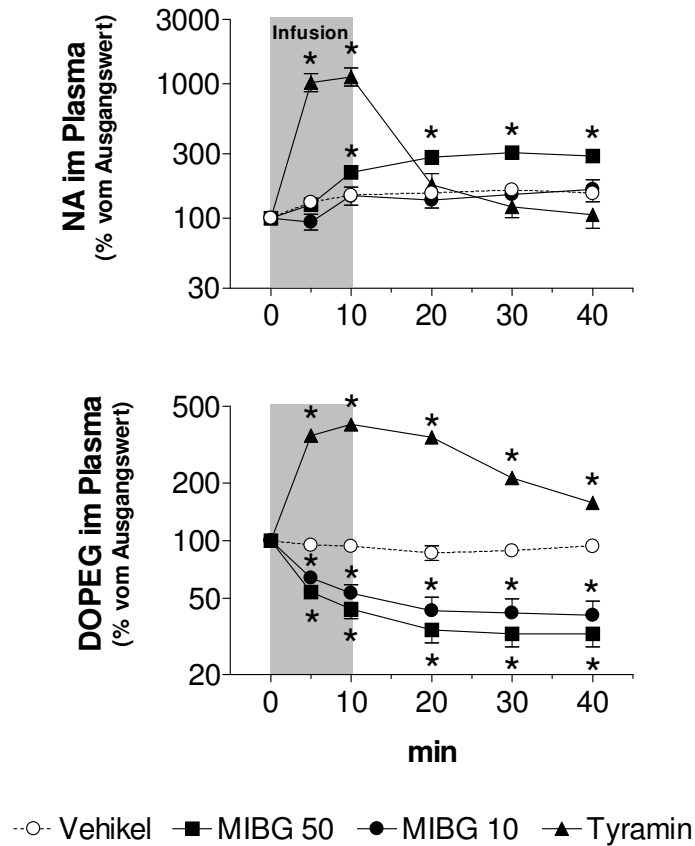
Für den desaminierten Noradrenalin-Metaboliten DOPEG zeigte sich ein anderes Bild. Die Daten wurden wiederum jeweils als prozentuale Veränderungen vom Ausgangswert dargestellt (Abb. 3.15). Dieser betrug $5,10 \pm 0,19$ nM ($n = 32$). Durch die 10-min Infusion von $50 \mu\text{mol/kg}$ Tyramin kam es während des gesamten Beobachtungszeitraums zu einem signifikanten Anstieg der DOPEG-Plasmaspiegel im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Der maximale Anstieg wurde am Infusionsende (Zeitpunkt 10 min) beobachtet (406 ± 23 %; $n = 6$). Bei Infusion von MIBG dagegen wurde ein Abfall der DOPEG-Plasmaspiegel beobachtet, der für die Infusion von $50 \mu\text{mol/kg}$ stärker ausgeprägt war als für die Infusion von $10 \mu\text{mol/kg}$ MIBG. Der DOPEG-Plasmaspiegel sank während des Beobachtungszeitraums nach $10 \mu\text{mol/kg}$ MIBG bis auf 46 ± 9 % und für die $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG bis auf 35 ± 8 % des Ausgangswertes ab (Abb. 3.15).

3.3.3 Wirkung von Methylnatropin auf die kardiovaskulären Effekte von $50 \mu\text{mol/10 min}$ MIBG oder Tyramin

Diese Versuche sollten dazu dienen zu eruieren, in welchem Ausmaß der Abfall der Herzfrequenz nach Gabe von MIBG und die fehlende Veränderung der Herzfrequenz nach Tyramin (Abb. 3.14) durch die Aktivierung des Barorezeptor-Reflexes bedingt waren. Die Frage war auch, ob die Abnahme der Herzfrequenz nach MIBG durch die in vitro beobachtete kardiodepressive Wirkung von MIBG zustande kam (Abschnitt 3.2.2). Dazu wurden jeweils zwei Tiere mit $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG bzw. Tyramin infundiert und deren Kreislaufparameter zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt. Zur Unterbrechung des Barorezeptor-Reflexes erhielten die Tiere nach einem Bolus von 1 mg/kg während des gesamten Versuches $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Methylnatropin über eine Infusion.

In Abb. 3.16 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs dargestellt. Für den mittleren arteriellen Blutdruck in der MIBG-Gruppe ergab sich im Vergleich zu den Tieren ohne Methylnatropin-Behandlung (46 ± 6 %; $n = 7$) ein stärker ausgeprägter Maximal-Anstieg (72 %; $n = 2$). In der Tyramin-Gruppe kam es

Abb. 3.15: Noradrenalin- und DOPEG-Plasmaspiegel während und nach Gabe von MIBG oder Tyramin.



Narkotisierte Kaninchen wurden vom Zeitpunkt 0 bis 10 min mit Vehikel, 10 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG, 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder 50 $\mu\text{mol/kg}$ Tyramin infundiert (gekennzeichnet durch den grau unterlegten Bereich) und die Plasmaspiegel für Noradrenalin (NA) und DOPEG wurden während und nach der Infusion bestimmt. Gezeigt sind geometrische Mittelwerte \pm SEM ($n = 6 - 11$ pro Gruppe) der prozentualen Veränderungen vom Ausgangswert für Noradrenalin ($2,81 \pm 0,20$ nM; $n = 32$) und DOPEG ($5,10 \pm 0,19$ nM; $n = 32$).

* zeigt $P < 0,05$ für einen Unterschied zum Vehikel (Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Test auf multiple Vergleiche)

zu einem maximalen Blutdruckanstieg um 118 % ($n = 2$). Dieser Anstieg war ähnlich stark ausgeprägt wie in den Versuchen ohne Methyldopamin (102 ± 12 %; $n = 6$).

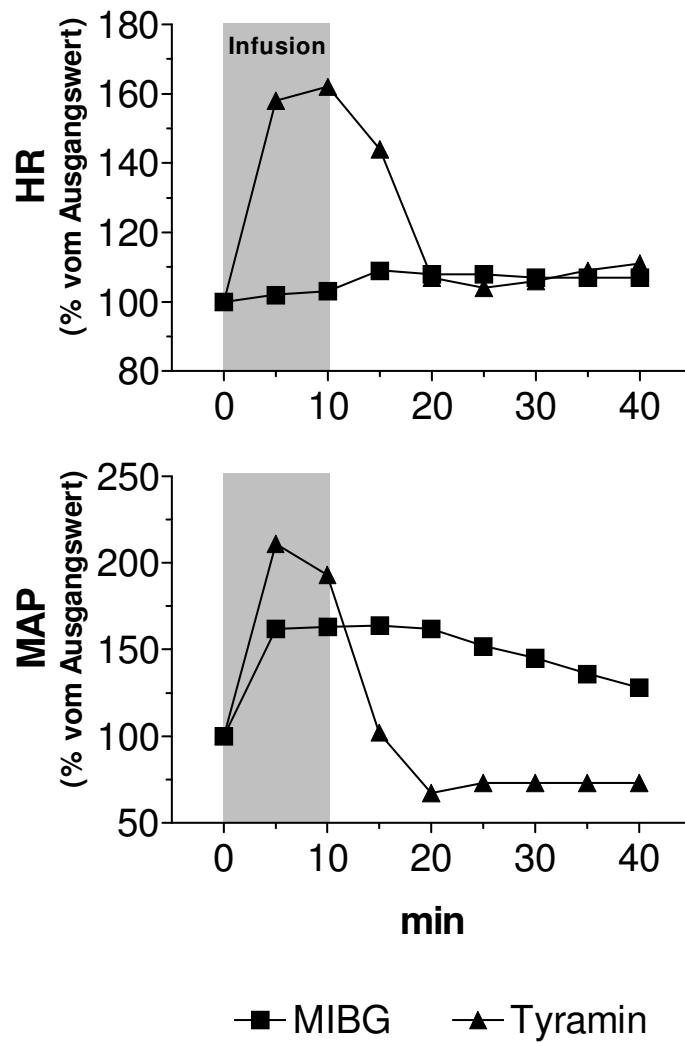
Betrachtet man aber das Ergebnis für die Herzfrequenz (Abb. 3.16), ergab sich ein anderes Bild. Sowohl durch MIBG als auch durch Tyramin kam es bei den jeweils zwei Versuchen zu einem Anstieg der Herzfrequenz um im Mittel 10 % (MIBG) bzw. 40 % (Tyramin). Im Vergleich dazu kam es in den Versuchen ohne Methyldopamin zu einem Abfall der Herzfrequenz, und zwar nach MIBG um maximal 32 ± 4 % ($n = 7$) und für Tyramin um maximal 28 ± 6 % ($n = 6$). Ein statistischer Vergleich wurde wegen der geringen Anzahl der Versuche in der Methyldopamin-Gruppe nicht durchgeführt.

3.4 Versuche in Homogenaten von Rattenorganen

3.4.1 Hemmung von Monoaminoxidase-A

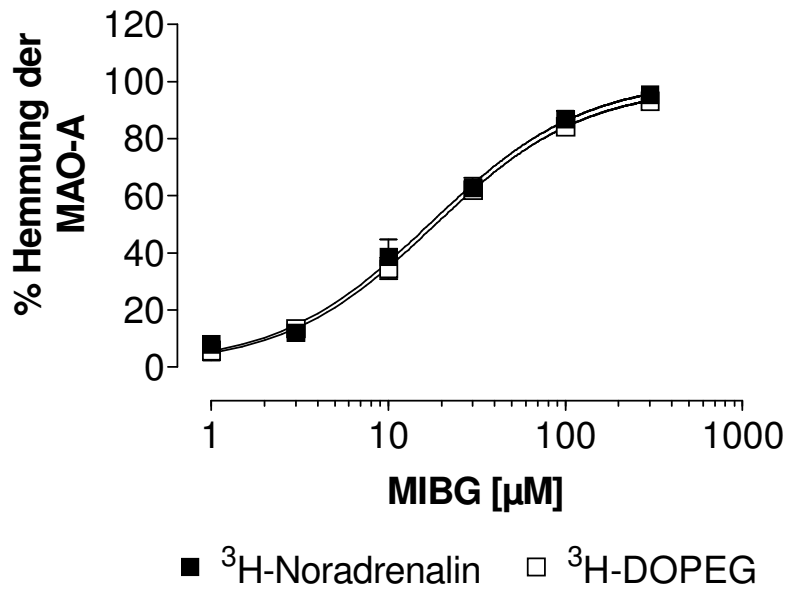
Rattenherz-Homogenat wurde verwendet, um die Substanz MIBG hinsichtlich der Hemmung des Enzyms MAO-A zu untersuchen. In den Versuchen wurde die absolute Enzymaktivität über den Abbau (bzw. das Verschwinden) von ^3H -Noradrenalin (Endkonzentration 150 nM) im Inkubationsansatz und über die Bildung des Metaboliten ^3H -DOPEG bestimmt. Die Inkubationen wurden in Gegenwart von 1 μM Selegelin durchgeführt, um einen MAO-A-spezifischen Abbau von ^3H -Noradrenalin zu gewährleisten. Für die Umsatzrate ergab sich ein Wert von 3456 ± 336 $\text{pmol} \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für den Abbau von ^3H -Noradrenalin und 2243 ± 222 $\text{pmol} \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für die Bildung des Metaboliten ^3H -DOPEG (jeweils $n = 6$). Durch Zusatz von steigenden Konzentrationen von MIBG kam es zu einem Anstieg von ^3H -Noradrenalin und zu einer Abnahme der Bildung von ^3H -DOPEG. Als Maß für eine 100 %ige Hemmung des Enzyms wurde der Effekt von 50 μM Clorgylin (ein selektiver MAO-A Hemmer) verwendet. Diese Daten wurden jeweils in eine prozentuale Hemmung des Enzyms MAO-A umgerechnet und mit Hilfe der Hill-Gleichung angepaßt (Abb. 3.17). Folgende Parameter, die

Abb. 3.16: Kardiovaskulären Effekte von 50 $\mu\text{mol/kg}$ MIBG oder Tyramin in mit Methylatropin behandelten Tieren



Mit $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ Methylatropin behandelte und narkotisierte Kaninchen wurden vom Zeitpunkt 0 bis 10 min mit $50 \mu\text{mol/kg}$ MIBG oder $50 \mu\text{mol/kg}$ Tyramin infundiert (gekennzeichnet durch den grau unterlegten Bereich) und die Kreislaufparameter Herzfrequenz (HR) und mittlerer arterielle Blutdruck (MAP) wurden während und nach der Infusion aufgezeichnet. Gezeigt sind die prozentualen Veränderungen bezogen auf den Ausgangswert für die Herzfrequenz ($232 \text{ Schläge}\cdot\text{min}^{-1}$) und den mittleren arteriellen Blutdruck (69 mmHg) von einem repräsentativen Versuch.

Abb. 3.17: Hemmung der MAO-A durch MIBG



Im Homogenat von Rattenherzen wurde die MAO-A Aktivität mit ^3H -Noradrenalin als Substrat (150 nM) und in Gegenwart von 1 μM Selegilin (ein selektiver MAO-B Hemmer) bestimmt. Als Maß für die Enzymaktivität diente das Verschwinden von ^3H -Noradrenalin aus dem Inkubationsansatz und die Bildung des desaminierten Metaboliten ^3H -DOPEG. Die Blockade des Verschwindens von ^3H -Noradrenalins und der Bildung von ^3H -DOPEG, die durch 50 μM Clorgylin (ein selektiver MAO-A Hemmer) erreichbar war, wurde als 100 % Enzymaktivität definiert. Steigende Konzentrationen von MIBG führten zu einer zunehmenden Hemmung der Enzymaktivität. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Für die Wirkstärke von MIBG ergab sich ein K_i -Wert von 17 (^3H -Noradrenalinabbau) und 18 (^3H -DOPEH-Bildung) μM .

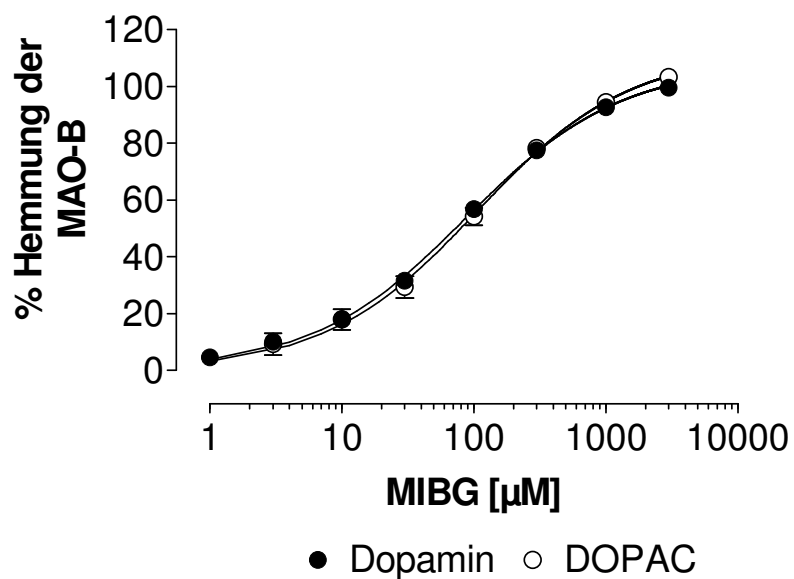
über die Hemmung des ^3H -Noradrenalin-Abbaus bestimmt wurden, beschreiben den Graph der Konzentration-Wirkung-Beziehung ($n = 6$): E_{max} $101 \pm 2,2$ %, n_H $1,00 \pm 0,054$, IC_{50} $17 \pm 1,3$ μM . Für die Auswertung über die Hemmung der ^3H -DOPEG-Bildung wurden folgende Parameter erhalten ($n = 6$): E_{max} $99 \pm 1,4$ %, n_H $1,02 \pm 0,035$, IC_{50} $18 \pm 0,8$ μM . Die Parameter der beiden Auswertungen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.4.2 Hemmung von Monoaminoxidase-B

Um festzustellen, ob MIBG auch die MAO-B hemmt, wurde ein ähnliches Versuchsschema wie für die Bestimmung der MAO-A verwendet. Als Enzymquelle wurde diesmal Homogenat aus Rattenleber verwendet, dem als Substrat Dopamin in einer Endkonzentration von 300 nM zugesetzt wurde. Der Abbau (bzw. das Verschwinden) von Dopamin und die Bildung des desaminierten Metaboliten DOPAC wurde benutzt, um die Enzymaktivität zu bestimmen. Die Inkubationen wurden in Gegenwart von 1 μM Clorgylin durchgeführt, um einen MAO-B-spezifischen Abbau von Dopamin zu gewährleisten. Für die Umsatzrate ergab sich ein Wert von $916 \pm 24 \text{ pmol} \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für den Abbau von Dopamin und $319 \pm 14 \text{ pmol} \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für die Bildung von DOPAC (jeweils $n = 6$). Durch Zusatz von steigenden Konzentrationen von MIBG kam es zu einem Anstieg von Dopamin und zu einem Abfall von DOPAC im Inkubationsmedium, woraus jeweils die entsprechenden prozentualen Hemmungen berechnet wurden (Abb. 3.18). Als Maß für eine 100 %ige Hemmung des Enzyms wurde die Wirkung von 1 mM Selegilin verwendet. Die Daten wurden mit der Hill-Gleichung angepaßt. Für die Hemmung des Dopamin-Abbaus wurden folgende Parameter erhalten ($n = 6$): E_{max} $108 \pm 0,9 \%$, n_H $0,75 \pm 0,013$, IC_{50} $87 \pm 3,1 \mu\text{M}$. Für die Auswertung über die Hemmung der DOPAC-Bildung ergaben sich folgende Parameter ($n = 6$): E_{max} $112 \pm 1,9 \%$, n_H $0,76 \pm 0,024$, IC_{50} $106 \pm 7,1 \mu\text{M}$.

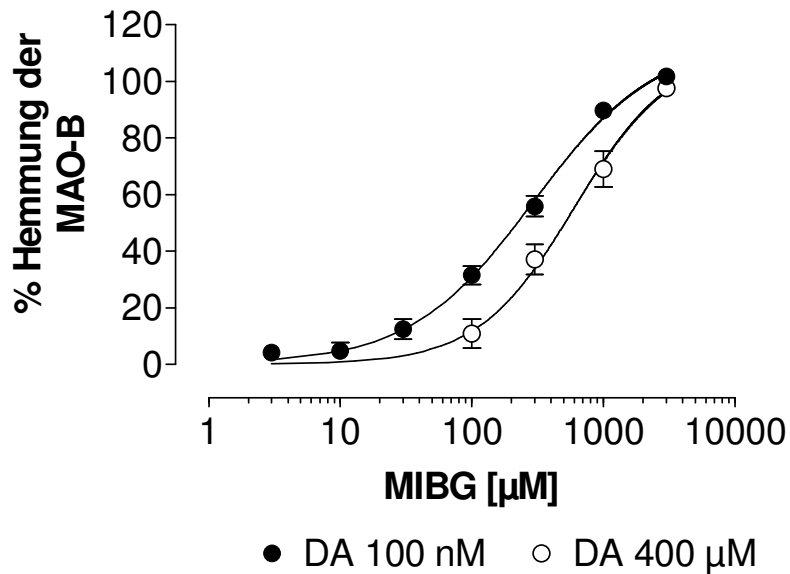
Der gleiche Versuchsplan mit Leberhomogenaten wurde nochmals verwendet, um den Einfluß der Substratkonzentration auf den IC_{50} -Wert für MIBG zu untersuchen. Zwei verschiedene Dopamin-Konzentrationen (100 nM und 400 μM) wurden untersucht. Im Ansatz wurde dann jeweils die Enzymaktivität bei steigenden MIBG-Konzentrationen über die Hemmung der DOPAC-Bildung bestimmt. Diese Daten wurden wiederum mit Hilfe der Hill-Gleichung ausgewertet (Abb. 3.19). Als 100 % Enzymaktivität wurde das Ausmaß der Hemmung der DOPAC-Bildung, das durch 1 mM Selegilin (100 nM Dopamin) bzw. 10 mM Selegilin (400 μM Dopamin) erreicht wurde, definiert. Für die Ausgangskonzentration von 100 nM Dopamin wurden folgende Parameter ermittelt ($n = 6$): E_{max} $115 \pm 3,3 \%$, n_H $0,98 \pm 0,095$, IC_{50} $301 \pm 36,1 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu kam es bei der höheren Ausgangskonzentration von 400 μM Dopamin zu einer nahezu parallelen, sta-

Abb. 3.18: Hemmung der MAO-B durch MIBG



Im Homogenat von Rattenherzen wurde die MAO-B Aktivität mit Dopamin als Substrat (300 nM) und in Gegenwart von 1 µM Clorgylin (ein selektiver MAO-A Hemmer) bestimmt. Als Maß für die Enzymaktivität diente das Verschwinden von Dopamin aus dem Inkubationsansatz und die Bildung des desaminierten Metaboliten DOPAC. Die Blockade des Verschwindens von Dopamin und der Bildung von DOPAC, die durch 1 mM Selegilin (ein selektiver MAO-B Hemmer) erreichbar war, wurde als 100% Enzymaktivität definiert. Steigende Konzentrationen von MIBG führten zu einer zunehmenden Hemmung der Enzymaktivität. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Für die Wirkstärke von MIBG ergab sich aus den Mittelwertskurven ein K_i -Wert von 87 (Dopaminabbau) und 106 (DOPAC-Bildung) µM.

Abb. 3.19: Kompetitive Hemmung der MAO-B durch MIBG



Im Homogenat von Rattenherzen wurde die MAO-B Aktivität mit zwei Konzentrationen von Dopamin (DA) als Substrat (100 nM und 400 µM) und in Gegenwart von 0,3 bzw. 1 µM Clorgylin (ein selektiver MAO-A Hemmer) bestimmt. Als Maß für die Enzymaktivität diente die Bildung des desaminierten Metaboliten DOPAC. Die Blockade der Bildung von DOPAC, die durch 1 bzw. 10 mM Selegelin (ein selektiver MAO-B Hemmer) erreichbar war, wurde als 100% Enzymaktivität definiert. Steigende Konzentrationen von MIBG führen zu einer zunehmenden Hemmung der Enzymaktivität. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Für die Wirkstärke von MIBG ergab sich aus den Mittelwertskurven ein K_i -Wert von 301 µM für die Konzentration 100 nM Dopamin und 812 µM für die Konzentration 400 µM Dopamin.

tistisch signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für MIBG um den Faktor 2,3 (95% Vertrauensbereich: 1,3-4,0; Abb. 3.19). Dabei wurde die Hemmkurve bei den Versuchen mit einer Substratkonzentration von 400 µM Dopamin durch folgende Parameter beschrieben: E_{max} $119 \pm 7,3$ %, n_H $1,25 \pm 0,117$ und IC_{50} $812 \pm 182,5$ µM ($n = 6$).

4 Diskussion

4.1 Sympathomimetische Effekte von MIBG und Tyramin

Im ersten Teil der Versuchsreihe wurden die sympathomimetischen Effekte von MIBG am isoliert perfundierten Kaninchenherz untersucht. Bei der Planung der Experimente gingen wir von der Voraussetzung aus, daß MIBG seine sympathomimetische Wirkung hauptsächlich indirekt hervorruft. Die Tatsachen, daß weder in der Literatur eine Wirkung auf α - und β -Rezeptoren gefunden wurde noch der Strukturvergleich mit bekannten Substanzen, die auf α - und β -Rezeptoren wirken, eine direkte Wirkung vermuten läßt, waren die Grundlage dafür, daß MIBG mit dem Prototyp eines indirekt-wirkenden Sympathomimetikums, Tyramin, verglichen wurde. Die Ergebnisse zeigen, daß MIBG Wirkungen vergleichbar mit Tyramin hervorrief: der dosisabhängige Anstieg der Herzfrequenz ging Hand in Hand mit einem dosisabhängigen Anstieg des Noradrenalin-Overflows, wobei beide Effekte sehr empfindlich auf die Hemmung von Uptake₁ durch den selektiven Blocker Desipramin reagierten.

Trotz dieser Ähnlichkeit unterschied sich MIBG von Tyramin hinsichtlich zweier Punkte. Erstens war die Wirkdauer von MIBG ab einer Dosis von 1 μ mol wesentlich länger als die von Tyramin. Dies läßt sich leicht durch die Tatsache erklären, daß MIBG im Gegensatz zu Tyramin nicht durch die Monoaminoxidase (MAO) abgebaut wird und folglich länger im noradrenergen Neuron verweilt. Zweitens war die Effektivität von MIBG bezüglich der Noradrenalin-freisetzenden Wirkung

wesentlich schwächer ausgeprägt als die von Tyramin, wobei der maximale Effekt von Tyramin circa dreimal höher war als derjenige von MIBG. Dies war verwunderlich, da MIBG nicht durch die MAO abgebaut wird und beide Substanzen eine vergleichbare Wirkstärke¹ (im Englischen „potency“) aufwiesen. Die relativ geringe Effektivität von MIBG als indirektes Sympathomimetikum könnte durch Tachyphylaxie² erklärt werden, wenn dieses Phänomen für die Wirkung von MIBG stärker ausgeprägt wäre als für die Wirkung von Tyramin. Das Phänomen der Tachyphylaxie ist bei indirekten Sympathomimetika besonders bei hohen Dosen zu beobachten, da Noradrenalin nicht so schnell nachsynthetisiert werden kann, wie es benötigt wird, und somit immer weniger Noradrenalin freigesetzt wird. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte aber keine Tachyphylaxie beobachtet werden, da sich der Maximaleffekt von MIBG oder Tyramin, der bei der Einmalgabe von 10 μmol beobachtet wurde, nicht von dem unterschied, der bei der höchsten Dosis von 10 μmol bei aufeinanderfolgender Gabe einer Dosisreihe zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung auftrat (vgl. Abb. 3.3).

Die Ursache, warum MIBG eine wesentlich geringere Wirksamkeit zeigte als Tyramin, könnte auch im komplexen Wirkungsmechanismus indirekter Sympathomimetika liegen. Alle diese Substanzen haben keinen direkten Einfluß auf α - oder β -Rezeptoren, sind aber gute Substrate für Uptake₁ und hemmen den vesikulären Monoamin-Transporter. Nach der Aufnahme ins Axoplasma über einen Kotransport von Natrium-Ionen hemmen sie die vesikuläre Wiederaufnahme von Noradrenalin, das durch Heraussdiffundieren aus den Speichervesikeln ins Axoplasma gelangt. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Noradrenalin-Konzentration im Axoplasma. Dieser Effekt wird noch dadurch gesteigert, daß Tyramin und MIBG das abbauende Enzym im Axoplasma, die Monoaminoxidase, hemmen. Noradrenalin ist zu hydrophil um selbständig durch die Zellmembran zu penetrieren. So kommt das Noradrenalin durch Umkehr der üblichen Transportrichtung von

¹Die Wirkstärke einer Substanz ist die Dosis (z. B. ED₅₀), die zur Erreichung einer bestimmten Wirkung erforderlich ist (nach [MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING 1996, S. 3]).

²Tachyphylaxie ist eine sehr schnell eintretende Toleranzentwicklung, d. h. daß nach wiederholter Zufuhr eines Arzneistoffes die Wirkung nachläßt und die Dosis erhöht werden muß, um die gleiche Wirkung zu erreichen (nach [MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING 1996, S. 74]).

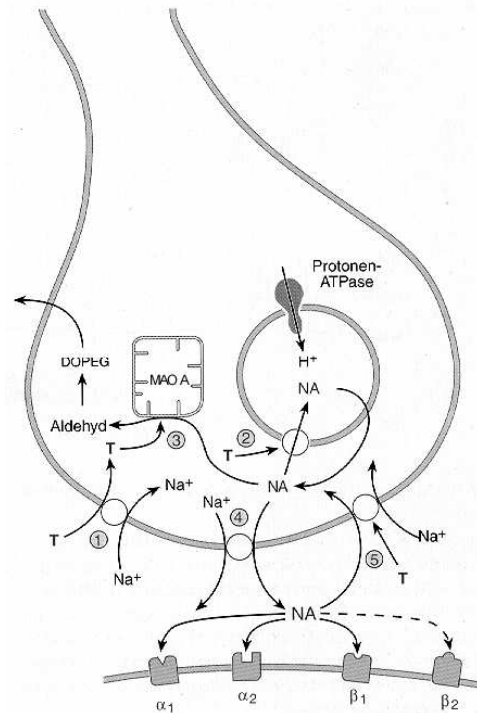
Uptake₁ in den synaptischen Spalt und somit an seinen Wirkort, die α - und β -Rezeptoren. Die nun mögliche Rückaufnahme von Noradrenalin ins Nervenende über Uptake₁ wird zusätzlich durch die Anwesenheit des indirekten Sympathomimethikums gehemmt (vgl. Abb. 4.1). Dieser Wirkungsmechanismus erklärt auch gut das oben beschriebene Phänomen der Tachyphylaxie. Die Wirksamkeit indirekter Sympathomimetika hängt also folglich von der Rate ab, mit der diese Stoffe über Uptake₁ ins Neuron aufgenommen werden und von der Wirkstärke, mit der sie den vesikulären Monoamin-Transporter hemmen [LANGELOH und TRENDELENBURG 1987, BÖNISCH und TRENDELENBURG 1988].

Dies bedeutet, daß indirekte Sympathomimetika nach ihrer neuronalen Aufnahme vesikulär gespeichertes Noradrenalin mobilisieren, die axoplasmatische Noradrenalin-Konzentration erhöhen und Noradrenalin aus dem Axoplasma freisetzen. Die durch Umkehr von Uptake₁ zustande kommende Noradrenalin-Freisetzung erfolgt also nicht durch Exocytose, sondern ist einzig und allein Transporter-vermittelt. Dieses Phänomen der durch Amine ausgelösten Noradrenalin-Freisetzung wird auch unter dem Begriff „facilitated exchange diffusion“ zusammengefaßt [BÖNISCH und TRENDELENBURG 1988].

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurde MIBG und Tyramin als Substrate für Uptake₁ in SK-N-SH Zellen verglichen. Von den SK-N-SH Zellen ist bekannt, daß sie den Uptake₁-Transporter exprimieren [RICHARDS und SADEE 1986, BRYAN-LLUDKA und BÖNISCH 1997]. Die Ergebnisse bei den Zell-Versuchen zeigen, daß die Sättigung von Uptake₁ durch MIBG oder Tyramin durch gleiche K_m - und V_{max} -Werte gekennzeichnet ist und somit bei jeder beliebigen Substratkonzentration für beide Substanzen gleiche Aufnahmeraten zu erwarten sind. Die Tatsache, daß MIBG wesentlich schlechter Noradrenalin freisetzt als Tyramin, kann deshalb nicht mit einer schlechteren Aufnahme von MIBG ins Axoplasma der noradrenergen Neurone erklärt werden.

Betrachtet man nun den vesikulären Monoamin-Transporter, so wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Burger untersucht [GRAEFE et al. 1999], wie sich MIBG und Tyramin hinsichtlich der Hemmung der Aufnahme von Noradrenalin in die Speichervesikel unterscheiden, die aus chromaffinen Granula des Nebennierenmarks vom Rind gewonnen wurden. Dazu wurde als Substrat eine Gemisch aus

Abb. 4.1: Wirkmechanismus indirekt wirkender Sympathomimetika am Beispiel von Tyramin.



Die fünf eingekreisten Zahlen beziffern die Wirkkomponenten von Tyramin (modifiziert nach [STARKE und PALM 1996, S. 173]).

1. Der Grundvorgang ist der Cotransport von Tyramin (T) und Natrium-Ionen aus dem Extrazellulärraum ins Axoplasma noradrenerger Neurone mit Hilfe des membrangebundenen Uptake_1 .
2. Im Neuron hemmt Tyramin kompetitiv die Aufnahme von axoplasmatischem Noradrenalin (NA) in die Speichervesikel über den vesikulären Monoamin-Transporter.
3. Ebenso hemmt Tyramin den Abbau von Noradrenalin durch die mitochondriale Monoamin-Oxidase Typ A (MAO-A) zu Dihydroxyphenylglykol (DOPEG).
4. Durch Umkehr von Uptake_1 werden axoplasmatisches Noradrenalin und Na^+ -Ionen in den synaptischen Spalt transportiert und Noradrenalin kann auf die verschiedenen Typen von α - und β -Rezeptoren wirken.
5. Tyramin hemmt kompetitiv die neuronale Rückaufnahme von freigesetztem Noradrenalin.

Noradrenalin und Adrenalin (70/30) bei einer Konzentration zwischen 12 und 110 μM verwendet und die initiale Aufnahme des Transporters in Gegenwart und in Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von MIBG gemessen. Dabei zeigte sich, daß MIBG die vesikuläre Aufnahme von Catecholaminen konzentrationsabhängig und kompetitiv hemmt. Der K_i -Wert für diesen Hemmeffekt war 20 μM . Der entsprechende K_i -Wert für Tyramin wurde von der gleichen Arbeitsgruppe schon in früheren Versuchen bestimmt und lag bei 2,5 μM [GRAEFE et al. 1999]. Somit ist Tyramin um den Faktor acht stärker wirksam bezogen auf die Hemmung des vesikulären Monoamin-Transporters. Diese Beobachtungen können nun leicht erklären, warum MIBG wesentlich schwächer Noradrenalin freisetzt als Tyramin. Die Fähigkeit von MIBG, Noradrenalin aus den Speichervesikeln zu mobilisieren, ist bedeutend schwächer ausgeprägt als die von Tyramin.

Sympathomimetische Effekte, wie z. B. Herzfrequenz- oder Blutdruckanstieg, konnten während der routinemäßigen Anwendung von MIBG in der Klinik nicht regelmäßig beobachtet werden. Die Plasmakonzentrationen nach i.v. Verabreichung einer therapeutischen Dosis von ^{131}I -MIBG (etwa 25 bis 35 μmol MIBG) wurde mit $< 0,1 \mu\text{M}$ bestimmt. Diese Konzentration liegt unter der Konzentration, die sympathomimetische Effekte hervorruft [WAFELMAN et al. 1994a, SMETS et al. 1989]. Sogar MIBG Dosen zwischen 255 und 290 μmol (i.v. Infusion innerhalb 3 h), die eine Plasmakonzentration von ca. 1 μM ergaben, zeigten keinen eindeutigen sympathomimetischen Effekt [WAFELMAN et al. 1994b]. Diese Literaturangaben stehen im Einklang mit unseren Versuchen, bei denen sich am Kaninchenherzen eine Schwellenkonzentration von 1 μM MIBG für das Auftreten eines positiv chronotropen Effektes gezeigt hat (vgl. Abb. 3.11 und 3.10). Aber natürlich können die Plasmakonzentrationen, die in den klinischen Untersuchungen ermittelt worden sind, nicht einfach mit der MIBG Konzentration im Medium, welches für die Herzperfusionsversuche verwendet wurde, verglichen werden.

Weibliche Nacktmäuse starben sofort nach der i.v. Injektion von 10 μmol MIBG [FARAHATI et al. 1997]. Diese Beobachtung könnte durch eine indirekt-sympathomimetische Wirkung zustande gekommen sein. Ebenso könnte die Ursache für den Tod der Mäuse in einer direkten kardiodepressiven Wirkung liegen, wie sie in den Herzperfusionsversuchen beobachtet wurde (vgl. Abb. 3.6). Diese

Beobachtung paßt gut zu der Tatsache, daß MIBG die mitochondriale Atmung hemmt [LOESBERG et al. 1990b, VANDENBERG et al. 1997]. Der kardiodepressive Effekt manifestierte sich in einem transienten Abfall der Herzfrequenz und in einem transienten Abfall der linksventrikulären Druckamplitude. Der Wert für die linksventrikuläre Druckamplitude ist nur bei konstantgehaltener Herzfrequenz ein Maß für den inotropen Zustand des linken Ventrikels. Da ein deutlicher Abfall der Herzfrequenz aber nicht nur am spontan schlagenden, sondern auch am elektrisch gereizten Herzens beobachtet wurde, kann man davon ausgehen, daß MIBG sowohl die Schrittmacherautomatie als auch die myokardiale Kontraktilität reduziert. Der transiente kardiodepressive Effekt von MIBG wurde offensichtlich auch durch die Applikationsform direkt als Bolus-Injektion in die Aorten-Kanüle mitbestimmt. Dadurch kam es nicht zu einer von Beginn an konstant bleibenden MIBG Konzentration, und somit auch nicht zu einer gleichbleibenden kardiodepressiven Wirkung. Da die kardiodepressive und die sympathomimetische Wirkung von MIBG im gleichen Dosisbereich beobachtet wurden, kann man davon ausgehen, daß die negativ chronotrope und inotrope Wirkung von MIBG genauso wenig im klinischen Bereich zu beobachten sind, wie die sympathomimetischen Effekte. Man kann aber natürlich auch die Möglichkeit ins Auge fassen, daß sich die beiden entgegengesetzten Wirkungen gegenseitig aufheben. In den in-vitro Versuchen konnte dies für den negativ chronotropen Effekt durch nachfolgenden Sachverhalt gezeigt werden: Desipramin verstärkte die negativ chronotrope Wirkung von MIBG. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, daß Desipramin die indirekte sympathomimetische Wirkung von MIBG abschwächte. Der durch MIBG hervorgerufene Anstieg der Herzfrequenz, der in Abwesenheit von Desipramin beobachtet wurde, ist ein Ergebnis der Noradrenalin-freisetzenden Wirkung, wodurch aber die direkte Wirkung von MIBG, die Herzfrequenz zu senken, maskiert wurde. Dies könnte auch die verlängerte Dauer der negativ chronotropen Wirkung von MIBG in den Herzen erklären, die mit Desipramin behandelt wurden (vgl. Tab. 3.6).

In den Versuchen mit narkotisierten Kaninchen ging es darum, die Ergebnisse aus den in-vitro Versuchen am Kaninchenherzen zu bestätigen. MIBG besaß auch in-vivo indirekt sympathomimetische Wirkungen. Es kam zum Anstieg des mittleren

arteriellen Blutdrucks und des totalen peripheren Widerstandes, der für MIBG im Vergleich zu Tyramin nicht so stark ausgeprägt war, aber dafür länger anhielt. Für die Herzfrequenz ergab sich ein anderes Bild. Während sich nach Tyramin keine signifikante Änderung der Herzfrequenz ergab, kam es unter MIBG zu einem Abfall der Herzfrequenz (vgl. Abb. 3.14). Dies stand im Widerspruch zu der erwarteten Wirkung eines indirekten Sympathomimetikums und zu den Versuchen am perfundierten Kaninchenherzen, bei dem es zu einem Anstieg kam. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Barorezeptor-Reflex sein. Dieser Reflex funktioniert über Dehnungsrezeptoren, die in der Wand der Aorta und im Karotissinus lokalisiert sind. Eine Blutdruckerhöhung führt zu einer Dehnung der Gefäßwand und zu einer Aktivierung dieser Rezeptoren. Der efferente Teil dieses Reflexbogens läuft über den Sympathikus (Hemmung) und den Nervus Vagus (Aktivierung, vgl. [ZINK 1990, S. 1351]). Dadurch kommt es zu einer Vasodilatation (Hemmung des Sympathikus) und zu einer Bradykardie (Aktivierung des Vagus). Deshalb wurde in einer kleinen Versuchserie der vagale Teil dieses Reflexbogen mit Hilfe von Methylnatropin, das die peripheren Muscarin-Rezeptoren blockiert, unterbrochen und ausgeschaltet. In diesen Versuchen kam es sowohl nach Gabe von MIBG als auch nach Gabe von Tyramin zu einem Anstieg der Herzfrequenz, der nach Tyramin wesentlich stärker ausgeprägt war als nach MIBG (vgl. Abb. 3.16). So konnte gezeigt werden, daß der durch die indirekt sympathomimetische Wirkung von MIBG und Tyramin erwartete Herzfrequenzanstieg durch den Barorezeptor-Reflex (ausgelöst durch den Blutdruckanstieg) maskiert wurde.

Bei der Analyse des Anstiegs der Noradrenalin-Konzentration im Plasma nach Gabe von MIBG oder Tyramin ergab sich, daß erst eine Infusion von 50 µmol/10 min MIBG eine Erhöhung der Noradrenalin-Freisetzung auslöste, der aber wesentlich schwächer ausgeprägt war als nach Tyramin bei der gleichen Infusionsrate. Dieser Sachverhalt läßt die Vermutung zu, daß MIBG wie am perfundierten Kaninchenherzen wesentlich schwächer Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen freisetzt als Tyramin. Die länger anhaltende Wirkung von MIBG (vgl. Abb. 3.15) bestätigt wiederum die Ergebnisse am isolierten Kaninchenherzen und kann über den fehlenden Abbau von MIBG durch die Monoaminoxidase erklärt werden.

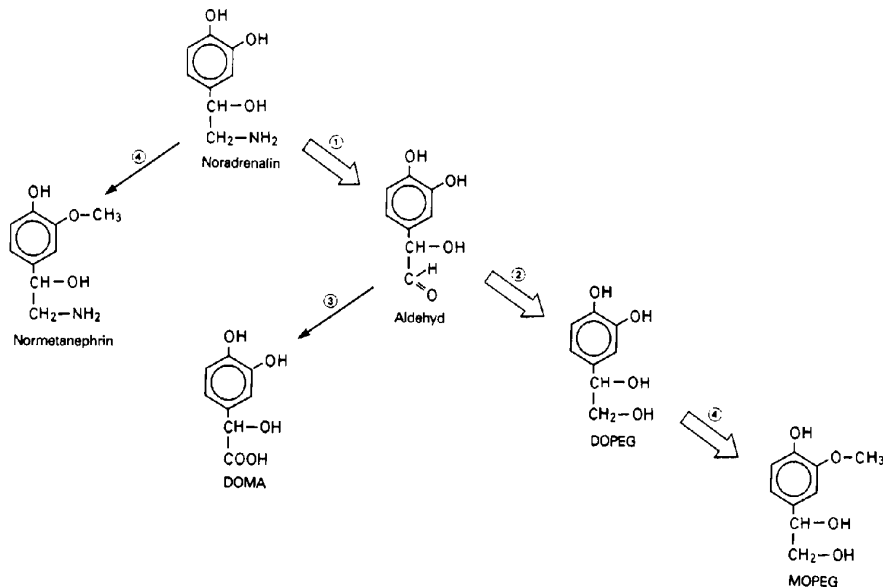
Der einzige qualitative Unterschied zwischen MIBG und Tyramin am narkotisierten Kaninchen war die Beobachtung, daß MIBG die Plasmakonzentration des Noradrenalin-Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG) reduzierte, wo hingegen Tyramin diese erhöhte (vgl. Abb. 3.15). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß MIBG die präsynaptische Monoaminoxidase (MAO-A) hemmt. Um dies zu erklären, ist es wichtig sich den Abbauweg von Noradrenalin anzuschauen (vgl. Abb. 4.2). Da für die Bildung des neuronalen Hauptmetaboliten DOPEG zwei Enzyme notwendig sind könnte MIBG entweder die Aldehyd-Reduktase oder die Monoaminoxidase oder beide Enzyme hemmen. Dies wurde in einer weiteren Versuchsserie untersucht (siehe Kapitel 4.3 auf Seite 103) .

4.2 Adrenerge Neuronen-blockierende Wirkung von MIBG

Von Beginn an wurde MIBG von der Arbeitsgruppe um Wieland als adrenerger Neuronenblocker bezeichnet [WIELAND et al. 1980]. Diese Behauptung wurde durch die ähnliche Strukturformel von MIBG und Guanethidin bzw. Bretylium hergeleitet, da sich MIBG aus dem Guanidin-Teil von Guanethidin und dem Benzyl-Rest von Bretylium zusammensetzen läßt. Guanethidin und Bretylium sind prototypische adrenerge Neuronenblocker. In der oben erwähnten Publikation von Wieland et al. (1980) wird auf eine Arbeit von Short und Darby von 1967 hingewiesen, in der das ortho- und para-Isomer von MIBG auf mögliche adrenerge Neuronen-blockierende Aktivität hin untersucht wurden. In dieser Versuchsreihe erwies sich nur das para-Isomer als wirksam. Die Substanz meta-Chlorbenzylguanidin wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Sie bewirkte keine adrenerge Neuronenblockade. Aus unserer Sicht war die Schlußfolgerung, daß MIBG ein adrenerger Neuronenblocker ist, rein spekulativ und wir hielten eine experimentelle Verifizierung für notwendig. Deshalb wurde eine Versuchsreihe am isoliert perfundierten Kaninchenherzen durchgeführt, um diesen Sachverhalt eindeutig zu belegen.

Ein adrenerger Neuronenblocker, wie z. B. Guanethidin, besitzt folgende wichtige

Abb. 4.2: Synaptischer Abbau von Noradrenalin.



Die vier eingekreisten Zahlen beziffern die abbauenden Enzym (modifiziert nach [STARKE 1996, S. 119]):

1. Monoaminoxidase
2. Aldehyd-Reduktase
3. Aldehyd-Dehydrogenase
4. Catechol-O-Methyltransferase

Der Hauptweg führt von links oben nach rechts unten. Er beginnt mit der oxidativen Desaminierung zum 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd. Dank der Eigenschaften der aldehydoxidierenden und -reduzierenden Enzyme überwiegt als nächster Schritt die Reduktion zu 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG), während die Oxidation zu 3,4-Dihydroxymandelsäure (DOMA) keine Rolle spielt. Diese Reaktion spielt sich vorwiegend in den noradrenergen Axonendigungen ab. In den Nachbarzellen, z. B. glatter Muskulatur oder Gliazellen, kann Noradrenalin zu Normetanephrin und DOPEG zu 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MOPEG) methyliert werden. DOPEG und MOPEG sind die Hauptprodukte des Noradrenalinabbaus in der Axonendigung und ihrer Nachbarschaft.

Eigenschaften [HAEUSLER et al. 1969]:

- es ist ein Substrat des Noradrenalin-Transporters im Axolemm der postganglionär-sympathischen Axone,
- es blockiert in hoher Konzentration schnelle Natrium-Kanäle und wirkt somit schwach lokalanästhetisch,
- dadurch kommt es zu einer Hemmung der durch ein fortgeleitetes Aktionspotential ausgelösten Noradrenalin-Freisetzung aus der sympathischen Nervenendigung
- die membranstabilisierende und freisetzungshemmende Wirkung nimmt mit zunehmender Expositionsdauer zu und ist deshalb nicht nur konzentrationsabhängig, sondern auch zeitabhängig.

Durch die Aufnahme in noradrenerge Axone über den neuronalen Noradrenalin-Transporter reichert sich ein adrenerger Neuronenblocker dort an und verhindert durch seine lokalanästhetische Wirkung die Bildung und Weiterleitung des Nervenaktionspotentials. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung.

In den Versuchen mit MIBG konnte ein konzentrationsabhängige Hemmung auf die durch einen elektrischen Reiz ausgelöste Noradrenalin-Freisetzung sehr gut beobachtet werden (vgl. Abb. 3.7). Mit steigenden Konzentrationen an MIBG sank der Noradrenalin-Overflow, der durch Feldstimulation ausgelöst wurde. Dieser Effekt war auch von der Zeit abhängig, in der MIBG während des reizfreien Intervalls in die Aortenkanüle der perfundierten Kaninchenherzen infundiert wurde. Dieser zeitabhängige Hemmeffekt wurde nur bei MIBG und nicht bei Tyramin beobachtet (vgl. Abb. 3.9). Somit war der Hemmeffekt von MIBG nicht durch eine Entleerung der vesikulären Noradrenalin-Speicher zu erklären, der durch indirekte Sympathomimetika hervorgerufen werden könnte.

Die Tatsache, daß MIBG den spontanen Noradrenalin-Overflow in den perfundierten Kaninchenherzen erhöhte (vgl. Abb. 3.3 und 3.8), läßt sich durch seine

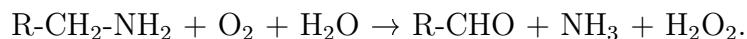
indirekt sympathomimetische Wirkung erklären, wodurch es ebenso zu einem Anstieg der Herzfrequenz mit steigender MIBG Konzentration kam (vgl. Abb. 3.2 und 3.10).

Somit verhält sich MIBG eindeutig wie ein adrenerger Neuronenblocker. Ein direkter Beweis dafür, daß MIBG lokalanästhetisch wirkt und schnelle Natriumkanäle blockiert, konnte mit unseren Versuchen nicht erbracht werden.

4.3 Hemmung der Monoaminoxidase durch MIBG

Nachdem gezeigt werden konnte, daß MIBG ein adrenerger Neuronenblocker ist, lag die Vermutung nahe, daß MIBG ebenso wie viele andere adrenerge Neuronenblocker das Enzym Monoaminoxidase (MAO) hemmt [MAXWELL und WASTILA 1977]. Diese Aussage wurde noch durch eine Arbeit von der Arbeitsgruppe um Kuntzmann unterstützt, in der die Substanz o-Brombenzylguanidin eine hemmende Wirkung auf die MAO besaß [KUNTZMAN und JACOBSON 1963]. MIBG wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Auch die hier vorgestellten Versuche am narkotisierten Kaninchen legen eine MAO-Hemmung durch MIBG nahe, denn MIBG verminderte dosisabhängig die DOPEG-Konzentration im Blutplasma der Tiere (vgl. Abb. 3.15).

Die Monoaminoxidase ist ein Enzym, das biogene Amine zu ihren entsprechenden Aldehyden nach folgender allgemeinen Formel umwandelt:



Dieses Zwischenprodukt wird schnell metabolisiert. Einerseits kann der Aldehyd durch die Aldehyddehydrogenase zu korrespondierenden Säure oxidiert werden, andererseits kann eine Reduktion durch das Enzym Aldehydreduktase zum entsprechenden Alkohol erfolgen.

In Versuchen an Gehirngewebe wurde festgestellt, daß es von der Monoaminoxidase zwei Isoformen gibt, MAO-A und MAO-B, die sich in Bezug auf ihre

Substratspezifität und ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren unterscheiden. Die wichtigsten Substrate der Monoaminoxidase sind Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Phenylethylamin und Serotonin. Aber auch andere biogene Amine, wie z. B. Tyramin oder Octopamin, werden durch die Monoaminoxidase abgebaut. Alle Substrate werden von beiden Formen der Monoaminoxidase desaminiert, wobei sich der Abbau hinsichtlich der relevanten kinetischen Parameter unterscheiden läßt. Mit Hilfe der kinetischen Parameter kann man eine relative Vorliebe für eine der beiden Iso-Enzyme definieren, die von der Konzentration, der Affinität und der Umsatzrate des Enzym bestimmt wird. Unter physiologischen Bedingungen werden Noradrenalin und Serotonin durch MAO-A und Phenylethylamin durch MAO-B metabolisiert. Die Substrate Dopamin und Tyramin werden von beiden Formen in etwa gleich schnell desaminiert. Ebenso wichtig ist die zelluläre Kompartimentierung der Monoaminoxidase. Während die Isoform MAO-A neuronal lokalisiert ist, liegt die Isoform MAO-B hauptsächlich extraneuronal vor. Aus diesem Grund wird Noradrenalin und Dopamin hauptsächlich durch MAO-A metabolisiert (vgl. Übersichtsarbeit [YODIM et al. 1988]).

Bei den in-vivo Versuchen konnten wir beobachten, daß MIBG die Plasmaspiegel von 3,4-Dihydroxyphenylglykol (DOPEG) verminderte. DOPEG ist der wichtigste desaminierte Metabolit von Noradrenalin präsynaptischen Ursprungs (vgl. Abb. 4.2). Diese Beobachtung macht es sehr wahrscheinlich, daß MIBG die Monoaminoxidase Typ A hemmt. Außerdem verminderte MIBG konzentrationsabhängig die spontane Abgabe von DOPEG im perfundierten Kaninchenherzen. Auch diese Beobachtung legt eine Hemmung der neuronalen MAO-A nahe.

Daraufhin wurden Versuche mit Gewebehomogenaten durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl für MAO-A (vgl. Abb. 3.17) als auch für MAO-B (vgl. Abb. 3.18) eine konzentrationsabhängige Hemmung der Enzymaktivität durch MIBG. Für MAO-A lag die IC_{50} bei 18 μM und für MAO-B bei 110 μM .

In einer weiteren Versuchserie konnten wir zeigen, daß es durch eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer parallelen Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die MIBG-induzierte MAO-B Hemmung nach rechts kam. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 100 nM auf 400 μM Dopamin kam es zu einer Erhöhung der IC_{50} Wertes um den Faktor 2,3 (vgl. Abb. 3.19).

Somit konnte gezeigt werden, daß MIBG bevorzugt das Enzym MAO-A hemmt, aber auch die MAO-B blockiert, und daß diese Hemmung kompetitiver Natur ist.

Die Hemmung der MAO-A ist in intaktem Gewebe mit wesentlich niedrigeren MIBG-Konzentrationen zu erreichen als in Gewebehomogenaten, da es über die Aufnahme in die noradrenergen Nerven zu einer Akkumulation von MIBG im Axoplasma kommt und die MAO-A intraneuronal lokalisiert ist. In Versuchen am perfundierten Kaninchenherzen ($IC_{50} = 17 \text{ nM}$) konnte gezeigt werden, daß MIBG die MAO-A um den Faktor 1000 stärker hemmte als im Gewebehomogenat ($IC_{50} = 18 \mu\text{M}$). Der Unterschied zwischen intaktem Gewebe (perfundiertes Kaninchenherz) und Gewebehomogenat bezüglich der IC_{50} von MIBG als Hemmstoff der MAO-A sollte das Ausmaß der intraneuronalen Akkumulation von MIBG widerspiegeln. Somit kommt es durch die Aufnahme über Uptake_1 zu einer rund 1000-fachen Akkumulation von MIBG im Axoplasma von noradrenergen Neuronen.

5 Zusammenfassung

Obwohl radioaktiv markiertes meta-Iodbenzylguanidin (MIBG) häufig in der Diagnose und bei der Behandlung von Neuroblastomen in der Klinik Verwendung findet, ist bis heute sehr wenig über seine Pharmakologie bekannt. In der Literatur finden sich öfters Andeutungen, die aber nicht belegt wurden. So fehlten Untersuchungen über indirekt-sympathomimetische Wirkungen von MIBG. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir am isoliert perfundierten Kaninchenherzen die Wirkung von MIBG im Vergleich zum Prototyp eines indirekten Sympathomimetikums (Tyramin). Dabei zeigte sich, daß MIBG zwar etwas potenter aber nicht so effektiv wie Tyramin war. Dies zeigte sich sowohl beim Parameter Herzfrequenz als auch beim Parameter Noradrenalin-Freisetzung. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Zeitverlauf, daß die Wirkung von MIBG wesentlich länger anhielt als die von Tyramin.

Der Unterschied zwischen MIBG und Tyramin bezüglich der Effektivität als indirekte Sympathomimetika konnte mit unterschiedlichen Wirkstärken beider Substanzen als Hemmstoff des vesikulären Monoamin-Transporters erklärt werden. Tyramin und MIBG wurden in Versuchen mit Neuroblastomzellen mit gleicher Geschwindigkeit durch Uptake₁ aufgenommen, Tyramin war aber ein wesentlich potenterer Hemmstoff des vesikulären Monoamin-Transporters als MIBG. Da aber MIBG im Gegensatz zu Tyramin kein Substrat der neuronalen Monoaminoxidase ist, hielt seine Wirkung auch deutlich länger an als die von Tyramin.

Die indirekt sympathomimetische Wirkung von MIBG wurde anschließend auch in-vivo untersucht. Dort zeigte sich auch, daß MIBG trotz im Vergleich zu klinischen Anwendungen hoher Dosen wesentlich schwächer indirekt-

sympathomimetisch wirkt als Tyramin. In diesen Versuchen wurde auch beobachtet, daß die indirekt-sympathomimetische Wirkung auf die Herzfrequenz durch eine Gegenregulation des Nervensystems (nämlich den Barorezeptor-Reflex) maskiert wurde.

Obwohl MIBG in der Literatur von Anfang an als adrenerger Neuronenblocker bezeichnet wurde, fand sich in der Literatur kein direkter Beweis für diese Behauptung. Mit Hilfe eines in-vitro Modells konnte in der vorliegenden Arbeit der Beweis erbracht werden, daß MIBG ein adrenerger Neuronenblocker ist. Dazu benutzten wir als Parameter die durch elektrische Stimulation induzierte Freisetzung von Noradrenalin im spontan schlagenden, perfundierten Kaninchenherzen. Die stimulationsbedingte Abgabe von Noradrenalin ins Perfusat wurde durch MIBG zeit- und konzentrationsabhängig blockiert.

Da viele adrenerge Neuronenblocker das Enzym Monoaminoxidase (MAO) hemmen, wurde in-vitro untersucht, ob MIBG die beiden Iso-Enzyme MAO-A und MAO-B hemmt. Es konnte gezeigt werden, daß MIBG die MAO kompetitiv hemmt und zwar bevorzugt die Isoform MAO-A. Diese MAO-Hemmung wurde auch in-vivo in den Versuchen mit narkotisierten Kaninchen beobachtet. MIBG verminderte nämlich dosisabhängig die Konzentration des desaminierten Noradrenalin-Metaboliten DOPEG im Blutplasma der Tiere. Die Beobachtung, daß für die Hemmung der MAO-A im perfundierten Herzen eine IC_{50} von 17 nM, im Gewebehomogenat von Herzen dagegen eine IC_{50} von 18 μ M gefunden wurde, spricht dafür, daß MIBG als Substrat von Uptake₁ im Axoplasma der sympathischen Neurone des Herzens um den Faktor 1000 angereichert wird.

Somit konnten in der vorliegenden Arbeit einige offene Fragen zur Pharmakologie von MIBG im Bereich des sympathomimetischen Nervensystems beantwortet werden, die auch für den klinischen Einsatz von MIBG wichtig sein könnten.

6 Abstract

Although radioiodinated MIBG is widely used clinically to diagnose and treat neural crest tumours, there is only paucity of published data on the pharmacology of MIBG. In the literature, there are frequently allusions which were not verified. For example, nothing is known about the indirect sympathomimetic effects of MIBG. This prompted us to compare the sympathomimetic effects of MIBG and tyramine (the prototype of indirectly acting amines) in spontaneously beating, isolated, perfused rabbit hearts. We were able to show, that MIBG was in fact more potent, but much less effective, than tyramine. Increases in heart rate and noradrenaline overflow were both indicators for that. On the other hand, the duration of the effects of MIBG was much longer than that of the effects of tyramine.

The difference between MIBG and tyramine with respect to the efficacy as indirectly acting sympathomimetic amines can be explained with different potencies to inhibit the vesicular monoamine transporter. For tyramine and MIBG we found in human neuroblastoma cells the same rate of neuronal uptake. On the other hand, as far as the inhibition of the vesicular monoamine transporter is concerned, tyramine was eight times more potent than MIBG. In addition, MIBG is contrary to tyramine, not a substrate of monoamine oxidase. Therefore, the duration of MIBG action was much more longer than that of tyramine.

In experiments carried out in anaesthetized rabbits, we examined the indirect sympathomimetic effects of MIBG *in vivo*. Although the dose of MIBG used in these experiments was relatively high compared to doses used in clinical settings, MIBG was much less effective than tyramine as indirectly acting sympathomimetic

amine. The effect of MIBG on heart rate was masked by reflex counter-regulation (baroreceptor reflex). Hence, MIBG caused a dose-dependent increase in blood pressure and a dose-dependent decrease in heart rate.

Although MIBG was labelled from the beginning as adrenergic neurone blocking agent in the literature, we found no direct evidence for this suggestion in the literature. In our study we were able to show, that MIBG behaves as an adrenergic neurone blocking agent. We used the spillover of noradrenaline induced by electrical stimulation as a parameter in spontaneously beating, isolated rabbit hearts. The stimulation-induced spillover of noradrenaline was inhibited by MIBG in a time- and concentration-dependent manner.

Because many adrenergic neurone blocking agents inhibit the enzyme monoamine oxidase (MAO), we examined *in vitro*, whether MIBG inhibits both iso-enzymes MAO-A and MAO-B. We were able to show, that the inhibition of MAO by MIBG is competitive in nature and preferentially involves inhibition of MAO-A. This inhibition of MAO was also shown in the *in vivo* experiments carried out in anaesthetized rabbits. In these experiments, MIBG reduced the concentration of the MAO metabolite of noradrenaline, DOPEG, in plasma in a dose dependent manner. In addition, MIBG was found to be 1000 times more potent in inhibiting MAO-A in the intact heart (IC_{50} 17 nM) than in inhibiting MAO-A in heart homogenates (IC_{50} 18 μ M). From this difference in potency it can be concluded that there is a 1000-fold accumulation of MIBG within the axoplasm of noradrenergic neurones.

In this paper a number of questions about the pharmacology of MIBG concerning the sympathomimetic nervous system were answered. This may be of importance in the clinical use of MIBG.

Literaturverzeichnis

- [ANDERSON et al. 1973] B.G. ANDERSON, W.H. BEIERWALTES, T.S. HARRISON, A.N. ANSARI, A.A. BUSWINK und R.D. ICE (1973). *Labeled dopamine concentration in pheochromocytomas*. J Nucl Med, 14:781–784.
- [BRUCHELT et al. 1988] G. BRUCHELT, R. GIRGERT, J. BUCK, H. WOLBURG, D. NIETHAMMER und J. TREUNER (1988). *Cytotoxic effects of m-[¹³¹I] and m-[¹²⁵I]iodobenzylguanidine on the human neuroblastoma cell lines SK-N-SH and SK-N-LO*. Cancer Res, 48:2993–2997.
- [BRYAN-LLUDKA und BÖNISCH 1997] L.J. BRYAN-LLUDKA und H. BÖNISCH (1997). *Lanthanides inhibit the human noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine transporters*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 355:699–706.
- [BUCK et al. 1985] J. BUCK, G. BRUCHELT, R. GIRGERT, J. TREUNER und D. NIETHAMMER (1985). *Specific uptake of m-[125I] iodobenzylguanidine in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH*. Cancer Res, 45:6366–70.
- [BÖNISCH und TRENDELENBURG 1988] H. BÖNISCH und U. TRENDELENBURG (1988). *The mechanism of action of indirectly acting sympathomimetic amines*. In: U. TRENDELENBURG und N. WEINER, Hrsg.: *Catecholamines I*, Bd. 90/I, S. 247–277. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- [DEGRADO et al. 1995] T.R. DEGRADO, M.R. ZALUTSKY und G. VAIDYANATHAN (1995). *Uptake mechanisms of meta-[¹²³I]iodobenzylguanidine in isolated rat heart*. Nucl Med Biol, 22:1–12.

- [DUTSCHKA und COENEN 1994] K. DUTSCHKA und H.H. COENEN (1994). *Ungetragerte Radiosynthese von meta-[¹²³I]-Iodobenzylguanidin und 3β-(4-[¹²³I]-Iod-phenyl)tropan-2β-carbonsure Methylester durch nicht-isotopen, Cu(I)-assistierten Halogenaustausch.* Nucl Med, 33:A11.
- [FARAHATI et al. 1995] J. FARAHATI, S.P. MUELLER, H.H. COENNEN und C. REINERS (1995). *Scintigraphy of neuroblastoma with radioiodinated m-iodobenzylguanidine.* In: S.T. TREVES, Hrsg.: *Paediatric Nuclear Medicine*, S. 528–545. Springer-Verlag, New York, 2 Aufl.
- [FARAHATI et al. 1997] J. FARAHATI, H.H. COENEN, K. DUTSCHKA, G. STUBEN, K. KNUHMAN, W. BUDACH, B. KREMENS und C. REINERS (1997). *Effect of specific activity on neuroblastoma uptake of I-123-meta-iodobenzylguanidine in nude mice xenografted with SK-N-SH cells.* Oncology Reports, 4:363–366.
- [FOWLER et al. 1976] J.S. FOWLER, R.R. MACGREGOR und A.P. WOLF (1976). *Radiopharmaceuticals. 16. Halogenated dopamine analogs. Synthesis and radiolabeling of 6-iododopamine and tissue distribution studies in animals.* J Nucl Med, 19:356–360.
- [FRIEDGEN et al. 1996] B. FRIEDGEN, R. WOLFEL, H. RUSS, E. SCHOMIG und K.-H. GRAEFE (1996). *The role of extraneuronal amine transport systems for the removal of extracellular catecholamines in the rabbit.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 354:275–286.
- [GASNIER et al. 1986] B. GASNIER, M.P. ROISIN, D. SCHERMAN, S. COORNAERT, G. DESPLANCHES und J.H. HENRY (1986). *Uptake of meta-iodobenzylguanidine by bovine chromaffin granule membranes.* Mol Pharmacol, 29:275–280.
- [GRAEFE et al. 1999] K.H. GRAEFE, F. BOSSLE, R. WOLFEL, A. BURGER, M. SOULADAKI, D. BIER, J. FARAHATI, K. DUTSCHKA und H. BONISCH (1999). *Sympathomimetic effects of m-iodobenzylguanidine: comparsion with tyramine.* J Nucl Med, 40:1342–1351.

- [HAEUSLER et al. 1969] G. HAEUSLER, W. HAEFELY und A. HUERLIMANN (1969). *On the mechanism of the adrenergic nerve blocking action of bretylium*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 265:260–277.
- [HOEFNAGEL et al. 1987] C.A. HOEFNAGEL, F.C.A. DEN HARTOG JAGER, B.G. TAAL, N.G.G.M. ABELING und E.E. ENGELSMAN (1987). *The role of I-131-MIBG in the diagnosis and therapy of carcinoids*. Eur J Nucl Med, 13:187–191.
- [IVERSEN 1967] L.L. IVERSEN (1967). *The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [JAQUES et al. 1984] S. JAQUES, M.C. TOBES, J.C. SISSON, J.A. BAKER und D.M. WIELAND (1984). *Comparison of the sodium dependency of uptake of meta-iodobenzylguanidine and norepinephrine into cultured bovine adrenomedullary cells*. Mol Pharmacol, 26:539–546.
- [KIMMIG et al. 1984] B. KIMMIG, W.E. BRANDEIS, M. EISENHUT, B. BU-BECK, H.J. HERMANN und K. ZUM WINKEL (1984). *Scintigraphy of a neuroblastoma with I-131 meta-iodobenzylguanidine*. J Nucl Med, 25:773–775.
- [KLINE et al. 1981] R.C. KLINE, D.P. SWANSON, D.M. WIELAND, J.H. THRALL, M.D. GROSS, B. PITT und W.H. BEIERWALTES (1981). *Myocardial imaging in man with I-123 meta-iodobenzylguanidine*. J Nucl Med, 22:129–132.
- [KORN et al. 1977] N. KORN, A. BUSWINK, T. YU, E.A. CARR, M. CAROLL und R.E. COUNSELL (1977). *A radioiodinated bretylium analog as a potential agent for scanning the adrenal medulla*. J Nucl Med, 18:87–89.
- [KUIN et al. 1994] A. KUIN, L. SMETS, T. VOLK, A. PAANS, G. ADAMS, A. ATEMA, E. JÄHDE, A. MAAS, M.F. RAJEWSKY, G. VISSER und P. WOOD (1994). *Reduction of intratumoral pH by the mitochondrial inhibitor m-iodobenzylguanidine and moderate hyperglycemia*. Cancer Res, 54:3785–3792.
- [KUIN et al. 1998] A. KUIN, M. AALDERS, M.A. VAN DER VALK, A. FREY, H.H.H.W. SCHMIDT und L.A. SMETS (1998). *Renal toxicity of the neuron-*

- blocking and mitochondriotropic agent m-iodobenzylguanidine*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42:37–45.
- [KUNTZMAN und JACOBSON 1963] R. KUNTZMAN und M. M. JACOBSON (1963). *Monoamine oxidase inhibition by series of compounds structurally related to bretylium and guanethidine*. *J Pharmacol Exp Ther*, 141:166–172.
- [LANGELOH und TRENDELENBURG 1987] A. LANGELOH und U. TRENDELENBURG (1987). *The mechanism of the ³H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake₁: role of monoamine oxidase and of vesicularly stored ³H-noradrenaline*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 336:611–620.
- [LIEBERMAN et al. 1969] L.M. LIEBERMAN, W.H. BEIERWALTES, V.M. VARMA, P. WEINHOLD und R. LING (1969). *Labeled dopamine concentration in human adrenal medulla and in neuroblastoma*. *J Nucl Med*, 10:93–97.
- [LOESBERG et al. 1990a] C. LOESBERG, H. VAN ROOIJ und L.A. SMETS (1990a). *Meta-iodobenzylguanidine (MIBG), a novel high-affinity substrate for cholera toxin that interferes with cellular mono(ADP-ribosylation)*. *Biochim Biophys Acta*, 1037(1):92–9.
- [LOESBERG et al. 1990b] C. LOESBERG, H. VAN-ROOIJ, W.J. NOOIJEN, A.J. MEIJER und L.A. SMETS (1990b). *Impaired mitochondrial respiration and stimulated glycolysis by m-iodobenzylguanidine (MIBG)*. *Int J Cancer*, 46:276–281.
- [LOWRY et al. 1951] O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.F. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Bio Chem*, 193:265–275.
- [MANGNER et al. 1986] T.J. MANGNER, M.C. TOBES, D.W. WIELAND, J.C. SISSON und B. SHAPIRO (1986). *Metabolism of ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine in patients with metastatic pheochromocytoma*. *J Nucl Med*, 27:37–44.
- [MAXWELL und WASTILA 1977] R.A. MAXWELL und W.B. WASTILA (1977). *Adrenergic neuron blocking drugs*. In: F. GROSS, Hrsg.: *Antihypertensiv Agents*, S. 101–247. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- [MORALES et al. 1967] J.O. MORALES, W.H. BEIERWALTES, R.E. COUNSELL und D.H. MEIER (1967). *The concentration of radioactivity from labeled epinephrine and its precursors in the dog adrenal medulla*. J Nucl Med, 8:800–809.
- [MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING 1996] E. MUTSCHLER und M. SCHÄFER-KORTING (1996). *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 7 Aufl.
- [NAKAJO et al. 1983] M. NAKAJO, B. SHAPIRO, J. GLOWNIAK, J.C. SISSON und W.H. BEIERWALTES (1983). *Inverse relationship between cardiac accumulation of meta-131Iodobenzylguanidine (I-131 MIBG) and circulating catecholamines in suspected pheochromocytoma*. J Nucl Med, 24:1127–1134.
- [NAKAJO et al. 1984] M. NAKAJO, B. SHAPIRO, J.C. SISSON, D.P. SWANSON und W.H. BEIERWALTES (1984). *Salivary gland accumulation of meta-131Iodobenzylguanidine*. J Nucl Med, 25:2–6.
- [NAKAJO et al. 1986] M. NAKAJO, K. SHIMABUKURO, H. YOSHIMURA, R. YONEKURA, Y. NAKABEPPU, P. TANOUE und S. SHINOHARA (1986). *Iodine-131 metaiodobenzylguanidine intra- and extraventricular accumulation in the rat heart*. J Nucl Med, 27:84–89.
- [PERRY 1970] W.L.M. PERRY (1970). *Pharmacological experiments on isolated preparations*. E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, 2 Aufl.
- [RICHARDS und SADEE 1986] M.L. RICHARDS und W. SADEE (1986). *Human neuroblastoma cell lines as models of catechol uptake*. Brain Res, 384:132–137.
- [RUTGERS et al. 1993] M. RUTGERS, G.A. TYTGAT, M. VERWIJS-JANSSEN, C. BUITENHUIS, P.A. VOUTE und L.A. SMETS (1993). *Uptake of the neuron-blocking agent meta-iodobenzylguanidine and serotonin by human platelets and neuro-adrenergic tumour cells*. Int J Cancer, 54:290–295.
- [SHAPIRO und GROSS 1987] B. SHAPIRO und M.D. GROSS (1987). *Radiochemistry, biochemistry and kinetics of ¹³¹I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) and*

- ¹²³I-MIBG: clinical implications of the use of ¹²³I-MIBG. *Med Pediatr Oncol*, 15:170–7.
- [SHORT und DARBY 1967] J.H. SHORT und T.D. DARBY (1967). *Sympathetic nervous system blocking agents. 3. Derivatives of benzylguanidine*. *J Med Chem*, 10:833–40.
- [SISSON et al. 1981] J.C. SISSON, M.S. FRAGER, T.W. VALK, M.D. GROSS, D.P. SWANSON, D.M. WIELAND, M.C. TOBES, W.H. BEIERWALTES und N.W. THOMPSON (1981). *Scintigraphic localization of pheochromocytoma*. *N Engl J Med*, 305:12–17.
- [SISSON et al. 1984] J.C. SISSON, B. SHAPIRO, W.H. BEIERWALTES, J.V. GLOWNIAK, M. NAKAJO, T.J. MANGNER, J.E. CARY, D.P. SWANSON, J.E. COPP und W.G. SATTERLEE (1984). *Radiopharmaceutical treatment of malignant pheochromocytoma*. *J Nucl Med*, 25:197–206.
- [SLOSMAN et al. 1988] D.O. SLOSMAN, D. DAVIDSON, A.B. BRILL und P.O. ALDERSON (1988). ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine uptake in the isolated rat lung: a potential marker of endothelial cell function. *Eur J Nucl Med*, 13:543–547.
- [SMETS et al. 1988] L.A. SMETS, B. BOUT und J. WISSE (1988). *Cytotoxic and antitumor effects of the norepinephrine analogue meta-iodo-benzylguanidine (MIBG)*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 21(1):9–13.
- [SMETS et al. 1989] L.A. SMETS, C. LOESBERG, M. JANSSEN, E.A. METWALLY und R. HUISKAMP (1989). *Active uptake and extravesicular storage of m-iodobenzylguanidine in human neuroblastoma SK-N-SH cells*. *Cancer Res*, 49:2941–2944.
- [SMETS et al. 1990] L.A. SMETS, M. JANSSEN, E. METWALLY und C. LOESBERG (1990). *Extracellular storage of the neuron blocking agent meta-iodobenzylguanidine (MIBG) in human neuroblastoma cells*. *Biochem Pharmacol*, 39:1959–64.

- [STARKE 1996] K. STARKE (1996). *Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme*. In: W. FORTH, D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE, Hrsg.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, S. 103–133. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 7 Aufl.
- [STARKE und PALM 1996] K. STARKE und D. PALM (1996). *Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme*. In: W. FORTH, D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE, Hrsg.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, S. 161–200. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 7 Aufl.
- [SZABO et al. 1989] B. SZABO, L. HEDLER und K. STARKE (1989). *Peripheral presynaptic and central effects of clonidine, yohimbine and rauwolscine on the sympathetic nervous system in rabbits*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 340:648–657.
- [TAAL et al. 1996a] B.G. TAAL, C.A. HOEFNAGEL, R.A. VALDES OLMOS, H. BOOT und J.H. BEIJNEN (1996a). *Palliative effect of metaiodobenzylguanidine in metastatic carcinoid tumors*. J Clin Oncol, 14:1829–1839.
- [TAAL et al. 1996b] B.G. TAAL, C.A. HOEFNAGEL, R.A. VALDES OLMOS und J.H. BOOT (1996b). *The effect of unlabelled MIBG prior to ¹³¹I-MIBG scanning and its potential benefit in the treatment of metastatic carcinoid*. Eur J Gastroent Hep, 8:A36.
- [TOBES et al. 1985] M.C. TOBES, JR JAQUES-S, J.C D.M. WIELAND und SISON (1985). *Effect of uptake-one inhibitors on the uptake of norepinephrine and metaiodobenzylguanidine*. J Nucl Med, 26:897–907.
- [TRENDELENBURG und GROHMANN 1983] U. TRENDELENBURG und M. GROHMANN (1983). *The isotope effect of tritium in ³H-noradrenaline*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 323:128–140.
- [VALK et al. 1981] T.W. VALK, M.S. FRAGER, M.D. GROSS, J.C. SISON, D.M. WIELAND, D.P. SWANSON, T.J. MANGNER und W.H. BEIERWALTES (1981). *Spectrum of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia*. A

- scintigraphic portrayal using ¹³¹I-metaiodobenzylguanidine*. *Ann Intern Med*, 94:762–767.
- [VANDENBERG et al. 1997] J.D. VANDENBERG, L.A. SMETS, M. RUTGERS, A. GRUMMELS, R. FOKKENS, P. JONKERGOUW und H. VAN ROOIJ (1997). *Chemical characterization and comparative cellular effects of metaiodobenzylguanidine and benzylguanidine*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40:131–137.
- [WAFELMAN et al. 1994a] A.R. WAFELMAN, C.A. HOEFNAGEL, R.A. MAES und J.H. BEIJNEN (1994a). *Radioiodinated metaiodobenzylguanidine: a review of its biodistribution and pharmacokinetics, drug interactions, cytotoxicity and dosimetry*. *Eur J Nucl Med*, 21:545–559.
- [WAFELMAN et al. 1994b] A.R. WAFELMAN, M.C. KONINGS, H. ROSING, C.A. HOEFNAGEL, B.G. TAAL, R.A.A. MAES und J.H. BEIJNEN (1994b). *High-performance liquid chromatographic determination of metaiodobenzylguanidine in whole blood and plasma of cancer patients*. *J Pharm Biomed Anal*, 12:1173–1179.
- [WAFELMAN et al. 1995] A.R. WAFELMAN, Y.L. NORTIER, H. ROSING, H.J. MAESSEN, B.G. TAAL, C.A. HOEFNAGEL, R.A.A. MAES und J.H. BEIJNEN (1995). *Renal excretion of meta-iodobenzylguanidine after therapeutic doses in cancer patients and its relation to dose and creatinine clearance*. *Nucl Med Commun*, 16:767–772.
- [WIELAND et al. 1979] D.M. WIELAND, D.P. SWANSON, L.E. BROWN und W.H. BEIERWALTES (1979). *Imaging the adrenal medulla with an I-131-labeled antiadrenergic agent*. *J Nucl Med*, 20:155–158.
- [WIELAND et al. 1980] D.M. WIELAND, J. WU, L.E. BROWN, T.J. MANGNER, D.P. SWANSON und W.H. BEIERWALTES (1980). *Radiolabeled adrenergic neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [¹³¹I]-iodobenzylguanidine*. *J Nucl Med*, 21:349–353.
- [WIELAND et al. 1981a] D.M. WIELAND, L.E. BROWN, W.L. ROGERS, K.C. WORTHINGTON, J.I. WU, N.H. CLINTHORNE, C.A. OTTO, D.P. SWANSON

- und W.H. BEIERWALTES (1981a). *Myocardial imaging with a radioiodinated norepinephrine storage analog*. J Nucl Med, 22:22–31.
- [WIELAND et al. 1981b] D.M. WIELAND, L.E. BROWN, M.C. TOBES, W.L. ROGERS, D.D. MARSH, T.J. MANGNER, D.P. SWANSON und W.H. BEIERWALTES (1981b). *Imaging the primate adrenal medulla with [^{123}I] and [^{131}I] meta-iodobenzylguanidine: concise communication*. J Nucl Med, 22:358–364.
- [YODIM et al. 1988] M.B.H. YODIM, J.P.M. FINBERG und K.F. TIPTON (1988). *Monamine Oxidase*. In: U. TRENDELENBURG und N. WEINER, Hrsg.: *Catecholamines*, S. 119–192. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- [ZINK 1990] C. ZINK (1990). *Pschrembel - Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin and New York, 256 Aufl.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Franz Bossle
Am Jägersbrunnen 4
97421 Schweinfurt

Tel.: (09 721) 2 41 45
E-Mail: fbossle@web.de

Geboren am: 12. 09. 1969 in Haßfurt
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Eva und Ludwig Bossle

Schulbildung

1976–1980 Grundschule: Auenschule Schweinfurt
1980–1989 Gymnasium: Walther-Rathenau-Gymnasium Schweinfurt

Wehrdienst

1989–1990 Sanitätsbatallion 12, Balthasar-Neumann Kaserne in Veits-
höchheim

Studium

1990–1994 Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität
in Würzburg
03.09.1992 1. Staatsexamen
25.10.1994 2. Staatsexamen
05.12.1995 3. Staatsexamen
20.12.1995 Approbation

Praktikum

- 1994–1995 Pharmazeutisches Praktikum bei der Firma Hoechst AG in Frankfurt
- 1995 Pharmazeutisches Praktikum in der Centrum-Apotheke in Frankfurt

Berufserfahrung

- 1996–1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.-H. Graefe
- seit 1999 Mitarbeiter in der Hubertus Apotheke Schweinfurt

Schweinfurt, 02. Juli 2002