

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Prävention hypertensiver Krisen  
in einem Rattenmodell für das Phäochromozytom  
mit akutem und chronischem Katecholaminexzess**

**Inaugural-Dissertation**

**Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Kathrin Kleinbrahm  
aus Köln**

**Würzburg, Juni 2011**

**Referent: Prof. Dr. med. B. Allolio**

**Koreferent: Prof. Dr. med. C. Wunder**

**Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**25. April 2012**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

## **Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	DAS PHÄOCHROMOZYTOM .....	1
1.2	PHARMAKOTHERAPIE DES PHÄOCHROMOZYTOMS.....	3
1.2.1	<i>Irreversible unselektive <math>\alpha</math>-Adrenozeptorantagonisten.....</i>	<i>4</i>
1.2.2	<i>Reversible kompetitive <math>\alpha_1</math>-Adrenozeptorantagonisten.....</i>	<i>7</i>
1.2.3	<i>L-Typ-Calciumkanalantagonisten vom Dihydropyridin-Typ .....</i>	<i>8</i>
1.3	FRAGESTELLUNG UND STUDIENDESIGN .....	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
2.1	MATERIALIEN .....	11
2.1.1	<i>Geräte .....</i>	<i>11</i>
2.1.2	<i>Reagenzien.....</i>	<i>12</i>
2.1.3	<i>Medikamente.....</i>	<i>13</i>
2.2	TIEREXPERIMENTELLER TEIL.....	14
2.2.1	<i>Tiere.....</i>	<i>14</i>
2.2.2	<i>Allgemeines Protokoll-/ und Studiendesign.....</i>	<i>14</i>
2.2.3	<i>Pumpenimplantation.....</i>	<i>15</i>
2.2.4	<i>Nicht-invasive Blutdruck-/ und Gewichtskontrollen.....</i>	<i>16</i>
2.2.5	<i>Hämodynamik.....</i>	<i>17</i>
2.2.6	<i>Versuchsreihe 1: Hämodynamische Stabilität nach einmaliger intravenöser Applikation von Phenoxybenzamin, Urapidil oder Nitrendipin.....</i>	<i>19</i>
2.2.7	<i>Versuchsreihe 2: Hämodynamische Stabilität nach einer Woche antihypertensiver Therapie mit Phenoxybenzamin oder Nifedipin .....</i>	<i>21</i>
2.2.7.1	<i>Echokardiographie.....</i>	<i>23</i>
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	24
2.3.1	<i>RNA-Isolierung.....</i>	<i>25</i>
2.3.2	<i>cDNA-Synthese .....</i>	<i>26</i>
2.3.3	<i>Realtime-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) .....</i>	<i>27</i>
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	29

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
3.1	VERSUCHSREIHE 1 .....	30
3.1.1	<i>Akute und chronische Katecholaminexposition ohne antihypertensive Therapie</i> .....	30
3.1.2	<i>Hämodynamische Stabilität nach einmaliger intravenöser Applikation von Phenoxybenzamin, Urapidil oder Nitrendipin</i> .....	33
3.2	VERSUCHSREIHE 2 .....	37
3.2.1	<i>Hämodynamische Effekte nach einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung mit POB oder Nifedipin</i> .....	37
3.2.2	<i>Hämodynamische Stabilität nach einwöchiger medikamentöser Vorbehandlung und zusätzlicher antihypertensiver Therapie</i> .....	43
3.2.3	<i>Echokardiographie und Herzfrequenz vor und nach dreiwöchiger Noradrenalinexposition und einwöchiger antihypertensiver Therapie</i> .....	47
3.2.4	<i>Relative Rezeptorexpressionsunterschiede nach dreiwöchiger Noradrenalinexposition und einwöchiger antihypertensiver Therapie im linken Ventrikel und der Aorta abdominalis</i> .....	48
3.2.4.1	Relative Rezeptorexpressionsunterschiede im linken Ventrikel .....	48
3.2.4.2	Relative Rezeptorexpressionsunterschiede in der Aorta abdominalis	51
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>67</b>
7.1	STECKBRIEFE DER EINGESETZTEN PHARMAKA .....	67
7.1.1	<i>Noradrenalin</i> .....	67
7.1.2	<i>Phenoxybenzamin</i> .....	69
7.1.3	<i>Urapidil</i> .....	71
7.1.4	<i>Nitrendipin</i> .....	72
7.1.5	<i>Nifedipin</i> .....	74
7.2	ABKÜRZUNGEN .....	76
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>78</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Phäochromozytom**

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert das Phäochromozytom als endokrinen Tumor der aus chromaffinen Zellen entsteht [1]. Er geht vor allem vom Nebennierenmark aus, kann aber auch in den Grenzstrangganglien entstehen und wird dann als Paragangliom bezeichnet [2]. Phäochromozytome sind zwar selten, können aber durch eine plötzliche Katecholaminfreisetzung zu gefährlichen hypertensiven Krisen führen, die mit Herzinfarkt [3], Arrhythmie [4, 5] oder Schlaganfall [6, 7] einhergehen können [3, 5-9]. Dieser Tumorentität kommt klinisch und differentialdiagnostisch somit eine große Bedeutung zu [9]. Die Therapie der Wahl und das einzig kurative Verfahren ist die chirurgische Resektion [10-13].

Verlässliche Angaben zur Inzidenz existieren nicht. Die Prävalenz unter den Patienten mit sekundärer Hypertonie wird mit 0,1-0,6% angegeben [14-16]. Bei Patienten mit Inzidentalomen findet sich in 8% ein Phäochromozytom, in 9% ein Myelolipom und in 10% ein adrenokortikales Karzinom. Am häufigsten werden Metastasen (19%) und Adenome (41%) diagnostiziert [17]. In der Mehrzahl sind Phäochromozytome adrenaler Genese und kommen unilateral vor. Die Prävalenz extradrenaler Neoplasien liegt nur bei etwa 20% [18, 19]. Maligne Tumorvarianten sind seltener, werden aber in bis zu 30% der extraadrenalen Neoplasien bestätigt [20].

Die Tumoren produzieren Noradrenalin [2, 21-23], Adrenalin [22] oder Dopamin [24, 25], wobei Kombinationen dieser Hormone möglich sind [22, 24, 25]. Der Großteil der Neoplasien sezerniert Noradrenalin [2, 21-23]. Eine Dopaminsekretion lenkt den Verdacht auf ein malignes Phäochromozytom [24, 26], wohingegen eine Adrenalinfreisetzung für die Herkunft aus dem Nebennierenmark spricht.

Die physiologischen Plasmaspiegel liegen beim Menschen bei 0-100 ng/l (Adrenalin) und 0-500 ng/l (Noradrenalin).

Heute ist bekannt, dass verschiedene intraoperative Ereignisse wie zum Beispiel die Tumormanipulation (s. Tabelle 1) mit plötzlichen exzessiven Anstiegen der Hormonspiegel und hämodynamischen Instabilitäten korrelieren (s. Abbildung 1) [5, 27]. Neben direkten Zusammenhängen mit intraoperativen Prozeduren [27-29] sind auch hämodynamische Dekompensationen im Alltag z. B. durch Anstrengung, Nahrungsaufnahme oder Miktion beschrieben [8, 30].

**Tabelle 1: Katecholaminspiegel und intraoperative Ereignisse**

Ereignis	Noradrenalinspiegel [ng/l]	Adrenalinsspiegel [ng/l]
15 min nach Pneumoperitoneum	1848 [711-6706]	568 [88-3688]
bei Manipulation an der Nebenniere	8774 [962-29.089]	5150 [93-11.440]

Die Daten sind als Median [Minimum-Maximum] angegeben. Es handelt sich um Absolutwerte gegenüber den Plasmakonzentrationen vor Luftinsufflation von 0-100 ng/l für Adrenalin und 0-500 ng/l für Noradrenalin [27].

Das klinische Erscheinungsbild ist variabel [8] und der Tumor wird in der Literatur daher auch als „Great mimic“ [8, 10] bezeichnet. Unterschiedliche sekretorische Profile, eine akute und chronische Hormonsekretion sowie unterschiedliche Katecholaminsensitivitäten (s. Abbildung 1) tragen zum breiten Spektrum der klinischen Manifestationen bei [13, 19].

Zu den häufigsten Symptomen gehören arterielle Hypertonie, intensive holozepale Kopfschmerzen, Palpitationen und Tachykardien sowie Schweißausbrüche [8]. Metabolische Entgleisungen wie Hyperglykämie, Laktatazidose und Gewichtsverlust [31] werden ebenso beobachtet wie ein akutes inflammatorisches Syndrom [32]. Die Hauptmanifestation am Herz ist die hypertensiv bedingte hypertrophe Kardiomyopathie [33, 34]. Bei noradrenalinsezernierenden Tumoren wird gehäuft ein persistierender Hypertonus beobachtet [10, 19]. In 10-17% der Fälle finden sich vor allem paroxysmale Symptome, wie Tachykardien, Palpitationen oder Schweißausbrüche, die vor allem von Dopamin oder Adrenalin verursacht werden [10, 19].

Die Diagnose verzögert sich durch die häufig unspezifischen Symptome [13]. Differentialdiagnostisch kommen unter anderem eine essentielle Hypertonie, Panikattacken, ein Karzinoid-Syndrom, oder zerebrale Neoplasien in Frage [8, 35-37]. Die Messung der Metanephrine im Urin und Plasma hat die Diagnostik deutlich vereinfacht, da diese Metabolite der Katecholamine unabhängig von einem paroxysmalen Hormonexzess erhöht sind [19, 38, 39]. Die biochemische Testung führt in mehr als 95% der Fälle zur Diagnosesicherung und muss vor einer Bildgebung durchgeführt werden [19, 39].

Der Schweizer Chirurg C. Roux führte 1926 in Lausanne die erste erfolgreiche chirurgische Tumorresektion durch [10-13]. Heute kann der Tumor laparoskopisch reseziert werden [40-44]. Verbesserungen der Diagnostik, insbesondere der Lokalisationsdiagnostik, der medikamentösen Vorbehandlung und der perioperativen hämodynamischen Stabilisierung sowie Neuerungen in Anästhesie und operativer Technik ließen die Mortalität im letzten Jahrhundert von 20-45% [45] auf 0-2,8% [46-48] sinken [8, 49-51].

Durch hypertensive Entgleisungen kann ein nicht erkanntes Phäochromozytom jedoch nach wie vor einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen [2, 6, 52]. Die Mortalität wird in diesen Fällen mit bis zu 80% angegeben [53].

### **1.2 Pharmakotherapie des Phäochromozytoms**

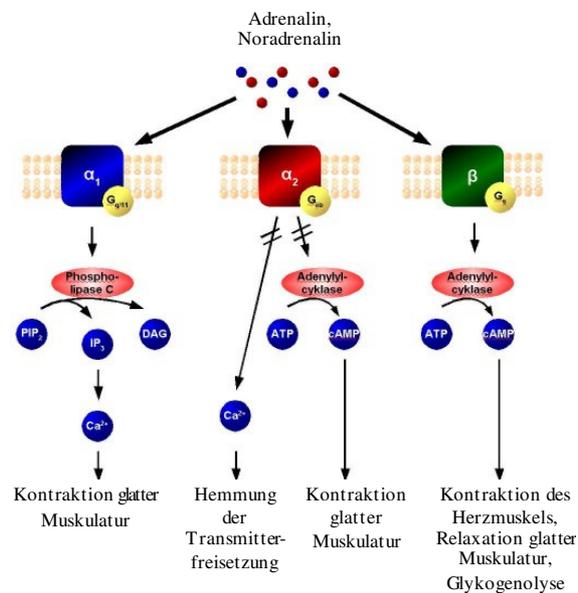
Der präoperativen antihypertensiven Therapie kommt klinisch große Bedeutung zu [1, 5, 44]. Zusätzlich kann die intraoperative Gabe von Antihypertensiva notwendig werden [5, 10, 35, 54, 55].

In der Vorbehandlung wird verbreitet der irreversible  $\alpha$ -Blocker Phenoxybenzamin (POB) eingesetzt. Dadurch konnte die hämodynamische Stabilität deutlich verbessert werden [2, 9, 49, 56]. Allerdings kann die prolongierte Wirkung zu postoperativen Komplikationen mit Hypotonien führen. Zudem besteht eine ausreichende präoperative Dosierung erst, wenn zum Beispiel posturale Hypotensionen auftreten (siehe unten), weshalb die Therapie gelegentlich nicht gut toleriert wird [8, 57,].

Aufgrund einer möglicherweise besseren Verträglichkeit werden reversible  $\alpha_1$ -Antagonisten (Urapidil [28], Prazosin [58, 59], Doxazosin [60, 61]) und Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ (Nitrendipin [62], Nifedipin [63], Nicardipin [48, 54, 55]) als Alternativen diskutiert.

In Abwesenheit kontrollierter Studien sprach auch das internationale Symposium zum Phäochromozytom (ISP) 2005 in Bethesda (USA) keine Medikamentenempfehlung aus, riet aber zu präoperativer Medikation [13, 44].

### 1.2.1 Irreversible unselektive $\alpha$ -Adrenozeptorantagonisten



---

**Abbildung 1: Signaltransduktion der adrenergen Rezeptoren**

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Sven Jähnichen (Urheber).

Adrenerge Rezeptoren (AR) sind G-Protein gekoppelt und werden in  $\alpha$ -/ und  $\beta$ -Subtypen unterteilt. Über  $G_s$ -/ und  $G_i$ -Proteine wird Einfluss auf den sekundären Botenstoff cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) genommen. cAMP-getriggert werden Phosphorylierungsprozesse verändert und es erhöht oder erniedrigt sich z. B. der Calciuminflus in die Zelle. So kann u. a. die Kontraktionskraft am Herzen gesteigert werden. Die Noradrenalinfreisetzung kann durch  $\alpha_2$ -AR vermittelte  $G_i$ -Stimulation gesenkt werden (negativer Feedback).  $G_q$ -getriggert vermittelt der  $\alpha_1$ -AR eine Phosphorylierung von L-Typ-Calciumkanälen und eine Erhöhung des Calciumeinstroms in die Zelle [64-72].

**Tabelle 2: Wirkprofil von Phenoxybenzamin**

blockierter Rezeptor	Wirkmechanismus	Effekte	Nebenwirkungen
$\alpha_1$	irreversibel, nicht kompetitiv	Vasodilatation und RR↓, intravaskulärer Volumenverbrauch↑	positive Chrono-/Inotropie am Herzen (Reflextachykardie),
$\alpha_2$	irreversibel, nicht kompetitiv	Unterbindung des negativen Feedback und NA-Freisetzung↑	Kopfschmerzen, arterielle und orthostatische Hypotension, Hypoglykämie, Hypovolämie, periphere Ödeme

[10, 12, 60, 72-75]

Seit den 50er Jahren ist POB ein wichtiges Medikament in der präoperativen Behandlung des Phäochromozytoms (s. Tabelle 2) [2, 9, 49, 61, 76]. Es muss mit einer niedrigen Dosis gestartet und diese dann alle zwei bis drei Tage bis zu einer maximalen Dosis von 1 mg/kg KG/Tag gesteigert werden [8].

Zur Überprüfung einer ausreichenden  $\alpha$ -Blockade werden folgende Kriterien herangezogen [8, 57]:

- (1) Blutdruck < 160/90 mmHg für mindestens 24 Stunden
- (2) orthostatische Hypotension nicht < 80/45 mmHg
- (3) nicht mehr als eine Extrasystole alle 5 min
- (4) keine ST-Strecken Veränderungen und T-Wellen Umkehrungen im EKG für eine Woche

Auch wenn eine Therapie mit POB zum Beispiel den Vorteil einer langen Wirkungsdauer aufgrund der irreversiblen Bindung am adrenergen Rezeptor bietet (s. Abbildung 1 und Tabelle 2), sind Nebenwirkungen zu berücksichtigen (s. Tabelle 2 und 3).

Die Behandlung mit POB wird häufig nicht gut toleriert [8, 57, 77] und kann z. B. mit schweren postoperativen Hypotonien einhergehen, die sogar katecholaminpflichtig sein können (s. Tabelle 2 und 3) [8, 9, 77, 78]. Eine Herunterregulierung der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren, das katecholaminbedingt reduzierte intravasale Volumen und der plötzliche Katecholaminabfall durch die Tumorentfernung werden dafür verantwortlich gemacht [12, 74]. Um einer Hypovolämie entgegenzuwirken, wird präoperativ begonnen das Plasmavolumen um mindestens 2 Liter aufzufüllen [9, 78]. Tachykardien können durch zusätzliche Gabe eines  $\beta$ -Blockers kontrolliert werden (s. Abbildung 1 und Tabelle 2). Dieser darf nicht vor Beginn einer  $\alpha$ -Blockade gegeben werden, da sonst durch alleinige  $\alpha$ -adrenerge Wirkung der Katecholamine an den Gefäßen schwere hypertensive Krisen verursacht werden können (s. Abbildung 1) [8, 10].

Trotz adäquater Blockade berichten allerdings einige Autoren von signifikanten Blutdruckerhöhungen während der Tumormanipulation [9, 10, 47, 56].

**Tabelle 3: Vor-/ und Nachteile einer Phenoxybenzamintherapie**

Vorteile	Nachteile
lange Wirkdauer aufgrund der irreversiblen Bindung am Rezeptor	irreversible Rezeptorblockade, von Rezeptorneusynthese abhängig
nur zweimal tägliche orale Applikation nötig	zusätzliche $\alpha_2$ -Blockade durch fehlende Selektivität, dadurch Unterbindung des negativen Feedback mit positiv chronotropen Effekten am Herzen
nicht-kompetitive Blockade ohne Verdrängung durch hohe Konzentrationen des Agonisten	hoher postoperativer Flüssigkeitsbedarf und Hypotension

[8, 9, 30, 49, 73, 75, 77-80]

### 1.2.2 Reversible kompetitive $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten

**Tabelle 4: Wirkprofil von  $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten**

blockierter Rezeptor	Wirkmechanismus	Effekte	Nebenwirkungen
$\alpha_1$	reversibel, kompetitiv	Vasodilatation und RR↓, zentral blutdrucksenkende Wirkung von Urapidil durch Agonismus am 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor	first-dose-Phänomen, orthostatische Störungen, Übelkeit, Kopfschmerzen

[28, 58, 65, 72]

Vor allem wegen einer besseren Verträglichkeit aufgrund eines kürzeren Wirkungsmechanismus (s. Abbildung 1 und Tabelle 4 und 5) werden Medikamente dieser Klasse als mögliche Alternativen gegenüber einer POB-Behandlung gesehen (s. Tabelle 5). Die tägliche orale Dosis liegt bei 2-16 mg für Doxazosin [9].

Kompetitive reversible Antagonisten werden durch hohe Konzentrationen des Agonisten zum Beispiel von Noradrenalin verdrängt.

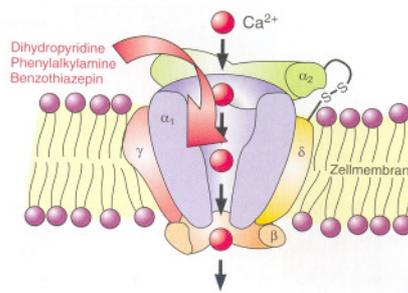
Möglicherweise resultiert daraus ein nicht ausreichender Schutz vor hypertensiven Krisen. Durch den Einsatz hoher Dosen sind allerdings im Rahmen eines Klasseneffekts ähnliche Nebenwirkungen zu erwarten wie bei der POB-Behandlung [77].

**Tabelle 5: Vor-/ und Nachteile einer Therapie mit  $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten**

Vorteile	Nachteile
reversibler Antagonismus mit kurzer Wirkung	kompetitive Verdrängung durch Agonisten und dadurch unzureichender Schutz
keine schwere Reflextachykardie, keine schweren postoperativen Hypotonien zu erwarten	mehrmalige orale Applikationen und hohe Dosen nötig, die mit Nebenwirkungen verbunden sein können

[9, 12, 58, 77]

### 1.2.3 L-Typ-Calciumkanalantagonisten vom Dihydropyridin-Typ



**Abbildung 2: L-Typ-Calciumkanal [81]**

L-Typ-Calciumkanäle sind spannungsabhängige Ionenkanäle und finden sich in glatten Gefäßmuskelzellen, dem Herzmuskel, sowie Sinus-/und AV-Knoten. Bei Depolarisation kommt es zum langsamen Calciumeinstrom in die Zelle, der für die elektromechanische Kopplung essentiell ist.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist die Bindungsstelle der Calciumantagonisten vom Dihydropyridin-Typ.

L-Typ steht für engl.: long lasting, high voltage activated [65, 72, 82, 83].

**Tabelle 6: Wirkprofil von Dihydropyridinen**

blockierter Rezeptor	Wirkmechanismus	Effekte	Nebenwirkungen
$\alpha$ -1c-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals	reversibel, kompetitiv	Relaxation der glatten Muskulatur mit RR↓, negative Chrono-/Inotropie, katecholamin-induzierte Vasospasmen↓	periphere Ödeme, Reflextachykardie, Flush, Kopfschmerzen

[9, 12, 54, 65, 72, 78, 83]

Auch Dihydropyridine werden als medikamentöse Alternativen verwendet. Als tägliche orale Dosis werden 30-90 mg/d Nifedipin eingesetzt [9]. Durch ihre Bindung an die  $\alpha$ -1c-Untereinheit des Rezeptors wird der katecholaminbedingte Calciuminflux in die Zelle unterbunden und eine Relaxation der glatten Muskulatur erreicht (s. Abbildung 2) [12, 82]. Die resultierende Nachlastsenkung bewirkt einen Blutdruckabfall (s. Tabelle 6), ohne mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einherzugehen (s. Tabelle 7).

**Tabelle 7: Vor-/ und Nachteile einer Therapie mit Dihydropyridinen**

Vorteile	Nachteile
keine Hypotension	möglicherweise nicht ausreichender Schutz vor hypertensiven Krisen
Prävention von Koronarspasmen und Myokarditis	
gute Verträglichkeit	

[9, 12, 54, 78]

### **1.3 Fragestellung und Studiendesign**

Ziel der Arbeit war es, den Stellenwert einzelner Behandlungsregime unter kontrollierten Bedingungen im Tierversuch zu analysieren.

Die Studie wurde im Rattenmodell unter Simulation der akuten und chronischen Katecholaminsekretion des Tumors durchgeführt. Davon ausgehend, sollte neben der Untersuchung des präventiven Effekts ausgewählter Antihypertensiva gegenüber unkontrollierten Blutdruckanstiegen auch deren Stellenwert in der Vorbehandlung charakterisiert werden. Unsere Hypothese, dass Calciumkanalblocker und reversible  $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten eine ausreichende hämodynamische Stabilität verglichen mit Phenoxybenzamin bieten, sollte geprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

##### Tierhaltung:

Isolator: Scantainer®, Scanbur A.S., Dänemark

##### Anästhesie:

Isofluran Vapor 19.3: Dräger Medizintechnik GmbH, München,  
Deutschland

Beatmungsgerät für Nagetiere: Harvard Apparatus Co., South Natick,  
Massachusetts, USA

##### Blutdruckdetektion:

PowerLap 4/25 und 4SP: ADInstruments Pty Ltd., Bella Vista,  
Australien

Datenerfassungssysteme: ADInstruments Pty Ltd., Bella Vista,  
ML 125 NIPB Controller und ML 845 Australien

Microtip Manometer: Millar Instruments, Texas, USA

##### Sonstiges:

Osmotische Minipumpen: Alzet®, Durect Corp., Kanada

Typ 2ML4 und Model 2001

Wärmeplatte: Thermotex, Breuer, Deutschland

Sonographiegerät Toshiba Aplio  
und Analyse-Software NICE Toshiba Medical Systems, Niederlande

Perfusor: Perfusor®fm, Braun, Melsungen,  
Deutschland

Digitale Waage: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

### Molekularbiologische Untersuchungen:

UltraTurrax Homogenisierungsstab: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Mastercycler Gradient: Bio-Rad Laboratories GmbH, München,  
Deutschland

iCycler iQ™ : Bio-Rad Laboratories GmbH, München,  
Deutschland

Biophotometer: Eppendorf, Deutschland

### **2.1.2 Reagenzien**

Natriumchloridlösung 0,9%: Fresenius Kabi, Deutschland

Ascorbinsäure: Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO 99,9%): Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Alkohol (reinst): J. T. Baker, Deutschland

Isopropanol: Merck Chemicals, Deutschland

Chloroform: Carl Roth GmbH, Deutschland

Diethylpyrocarbonat (DEPC): Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Oligonukleotide: MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland  
und Thermo Electron GmbH, Ulm,  
Deutschland

TRIzol® Reagenz: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

SybrGreen® Supermix: Bio-Rad Laboratories GmbH, München,  
Deutschland

iScript™ cDNA-Synthese-Kit: Bio-Rad Laboratories GmbH, München,  
Deutschland

### 2.1.3 Medikamente

#### Anästhetika:

Ether: Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Isofluran: Baxter AG, Deutschland

#### Antihypertensive Medikamente:

Urapidil: i. v. Applikation Ebrantil®, Altana Pharma, Konstanz,  
Deutschland

kontinuierliche Infusion Ebrantil®, Altana Pharma, Konstanz,  
Deutschland

Nitrendipin: i. v. Applikation Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

POB: i. v. Applikation Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Applikation via Pumpe Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Nifedipin: kontinuierliche Infusion Adalat® pro infusione, Bayer HealthCare  
AG, Leverkusen, Deutschland

Applikation via Pumpe Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Deutschland

Sonstige:

Noradrenalin: i. v. Applikation	Arterenol®, Sanofi-Aventis, Deutschland
Applikation via Pumpe	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Heparin-Natrium:	Braun, Deutschland

## **2.2 Tierexperimenteller Teil**

### **2.2.1 Tiere**

Männliche, 12-Wochen alte, 300-350 g schwere Wistar Ratten, bezogen von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) wurden unter konstanten Bedingungen bei 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten, die ein Isolator (Scantainer®) aufrecht erhielt. Die Tiere waren in Plexiglaskäfigen mit Gitterrostoberseite zu je 4-5 Tieren untergebracht, unterlagen einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus und hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

### **2.2.2 Allgemeines Protokoll-/ und Studiendesign**

Nach einer Eingewöhnungsphase von einigen Tagen, einer nicht-invasiven Blutdruckmessung (s. Abbildung 3), sowie einer Gewichtsbestimmung wurde den Wistar Ratten eine osmotische, noradrenalinfreisetzende Minipumpe von Alzet® implantiert, um einen chronischen Katecholaminexzess zu simulieren (s. Abbildung 4). Einmal wöchentlich wurden nicht-invasive Blutdruckkontrollen durchgeführt (s. Abbildung 3). Das Körpergewicht wurde mit einer digitalen Waage (Sartorius AG) bestimmt.

Nach dreiwöchigem NA-Exzess fand eine hämodynamische Messung statt und POB, Urapidil und Nitrendipin (Versuchsreihe 1, n=13) bzw. Urapidil und Nifedipin (Versuchsreihe 2, n=26) wurden bezüglich ihres protektiven Effekts gegenüber akuten Katecholaminkrisen untersucht (s. Abbildung 4 und 5).

Die hypertensiven Entgleisungen wurden durch Noradrenalin-Boli in aufsteigender Dosis (0,1; 1; 10; 100; 1000  $\mu\text{g/kg KG}$ ) ausgelöst. In Versuchsreihe 2 (n=26) wurden 19 Tiere mit POB oder Nifedipin während der chronischen Katecholaminexposition vorbehandelt. Die übrigen Tiere bildeten die Kontrollgruppe (n=7) (s. Abbildung 5).

Nach dreiwöchigem NA-Exzess erfolgte die - nach Blutdruck gematchte - Aufteilung der Tiere in die Medikamentengruppen. So konnte Strukturgleichheit gewährleistet werden (s. Abbildung 4 und 5).

Im Anschluss an die Messungen, wurde - nach Vertiefung der Narkose - das Gewebe des linken Ventrikels und der Aorta der Tiere entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Untersuchung wurde das Gewebe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Sämtliche Protokolle wurden vom lokalen Tierschutzkomitee der Regierung von Unterfranken geprüft und genehmigt. Die Durchführung der Versuche erfolgte unter Berücksichtigung der Richtlinien des National Institute of Health (National Institute of Health Guide for the care and use of laboratory animals).

### **2.2.3 Pumpenimplantation**

Die Implantation der 50  $\mu\text{g}$  Noradrenalin/h freisetzenden Pumpe vom Typ 2ML4 (Alzet®, 2,5  $\mu\text{l/h}$ ) wurde am Rücken durch eine kleine Hautinzision subkutan in eine präparierte Gewebetasche vorgenommen. Der Eingriff erfolgte unter Maskennarkose mit einem Isofluran-/ Sauerstoffgemisch (1,5% Isofluran, 0,5 l  $\text{O}_2/\text{min}$ ) [84, 85] bei spontaner Atmung auf einer  $38^{\circ}\text{C}$  Wärmeplatte (Thermotex).

Die Pumpenbefüllung mit Noradrenalin (L-Norepinephrin Bitartrat gelöst in Ascorbinsäure 50 mM/NaCl 0,9%) [86-88] erfolgte unmittelbar zuvor nach Anleitung des Herstellers.

#### **2.2.4 Nicht-invasive Blutdruck-/ und Gewichtskontrollen**

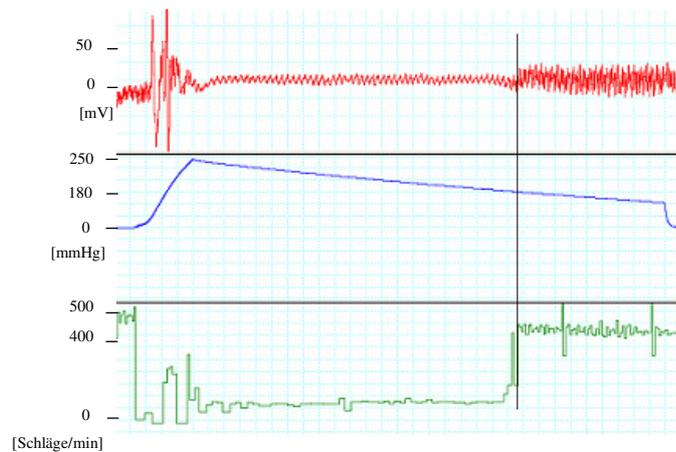
Die Messung des systolischen Blutdrucks vor Pumpenimplantation, sowie die Verlaufskontrollen in den drei Wochen bis zur Hämodynamik wurden nicht-invasiv mittels tail-cuff Methode durchgeführt (s. Abbildung 3) [89-92].

Bei der Untersuchung befanden sich die wachen Tiere in Plexiglaskäfigen (Restrainer), die auf einer konstant 38°C warmen Platte (Thermotex) standen, um die Durchblutung der Schwanzarterie zu fördern. Die Tiere wurden zunächst über einige Tage an die Restrainer und das Geräusch durch den Druckgenerator gewöhnt.

Zur Messung wurde eine Druckmanschette mit integriertem Pulsensor am oberen Teil des Schwanzes angebracht. Die Manschette wurde automatisch auf 300 mmHg aufgepumpt, um die Durchblutung der Schwanzarterie zu unterbinden und langsam mit etwa 12 mmHg/s entlastet. Als systolischer Druck wurde der Wert beim erstmaligen Auftreten von gleichförmigen Oszillationen - bedingt durch das Wiederöffnen der Schwanzgefäße - registriert (s. Abbildung 3).

Die Aufzeichnung erfolgte mit dem PowerLap 4/25 Datenerfassungssystem ML125 NIPB Controller und mit der Chart 5 Software (ADInstruments) mit der die Daten auch ausgewertet wurden. Es wurde jeweils aus drei Druckmessungen der arithmetische Mittelwert bestimmt.

Mit Blutdruck, Druck oder RR ist - sofern nicht anders gekennzeichnet - der systolische Blutdruck gemeint.



---

### **Abbildung 3: Nicht-invasive Blutdruckmessung mit der tail-cuff-Methode**

Beim erstmaligen Auftreten von gleichförmigen Oszillationen, die durch die schwarze Linie markiert sind, wurden der systolische Blutdruck [mmHg] und die Herzfrequenz [Schläge/min] abgelesen.

Gewichtskontrollen wurden unmittelbar vor der Pumpenimplantation und der Hämodynamik mit einer digitalen Waage (Sartorius AG) durchgeführt.

#### **2.2.5 Hämodynamik**

Nach drei Wochen kontinuierlicher Noradrenalinbehandlung wurde den Tieren - nach Einleitung mit Ether und einer Gewichtsbestimmung - ein Polyethylen-Katheter in die rechte Arteria carotis zur Aufzeichnung des Blutdrucks gelegt. Die Tiere wurden dazu intubiert und narkotisiert (1,5-2% Isofluran und 0,5 l O<sub>2</sub>/min) [84, 85, 93].

Der venöse Zugang zur Verabreichung der Medikamente erfolgte über die rechte Vena jugularis [85, 94].

Mittels kalibriertem Microtip Manometer (Millar Instruments) wurden die Druckkurven detektiert.

Die Aufzeichnung der hämodynamischen Indizes erfolgte bei leichter Isofluran-Anästhesie [84, 85] mit dem PowerLab 4SP Datenerfassungssystem ML845 und der Chart 5 Software (ADInstruments), mit der auch deren Auswertung vorgenommen wurde.

Im Anschluss an die Platzierung der Katheter wurde zunächst Heparin (100 IE/kg KG) intravenös appliziert und eine Blutdruckstabilisation abgewartet. Nach jeder weiteren Injektion wurde immer erst nach Einstellung eines stabilen Blutdruckwertes mit dem Versuchsprotokoll fortgefahren (s. Abbildung 4 und 5).

Im Rahmen der Messungen wurden - mit und ohne antihypertensive Therapie - akute Katecholaminkrisen simuliert und der protektive Effekt einzelner Medikamente gegenüber hypertensiven Zuständen untersucht. Die Simulation der akuten Katecholaminexzesse wurde durch intravenös verabreichte Noradrenalin-Boli in aufsteigender Dosis (0,1-1000  $\mu$ g/kg KG) erreicht (s. Abbildung 4 und 5).

Bei der gesamten Versuchsreihe wurde darauf geachtet, dass der Blutdruck der Tiere 250 mmHg systolisch nicht überschreitet und gegebenenfalls auf eine höhere Dosierung verzichtet.

Im Rahmen der Auswertung der Messungen wurden die folgenden Parameter analysiert [95]:

- (1) der maximale systolische Blutdruck
- (2) die Anzahl hypertensiver Episoden (Anstiege des systolischen Drucks um mehr als 30 mmHg)
- (3) die Anzahl schwerer hypertensiver Episoden (Anstiege des systolischen Blutdrucks auf mehr als 200 mmHg)

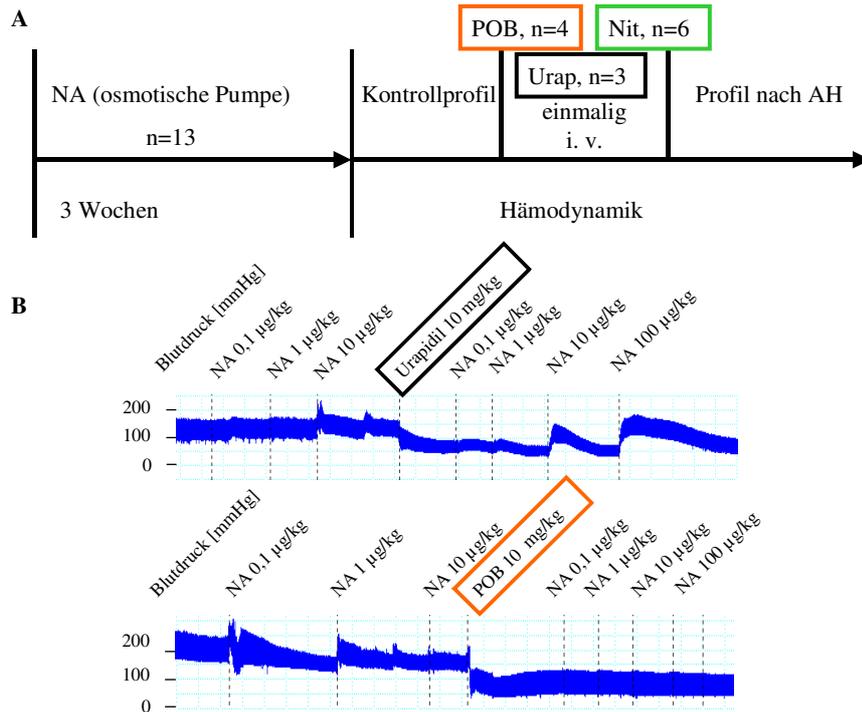
Von jedem Tier wurden zwei hämodynamische Profile erstellt und verglichen: vor der antihypertensiven Therapie (Kontrollprofil) und nach deren Verabreichung (s. Abbildung 4 und 5 ).

### **2.2.6 Versuchsreihe 1: Hämodynamische Stabilität nach einmaliger intravenöser Applikation von Phenoxybenzamin, Urapidil oder Nitrendipin**

In einem ersten Studienteil wurde der protektive Effekt einer einmaligen intravenösen Gabe von Phenoxybenzamin, einem irreversiblen  $\alpha$ -Blocker, Urapidil, einem reversiblen  $\alpha_1$ -Blocker und Nitrendipin, einem langwirksamen L-Typ-Calciumkanalantagonist, gegenüber hypertensiven Zuständen untersucht (s. Abbildung 4).

Im Sinne eines proof-of-principle-Experiments, wurden nach der dreiwöchigen Behandlung mit Noradrenalin im Rahmen der hämodynamischen Messungen die akuten Katecholaminkrisen vor und nach Injektion eines i. v. Bolus von entweder POB (10 mg/kg KG, gelöst in 10% DMSO/Wasser, n=4), Urapidil (10 mg/kg KG, Ebrantil®, n=3) oder Nitrendipin (600  $\mu$ g/kg KG, gelöst in 10% DMSO/Wasser, n=7) simuliert (s. Abbildung 4).

Bei der Auswahl der Dosen der antihypertensiven Medikamente wurde ein hoher Dosisbereich gewählt um einen maximalen Effekt zu untersuchen (s. Tabellen im Anhang unter 7.1).



**Abbildung 4: Experimentelles Design (A) und Drug Effect Monitoring (B)**

- (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des ersten Studienteils (n=13).
- (B) Exemplarisch dargestellt sind hämodynamische Profile, vor und nach einmaliger i. v. Applikation von POB (10 mg/kg KG, n=4) und Urapidil (10 mg/kg KG, n=3), (Nitrendipin 600 µg/kg KG, n=6, ist nicht dargestellt). Die Tiere waren zuvor für drei Wochen chronisch NA- exponiert (50 µg/h).

AH: Antihypertensivum, NA: Noradrenalin, POB: Phenoxybenzamin, Urap: Urapidil, Nit: Nitrendipin

Zur Auswahl der Medikamente und Dosierungen siehe Tabelle im Anhang unter 7.1.

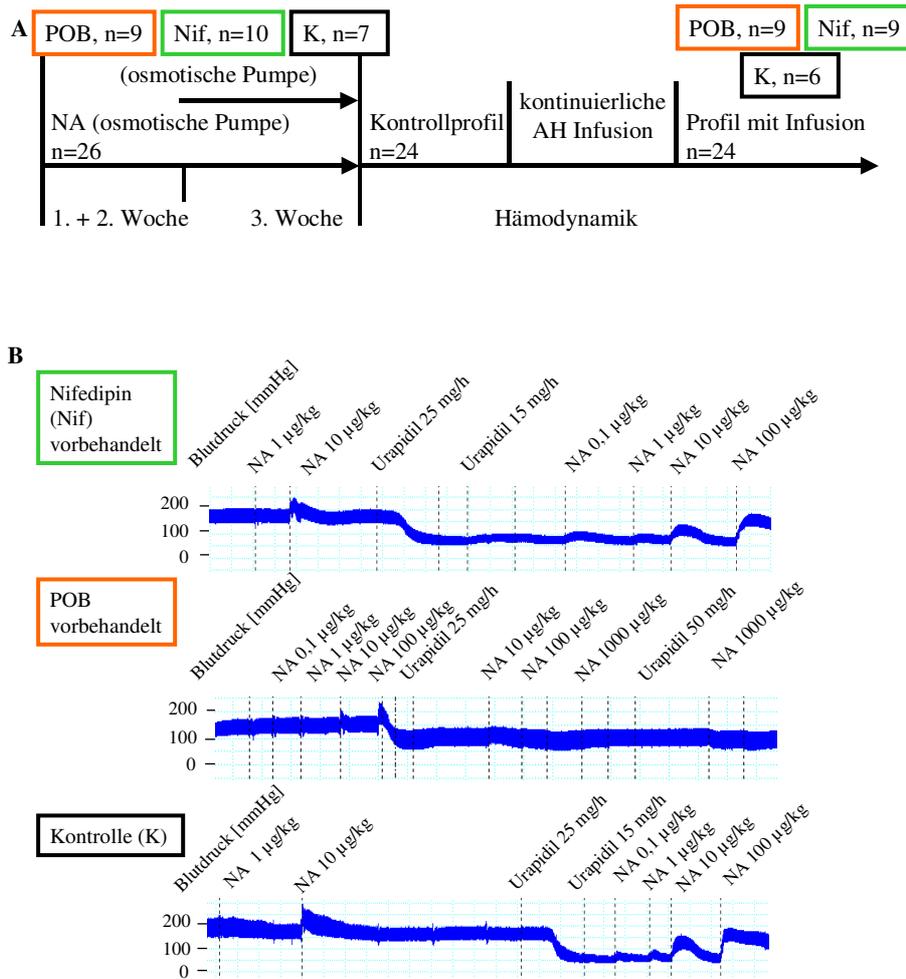
### **2.2.7 Versuchsreihe 2: Hämodynamische Stabilität nach einer Woche antihypertensiver Therapie mit Phenoxybenzamin oder Nifedipin**

Im Rahmen eines zweiten Studienteils wurde der Effekt einer kontinuierlichen einwöchigen antihypertensiven Therapie über eine weitere osmotische Pumpe mit entweder POB (10 mg/kg KG/Tag, gelöst in 10% DMSO/H<sub>2</sub>O, n=9) oder Nifedipin (10 mg/kg KG/Tag, gelöst in 10% DMSO/H<sub>2</sub>O, n=10), einem kurz wirksamen L-Typ-Calciumkanalblocker, auf die hämodynamische Stabilität untersucht (s. Abbildung 5). Die Pumpen der Kontrollgruppe wurden mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (10% DMSO/H<sub>2</sub>O, n=7) befüllt.

Nach zweiwöchiger Noradrenalinbehandlung, wurde den Tieren dieser Versuchsreihe die medikamentenbefüllte Pumpe (Model 2001, 1 µl/h, Alzet®) eingesetzt. Unter Maskennarkose bei spontaner Atmung (1,5% Isofluran, 0,5 l O<sub>2</sub>/min) [84, 85], wurde die Pumpe subkutan zwischen den Schulterblättern platziert.

Nach einer weiteren Woche erfolgten die hämodynamischen Messungen. Zunächst wurden die Katecholaminkrisen ohne weitere Therapie simuliert, anschließend unter zusätzlicher antihypertensiver Therapie mit Urapidil (Ebrantil®, n=11) oder Nifedipin (Adalat® pro infusione, n=13), die kontinuierlich intravenös über einen Perfusor (Perfusor®fm) gegeben wurden (s. Abbildung 5). Der zusätzliche venöse Zugang erfolgte über die rechte Vena femoralis. Die Infusionsrate wurde so gewählt, dass sich ein stabiler Blutdruck bei etwa 120 mmHg einstellte. Dies entsprach einer Dosis von durchschnittlich 1-2 mg/h für Nifedipin und 25-50 mg/h für Urapidil.

Auch die Dosen der in diesem Studienteil verwendeten Medikamente wurden hochdosiert verabreicht um maximale Effekte zu untersuchen (s. Tabellen im Anhang unter 7.1).



**Abbildung 5: Experimentelles Design (A) und Drug Effect Monitoring (B)**

- (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des zweiten Studienteils (n=26) mit einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung.
- (B) Exemplarisch dargestellt sind hämodynamische Profile eines Nifedipin (10 mg/kg KG/Tag, n=10), eines POB (10 mg/kg KG/Tag, n=9) sowie eines mit dem Lösungsmittel DMSO (1 µl/h, Kontrolle, n=7) behandelten Tieres, vor und nach zusätzlicher kontinuierlicher antihypertensiver Therapie mit Urapidil i. v. (15-50 mg/h). Alle Tiere waren zuvor für drei Wochen chronisch NA-exponiert (50 µg/h) und eine Woche antihypertensiv behandelt.

AH: Antihypertensivum, K: Kontrolle, NA: Noradrenalin, POB: Phenoxybenzamin,

Urap: Urapidil, Nif: Nifedipin, DMSO: Dimethylsulfoxid

Zur Auswahl der Medikamente und Dosierungen siehe Tabellen im Anhang unter 7.1.

### 2.2.7.1 Echokardiographie

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe fanden transthorakale echokardiographische Untersuchungen unter Narkose mit einem Isofluran-/Sauerstoffgemisch (Isofluran 1,5%, 0,5 l O<sub>2</sub>/min) [84, 85] bei spontaner Atmung statt.

Die Sonographie wurde von einer erfahrenen Untersucherin nach Einleitung mit Ether und Rasur der vorderen Thoraxwand in Rückenlage mit einem Toshiba Aplio Sonographiegerät (Toshiba, Medical Systems) und einem 15 MHz Ultraschallkopf auf einer Wärmeplatte mit 38°C vorgenommen.

Untersuchungen fanden vor Implantation der noradrenalinfreisetzenden Pumpe und unmittelbar vor Beginn der Hämodynamik nach drei Wochen statt.

Die Messungen im linken Ventrikel der Ratten wurden im 2D-Echtzeitmodus und im M-Mode (100 mm/s, engl.: motion mode) durchgeführt.

Im maximalen 2D-Durchmesser der parasternalen kurzen Achse wurden in apikaler Ebene (Vierkammerblick) und in Höhe des Papillarmuskels - bei einer Bilderfassungsrate von bis zu 100 MHz - neben der Herzfrequenz jeweils die folgenden Parameter bestimmt [96-98]. :

- (1) enddiastolischer und endsystolischer Durchmesser (EDD und ESD, engl.: end-diastolic-/systolic diameter) in [mm]
- (2) zweidimensionale Verkürzungsfraction (2D FS, engl.: fractional shortening) nach der Formel:  
$$\text{EDD-ESD/EDD} \times 100 \text{ [\%]}$$
- (3) enddiastolische Vorder-/ und Hinterwanddicke (EDVW und EDPW, engl.: end-diastolic posterior wall) in [mm]
- (4) enddiastolische und endsystolische Fläche (EDA und ESA) in [mm<sup>2</sup>]

Die endsystolischen und enddiastolischen Phasen wurden mit dem off-line-Analysesystem NICE (Toshiba Medical Systems) erfasst und die Auswertung (siehe oben) erfolgte verblindet nach standardisierten Kriterien [96].

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

Zur Bestimmung relativer Rezeptorexpressionsunterschiede wurde eine semiquantitative Realtime-PCR (Polymerase-Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction) durchgeführt. Die Realtime-PCR ist die Methode der Wahl zur Erfassung auch kleiner quantitativer Expressionsunterschiede [99]. Als Detektionssystem wurde der Fluoreszenzfarbstoff Sybr®Green eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet [99, 100].

cDNA des linken Ventrikels und der Aorta, Sybr®Green (Bio-Rad Laboratories GmbH), Primer der 1a-, 1b- und 1d-Untereinheit des  $\alpha_1$ -Rezeptors, und der  $\alpha$ -1c-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals wurden verwendet. Zur Standardnormalisierung wurde das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin, das stabil in allen kernhaltigen Zellen exprimiert ist, eingesetzt. Analysiert wurde Gewebe der POB (n=6)-/ und Nifedipin (n=5)-behandelten Tiere, der Kontrollgruppe (n=4) und von unbehandelten Tieren (n=3).

Die relativen Expressionsunterschiede wurden rechnerisch bestimmt. Aus den Ct-Werten (crossing threshold) des Ziel- und des Housekeeping-Gens (Referenzgen) für jeweils eine Probe und eine Kontrolle, wurde nach folgender Formel die relative Expression bestimmt (nach der Delta-delta Methode, PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, USA) [99, 101, 102]:

$$\text{relative Expression} = 2^{- (\Delta \text{ Ct Zielgen} - \Delta \text{ Ct Referenzgen})}$$

$$2 = \text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung der Kurve aus Ct-Werten und der Menge revers transkribierter RNA})}$$

$$\text{Referenzgen} = \beta\text{-Aktin}$$

$$\Delta \text{ Ct Zielgen} = \text{Ct Probe} - \text{Ct Kontrolle}$$

$$\Delta \text{ Ct Referenzgen} = \text{Ct Probe} - \text{Ct Kontrolle}$$

Für jede zu untersuchende Probe wurden je zwei Wells mit dem Zielgen-Primer (Probe und Kontrolle) und zwei mit dem Referenzgen-Primer (Probe und Kontrolle) pipettiert. Die Ct-Werte sind als die Punkte definiert, an denen die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt [102].

Die Ergebnisse wurde jeweils zu den Tieren der Kontrollgruppe oder den unbehandelten Tieren normalisiert und so das Verhältnis der relativen Expression (Ratio) [101, 102] bestimmt:

$$\frac{\text{relative Expression}_{\text{Tier aus Gruppe (POB, Nifedipin, Kontrolle)}}}{\Delta \text{ relative Expression}_{\text{Kontroll-Tiere (n=4) oder unbehandelte Tiere (n=3)}}}$$

### 2.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation erfolgte mit TRIzol® Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

#### Homogenisierung:

- (1) 1 ml TRIzol®/100 mg zum Gewebe des linken Ventrikels in das Rundbodenröhrchen geben
- (2) 30-sekündige Homogenisierung (UltraTurrax Homogenisierungsstab)
- (3) Proben in 2 ml Cups überführen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren

Der Homogenisierungsstab wurde immer sorgfältig mit DEPC-Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat/destilliertes Wasser) gereinigt.

#### Phasenseparation:

- (1) 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/min und 4°C
- (2) wässrigen Überstand mit der enthaltenen RNA in einen neuen Cup überführen und mit 200 µl Chloroform kräftig ausschütteln
- (3) Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 min
- (4) Zentrifugation für 15 min bei 10.000 U/min und 4°C, diesen Schritt zweimal wiederholen und die wässrigen Überstände jeweils in neue Gefäße überführen

RNA-Präzipitation:

- (1) Zugabe von 0,5 ml Isopropanol auf den Überstand
- (2) Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- (3) Zentrifugation für 10 min bei 10000 U/min und 4°C

RNA-Waschen:

- (1) vorsichtiges Abkippen des Überstandes
- (2) 1 ml 75%-ige DEPC-Wasser-Ethanol-Lösung zum Pellet pipettieren und leicht bewegen
- (3) bei 13.000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugieren

Lösen der RNA:

- (1) Überstand vorsichtig abkippen
- (2) RNA-Pellet bei Raumtemperatur für 10-20 min trocknen
- (3) 20-30 µl DEPC-Wasser zum Pellet pipettieren evtl. Cup kurz auf einen 50°C Wärmeblock stellen

RNA-Quantifizierung:

- (1) Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration [ng/µl] (Biophotometer, Eppendorf) in 1:70-Verdünnung
- (2) Bestimmung der optischen Dichte (OD) 260/280 nm und 260/230 nm um einen Hinweis auf eine Kontamination mit Proteinen oder Phenolaten zu bekommen

Ein Teil der RNA-Probe wurde nach ihrer Prüfung auf Reinheit direkt in cDNA umgeschrieben. Die übrige RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

**2.3.2 cDNA-Synthese**

Die RNA wurde mit dem iScript<sup>™</sup> cDNA-Synthese Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) in einem Mastercycler gradient (Eppendorf) nach folgendem Reaktionsansatz und Protokoll des Herstellers revers transkribiert:

Reaktionsansatz:

**Tabelle 8: Reaktionsansatz**

Reagenz	Volumen in [µl]
5 x iScript® Reaktions-Mix	4
iScript® - Reverse Transkriptase	1
Nuclease-freies Wasser	X
1 µg RNA	X
Gesamtvolumen	20

Programm:

**Tabelle 9: Programm**

Zeit in [min]	Temperatur in [°C]	Zyklen
5	25	1x
30	42	1x
5	85	1x

**2.3.3 Realtime-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Primer:

Die Primer wurden nach Pratt et al. [103] und Cavalli et al. [104] ausgewählt und mit dem Programm Primer3 [105] angepasst. MWG Biotech GmbH und Thermo Scientific synthetisierten die Oligonukleotide. Die Realtime-PCRs wurde mit dem iCycler™ (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt und ausgewertet.

Für die Erstellung der Reaktionsansätze und die Protokolle wurden Herstellerangaben berücksichtigt und gegebenenfalls angepasst.

**Tabelle 10: Primerbezeichnung und Sequenz**

Primerbezeichnung	Sequenz
CaCn $\alpha$ -1c forward	5'-GTG AGG CTG AGC GAA GAA G-3'
CaCn $\alpha$ -1c reverse	5'-TGA GAG ATG TCT CCC CCT TG-3'
$\alpha$ -AR 1a forward	5'-CTC GAG AGA AGA AAG CTG CC-3'
$\alpha$ -AR 1a reverse	5'-GGC TGG AGC ATG GGT ATA TG-3'
$\alpha$ -AR 1b forward	5'-CCA CTC CAA GAA CTT TCA TGA GGA CAC C-3'
$\alpha$ -AR 1b reverse	5'-ATG CAG CTG CCG CTG TCA TCC AGA GAG T-3'
$\alpha$ -AR 1d forward	5'-AGG TGG TTC TGA GGA TCC ACT GTC-3'
$\alpha$ -AR 1d reverse	5'-CGG AAC TTA TGG GAC AGG CTG GA-3'
$\beta$ -Aktin forward	5'-TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG-3'
$\beta$ -Aktin reverse	5'-TAC ATG GTC GGG GTG TTG AA-3'

**Tabelle 11: PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen in [ $\mu$ l]
SybrGreen® Supermix	12,5
destilliertes Wasser	6,25
Primer-Mix (forward und reverse) [500 nM]	1,25
cDNA aus 1 $\mu$ g RNA	5
Gesamtvolumen	25

**Tabelle 12: PCR-Programm**

Zeit in [min]	Temperatur in [°C]	Zyklen
3	95 (Initialisierung)	1x
1	95 (Denaturierung)	40x
1	65 (Annealing)	
1	72 (Extension)	
1	95 (Dissoziationskurve)	1x
1	56 (Dissoziationskurve)	1x
10 s	56+0,5 je Zyklus (Schmelzkurve)	80x

**Tabelle 13: Modifiziertes PCR-Programm für bestimmte Primer**

Primerbezeichnung	Annealing-Temperatur in [°C]
$\alpha$ -AR 1b for. und rev.	60
$\alpha$ -AR 1d for. und rev.	60

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Unreinheiten z.B. unspezifische Primerdimere im Amplifikat auszuschließen, wurde immer eine Schmelzkurve erstellt, deren Maximum annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments gibt.

## 2.4 Statistische Auswertung

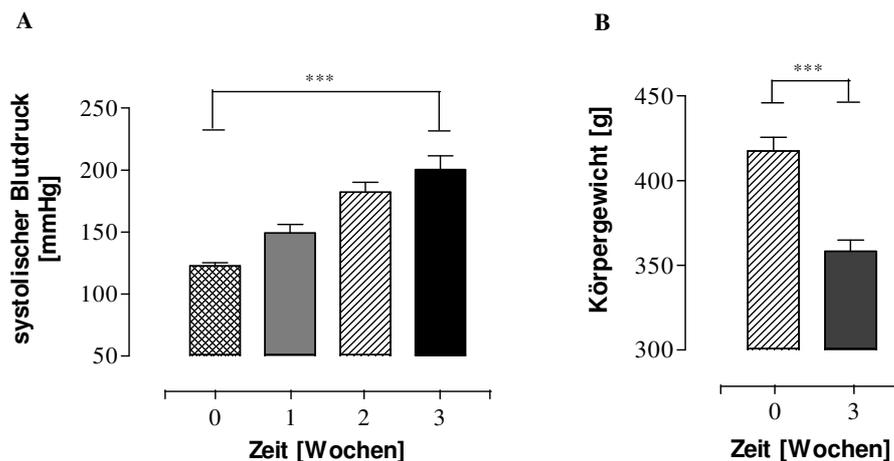
Alle Daten sind - sofern nicht anders gekennzeichnet - als arithmetischer Mittelwert (M, engl.: arithmetic mean) und Standardfehler (SE, engl.: standard error) angegeben. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu beurteilen, wurden ANOVA mit Post-hoc Analyse, Student's t-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Bei allen Tests wurde ein p-value <0,05 als statistisch signifikant gewertet. Die Analysen wurden mit Prism® 3.0 und dem statistischen Programm R® 2.5.0 durchgeführt [106].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuchsreihe 1

##### 3.1.1 Akute und chronische Katecholaminexposition ohne antihypertensive Therapie

In der ersten Versuchsreihe (n=13) wurde den Tieren über drei Wochen kontinuierlich Noradrenalin (NA) über eine osmotische Minipumpe infundiert (50 µg/h). Die chronische Noradrenalinexposition erhöhte den systolischen Blutdruck (RR) von  $122 \pm 2,7$  mmHg auf  $212 \pm 2$  mmHg ( $p < 0,001$ ) (s. Abbildung 6 (A)) und die Herzfrequenz von  $390 \pm 15$  Schläge/min auf  $446 \pm 16$  Schläge/min ( $p < 0,05$ ). Das Körpergewicht (KG) nahm von  $417 \pm 8$  g auf  $358 \pm 7$  g ab ( $p < 0,001$ ) (s. Abbildung 6 (B)).



**Abbildung 6: Entwicklung des systolischen Blutdrucks (A) und des Körpergewichts (B) unter chronischer NA-Exposition**

Dargestellt ist die Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] und des Körpergewichts [kg] über drei Wochen in denen die Tiere (n=13) chronisch NA-exponiert (50 µg/h) waren.

**0:** vor Implantation der NA-freisetzenden Pumpe, **1:** nach einwöchiger NA-Exposition, **2:** nach zweiwöchiger NA-Exposition, **3:** nach dreiwöchiger NA-Exposition,

NA: Noradrenalin

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. \*\*\* $p < 0,001$

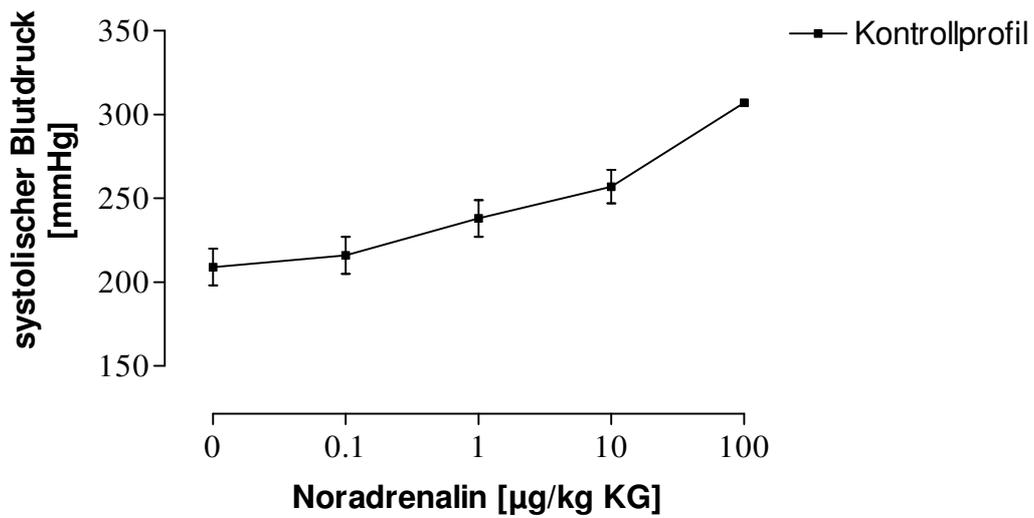
Es erfolgte keine wesentliche Gewöhnung der Tiere an die kontinuierliche Noradrenalinexposition. Die Wistar Ratten nahmen während der chronischen Exposition an Körpergewicht ab (s. Abbildung 6 (B)) und reagierten sensibel auf die akuten NA-Stimulationen (s. Abbildung 7).

Zur Charakterisierung der NA-Sensitivität nach chronischer NA-Exposition, wurden hämodynamische Profile unter bolusweiser Gabe von steigenden NA-Dosen aufgezeichnet (s. Abbildung 7 und Tabelle 14).

Dabei wurde bereits mit 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NA ein messbarer Blutdruckanstieg beobachtet, der ab 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  deutlich wurde (s. Abbildung 7). Insgesamt zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung des Blutdruckes, die im gemessenen Bereich im aufsteigenden Teil einer vermutlich sigmoiden Kurve lag. Das Maximum wurde nicht ausgetestet, da im Anschluss nach Gabe eines Antihypertensivums erneut ein Profil aufgezeichnet werden sollte und folglich die Tiere das Experiment schadlos überstehen sollten.

Aus diesem Grund wurde nach Erreichen eines Blutdruckes von 250 mmHg kein weiterer Bolus mehr gegeben. 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG konnten ohne antihypertensive Vorbehandlung nur einem Tier verabreicht werden.

Die hämodynamische Messung während der intravenösen Noradrenalin-Bolus-Applikation (0,1-1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG) zeigte ohne antihypertensive Therapie einen Blutdruckanstieg von mindestens 30 mmHg bei 18% der Tiere (n=13), bei einer Dosis von 0,1  $\mu\text{g}$  NA/kg KG und 50% der Tiere bei 1  $\mu\text{g}$  NA/kg KG (s. Abbildung 7 und Tabelle 14).



---

**Abbildung 7: Noradrenalinabhängige Blutdruckanstiege ohne antihypertensive Therapie (Kontrollprofil)**

Vor Erstellung des hämodynamischen Kontrollprofils waren alle Tiere (n=13) drei Wochen chronisch NA-exponiert (50  $\mu\text{g/h}$ ). 100  $\mu\text{g NA/kg KG}$  konnten nur bei einem Tier verabreicht werden. Alle anderen Tiere hatten schon mit einer Dosis von 10  $\mu\text{g NA/kg KG}$  Blutdruckerhöhungen >250 mmHg.

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. NA: Noradrenalin

### **3.1.2 Häodynamische Stabilität nach einmaliger intravenöser Applikation von Phenoxybenzamin, Urapidil oder Nitrendipin**

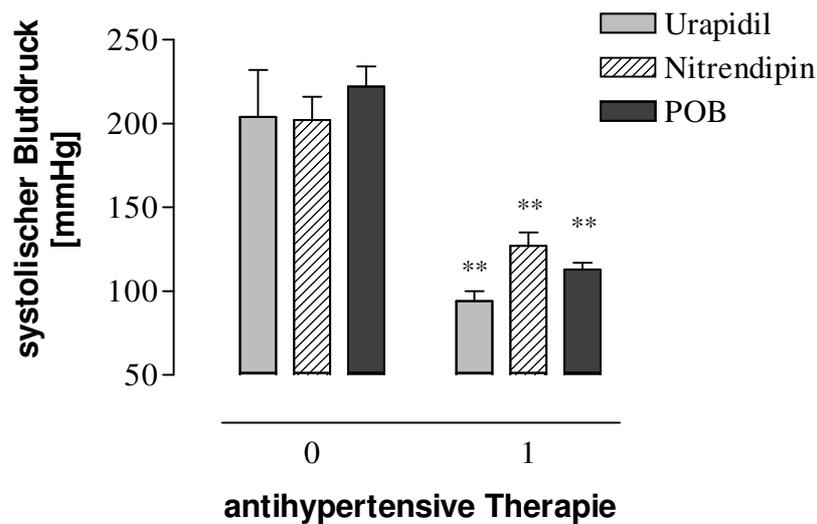
Der irreversible unselektive  $\alpha$ -Blocker Phenoxybenzamin (POB) (10 mg/kg KG, n=4), der kompetitive reversible selektive  $\alpha_1$ -Blocker Urapidil (10 mg/kg KG, n=3) und der langwirksame L-Typ-Calciumkanalantagonist Nitrendipin (600  $\mu$ g/kg KG, n=6), wurden einmalig intravenös nach Erstellung des Kontrollprofils (s. Abbildung 7.) verabreicht.

Der Effekt bezüglich der Prävention hypertensiver Krisen sollte so untersucht werden.

Die Dosen der Antihypertensiva wurden so gewählt, dass ein maximaler oder nahezu maximaler Effekt der Medikamente erwartet werden konnte und diese gleichzeitig noch verträglich waren. Im Vergleich zum Menschen, überschritten die Dosierungen die empfohlenen Maximaldosen zum Teil deutlich (s. Tabellen im Anhang unter 7.1). Dabei ging es in diesem ersten Experiment weniger um eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation im Menschen, als vielmehr um die Charakterisierung des Prinzips; inwieweit also unterschiedliche Medikamentenklassen NA-induzierte hypertensive Krisen verhindern, oder zumindest so maßgeblich abschwächen können, dass keine Gefahr mehr von ihnen ausgeht.

Alle drei antihypertensiv wirksamen Medikamente reduzierten mit unterschiedlicher Effektivität den Blutdruck (s. Abbildung 8 und Tabelle 14):

- Urapidil um  $52 \pm 8,6\%$  ( $p < 0,01$ )
- POB um  $50 \pm 5,9\%$  ( $p < 0,01$ )
- Nitrendipin um  $31 \pm 8,9\%$  ( $p < 0,01$ )



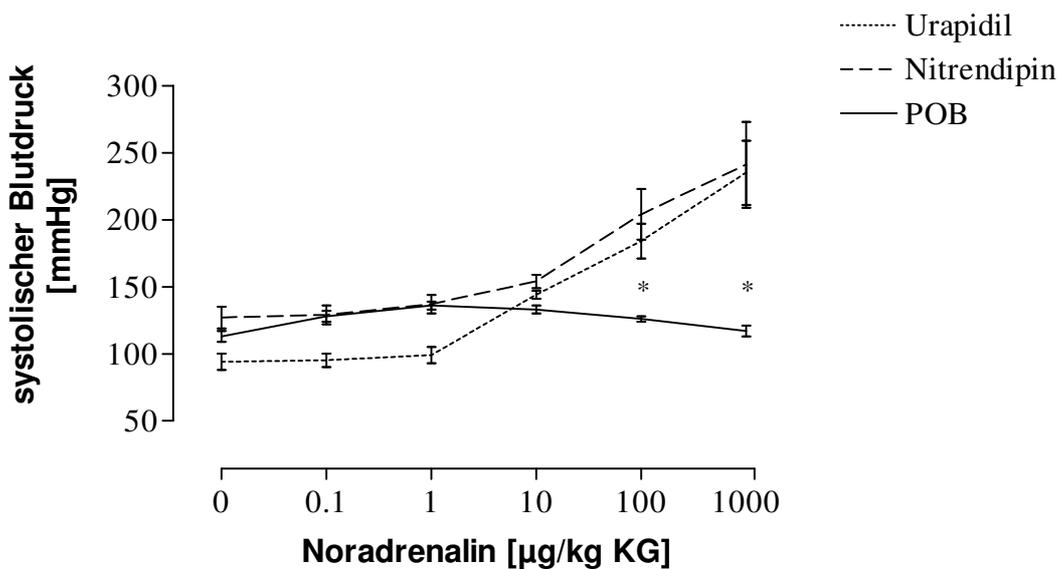
**Abbildung 8: Systolischer Blutdruck vor und nach einmaliger i. v. Applikation von Urapidil, Nitrendipin oder POB**

Dargestellt sind die systolischen Blutdrücke [mmHg] der einzelnen Gruppen vor (0) und nach (1) Gabe des Antihypertensivums (Urapidil, 10 mg/kg KG, n=3; Nitrendipin, 600 µg/kg KG, n=6; POB 10 mg/kg KG, n=4). Alle Tiere (n=13) waren zuvor drei Wochen chronisch NA-exponiert (50 µg/h). Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. POB: Phenoxybenzamin, \*\*p<0,01

Nach antihypertensiver Therapie stabilisierte sich der Blutdruck auf dem neuen Niveau. Dabei blieb der Blutdruck auch unter Gabe von NA bis zu 1 µg/kg KG stabil und zwar in allen drei Gruppen. Es wurden keine Ausnahmen bei einzelnen Tieren beobachtet (s. Abbildung 9).

Bei einer Dosiserhöhung auf 10 µg NA/kg KG stieg der systolische Blutdruck allerdings bei 100% der Urapidil (n=3), 33% der Nitrendipin (n=6), aber nur 25% der POB (n=4) behandelten Tiere um mehr als 30 mmHg an (s. Abbildung 9 und Tabelle 14). Die mittleren Druckerhöhungen betragen - ausgehend vom Basiswert - in der Urapidil-Gruppe  $49 \pm 5$  mmHg, in der Nitrendipin-Gruppe  $20 \pm 9$  mmHg und in der POB-Gruppe  $10 \pm 8$  mmHg ( $p < 0,05$ ) (s. Abbildung 9).

Bei einer Dosis von 100 µg NA/kg KG hatten 33% der Urapidil-/ (n=3) und 100% der Nitrendipin-behandelten Tiere (n=6) einen Blutdruckanstieg auf mehr als 200 mmHg. Die Tiere denen POB appliziert worden war, zeigten sich auch bei einer Dosis von 1000 µg NA/kg KG hämodynamisch stabil (s. Abbildung 9 und Tabelle 14).



**Abbildung 9: Noradrenalinabhängige Blutdruckanstiege nach einmaliger i. v. Applikation von Urapidil, Nitrendipin oder POB**

Vor Injektion der Antihypertensiva (Urapidil, 10 mg/kg KG, n=3; Nitrendipin, 600 µg/kg KG, n=6; POB 10 mg/kg KG, n=4) waren die Tiere drei Wochen chronisch NA-exponiert (50 µg/h). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

POB: Phenoxybenzamin, \* $p < 0,05$

**Tabelle 14: Hämodynamische Profile nach einmaliger i. v. Applikation von Urapidil, Nitrendipin oder POB und Stimulation mit steigenden Noradrenalin Dosen**

	Kontroll- profil	Nitrendipin	Urapidil	POB	p-value
Baseline RR <sub>sys</sub> [mmHg] *	207+/-11	127+/-8	94+/-6	113+/-4	<0,001
Δ RR <sub>sys</sub> >30 mmHg †	1 [0-3]	1,5 [0-3]	3 [3-3]	0 [0-1]	<0,05
RR <sub>sys</sub> >200 mmHg †	3 [0-4]	1.5 [0-2]	1 [0-2]	0 [0-0]	<0,05
Maximum RR <sub>sys</sub> [mmHg]*	256+/-10‡	240+/-30	235+/-29	138+/-3	<0,01

\* Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Der p-value wurde durch eine ANOVA bestimmt.

† Ereignisse/Tier. Die Daten sind als Median [Min.-Max.] angegeben. Der p-value wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test errechnet.

‡ 100 µg/kg KG NA war die maximal applizierte Dosis, die nur einem Tier verabreicht werden konnte. Die Daten beziehen sich jeweils auf den systolischen Blutdruck (RR<sub>sys</sub>).  
POB: Phenoxybenzamin

Nach einmaliger intravenöser Applikation zeigten die POB-behandelten Tiere eine ausreichende hämodynamische Stabilität gegenüber hypertensiven Zuständen durch NA-Boli.

Ein protektiver Effekt von Nitrendipin konnte hingegen nur bis zu einer Dosis von etwa 10 µg NA/kg KG beobachtet werden.

Die Tiere der Urapidil-Gruppe waren nur bis zu einer Dosis von 1 µg NA/kg KG hämodynamisch stabil (s. Abbildung 9).

## 3.2 Versuchsreihe 2

### 3.2.1 Hämodynamische Effekte nach einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung mit POB oder Nifedipin

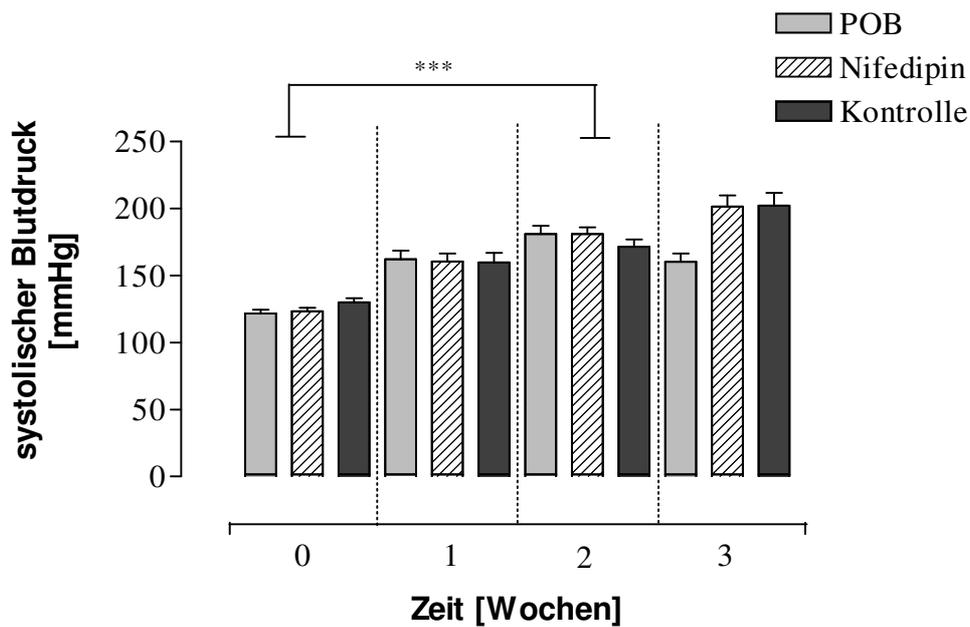
Der irreversible unselektive  $\alpha$ -Blocker Phenoxybenzamin (10 mg/kg KG/Tag, n=9) und der kurz wirksame L-Typ-Calciumkanalblocker Nifedipin (10 mg/kg KG/Tag, n=10) wurden hochdosiert via osmotischer Minipumpe (1  $\mu$ l/h) verabreicht und der Effekt einer einwöchigen Vorbehandlung während der chronischen kontinuierlichen Katecholaminexposition untersucht. Sieben Tiere erhielten das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und bildeten die Kontrollgruppe.

Da sich Urapidil im ersten Versuchsteil am uneffektivsten bei der Prävention hypertensiver Krisen gezeigt hatte, wählten wir diese beiden Medikamente zum Vergleich aus.

Die Dosen wurden in einem hohen Bereich gewählt um maximale Effekte zu untersuchen (s. Tabellen im Anhang unter 7.1).

Während der zweiwöchigen Noradrenalinbehandlung nahm der Blutdruck signifikant von  $124 \pm 2$  mmHg auf  $178 \pm 3$  mmHg zu ( $p < 0,001$ ) (s. Abbildung 10).

Zwar reduzierte die einwöchige antihypertensive Therapie mit POB den Blutdruck nicht komplett ( $167 \pm 7$  mmHg), die Werte der Kontrollgruppe lagen mit  $216 \pm 7$  mmHg bei der Messung des Ausgangsblutdrucks im Rahmen der Hämodynamik jedoch signifikant höher ( $p < 0,01$ ). Der Blutdruck der Nifedipin-Gruppe unterschied sich nicht wesentlich von dem der Kontrollgruppe (s. Abbildung. 10 und Tabelle 15).



**Abbildung 10: Entwicklung des systolischen Blutdrucks unter chronischer Noradrenalinexposition und antihypertensiver Vorbehandlung**

Dargestellt ist die Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] über drei Wochen in denen die Tiere (n=26) chronisch NA-exponiert (50 µg/h) waren. In der dritten Woche wurden die Tiere zusätzlich antihypertensiv behandelt (POB, 10 mg/kg/Tag, n=9; Nifedipin, 10 mg/kg/Tag, n=10 oder Kontrolle (DMSO, 1 µl/h, n=7).

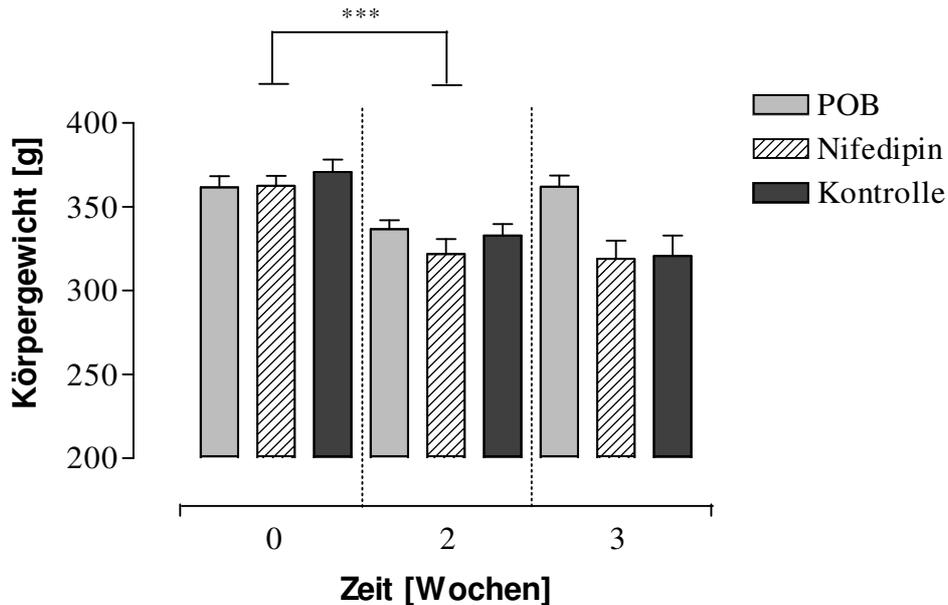
**0:** vor Implantation der NA-freisetzenden Pumpe, **1:** nach einwöchiger NA-Exposition, **2:** nach zweiwöchiger Exposition und Zeitpunkt der Implantation der Antihypertensiva-freisetzenden Pumpe, **3:** nach dreiwöchiger NA-Exposition und einwöchiger Therapie mit POB oder Nifedipin

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

POB: Phenoxybenzamin, NA: Noradrenalin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*\*\*p<0,001

Das Körpergewicht nahm unter der chronischen Katecholaminexposition innerhalb von zwei Wochen um 10% ab ( $p < 0,001$ ) und stieg in der Kontrollgruppe und der Nifedipin-Gruppe nicht wieder an.

Die Tiere der POB-Gruppe erreichten innerhalb der einwöchigen Behandlung wieder ihr Ausgangsgewicht (s. Abbildung 11).



**Abbildung 11: Entwicklung des Körpergewichts unter chronischer NA-Exposition und antihypertensiver Vorbehandlung**

Dargestellt ist die Entwicklung des Körpergewichts [kg] über drei Wochen in denen die Tiere ( $n=26$ ) chronisch NA-exponiert ( $50 \mu\text{g/h}$ ) waren. In der dritten Woche wurden die Tiere zusätzlich antihypertensiv behandelt (POB,  $10 \text{ mg/kg/Tag}$ ,  $n=9$ ; Nifedipin,  $10 \text{ mg/kg/Tag}$ ,  $n=10$  oder Kontrolle (DMSO,  $1 \mu\text{l/h}$ ,  $n=7$ ).

**0:** vor Implantation der NA-freisetzenden Pumpe, **2:** nach zweiwöchiger Exposition und Zeitpunkt der Implantation der Antihypertensiva-freisetzenden osmotischen Pumpe **3:** nach dreiwöchiger NA-Exposition und einwöchiger Therapie mit POB oder Nifedipin

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

POB: Phenoxybenzamin, NA: Noradrenalin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*\*\* $p < 0,001$

Die Herzfrequenz stieg während der chronischen NA-Exposition signifikant um 14% ( $p < 0,05$ ) in allen drei Gruppen an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet.

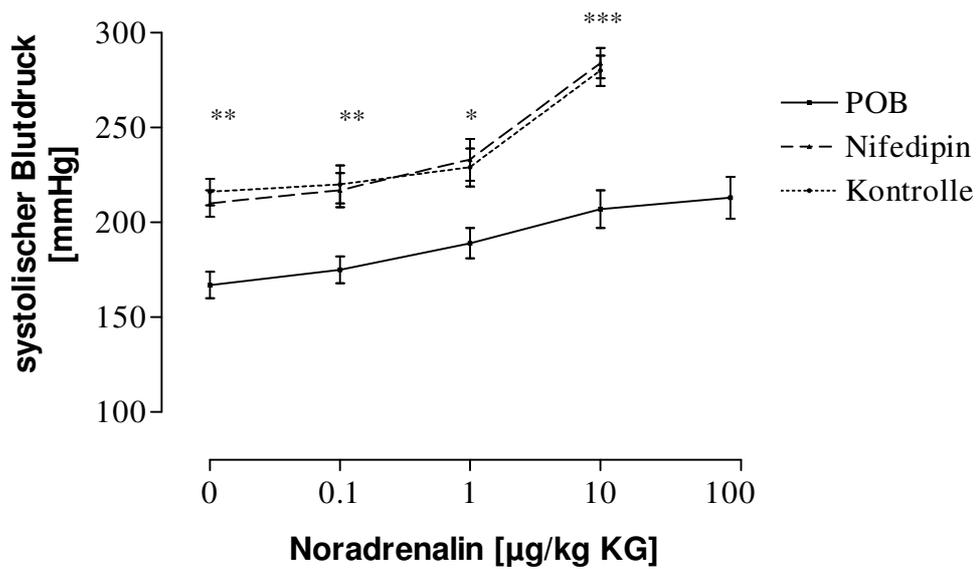
Im Rahmen der NA-Bolus-Injektionen, stieg der RR bei einer Dosis von 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG bei 100% ( $n=6$ ) der Kontrolltiere, 70% ( $n=10$ ) der Nifedipin-behandelten Tiere und 25% ( $n=8$ ) der POB-behandelten Tiere auf über 200 mmHg an ( $p < 0,05$ ) (s. Abbildung 12 und Tabelle 15).

Bei einer Dosiserhöhung auf 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG zeigten 100% der Kontroll-/ Nifedipin-Tiere und 63% der Tiere der POB-Gruppe einen systolischen Blutdruck größer 200 mmHg (s. Abbildung 12 und Tabelle 15).

Blutdruckanstiege um mehr als 30 mmHg - ausgehend vom Ausgangsblutdruck - wurden bei einer NA-Dosis von 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG bei 100% der Tiere der Kontroll-/Nifedipin-Gruppe und 50% der POB-Gruppe ( $p < 0,05$ ) erreicht (s. Abbildung 12 und Tabelle 15).

Eine Dosiserhöhung auf  $>10$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG war bei den Tieren der Kontroll-/und der Nifedipin-Gruppe aufgrund erwarteter Drücke  $> 250$  mmHg nicht mehr möglich.

75% (6 von 8) der POB-behandelten Tiere konnte eine Dosis von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG und 38% (3 von 8) eine Dosis von 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG verabreicht werden (s. Abbildung 12 und Tabelle 15).



**Abbildung 12: Noradrenalinabhängige Blutdruckanstiege nach antihypertensiver Vorbehandlung ohne zusätzliche kontinuierliche antihypertensive Therapie (Kontrollprofil)**

Vor Erstellung des Kontrollprofils waren die Tiere (n=26) drei Wochen chronisch NA-exponiert (50 µg/h) und eine Woche antihypertensiv behandelt (POB, 10 mg/kg/Tag, n=9; Nifedipin, 10 mg/kg/Tag, n=10 oder Kontrolle (DMSO, 1 µl/h, n=7).

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

POB: Phenoxybenzamin, NA: Noradrenalin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

**Tabelle 15: Hämodynamische Profile nach einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung ohne zusätzliche antihypertensive Therapie**

<u>Vorbehandlung:</u>		Kontrolle	Nifedipin	POB	p-value
	Baseline RR <sub>sys</sub> [mmHg]*	216+/-7	210+/-7	167+/-7	<0,01
	Maximum RR <sub>sys</sub> [mmHg]*	268+/-16	282+/-8	220+/-11	<0,001
	$\Delta$ RR <sub>sys</sub> >30 mmHg †	1 [1-1]	1 [1-2]	1 [0-2]	0,399
	RR <sub>sys</sub> >200 mmHg †	4 [2-4]	3.5 [1-4]	2 [0-4]	<0,05

\* Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der p-value wurde durch eine ANOVA bestimmt.

† Ereignisse/Tier. Die Daten sind als Median [Min.-Max.] angegeben. Der p-value wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test errechnet.

Die Daten beziehen sich jeweils auf den systolischen Blutdruck (RR<sub>sys</sub>).

POB: Phenoxybenzamin

Nach einwöchiger Vorbehandlung mit POB waren die Tiere, bezüglich RR-Anstiegen über 200 mmHg und um mehr als 30 mmHg vom Ausgangswert, bei einer NA-Dosis von 10  $\mu$ g/kg KG signifikant hämodynamisch stabiler ( $p < 0,05$ ) (s. Abbildung 12).

Wenn auch keine komplette Blockade der Rezeptoren vorlag, waren die Tiere dieser Gruppe vor hypertensiven Zuständen besser geschützt.

### **3.2.2 Hämodynamische Stabilität nach einwöchiger medikamentöser Vorbehandlung und zusätzlicher antihypertensiver Therapie**

Zusätzlich zur medikamentösen Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin (POB) (10 mg/kg KG/Tag, n=9), dem kurz wirksamen L-Typ-Calciumkanalblocker Nifedipin (10 mg/kg KG/Tag, n=10) oder dem Lösungsmittel DMSO/Wasser (10%) (n=7), erhielten die Tiere während der akuten NA-Exposition kontinuierliche antihypertensive Infusionen.

Die Tiere aller Gruppen wurden entweder mit dem kurzwirksamen L-Typ-Calciumkanalantagonist Nifedipin (Adalat pro infusione®) oder dem reversiblen  $\alpha_1$ -Rezeptorblocker Urapidil (Ebrantil®) kontinuierlich über einen Perfusor antihypertensiv behandelt. Anschließend wurde die NA-Bolus-Applikation vorgenommen. Der Perfusor wurde so adjustiert, dass sich ein systolischer Blutdruck um 120 mmHg als Ausgangsdruck einstellte (s. Tabelle 16).

**Tabelle 16: Durchschnittliche Dosierungen der antihypertensiven Medikamente**

Gruppe (Anzahl)	Nifedipin [mg/h] (Anzahl)	Urapidil [mg/h] (Anzahl)
POB (n=9)	1 (n=5)	50 (n=4)
Nifedipin (n=10)	1,2 (n=5)	31,25 (n=4)
Kontrolle (n=7)	1,7 (n=3)	25 (n=3)

Sowohl die Tiere der Kontroll-/ als auch die der Nifedipin-Gruppe reagierten wesentlich sensibler auf Urapidil, als die Tiere der POB-Gruppe.

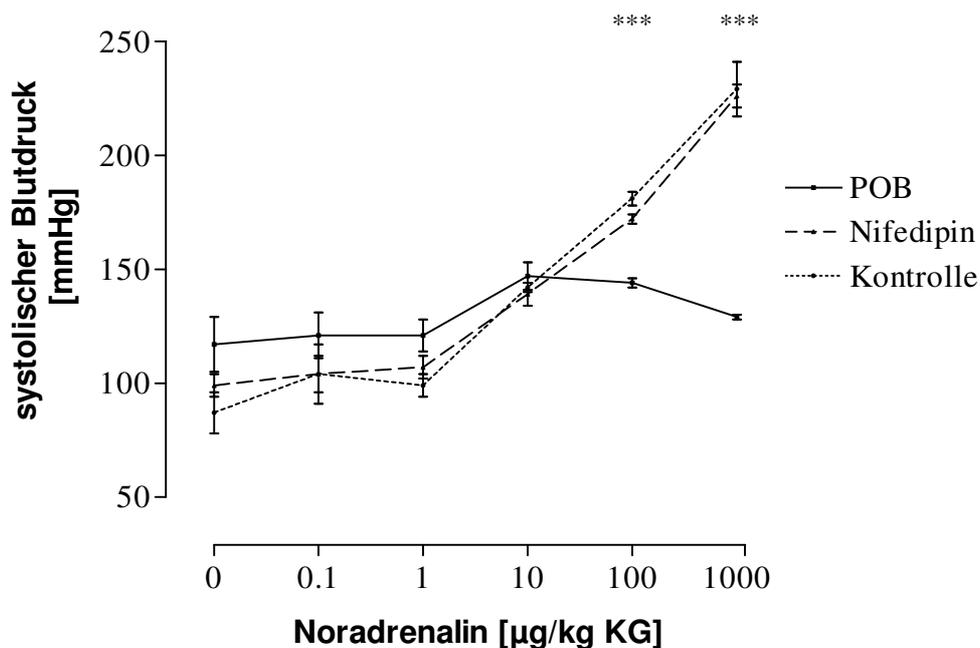
Dies spricht für eine deutliche, wenn auch nicht komplette, Blockade der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren durch POB, da sich die hämodynamische Stabilität der POB-Tiere unter zusätzlicher Infusion des synergistisch wirkenden Urapidil verbesserte.

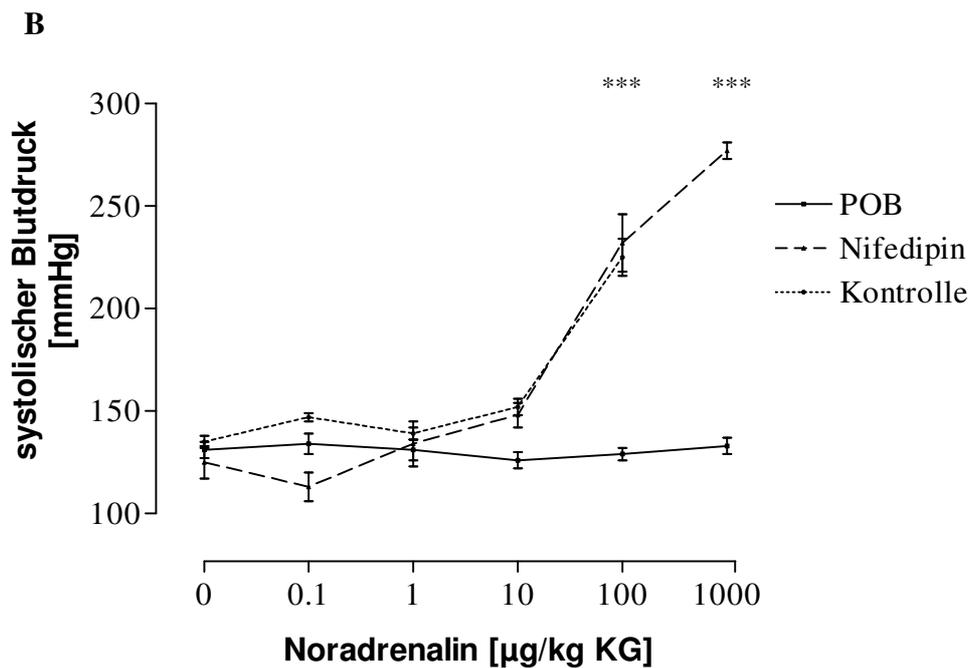
Beide Antihypertensiva verbesserten die hämodynamische Stabilität der POB-vorbehandelten Tiere und es wurden keine RR-Anstiege >200 mmHg beobachtet (s. Abbildung 13 und Tabelle 17). Allerdings zeigten sich unter Urapidil-Infusion bei einer NA-Dosis von 100 µg/kg KG bei 33% (n=3) Blutdruckanstiege um mehr als 30 mmHg (s. Abbildung 13 (A) und Tabelle 17). Die Nifedipin-Infusion ließ den Blutdruck bei keinem POB-vorbehandelten Tier unter NA-Boli-Injektion um mehr als 30 mmHg ansteigen (s. Abbildung 13 (B) und Tabelle 17).

Blutdruckerhöhungen um mehr als 200 mmHg konnten unter Urapidil-Infusion und zusätzlicher Gabe von 100 µg NA/kg KG, sowohl in der Nifedipin (n=4) -/ als auch in der Kontrollgruppe (n=3), nicht beobachtet werden (s. Abbildung 13 (A) und Tabelle 17). 80% der Nifedipin-behandelten Tiere (n=5) und 100% der Kontrolltiere (n=3) hatten Blutdruckanstiege über 200 mmHg unter Nifedipin-Infusion und gleichzeitiger Gabe von 100 µg NA/kg KG (s. Abbildung 13 (B) und Tabelle 17).

Blutdruckanstiege um mehr als 30 mmHg zeigten je 100% der Nifedipin -/ und Kontrollgruppe bei einer Dosis von 100 µg NA/kg KG, unabhängig vom Antihypertensivum (s. Abbildung 13 und Tabelle 17).

A





**Abbildung 13: Hämodynamische Stabilität nach einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung und zusätzliche kontinuierliche antihypertensiver Therapie mit Urapidil (A) oder Nifedipin (B)**

Dargestellt ist der systolische Blutdruck [mmHg] in Abhängigkeit von der NA-Dosis [ $\mu\text{g/kg KG}$ ].

Vor Injektion der Antihypertensiva waren die Tiere ( $n=26$ ) drei Wochen chronisch NA-exponiert ( $50 \mu\text{g/h}$ ) und eine Woche antihypertensiv behandelt (POB,  $10 \text{ mg/kg/Tag}$ ,  $n=9$ ; Nifedipin,  $10 \text{ mg/kg/Tag}$ ,  $n=10$  oder Kontrolle (DMSO,  $1 \mu\text{l/h}$ ,  $n=7$ ). Zusätzlich wurden die Tiere mit Urapidil ( $25\text{-}50 \text{ mg/h}$ ) (A) oder Nifedipin ( $1\text{-}2 \text{ mg/h}$ ) (B) kontinuierlich - während der NA-Stimulationen - behandelt.

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

POB: Phenoxybenzamin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*\*\* $p<0,001$

**Tabelle 17: Hämodynamische Profile nach einwöchiger antihypertensiver Vorbehandlung mit zusätzlicher kontinuierlicher antihypertensiver Therapie mit Urapidil oder Nifedipin**

		<u>Vorbehandlung:</u>			
<u>Perfusor:</u>		Kontrolle	Nifedipin	POB	p-value
Nifedipin	$\Delta RR_{sys} >30$ mmHg †	1 [1-1]	2 [1-2]	0 [0-0]	0,004
	$RR_{sys} >200$ mmHg †	1 [1-1]	1 [1-2]	0 [0-0]	0.005
	Maximum BP [mmHg]*	225 +/- 11	272 +/- 5	137 +/- 5	<0,001
Urapidil	$\Delta RR_{sys} >30$ mmHg †	2[2-3]	2 [2-3]	0.5 [0-2]	0,06
	$RR_{sys} >200$ mmHg †	1 [0-1]	0.5 [0-1]	0 [0-0]	0.178
	Maximum $RR_{sys}$ [mmHg]*	210 +/- 20	199 +/- 15	151 +/- 4	<0.05

Der Nifedipin-/ Urapidil-Perfusor wurde so eingestellt, dass ein Ausgangsblutdruck von etwa 100-120 mmHg vor Applikation der NA-Boli erreicht wurde.

\* Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben, der p-value wurde durch eine ANOVA bestimmt.

† Ereignisse/Tier. Die Daten sind als Median [Min.-Max.] angegeben, der p-value wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test errechnet.

Die Daten beziehen sich jeweils auf den systolischen Blutdruck ( $RR_{sys}$ ).

POB: Phenoxybenzamin

Unter einer Kombinationstherapie aus POB-Vorbehandlung und kontinuierlicher Nifedipin-Infusion, zeigte sich während der NA-Bolus-Applikation eine signifikant verbesserte hämodynamische Stabilität ( $p < 0,001$ ) (s. Tabelle 17).

### **3.2.3 Echokardiographie und Herzfrequenz vor und nach dreiwöchiger Noradrenalinexposition und einwöchiger antihypertensiver Therapie**

Die kontinuierliche dreiwöchige Noradrenalinexposition erhöhte die Herzfrequenz um 14% von  $390 \pm 15$  auf  $446 \pm 16$  Schläge/Minute ( $p < 0,05$ ).

In der echokardiographischen Bildgebung zeigte sich eine Abnahme der enddiastolischen und endsystolischen Fläche, im Sinne einer hyperkontraktilen Tachykardie, ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Gleichzeitig stieg die myokardiale Verkürzungsfraction (fractional shortening (FS)), als grobes Maß für die linksventrikuläre systolische Pumpfunktion, leicht. Anzeichen für eine catecholamininduzierte Herzinsuffizienz fanden sich nicht (s. Tabelle 18).

**Tabelle 18: Echokardiographische Messungen**

Parameter	$\Delta$ Kontrolle	$\Delta$ Nifedipin	$\Delta$ POB	p-value
HR [Schläge/min]	44.5 +/- 24.2	59 +/- 17	44.56 +/- 16.2	0.8
ESA [mm <sup>2</sup> ]	-8.33 +/- 1.3	-8.8 +/- 1.9	-9.11 +/- 1.9	0.9
EDA [mm <sup>2</sup> ]	-9.33 +/- 2.1	-7.9 +/- 2.3	-7.56 +/- 3.2	0.9
2D FS%	15.33 +/- 3.2	15.1 +/- 4.7	14.78 +/- 3.4	0.9

**HR:** Herzfrequenz, **ESA:** Endsystolische Fläche, **EDA:** Enddiastolische Fläche, **FS:** Verkürzungsfraction, **2D:** zweidimensional, **POB:** Phenoxybenzamin  
Alle Werte sind als durchschnittliche Veränderung ( $\Delta$ ) während der dreiwöchigen NA-Exposition angegeben.

### **3.2.4 Relative Rezeptorexpressionsunterschiede nach dreiwöchiger Noradrenalinexposition und einwöchiger antihypertensiver Therapie im linken Ventrikel und der Aorta abdominalis**

Um zu untersuchen, ob die Effekte von POB und Nifedipin auf den Blutdruck durch einen veränderten Rezeptorstatus erklärt werden können, führten wir eine semiquantitative Realtime-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) durch. Analysiert wurde die Expression des  $\alpha_1$ -Rezeptors und des Calciumkanals in Gewebeproben des linken Ventrikels und der Aorta abdominalis. Zur Standardnormalisierung wurde das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin verwendet.

Alle Tiere wurden drei Wochen mit Noradrenalin behandelt. Nach zwei Wochen NA-Exposition erhielten die Tiere zusätzlich eine Woche lang eine Vorbehandlung mit POB (10 mg/kg/Tag), Nifedipin (10 mg/kg/Tag), oder dem Lösungsmittel DMSO (1  $\mu$ l/h, Kontrollgruppe). Untersucht wurde Gewebe von 6 Tieren der POB-Gruppe, 5 Tieren aus der Nifedipin-Gruppe, sowie 4 Tieren der Kontrollgruppe. Außerdem analysierten wir einige Gewebeproben von unbehandelten Tieren (n=3).

Die Ergebnisse wurden entweder zu den nicht behandelten, oder den Tieren der Kontrollgruppe normalisiert, um den Effekt einer dreiwöchigen NA-Exposition und einer einwöchigen medikamentösen Vorbehandlung zu untersuchen.

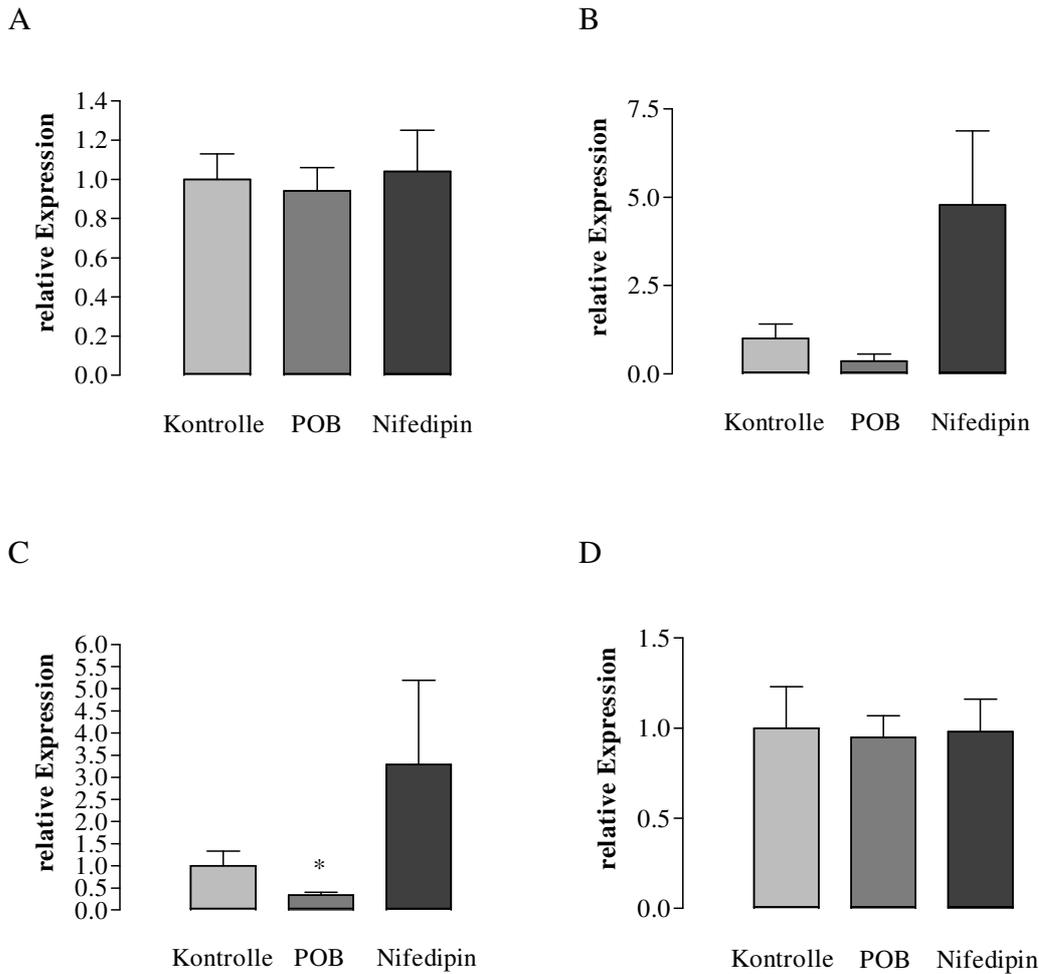
#### **3.2.4.1 Relative Rezeptorexpressionsunterschiede im linken Ventrikel**

Der alpha-Adrenozeptor war bei den POB-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe herunterreguliert.

Die Tiere der Nifedipin-Gruppe zeigten eine Hochregulation (s. Abbildung 14 (A-C)).

Die 1d-Untereinheit der POB-behandelten Tiere wurde im linken Ventrikel - verglichen mit der Kontrollgruppe - signifikant geringer exprimiert (s. Abbildung 14 (C)).

Die Expression des Calciumkanals zeigte nur minimale Unterschiede zwischen den vorbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe (s. Abbildung 14 (D)).



**Abbildung 14: Relative Rezeptorexpressionsunterschiede des  $\alpha$ -Adrenozeptors und des Calciumkanals im linken Ventrikel**

Dargestellt sind die relativen Rezeptorexpressionsunterschiede der  $\alpha$ -Adrenozeptor-Subtypen 1a-/ (A), 1b-/ (B), 1d-/ (C) und der  $\alpha$ -1c-Untereinheit des Calciumkanals (D). Alle Tiere wurden drei Wochen NA-exponiert (50  $\mu$ g/h) und eine Woche mit POB (10 mg/kg/Tag), Nifedipin (10 mg/kg/Tag,) oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt.

Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben (POB, n=6; Nifedipin, n=5) und zu den Kontrolltieren (n=4) normalisiert. Angegeben ist das Verhältnis (Ratio) der relativen Expression.

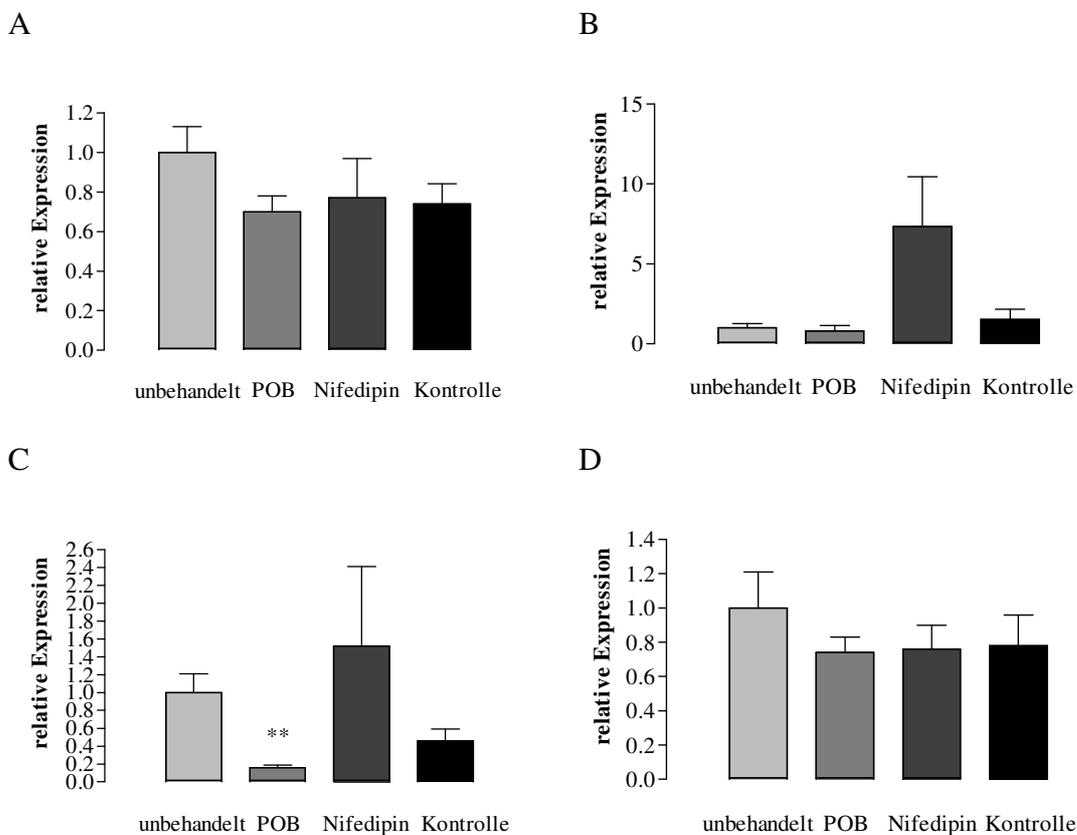
Zur Standardnormalisierung wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

NA: Noradrenalin, POB: Phenoxybenzamin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*p<0,05.

Der alpha-Adrenozeptor war bei den POB-behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren herunterreguliert (s. Abbildung 15 (A-C)). Die Tiere der Nifedipin-Gruppe zeigten eine Hochregulation der 1b-/und 1d-Untereinheit und eine geringere Expression der 1a-Untereinheit (s. Abbildung 15 (A-C)).

Der Calciumkanal wurde sowohl von den POB-, als auch von den Nifedipin-vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren geringer exprimiert.

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten reduzierte Rezeptorexpressionen, verglichen mit den unbehandelten Tieren (s. Abbildung 15 (D)).



**Abbildung 15: Relative Rezeptorexpressionsunterschiede des  $\alpha$ -Adrenozeptors und des Calciumkanals im linken Ventrikel**

Dargestellt sind die relativen Rezeptorexpressionsunterschiede der  $\alpha$ -Adrenozeptor-Subtypen 1a-/(A), 1b-/(B), 1d-/(C) und der  $\alpha$ -1c-Untereinheit des Calciumkanals (D). Die Tiere wurden drei Wochen NA-exponiert (50  $\mu$ g/h) und eine Woche mit POB (10 mg/kg/Tag) Nifedipin (10 mg/kg/Tag) oder dem Vehikel DMSO behandelt. Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben (POB, n=6; Nifedipin, n=5; Kontrolle, n=4) und zu den unbehandelten Tieren (n=3) normalisiert.

Angegeben ist das Verhältnis (Ratio) der relativen Expression. \*\*p<0,01

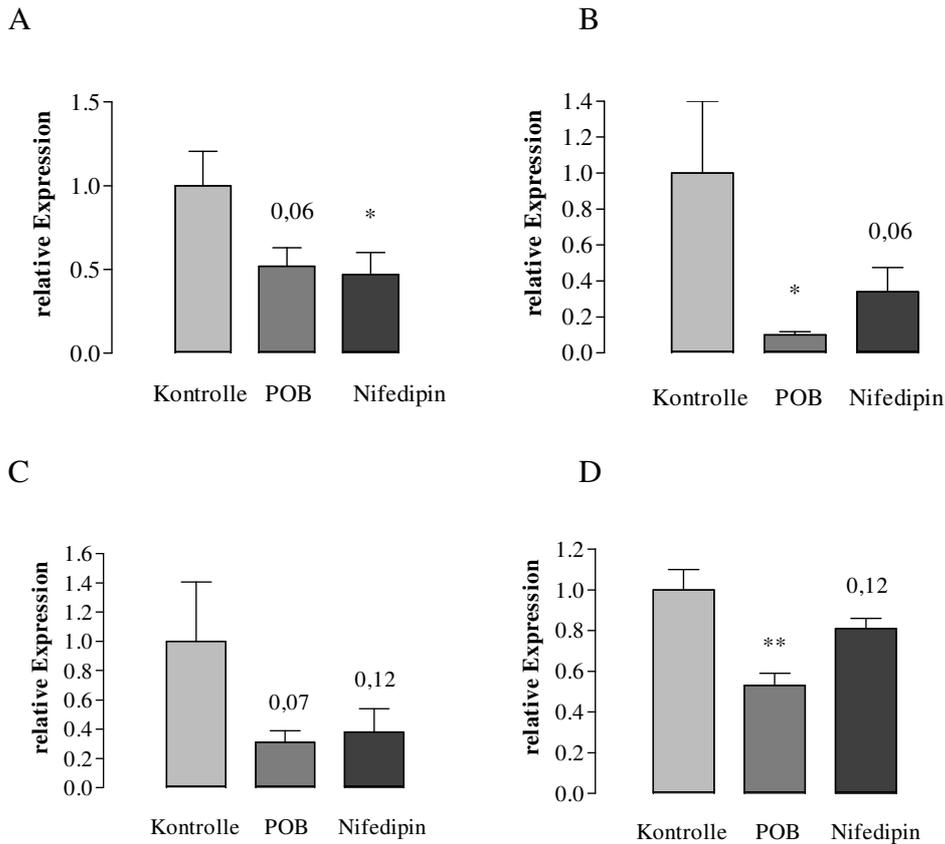
#### **3.2.4.2 Relative Rezeptorexpressionsunterschiede in der Aorta abdominalis**

Sowohl bei den Nifedipin-/ als auch bei den POB-behandelten Tieren, war eine Herunterregulation des  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtyps, im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (s. Abbildung 16 (A-C)). Die 1b-Untereinheit der POB-behandelten Tiere war signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 16 (B)).

Interessanterweise hatte Nifedipin einen vergleichbaren Effekt auf die Expression des  $\alpha$ -adrenergen Rezeptors, ohne signifikante Unterschiede zu POB (s. Abbildung 16 (A-C)). Die mit Nifedipin vorbehandelten Tiere exprimierten die 1a-Untereinheit des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors signifikant geringer als die Kontrolltiere (s. Abbildung 16 (A)).

Bezüglich der Kontrolle des Blutdrucks war Nifedipin POB jedoch deutlich unterlegen.

Im Unterschied dazu war die Expression des Calciumkanals der POB-behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 16 (D)).



**Abbildung 16: Relative Rezeptorexpressionsunterschiede des  $\alpha$ -Adrenozeptors und des Calciumkanals in der Aorta abdominalis**

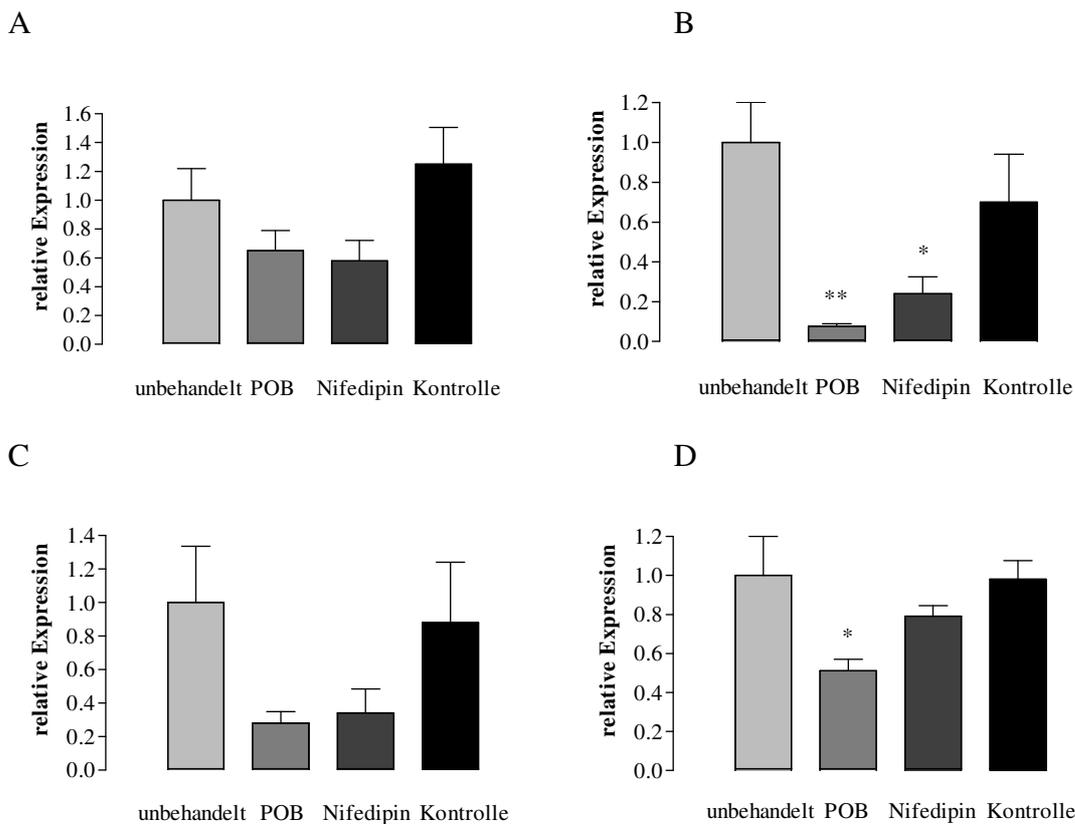
Dargestellt sind die relativen Rezeptorexpressionsunterschiede der  $\alpha$ -Adrenozeptor-Subtypen 1a-/(A), 1b-/(B), 1d-/(C) und der  $\alpha$ -1c-Untereinheit des Calciumkanals (D). Die Tiere wurden drei Wochen NA-exponiert (50  $\mu$ g/h) und eine Woche mit POB (10 mg/kg/Tag) Nifedipin (10 mg/kg/Tag,) oder dem Vehikel DMSO behandelt. Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben (POB, n=6; Nifedipin, n=5) und zu den Kontrolltieren (n=4) normalisiert. Angegeben ist das Verhältnis (Ratio) der relativen Expression. Zur Standardnormalisierung wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

NA: Noradrenalin, POB: Phenoxybenzamin, DMSO: Dimethylsulfoxid,

\*p<0,05, \*\*p<0,01 oder der exakte p-value sind angegeben.

Die POB-vorbehandelten Tieren exprimierten sowohl den  $\alpha_1$ -AR, als auch den Calciumkanal geringer als die unbehandelten Tiere (s. Abbildung 17). Signifikant herunterreguliert war sowohl die 1b-Untereinheit (s. Abbildung 17 (B)), als auch der Calciumkanal (s. Abbildung 17 (D)).

Bei den Tieren die mit Nifedipin vorbehandelt wurden, zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulation der Rezeptoren (s. Abbildung 17 (A-D)), wenn auch deutlich geringer ausgeprägt als bei den Tieren der POB-Gruppe.



**Abbildung 17: Relative Rezeptorexpressionsunterschiede des  $\alpha$ -Adrenozeptors und des Calciumkanals in der Aorta abdominalis**

Dargestellt sind die relativen Rezeptorexpressionsunterschiede der  $\alpha$ -Adrenozeptor-Subtypen 1a-/(A), 1b-/(B), 1d-/(C) und der  $\alpha$ -1c-Untereinheit des Calciumkanals (D). Die Tiere wurden drei Wochen NA exponiert (50  $\mu$ g/h) und eine Woche mit POB (10 mg/kg/Tag) Nifedipin (10 mg/kg/Tag) oder dem Vehikel DMSO behandelt. Die Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben (POB, n=6; Nifedipin, n=5; Kontrolle, n=4) und zu den unbehandelten Tieren (n=3) normalisiert. Angegeben ist das Verhältnis (Ratio) der relativen Expression. Zur Standardnormalisierung wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

NA: Noradrenalin, POB: Phenoxybenzamin, DMSO: Dimethylsulfoxid, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

Die einwöchige Vorbehandlung mit POB bzw. Nifedipin veränderte die Rezeptorexpression des alpha-Adrenozeptors und des Calciumkanals im linken Ventrikel und der Aorta abdominalis. Im Gewebe der POB-behandelten Tiere waren sowohl die Subtypen des  $\alpha$ -AR, als auch der Calciumkanal deutlich geringer exprimiert (s. Abbildung 14-17).

Die Nifedipin-behandelten Tiere zeigten tendenziell eine zunehmende Expression. In der Aorta abdominalis waren sowohl der  $\alpha$ -adrenerge-Rezeptor, als auch der Calciumkanal der POB-behandelten Tiere signifikant geringer exprimiert (s. Abbildung 16-17). Auch die Nifedipin-behandelten Tiere zeigten eine Herunterregulation der Rezeptoren, wenn auch auf den Calciumkanal durch Nifedipin verglichen mit POB eine deutlich geringere Wirkung ausgeübt wurde (s. Abbildung 16-17).

Sowohl die dreiwöchige NA-Exposition der Tiere, als auch die einwöchige antihypertensive Therapie hatten somit Auswirkungen auf die Rezeptorexpression (s. Abbildung 14-17).

## 4 Diskussion

Ein plötzlicher Katecholaminexzess mit hypertensiver Krise ist eine typische und gefährliche Komplikation eines Phäochromozytoms [6, 27-29, 107, 108]. Dennoch findet sich in der Literatur keine einheitliche Empfehlung zur medikamentösen, präoperativen Behandlung der Patienten.

Phenoxybenzamin galt lange als das Standardmedikament in der präoperativen Behandlung von Phäochromozytompatienten [2, 9, 49, 61], es wird aber aufgrund von Nebenwirkung zunehmend nach Alternativen gesucht.

In einem Rattenmodell für akute und chronische Noradrenalinfreisetzung konnte die Effektivität antihypertensiver Medikamente unter kontrollierten Bedingungen und unter Simulation einer Katecholaminkrise untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass POB verglichen mit Urapidil, Nitrendipin und Nifedipin eine hypertensive Krise am effektivsten vorbeugt.

Zunächst untersuchten wir die Wirksamkeit der Medikamente hinsichtlich der Vorbeugung einer hypertensiven Krise bei einer akuten Katecholaminexposition.

Eine einmalige Injektion von POB stabilisierte die Tiere hämodynamisch am wirkungsvollsten.

Anschließend wurde der Effekt einer einwöchigen antihypertensiven Behandlung unter gleichzeitiger chronischer Noradrenalinexposition auf die hämodynamische Stabilität untersucht. Eine Kombination aus POB-Vorbehandlung und Nifedipin-Infusion kontrollierte den Blutdruck am effektivsten.

Phenoxybenzamin wird immer noch weit verbreitet eingesetzt [2, 9, 49, 61]. Allerdings hat das Antihypertensivum, aufgrund seiner irreversiblen Bindung am alpha-Adrenozeptor, eine lange Halbwertszeit und es wurden schwere postoperative Hypotensionen nach Phäochromozytomresektion und Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin beschrieben [8, 9, 77, 78]. Auch aus diesem Grund wird von einzelnen Autoren ein reversibler, selektiver  $\alpha_1$ -Blocker [28, 58-61, 109], oder ein Calciumkanalantagonist [48, 54, 55, 62, 63, 110] als besser verträgliche Alternative diskutiert.

Boutros et al. geht in einer Arbeit sogar soweit, auf eine medikamentöse Vorbehandlung vollständig zu verzichten. Todesfälle oder kardiale Komplikationen wurden in dieser Studie (n=29) nicht bekannt [47]. Im Gegensatz dazu berichtet Steinsapir et al. von zwei Todesfällen bei nicht vorbehandelten Patienten (n=7) [111]. Der Verzicht auf eine Vorbehandlung wird daher trotz der zweifelsohne wesentlich verbesserten Lokalisationsdiagnostik und Operationstechnik im Allgemeinen nicht praktiziert.

Eine vor kurzem veröffentlichte retrospektive Studie an 73 Patienten verglich POB und Doxazosin in der Vorbehandlung und beschrieb eine identische hämodynamische Stabilität [109]. In einer weiteren Studie an 18 Patienten wurde eine Kombinationstherapie aus präoperativer Vorbehandlung mit 5 mg Prazosin/d sowie einer dreitägigen kontinuierlichen Urapidil-Infusion von 10-15 mg/h, die auch perioperative weitergeführt wurde, untersucht und als eine sicherere, effiziente Alternative zu POB in der Vorbehandlung beschrieben [28].

Es finden sich zwar einige Studien, in denen reversible  $\alpha$ -Adrenozeptorblocker [28, 60, 109] oder Calciumantagonisten [55, 110] mit gutem Erfolg eingesetzt wurden, aber die Patientenzahlen dieser Studien waren stets sehr gering. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Power dieser Studien zu gering ist, um zu einer sinnvollen Aussage bezüglich hypertensiver Krisen zu kommen.

Um systematisch den Effekt von Phenoxybenzamin, Urapidil, Nitrendipin und Nifedipin bei der Prävention hypertensiver Krisen zu testen, haben wir uns entscheiden diese Untersuchungen in einem Tiermodell unter kontrollierten Bedingungen vorzunehmen.

Um das angewandte Modell so einfach wie möglich zu halten, wurde die chronische und die akute Katecholaminexposition durch Gabe von Noradrenalin simuliert.

Es ist bekannt, dass Phäochromozytome auch Adrenalin [22] und Dopamin [24, 25] sezernieren können. Noradrenalin ist allerdings in den meisten beschriebenen Fällen das dominierende Katecholamin mit deutlich höheren Plasmaspiegeln [2, 21-23, 27, 112].

Chronisch erhöhte Noradrenalinpiegel führen zu Desensibilisierung adrenerger Rezeptoren [48, 64, 66, 67, 71, 113, 114]. Als Mechanismen werden neben der Entkopplung der Adrenozeptoren von G-Proteinen auch die Abnahme der Rezeptordichte angesehen [64].

Aus diesem Grund wurden die Tiere drei Wochen kontinuierlich mit Noradrenalin via osmotischer Pumpe behandelt [87, 88, 115]. Innerhalb der ersten Woche stiegen Blutdruck und Herzfrequenz signifikant an und blieben im weiteren Verlauf der Studie erhöht. Diese Veränderungen im kardiovaskulären System gehören zu den klassischen Symptomen von Phäochromozytompatienten [8] und wurden bereits nach sechstägiger NA-Infusion bei Ratten beobachtet [86].

Echokardiographisch zeigte sich eine signifikant erhöhte Herzfrequenz in allen Behandlungsgruppen, ohne Unterschiede zwischen den Gruppen. Zudem konnte eine Verminderung der enddiastolischen Ventrikelfläche - verglichen mit der Bildgebung vor Beginn der NA-Exposition - festgestellt werden, welche mit einer hyperkontraktilen Tachykardie vereinbar ist.

Der akute NA-Exzess wurde durch intravenöse Applikationen von NA simuliert. Die tatsächlichen Katecholaminplasmakonzentrationen im Rahmen hypertensiver Entgleisungen bei Phäochromozytompatienten sind nicht hinreichend untersucht und die Datenlage ist nicht ausreichend um eindeutige Schlüsse zu ziehen.

Die normale NA-Konzentration im Plasma liegt zwischen 0 und 500 ng/l [27] und kann bei einer plötzlichen Freisetzung die Normalwerte um das bis zu 1000-fache überschreiten [1]. Im Zusammenhang mit einer Manipulation am Tumor, beschrieb Joris et al. Noradrenalinserumwerte von bis zu 30.000 ng/l [27]. Daher wählten wir für die NA-Boli ein breites Dosisspektrum von 0,1-1000 µg/kg Körpergewicht (s. Anhang unter 7.1.1). Potenziell zu erwartende Konzentrationsspitzen im Menschen sollten so abgedeckt werden, um die Absicht gut definierte worst-case-Situationen zu untersuchen, sicher zu stellen. Um einen maximalen Effekt zu erzielen, wurden alle antihypertensiven Medikament in der maximal verträglichen Dosis gegeben.

Phenoxybenzamin verwendeten wir in einer Dosis von 10 mg/kg KG als Bolus bzw. 10 mg/kg KG/d in der einwöchigen Vorbehandlung (s. Anhang unter 7.1.2). Nach Verabreichung von 10 mg/kg KG als Kurzinfusion war bereits eine komplette Blockade des  $\alpha_2$ -AR in spontan hypertensiven Ratten (SHR) beschrieben worden [116].

Die POB-behandelten Tiere waren sowohl nach einmaliger i. v. Applikation, als auch nach einwöchiger kontinuierlicher Vorbehandlung am effektivsten vor hypertensiven Krisen geschützt.

Der blutdrucksenkende Effekt blieb jedoch unvollständig. Dieser Trend könnte auf eine Desensibilisierung gegenüber POB hinweisen [64]. Eine Umkehr der NA-Adaptionen, die zu einer gesteigerten Empfindlichkeit durch Anstieg der Rezeptordichte führt [64, 117], könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Rosenbaum vermutete, dass sehr hohe Katecholaminspiegel die Rezeptoren vor einer Bindung durch POB schützen könnten [91].

Die kontinuierliche Infusion des synergistisch wirkenden Urapidil, führte auch in den POB-vorbehandelten Tieren zu einer deutlichen Blutdrucksenkung, ein weiterer Hinweis auf eine unvollständige Blockade oder eine Desensibilisierung. Allerdings hatten auch die POB-behandelten Tiere leichte Blutdruckanstiege ab einer Dosis von 1  $\mu\text{g}$  NA/kg KG. Die Tiere, die zusätzlich eine Nifedipin-Infusion erhielten waren auch bei Applikation hoher NA-Dosen ausreichend hämodynamisch stabil.

Obwohl sich POB als das effektivste Medikament in der Prävention hypertensiver Krisen zeigte, verliert es offensichtlich über die Zeit an Wirksamkeit. Bei einer kürzeren Behandlungsdauer könnte sich möglicherweise eine niedrigere Dosis als ebenso effektiv und gleichfalls nebenwirkungsärmer erweisen.

Kompetitive reversible  $\alpha_1$ -Adrenozeptorblocker könnten aufgrund des reversiblen Wirkungsmechanismus besser verträglich sein als POB. Es ist allerdings davon auszugehen, dass es sich bei den, mit einer POB-Behandlung assoziierten, Nebenwirkungen um sogenannte Klasseneffekte handelt, die sich bei einer vergleichbaren Dosis der  $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonisten nicht von POB unterscheiden lassen [77]. Einzig die kürzere Wirkungsdauer könnte den postoperativen Zustand der Patienten verbessern, da mit der postoperativen Hypotension einfacher umzugehen sein sollte.

Nach Applikation von 10 mg/kg Urapidil i. v. in normotensiven Ratten, konnte bereits eine deutliche Reduktion des MAP beschrieben werden [118] und wir entschieden uns daher für diese Dosis.

10 mg/kg KG Urapidil einmalig i. v. verabreicht (s. Anhang unter 7.1.3), senkten den Blutdruck der chronisch NA-exponierten Tiere ohne eine Hypotension zu verursachen.

Obwohl Urapidil in diesem Studienteil den Blutdruck am deutlichsten reduzierte, konnten wir zeigen, dass ab einer NA-Dosis  $>1\mu\text{g}/\text{kg KG}$  kein ausreichender Schutz mehr vor hypertensiven Entgleisungen besteht.

Auch eine kontinuierliche Urapidil-Infusion bot nur einen Schutz bis zu einer NA-Dosis von  $1\mu\text{g}/\text{kg KG}$ . Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf die befürchtete Verdrängung von Urapidil durch hohe NA-Konzentrationen hin. Urapidil und vermutlich auch andere kompetitive  $\alpha$ -Blocker bieten keinen ausreichenden Schutz vor Katecholaminkrisen. Die Tiere der Nifedipin-/Kontrollgruppe, die präoperativ keinen  $\alpha$ -Blocker erhielten, zeigten eine wesentlich empfindlichere Reaktion auf die Urapidil-Infusion, mit Hypotonien teilweise  $<60/40$  mmHg. Diese Beobachtung bestätigt den befürchteten Klasseneffekt bezüglich des Nebenwirkungsprofils von reversiblen  $\alpha$ -AR-Blockern.

Nitrendipin hat eine längere Halbwertszeit als Nifedipin und wurde deshalb für die einmalige i. v. Applikation verwendet. Mit  $600\mu\text{g}/\text{kg KG}$  wurde die i. v. Dosis in einem hohen Bereich gewählt (s. Anhang unter 7.1.4). Brody et al. beschrieb bereits eine 39%ige Reduktion des Blutdrucks bei einer Dosis von  $100\mu\text{g}/\text{kg KG}$  [62].

NA-Dosen von  $10\mu\text{g}/\text{kg KG}$ , bei einigen Tieren sogar niedrigere Dosen, führten zu deutlichen hämodynamischen Instabilitäten. Auch wenn Calciumkanalblocker nur einen unvollständigen Schutz gegenüber hypertensiven Entgleisungen bieten, sprechen unsere Daten für einen effektiveren Schutz als durch Urapidil.

Aus diesem Grund setzten wir einen Calciumantagonisten neben POB zur Vorbehandlung ein. Für die kontinuierliche siebentägige Infusion via osmotischer Pumpe wählten wir Nifedipin ( $10\text{ mg}/\text{kg KG}/\text{d}$ ) (s. Anhang unter 7.1.5), da eine ausreichende Stabilität über diesen Zeitraum beschrieben wurde [119, 120].

Da Antihypertensiva dieser Gruppe als instabil gelten, testeten wir zusätzlich in einem weiteren Experiment die Haltbarkeit der Substanz. Nifedipin wurde im DMSO-Wassergemisch (10%) gelöst und über eine Woche im Brutschrank bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde die Aktivität durch i. v. Injektion in vivo überprüft, wobei die Wirkung vollständig erhalten war. Die Blutdruckwerte der Nifedipin-vorbehandelten Tiere im Rahmen der Hämodynamik zeigten keine wesentlichen Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse weisen auf einen ungenügenden Schutz gegenüber chronischem und akutem NA-Exzess durch Nifedipin hin. Die einmalige i. v. Applikation von Nitrendipin bot einen vergleichsweise besseren Schutz.

Proye et al. beschrieb einen unvollständigen Schutz durch eine Nicardipin-Vorbehandlung mit Blutdruckanstiegen, erhöhtem Herzindex und niedrigem peripheren Widerstand. 58% (n=19) der Studienpatienten erlitten hypertensive Entgleisungen während der Tumormanipulation [54]. Diese Beobachtung stimmt mit unseren Ergebnissen der medikamentösen Vorbehandlung überein. Eine Desensibilisierung könnte eine mögliche Erklärung sein. Diskutiert werden Calciumkanalblocker auch bei normotensiven Patienten mit paroxysmalen hypertensiven Episoden [9, 51, 78]. Diese Annahme würde dazu passen, das POB-vorbehandelte Tiere durch eine Nifedipin-Infusion stabilisiert werden konnten.

Um Rezeptorexpressionsunterschiede durch die NA-Exposition und die medikamentöse Vorbehandlung bedingt aufzuzeigen, führten wir eine semiquantitative PCR (Realtime PCR) mit Sybr® Green durch [99, 100].

Verwendet wurden Gewebeproben des linken Ventrikels und der Aorta abdominalis von POB-/ Nifedipin-vorbehandelten Tieren, Kontroll-Tieren und unbehandelten Tieren, sowie Primer des  $\alpha_1$ -AR und des Calciumkanals.

Die POB-vorbehandelten Tieren zeigten eine reduzierte Expression der Rezeptoren, sowohl im Ventrikel als auch in der Aorta abdominalis.

Im Ventrikel zeigten die Nifedipin-behandelten Tiere eher eine zunehmende Expression. In der Aorta zeigte sich ebenfalls eine, wenn auch deutlich geringer ausgeprägte, Abnahme der Expression.

Die mRNA-Spiegel des L-Typ-Calciumkanals werden vor allem durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation reguliert, die zu einer Zunahme führt.  $\alpha$ -adrenerge Stimulation hat einen reziproken Effekt [68, 82]. In spontan hypertensiven Ratten werden Erhöhungen der mRNA- und Protein-Level beschrieben [103, 121]. Die Rezeptorblockade durch POB und die  $\alpha$ -adrenerge Wirkung von NA könnten die Reduktion erklären.

Die mRNA-Level der 1a-Untereinheit des  $\alpha_1$ -AR waren im Ventrikel erniedrigt. Eine signifikante Zunahme der Expression dieses Subtyp unter NA, wie von Rokosh et al. an kardialen Myozyten der Ratte beschrieben, konnten wir nicht nachweisen [122].

Die Proben der Aorta der Kontrollgruppe zeigten gegenüber den unbehandelten Tieren leicht erhöhte Werte. Die medikamentöse Vorbehandlung mit POB und Nifedipin führte zu erniedrigten Spiegeln.

Eine möglich Erklärung ist eine Blockade durch POB. Nifedipin könnte die periphere Wirkung des Katecholamins abschwächen [123], allerdings bliebe die Frage, warum eine Vorbehandlung ohne Blutdruckreduktion bleibt, unbeantwortet.

Die Level des 1b- $\alpha_1$ -AR im Ventrikel waren in der Kontrollgruppe minimal, in der Nifedipin-Gruppe deutlicher erhöht. Eine POB-Behandlung führte zu einer leichten Abnahme.

In der Aorta zeigte sich eine Reduktion des Subtyps in allen Gruppen, am deutlichsten bei den POB-Tieren. Rokosh et al. beschreibt eine Reduktion des mRNA-Levels dieses Subtyps unter NA-Einfluss [122]. Allerdings zeigten die POB-vorbehandelten Tiere, die am deutlichsten erniedrigten Spiegel. Eine Erklärung könnte die schon vermutete Umkehr der NA-Adaption sein, durch die sich eine gesteigerte Empfindlichkeit erklären ließe.

Der 1d- $\alpha_1$ -AR hatte bei den Kontroll-/ und POB-Tieren im Ventrikel und in der Aorta einen erniedrigten Spiegel. Die Nifedipin-Tiere hingegen, zeigten im Ventrikel einen erhöhten Wert. In der Aorta war auch der Spiegel der Nifedipin-Tiere erniedrigt. Die erniedrigten Spiegel passen zu den Beobachtungen von Rokosh et al., der für diesen Subtyp ebenfalls eine Reduktion unter NA beschreibt [122].

Wir konnten im Rahmen der Realtime-PCR-Studie sowohl einen Effekt der NA-Exposition, als auch der medikamentösen Vorbehandlung zeigen. Die POB-behandelten Tiere hatten erniedrigte mRNA-Level im Vergleich zu den anderen Gruppen. Ein Zusammenhang zwischen irreversiblen  $\alpha$ -Block und erniedrigten mRNA-Spiegeln scheint somit wahrscheinlich. Die Interpretation der Ergebnisse der Realtime-PCR liefert interessante Aspekte, wie z. B die Wirkung von Nifedipin auf molekularer Ebene. Weitere Untersuchungen sind somit von Interesse.

Ein limitierendes Kriterium der Studie ist die fehlende Berücksichtigung der postoperativen Hypotension. Aus technischen Gründen ist es nicht möglich zwischen Effekten durch Entfernung der NA-Pumpe und Traumaschäden zu unterscheiden.

Bedeutsam ist außerdem, den Effekt von Adrenalin auf die hämodynamische Stabilität zu untersuchen, wozu weitere Studien nötig sind.

Eine tägliche orale Gabe der Antihypertensiva über den siebentägigen Zeitraum wäre näher an der klinischen Praxis gewesen, hätte aber zusätzlichen täglichen Stress für die Tiere und Diskontinuität bedeutet. Die Wahl des Vorbehandlungszeitraum von sieben Tagen orientierte sich eng an der klinischen Praxis [29]. Außerdem wurden Präparate, wie Arterenol®, Ebrantil® und Adalat® verwendet, die auch in der Klinik gebräuchlich sind. Die Medikamente die zur intraoperativen Stabilisierung zum Einsatz kamen, werden auch in der Klinik für diese Indikation eingesetzt [35, 54, 55]. Das verwendete volatile Anästhetikum Isofluran wird zudem sicher in der Phäochromozytomresektion angewendet [56].

Von allen im Rahmen dieser Studie getesteten Antihypertensiva, zeigte POB bezüglich der Simulation eines perioperativen Managements den effektivsten Schutz vor hypertensiven Entgleisungen. Unter zusätzlicher Nifedipin-Infusion, zeigten sich die vorbehandelten Tiere hämodynamisch auch gegenüber hohen NA-Dosen extrem stabil. In der Vorbehandlung von Patientin mit Phäochromozytom sollte POB weiterhin das Medikament der Wahl bleiben. Eine Kombination mit einer Dihydropyridin-Infusionstherapie scheint sehr vielversprechend. Calciumkanalantagonisten boten hingegen keinen effektiven Schutz in der Vorbehandlung. Eine zusätzliche Infusion mit Urapidil ist der mit Nifedipin, im Bezug auf die hämodynamische Stabilität, unterlegen. Urapidil eignet sich folglich nicht in erster Linie um eine hypertensive Krise zu verhindern.

## 5 Zusammenfassung

Hypertensive Entgleisungen werden bei Phäochromozytompatienten sowohl intra-/als auch präoperativ beobachtet.

Die Wahl der antihypertensiven Therapie ist jedoch Gegenstand einer wissenschaftlichen Kontroverse. Der Stellenwert einzelner Behandlungsregime ist in Abwesenheit randomisierter kontrollierter Studien unklar. Seit den 50er Jahren ist Phenoxybenzamin (POB) das am häufigsten eingesetzte Medikament in der Vorbehandlung. Als Alternativen mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil, werden selektive  $\alpha_1$ -Blocker und Calciumkanalantagonisten diskutiert.

In dieser Arbeit wurde in einem Tiermodell geprüft, ob  $\alpha_1$ -Blocker (Urapidil), Calciumkanalantagonisten (Nitrendipin und Nifedipin) und irreversible  $\alpha_1/\alpha_2$ -Blocker (Phenoxybenzamin) vergleichbar wirkungsvoll in der Prävention hypertensiver Krisen sind.

Zur Simulation eines chronischen Katecholaminexzesses wurden die Tiere drei Wochen mit Noradrenalin (NA) via osmotischer Pumpe (50  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) behandelt. Anschließend wurden die Tiere narkotisiert und akute Katecholaminkrisen durch NA-Boli in aufsteigender Dosis simuliert (0,1-1000  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ).

POB (10 mg/kg KG, n=4), Urapidil (10 mg/kg KG, n=3) und Nitrendipin (600  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ , n=6) senkten den systolischen Ausgangsblutdruck von  $212 \pm 12$  mmHg um  $52 \pm 7\%$ ,  $31 \pm 9\%$  und  $50 \pm 6\%$ . Die anschließenden Katecholaminkrisen führten zu Druckanstiegen von  $138 \pm 3$  mmHg,  $235 \pm 29$  mmHg,  $240 \pm 30$  mmHg in POB, Urapidil und Nitrendipin-behandelten Tieren ( $p < 0,01$ ).

In einer zweiten Studie wurden die Tiere für sieben Tage zusätzlich zu der Noradrenalingabe mit POB (10 mg/kg KG/Tag, n=9), Nifedipin (10 mg/kg KG/Tag, n=10), oder dem Lösungsmittel 10% DMSO/Wasser (n=7) behandelt.

Der systolische Ausgangsblutdruck lag bei  $167 \pm 7$  mmHg (POB),  $210 \pm 7$  mmHg (Nifedipin) und  $217 \pm 7$  mmHg (Kontrolle) ( $p < 0,01$ ).

Während der folgenden NA-Krisen lag der maximale systolische Blutdruck bei  $220 \pm 11$  mmHg (POB),  $282 \pm 8$  mmHg (Nifedipin) und  $268 \pm 16$  mmHg (Kontrolle) ( $p < 0,001$ ).

Anschließend erhielten die Tiere während der Katecholaminstimulation eine zusätzliche kontinuierliche Infusion mit Urapidil (Ebrantil®) oder Nifedipin (Adalat pro infusione®).

Durch eine kontinuierliche Infusion mit Nifedipin - zusätzlich zur POB-Vorbehandlung - konnte der Blutdruck am effektivsten stabilisiert werden ( $137 \pm 5$  mmHg (POB),  $272 \pm 5$  mmHg (Nifedipin)  $225 \pm 11$  mmHg (Kontrolle) ( $p < 0,001$ ).

Es konnte gezeigt werden, dass POB verglichen mit Urapidil, Nitrendipin und Nifedipin hypertensive Krisensituationen am effektivsten vorbeugt.

## 6 Summary

Calcium channel blockers and reversible  $\alpha_1$ -adrenoceptor blockers have been proposed as alternatives to POB in preoperative antihypertensive treatment of patient with pheochromocytoma. However these drugs were never sufficiently tested for this purpose and there are no consistent recommendations for antihypertensive pretreatment.

POB, urapidil, nitrendipine and nifedipine were systemically tested in rats in order to prove effectiveness in controlling blood pressure during acute and chronic catecholamine excess as observed in patients with pheochromocytoma.

Rats were treated with norepinephrine (NE) for three weeks via osmotic mini pumps (50  $\mu\text{g/h}$ ). Afterwards rats were anaesthetized, catheterized for hemodynamic measurements and acute catecholamine excess was stimulated by increasing doses of NE (0.1-1000  $\mu\text{g/kg BW IV}$ ).

A single dose of POB (10 mg/kg BW, n=4), urapidil (10 mg/kg BW, n=3) and nitrendipine (600  $\mu\text{g/kg BW}$ , n=6) lowered blood pressure from  $212 \pm 12$  mmHg at baseline by  $52 \pm 7\%$ ,  $31 \pm 9\%$  and  $50 \pm 6\%$  resp. Subsequently stimulation of acute catecholamine excess lead to a maximum blood pressure of  $138 \pm 3$  mmHg,  $235 \pm 29$ mmHg,  $240 \pm 30$  mmHg in POB, urapidil and nitrendipine treated animals ( $p < 0.01$ ).

In a second study animals were additionally treated with POB (10 mg/kg BW/d, n=9), nifedipine (10 mg/kg BW/d, n=10) or vehicle (n=7) for seven days prior to hemodynamic assessment. Baseline blood pressure was  $167 \pm 7$  mmHg (POB),  $210 \pm 7$  mmHg (nifedipine) and  $217 \pm 7$  mmHg (controls) ( $p < 0.01$ ). During the following NE challenge maximum blood pressure was  $220 \pm 11$  mmHg (POB),  $282 \pm 8$  (nifedipine) and  $268 \pm 16$  mmHg (controls) ( $p < 0.001$ ).

Subsequently rats received an additional continuous infusion with either urapidil (Ebrantil®) or nifedipine (Adalat pro infusione®) during acute NE bolus stimulation.

A continuous infusion with nifedipine in addition to POB pretreatment showed a significantly better hemodynamic stability  $137 \pm 5$ mmHg (POB),  $272 \pm 5$ mmHg (nifedipine)  $225 \pm 11$ mmHg (controls) ( $p < 0.001$ ).

## Summary

---

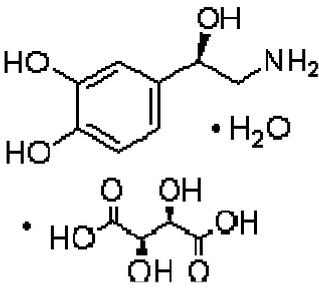
In summary all drugs which were tested in our studies lowered the blood pressure significantly. However only POB prevented recurring severe hypertensive episodes within NE excess. A pretreatment with POB and additional continuous infusion with nifedipine provides superior hemodynamic stability.

## 7 Anhang

### 7.1 Steckbriefe der eingesetzten Pharmaka

#### 7.1.1 Noradrenalin

**Tabelle 19 Noradrenalin**

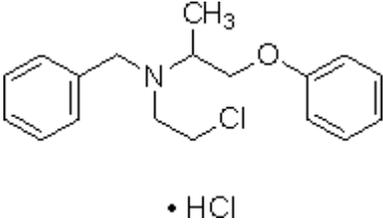
Strukturformel	
 <p>L-(-)-Norepinephrin (+)-Bitartrat [124]</p>	
Verwendet	L-(-)-Norepinephrin (+)-Bitartrat N 5785 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) gelöst in Ascorbinsäure 50 mM/NaCl 0,9 % und, via osmotischer Pumpe verabreicht; Arterenol® (Sanofi-Aventis, Deutschland) zur i. v. Bolus-Injektion
Löslichkeit	NaCl 0,9 % mit 50mM Ascorbinsäure [86-88] nach Herstellerempfehlung, zur Prüfung der Löslichkeit wurden Löslichkeitsversuche durchgeführt
Handelsname	Arterenol®
Darreichungsform	Injektionslösung

Pharmakodynamik
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>-/ und <math>\beta</math>-adrenerger Agonist</li> </ul>
Dosisfindung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rosenbaum et al. beschreibt Serumspiegel von 10.000-40.000 pg/ml bei Ratten denen ein Phäochromozytom subkutan implantiert wurde, in Kontroll-Tieren wurden Werte von 200-400 pg/ml gemessen [91, 92].</li> <li>• Serumspiegelanstiege auf <math>21.887 \pm 5949</math> pg/ml (ausgehend von <math>1106 \pm 291</math> pg/ml) führten zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks von <math>131 \pm 2</math> auf <math>182 \pm 4</math> mmHg [92].</li> <li>• Eine Injektion von <math>0,1 \mu\text{g/kg/min}</math> erhöhte den MAP (mittlere arterielle Druck) um 10 mmHg, <math>1 \mu\text{g/kg/min}</math> um 25 mmHg und <math>10 \mu\text{g/kg/min}</math> um 40 mmHg in Mäusen [125].</li> <li>• Eine Infusionsrate von <math>3 \mu\text{g NA/kg/min}</math> erhöhte den Blutdruck um 17% und den NA-Plasmaspiegel auf <math>24.740 \pm 3890</math> pg/ml in Ratten [126].</li> <li>• Johnson et al. infundierte Ratten <math>0,1 \text{ mg/kg/h}</math> s. c. über osmotische Pumpen für sechs Tage und erreichte eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks von 40 mmHg; der Plasmanoradrenalinpiegel erhöhte sich von 330 auf 13.000 pg/ml (nach einem Tag) und auf 21.000 pg/ml nach sechs Tagen [87, 115].</li> <li>• Sun et al. infundierte <math>50 \mu\text{g NA/kg/h}</math> für drei bzw. sechs Tage normotensiven Ratten, der Blutdruck erhöhte sich nach sechs Tagen auf 150 mmHg (Kontrolltiere 123 mmHg), die Herzfrequenz betrug 325/min (Kontrolltiere 255/min) [86].</li> <li>• Der physiologische Noradrenalinpiegel liegt beim Mensch bei 0-500 ng/l. In Korrelation mit Tumormanipulationen sind Spiegel um 30.000 ng/l beschrieben [27].             <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Der anzustrebende Spiegel liegt bei etwa 15.000-20.000 pg/ml.</li> <li>➤ Wir verabreichten <math>50 \mu\text{g/h}</math> s. c. über eine osmotische Pumpe und wählten für die Bolus-Applikation einen Dosisbereich von <math>0,1 \mu\text{g/kg}</math> bis <math>1000 \mu\text{g/kg}</math>, wobei die hohen Dosen nur bei ausreichender hämodynamischer Stabilität gegeben wurden.</li> </ul> </li> </ul>

[65, 72, 87, 88, 115], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, Hersteller-/ und Sicherheitsblatt 2006

7.1.2 Phenoxybenzamin

Tabelle 20 Phenoxybenzamin

Strukturformel	
 <p style="text-align: center;">• HCl</p> <p style="text-align: center;">Phenoxybenzaminhydrochlorid [127]</p>	
Verwendet	Phenoxybenzaminhydrochlorid B019, >97 % Puder (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) gelöst in DMSO 10% und via i. v. Injektion bzw. osmotischer Pumpe verabreicht
Löslichkeit	Ethanol, Propylenglykol, DMSO, zur Prüfung der Löslichkeit wurden Herstellerempfehlungen herangezogen und Löslichkeitsversuche durchgeführt [128]
Handelsname	Dibenzylin®, Dibenzyran®
Darreichungsform	oral, Kapsel
Pharmakodynamik	
blockierter Rezeptor	$\alpha_1/\alpha_2$ unselektiv
Wirkmechanismus	irreversible, nicht-kompetitiv

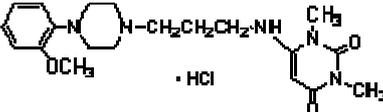
Dosisfindung

- Rosenbaum et al. beschreibt eine unvollständige Rezeptorblockade mit 4 mg/kg /d i. p. in der Phäochromzytom-Ratte [91, 92].
- Hamilton et al. applizierte 5 mg/kg i. v. und erreichte eine Reduktion des MAP um 17% im Hasen [73].
- Raasch et al. verabreichte 10 mg/kg i. v. und beobachtete eine komplette Blockade des  $\alpha_2$ -AR in SHR [116].
- Die initiale Dosis beim Menschen liegt bei 10 mg zweimal/d, die maximale Dosis bei 1 mg/kg/d [8].
  - Wir verabreichten 10 mg/kg KG einmalig i. v. und 10 mg/kg/d s. c über eine osmotische Pumpe jeweils gelöst in 10% DMSO/Wasser.

[72, 129, 130], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, Herstellerinformation und Sicherheitsdatenblatt 2006

7.1.3 Urapidil

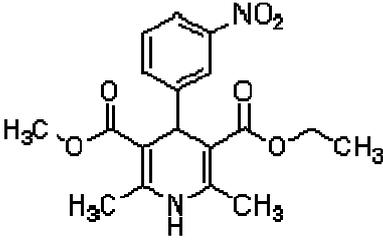
Tabelle 21 Urapidil

Strukturformel	
 <p>Urapidilhydrochlorid [131]</p>	
Verwendet	Ebrantil® zur Injektion und Infusion (Altana Pharma, Konstanz, Deutschland);
Handelsname	Ebrantil®
Darreichungsform	Injektionslösung, Kapseln
Pharmakodynamik	
blockierter Rezeptor	$\alpha_1$ -selektiv
Wirkmechanismus	reversible, kompetitiv
Dosisfindung	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tausin-Fin et al. infundierte perioperativ kontinuierlich 10-15 mg/h Urapidil im Menschen und verabreichte präoperativ 5 mg Prazosin/d und 10-15 mg/h Urapidil i. v. für 3 Tage . Er beschreibt eine sicherer effiziente Alternative in der Vorbehandlung [28].</li> <li>• Bunag et al. injizierte 10 mg/kg/min Urapidil i. v. in der Ratte, der MAP wurde um 14% reduziert [118].</li> <li>• Beim Menschen werden 10 bis max. 50 mg langsam i. v. gespritzt. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Wir verabreichten 10 mg/kg Urapidil i. v. als Bolus, die Infusionsrate wurde nach Blutdruck (Zielwert 120 mmHg) eingestellt.</li> </ul> </li> </ul>	

[65, 72, 132], Gebrauchs-/ und Fachinformation *Ebrantil*®, Altana Pharma, Deutschland, 2005

7.1.4 Nitrendipin

Tabelle 22 Nitrendipin

Strukturformel	
 <p>Nitrendipin [133]</p>	
Verwendet	Nitrendipin N144, >95 % Puder (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) gelöst in 10% DMSO/Wasser zur i. v. Injektion
Löslichkeit	DMSO, zur Prüfung der Löslichkeit wurden Herstellerempfehlungen herangezogen und Löslichkeitsversuche durchgeführt [128]
Handelsname Darreichungsform	Bayotensin®, Jutapress® Oral, Tabletten
Pharmakodynamik	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• langwirksamer Calciumantagonist vom Dihydropyridin-Typ</li> <li>• Wirkung durch reversible Bindung an die <math>\alpha</math>-1c-Untereinheit des Calciumkanals</li> </ul>	

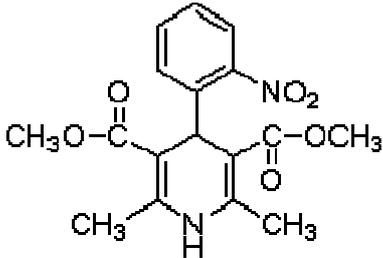
Dosisfindung

- Brody et al. verabreichte 100 µg/kg als Bolus i. v. und beobachtete eine Reduktion des MAP um  $39 \pm 5\%$  in der Ratte [62].
- Teranishi et al. applizierte SHR 600 µg/kg Nifedipin i. v. als Bolus, der Blutdruck fiel um 14-17% [134].
- In SHR wurde eine Dosis von 100 µg/kg Nitrendipin i. v. verabreicht und RR-Senkungen bis zu 50 mmHg beobachtet [135].
  - Wir verabreichten 600 µg/kg Nitrendipin als i. .v Bolus.

[65, 72, 83, 136], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, Herstellerinformation und Sicherheitsblatt  
2006

7.1.5 Nifedipin

Tabelle 23 Nifedipin

Strukturformel	
 <p>Nifedipin [137]</p>	
Verwendet	Nifedipin N 7634, >98 % Puder (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) gelöst in 10% DMSO/Wasser zur Pumpenapplikation; Adalat® pro infusione (Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland) als Infusion
Besonderheiten	sehr lichtempfindlich
Löslichkeit	Ethanol, DMSO, zur Prüfung der Löslichkeit wurden Herstellerempfehlungen herangezogen und Löslichkeitsversuche durchgeführt [128]
Handelsname Darreichungsform	Adalat® pro infusione, Adalat® Infusionslösung, Kapseln

Pharmakodynamik
<ul style="list-style-type: none"><li>• kurzwirksamer Calciumantagonist vom Dihydropyridin-Typ</li><li>• Wirkung durch reversible Bindung an die <math>\alpha</math>-1c-Untereinheit des Calciumkanals</li></ul>
Dosisfindung
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hirata et al. verabreichte 3 mg/kg/d via osmotischer Pumpe in normotensiven Ratten und beschrieb eine diskrete Blutdrucksenkung [138].</li><li>• Michaluk et al. applizierte 5 mg/kg/d i. p. ohne Veränderung des Blutdrucks in normotensiven Ratten [139].</li><li>• Teranishi et al. applizierte SHR 600 <math>\mu</math>g/kg Nifedipin i. v. als Bolus, der Blutdruck fiel um 14-17% [134].</li><li>• Karasawa et al. verabreichte 100 <math>\mu</math>g/kg Nifedipin i. v. in SHR und beschrieb RR-Senkungen von etwa 50 mmHg mit kurzem Effekt [135].<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Wir verabreichten 10 mg/kg/d gelöst in 10% DMSO/Wasser s.c. via osmotischer Pumpe.</li><li>➤ Die Infusionsrate wurde nach Blutdruck (Zielwert 120 mmHg) eingestellt.</li></ul></li></ul>

[65, 72, 83]; Gebrauchs- und Fachinformation Adalat® pro infusione, Bayer HealthCare, 2004; Sigma-Aldrich Chemie GmbH Herstellerinformation und Sicherheitsblatt 2006

## 7.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AH	Antihypertensivum
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AR	Adrenozeptor
Blutdruck	gemeint ist der systolischer Blutdruck
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
DAG:	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDA	enddiastolische Fläche (end-diastolic area)
EDD	enddiastolischer Durchmesser (end-diastolic diameter)
EKG	Elektrokardiogramm
ESA	endsystolische Fläche (end-systolic area)
ESD	endsystolischer Durchmesser (end.systolic diameter)
FS	Verkürzungsfraction (fractional shortening)
Gi:	inhibitorisches G-Protein
Gs:	stimulierendes G-Protein
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HR	Herzfrequenz (heart rate)
5-HT	5-Hydroxytryptamin
IP3:	Inositoltriphosphat
i. v.	intravenös
KG	Körpergewicht
M	Mittelwert (mean)
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
Max.	Maximum
MEN-2:	mutiple endokrine Neoplasie Typ 2
MHz	Megahertz
min	Minute

## Anhang

---

Min.	Minimum
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-mode	motion mode
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
Nif	Nifedipin
Nit	Nitrendipin
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
POB:	Phenoxybenzamin
RR oder RR <sub>sys</sub>	systolischer Blutdruck
SE	Standardfehler (standard error)
s	Sekunde
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
sys	systolisch
Tab.	Tabelle
U	Umdrehungen
Urap	Urapidil
WHO	World Health Organization
↑	Erhöhung
↓	Erniedrigung

## 8 Literaturverzeichnis

1. Pacak K: Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(11):4069-4079.
2. Manger WM: An overview of pheochromocytoma: history, current concepts, vagaries, and diagnostic challenges. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1073:1-20.
3. Liao WB, Liu CF, Chiang CW, Kung CT, Lee CW: Cardiovascular manifestations of pheochromocytoma. *Am J Emerg Med* 2000, 18(5):622-625.
4. Taylor MJ, McIndoe A: Unresponsive asystolic cardiac arrest responding to external cardiac pacing in a patient with phaeochromocytoma. *Anaesthesia* 2007, 62(8):838-841.
5. Adams HA, Hempelmann G: [Anesthesia for patients with pheochromocytoma. Our own results and a review]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1993, 28(8):500-509.
6. Weismann D, Fassnacht M, Schubert B, Bonfig R, Tschammler A, Timm S, Hahner S, Wunder C, Allolio B: A dangerous liaison--pheochromocytoma in patients with malignant disease. *Ann Surg Oncol* 2006, 13(12):1696-1701.
7. Myklejord DJ: Undiagnosed pheochromocytoma: the anesthesiologist nightmare. *Clin Med Res* 2004, 2(1):59-62.
8. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K: Phaeochromocytoma. *Lancet* 2005, 366(9486):665-675.
9. Bravo EL: Pheochromocytoma. *Curr Ther Endocrinol Metab* 1997, 6:195-197.
10. Prys-Roberts C: Phaeochromocytoma--recent progress in its management. *Br J Anaesth* 2000, 85(1):44-57.
11. Ross EJ: Clinical aspects of phaeochromocytoma. *Proc R Soc Med* 1972, 65(9):792-793.
12. van der Horst-Schrivers AN, Kerstens MN, Wolffenbuttel BH: Preoperative pharmacological management of phaeochromocytoma. *Neth J Med* 2006, 64(8):290-295.
13. Mannelli M: Management and treatment of pheochromocytomas and paragangliomas. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1073:405-416.
14. Anderson GH, Jr., Blakeman N, Streeten DH: The effect of age on prevalence of secondary forms of hypertension in 4429 consecutively referred patients. *J Hypertens* 1994, 12(5):609-615.

15. Omura M, Saito J, Yamaguchi K, Kakuta Y, Nishikawa T: Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens Res* 2004, 27(3):193-202.
16. Sinclair AM: Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch Intern Med* 1987, 147:1289-1293.
17. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR: The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004, 25(2):309-340.
18. Whalen RK, Althausen AF, Daniels GH: Extra-adrenal pheochromocytoma. *J Urol* 1992, 147(1):1-10.
19. Bravo EL, Tagle R: Pheochromocytoma: state-of-the-art and future prospects. *Endocr Rev* 2003, 24(4):539-553.
20. O'Riordain DS, Young WF, Jr., Grant CS, Carney JA, van Heerden JA: Clinical spectrum and outcome of functional extraadrenal paraganglioma. *World J Surg* 1996, 20(7):916-921; discussion 922.
21. Boccara G, Mann C, Guillon G: Secretion of vasopressin from a human pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 1998, 128(12 Pt 1):1049.
22. Page LB, Raker JW, Berberich FR: Pheochromocytoma with predominant epinephrine secretion. *Am J Med* 1969, 47(4):648-652.
23. Chalfie M, Perlman RL: Studies of a transplantable rat pheochromocytoma: biochemical characterization and catecholamine secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 1976, 197(3):615-622.
24. Proye C, Fossati P, Fontaine P, Lefebvre J, Decoulx M, Wemeau JL, Dewailly D, Rwamasirabo E, Cecat P: Dopamine-secreting pheochromocytoma: an unrecognized entity? Classification of pheochromocytomas according to their type of secretion. *Surgery* 1986, 100(6):1154-1162.
25. Proye C, Racadot-Leroy N, Vix M, Vermesse B, Carnaille B: [Comparative secretory profiles of benign and malignant pheochromocytomas]. *Ann Chir* 1994, 48(5):430-434.
26. Kamiutsuri K, Taki Y, Myojo Y, Tohyama K: [Management for the removal of dopamin-secreting pheochromocytoma]. *Masui* 2007, 56(2):186-189.
27. Joris JL, Hamoir EE, Hartstein GM, Meurisse MR, Hubert BM, Charlier CJ, Lamy ML: Hemodynamic changes and catecholamine release during laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma. *Anesth Analg* 1999, 88(1):16-21.

28. Tauzin-Fin P, Sesay M, Gosse P, Ballanger P: Effects of perioperative alpha block on haemodynamic control during laparoscopic surgery for pheochromocytoma. *Br J Anaesth* 2004, 92(4):512-517.
29. Newell KA, Prinz RA, Brooks MH, Glisson SN, Barbato AL, Freeark RJ: Plasma catecholamine changes during excision of pheochromocytoma. *Surgery* 1988, 104(6):1064-1073.
30. Gifford RW, Jr., Manger WM, Bravo EL: Pheochromocytoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994, 23(2):387-404.
31. La Batide-Alanore A, Chatellier G, Plouin PF: Diabetes as a marker of pheochromocytoma in hypertensive patients. *J Hypertens* 2003, 21(9):1703-1707.
32. Tokuda H, Hosoi T, Hayasaka K, Okamura K, Yoshimi N, Kozawa O: Overexpression of protein kinase C-delta plays a crucial role in interleukin-6-producing pheochromocytoma presenting with acute inflammatory syndrome: a case report. *Horm Metab Res* 2009, 41(4):333-338.
33. Serfas D: Pheochromocytoma and hypertrophic cardiomyopathy: apparent suppression of symptoms and noradrenaline secretion by calcium-channel-blockade. *Lancet* 1987, ii:711-714.
34. Quigg RJ, Om A: Reversal of severe cardiac systolic dysfunction caused by pheochromocytoma in a heart transplant candidate. *J Heart Lung Transplant* 1994, 13(3):525-532.
35. Mundschenk J: Phäochromozytom Klinik Diagnostik und Therapie. *Dt Ärztebl* 2001, 39:2502-2510.
36. Lehnert H, Schulz C, Mundschenk J, Kopf D: [Clinical and endocrine diagnosis of pheochromocytoma]. *Zentralbl Chir* 1997, 122(6):447-453.
37. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Longo DL, Hauser SL, Jameson JL: Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol. 17. New York: McGraw-Hill Medical; 2008: 2269-2275.
38. Lenders JW, Keiser HR, Goldstein DS, Willemsen JJ, Friberg P, Jacobs MC, Kloppenborg PW, Thien T, Eisenhofer G: Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 1995, 123(2):101-109.
39. Bravo EL: Evolving concepts in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of pheochromocytoma. *Endocr Rev* 1994, 15(3):356-368.
40. Manger T, Piatek S, Klose S, Kopf D, Kunz D, Lehnert H, Lippert H: [Bilateral laparoscopic transperitoneal adrenalectomy in pheochromocytoma]. *Langenbecks Arch Chir* 1997, 382(1):37-42.

41. Weismann D, Fassnacht M, Weinberger F, Hamelmann W, Diehl S, Lorenz K, Baerlechner E, Reincke M, Beuschlein F, Knoefel W *et al*: Intraoperative haemodynamic stability in patients with pheochromocytoma--minimally invasive vs conventional open surgery. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006, 65(3):352-358.
42. Cheah WK, Clark OH, Horn JK, Siperstein AE, Duh QY: Laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma. *World J Surg* 2002, 26(8):1048-1051.
43. Niemann U, Hiller W, Behrend M: 25 years experience of the surgical treatment of pheochromocytoma. *Eur J Surg* 2002, 168(12):716-719.
44. Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, Bornstein SR, Gimenez-Roqueplo AP, Grossman AB, Kimura N, Mannelli M, McNicol AM, Tischler AS: Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007, 3(2):92-102.
45. Apgar V, Papper EM: Pheochromocytoma. Anesthetic management during surgical treatment. *AMA Arch Surg* 1951, 62(5):634-648.
46. Walz MK, Alesina PF, Wenger FA, Koch JA, Neumann HP, Petersenn S, Schmid KW, Mann K: Laparoscopic and retroperitoneoscopic treatment of pheochromocytomas and retroperitoneal paragangliomas: results of 161 tumors in 126 patients. *World J Surg* 2006, 30(5):899-908.
47. Boutros AR, Bravo EL, Zanettin G, Straffon RA: Perioperative management of 63 patients with pheochromocytoma. *Cleve Clin J Med* 1990, 57(7):613-617.
48. Lebuffe G, Dosseh ED, Tek G, Tytgat H, Moreno S, Tavernier B, Vallet B, Proye CA: The effect of calcium channel blockers on outcome following the surgical treatment of pheochromocytomas and paragangliomas. *Anaesthesia* 2005, 60(5):439-444.
49. Hull CJ: Pheochromocytoma. Diagnosis, preoperative preparation and anaesthetic management. *Br J Anaesth* 1986, 58(12):1453-1468.
50. Manger WM, Gifford RWJ: Clinical and experimental pheochromocytoma, 2. edn: Cambridge, Blackwell; 1996.
51. Kinney MA, Narr BJ, Warner MA: Perioperative management of pheochromocytoma. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002, 16(3):359-369.
52. Sutton MG, Sheps SG, Lie JT: Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma. Review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin Proc* 1981, 56(6):354-360.

53. O'Riordan JA: Pheochromocytomas and anesthesia. *Int Anesthesiol Clin* 1997, 35(4):99-127.
54. Proye C, Thevenin D, Cecat P, Petillot P, Carnaille B, Verin P, Sautier M, Racadot N: Exclusive use of calcium channel blockers in preoperative and intraoperative control of pheochromocytomas: hemodynamics and free catecholamine assays in ten consecutive patients. *Surgery* 1989, 106(6):1149-1154.
55. Combemale F, Carnaille B, Tavernier B, Hautier MB, Thevenot A, Scherpereel P, Proye C: [Exclusive use of calcium channel blockers and cardioselective beta-blockers in the pre- and per-operative management of pheochromocytomas. 70 cases]. *Ann Chir* 1998, 52(4):341-345.
56. Kinney MA, Warner ME, vanHeerden JA, Horlocker TT, Young WF, Jr., Schroeder DR, Maxson PM, Warner MA: Perianesthetic risks and outcomes of pheochromocytoma and paraganglioma resection. *Anesth Analg* 2000, 91(5):1118-1123.
57. Roizen MF: Anesthesia for patients with pheochromocytoma. *Anesthesiol Clin North Am* 1987, 5:269-275.
58. Cubeddu LX, Zarate NA, Rosales CB, Zschaeck DW: Prazosin and propranolol in preoperative management of pheochromocytoma. *Clin Pharmacol Ther* 1982, 32(2):156-160.
59. Wallace JM, Gill DP: Prazosin in the diagnosis and treatment of pheochromocytoma. *Jama* 1978, 240(25):2752-2753.
60. Prys-Roberts C, Farndon JR: Efficacy and safety of doxazosin for perioperative management of patients with pheochromocytoma. *World J Surg* 2002, 26(8):1037-1042.
61. Miura Y, Yoshinaga K: Doxazosin: a newly developed, selective alpha 1-inhibitor in the management of patients with pheochromocytoma. *Am Heart J* 1988, 116(6 Pt 2):1785-1789.
62. Brody MJ, Barron KW, Faber JE, Lappe RW, Trapani AJ: Effects of Nitrendipine and Nisoldipine on Arterial Pressure and Regional Hemodynamics in the Conscious Rat. In: *Nitrendipine*. Edited by Scriabine A, Vanov S, Deck K. Baltimore, Munich: Urban&Schwarzenberg; 1984: 271-279.
63. Serfas D, Shoback DM, Lorell BH: Pheochromocytoma and hypertrophic cardiomyopathy: apparent suppression of symptoms and noradrenaline secretion by calcium-channel blockade. *Lancet* 1983, 2(8352):711-713.
64. Schütz W: Grundsätze der Katecholamintherapie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2000, 35:67-81.

65. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2009: 119 ff., 178 ff., 469 ff.
66. Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ: Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* 2000, 101(14):1634-1637.
67. Brodde OE, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999, 51(4):651-690.
68. van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T: Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cardiovasc Res* 2005, 65(1):28-39.
69. Chen-Izu Y, Xiao RP, Izu LT, Cheng H, Kuschel M, Spurgeon H, Lakatta EG: G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels. *Biophys J* 2000, 79(5):2547-2556.
70. Xiao RP: Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G(s) and G(i) proteins. *Circ Res* 2000, 87(8):635-637.
71. Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA: Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2000, 88(3):281-309.
72. Thiel H, Roewer N: *Anästhesiologische Pharmakotherapie*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009: 250 ff., 269 f., 276 ff.
73. Hamilton CA, Dalrymple HW, Reid JL, Sumner DJ: The recovery of alpha-adrenoceptor function and binding sites after phenoxybenzamine. An index of receptor turnover? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984, 325(1):34-41.
74. Rosenthal R, Conen D: Phäochromozytom: Diagnose und Therapie. *Schweiz Med Wochenschr* 2000, 37:1298-1304.
75. Hoffman BB, Lefkowitz RJ: Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edited by Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, vol. 9. New-York: McGraw-Hill; 1995: 199-247.
76. Iseri LT, Henderson HW, Derr JW: Use of adrenergic drug, regitine, in pheochromocytoma. *Am Heart J* 1951, 42:129-136.
77. Carruthers SG: Adverse effects of alpha 1-adrenergic blocking drugs. *Drug Saf* 1994, 11(1):12-20.
78. Bravo EL: Pheochromocytoma. *Cardiol Rev* 2002, 10(1):44-50.

79. Langer SZ: Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 1980, 32(4):337-362.
80. Bergman SM, Sears HF, Javadpour N, Keiser HR: Postoperative management of patients with pheochromocytoma. *J Urol* 1978, 120(1):109-112.
81. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: Abb. 18.9 Modell des L-Typ-Calciumkanals. In: *Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2009: 189. Mit freundlicher Genehmigung der Elsevier GmbH.
82. Maki T, Gruver EJ, Davidoff AJ, Izzo N, Toupin D, Colucci W, Marks AR, Marsh JD: Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines. *J Clin Invest* 1996, 97(3):656-663.
83. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: *Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2009: 189 ff.
84. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C *et al*: The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2005, 67(4):604-612.
85. Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J, Govindaraj V, von Poser-Klein C, Bauersachs J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L *et al*: Ligand-dependent activation of ER{beta} lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2008, 77(4):774-781.
86. Sun X, Ng YC: Effects of norepinephrine on expression of IGF-1/IGF-1R and SERCA2 in rat heart. *Cardiovasc Res* 1998, 37(1):202-209.
87. Johnson MD, Smith PG, Mills E, Schanberg SM: Paradoxical elevation of sympathetic activity during catecholamine infusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1983, 227(1):254-259.
88. Theeuwes F, Yum SI: Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng* 1976, 4(4):343-353.
89. Rhoden CH, Leeper DB, Smith IM, Evans TC, Duling BR: Blood pressure changes in mice after lethal staphylococcal infection and endotoxin challenge. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975, 149(3):622-625.
90. Widdop RE, Li XC: A simple versatile method for measuring tail cuff systolic blood pressure in conscious rats. *Clin Sci (Lond)* 1997, 93(3):191-194.

91. Rosenbaum JS, Zera P, Umans VA, Ginsburg R, Hoffman BB: Desensitization of aortic smooth muscle contraction in rats harboring pheochromocytoma. *J Pharmacol Exp Ther* 1986, 238(2):396-400.
92. Rosenbaum JS, Ginsburg R, Billingham ME, Hoffman BB: Effects of adrenergic receptor antagonists on cardiac morphological and functional alterations in rats harboring pheochromocytoma. *J Pharmacol Exp Ther* 1987, 241(1):354-360.
93. Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C: Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 282(6):H2099-2105.
94. Hu K, Gaudron P, Ertl G: Long-term effects of beta-adrenergic blocking agent treatment on hemodynamic function and left ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction: importance of timing of treatment and infarct size. *J Am Coll Cardiol* 1998, 31(3):692-700.
95. Sprung J, O'Hara JF, Jr., Gill IS, Abdelmalak B, Sarnaik A, Bravo EL: Anesthetic aspects of laparoscopic and open adrenalectomy for pheochromocytoma. *Urology* 2000, 55(3):339-343.
96. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT: Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999, 99(23):3063-3070.
97. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P *et al*: Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000, 106(1):55-62.
98. Frantz S, Hu K, Widder J, Weckler B, Scheuermann H, Bauersachs J, Ertl G, Callies F, Allolio B: Detrimental effects of testosterone on post-myocardial infarction remodelling in female rats. *J Physiol Pharmacol* 2007, 58(4):717-727.
99. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29(9):e45.
100. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998, 24(6):954-958, 960, 962.
101. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
102. Pfaffl MW: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* 2004, 10:92-95.

103. Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, Bonnet P, Rusch NJ: Upregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension* 2002, 40(2):214-219.
104. Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C *et al*: Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(21):11589-11594.
105. Rozen S, Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz S, Misener S. Totowa, NJ: Humana Press; 2000: 365-386.
106. R: A language and environment for statistical computing. [computer program]. R version 2.5.0 (2007-04-23) edn. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2007.
107. Platts JK, Drew PJ, Harvey JN: Death from pheochromocytoma: lessons from a post-mortem survey. *J R Coll Physicians Lond* 1995, 29(4):299-306.
108. Primhak RA, Spicer RD, Variend S: Sudden death after minor abdominal trauma: an unusual presentation of pheochromocytoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986, 292(6513):95-96.
109. Bruynzeel H, Feelders RA, Groenland TH, van den Meiracker AH, van Eijck CH, Lange JF, de Herder WW, Kazemier G: Risk Factors for Hemodynamic Instability during Surgery for Pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(2):678-685.
110. Colson P, Ryckwaert F, Ribstein J, Mann C, Dareau S: Haemodynamic heterogeneity and treatment with the calcium channel blocker nifedipine during pheochromocytoma surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998, 42(9):1114-1119.
111. Steinsapir J, Carr AA, Prisant LM, Bransome ED, Jr.: Metyrosine and pheochromocytoma. *Arch Intern Med* 1997, 157(8):901-906.
112. Pacak K, Ilias I, Adams KT, Eisenhofer G: Biochemical diagnosis, localization and management of pheochromocytoma: focus on multiple endocrine neoplasia type 2 in relation to other hereditary syndromes and sporadic forms of the tumour. *J Intern Med* 2005, 257(1):60-68.
113. Lattion AL, Diviani D, Cotecchia S: Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994, 269(36):22887-22893.

114. Tsujimoto G, Honda K, Hoffman BB, Hashimoto K: Desensitization of postjunctional alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptor-mediated vasopressor responses in rat harboring pheochromocytoma. *Circ Res* 1987, 61(1):86-98.
115. Johnson MD, Grignolo A, Kuhn CM, Schanberg SM: Hypertension and cardiovascular hypertrophy during chronic catecholamine infusion in rats. *Life Sci* 1983, 33(2):169-180.
116. Raasch W, Jungbluth B, Schafer U, Hauser W, Dominiak P: Modification of noradrenaline release in pithed spontaneously hypertensive rats by I1-binding sites in addition to alpha2-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 304(3):1063-1071.
117. Brodde OE: Prinzipien der rationalen Katecholamintherapie. In: *Refresher Course Aktuelles Wissen für Anästhesisten*. Edited by Radke J. Berlin: Springer; 1995: 89-102.
118. Bunag RD, Thomas CV, Mellick JR: Ketanserin versus urapidil: age-related cardiovascular effects in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2002, 435(1):85-92.
119. Vazquez E, Coronel I, Bautista R, Romo E, Villalon CM, Avila-Casado MC, Soto V, Escalante B: Angiotensin II-dependent induction of AT(2) receptor expression after renal ablation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 288(1):F207-213.
120. Jacques D, Bkaily G, Jasmin G, D'Orleans-Juste P, Chahine M: Isradipine prevents the development of spontaneously occurring cardiac necrosis in cardiomyopathic hamster. *Can J Physiol Pharmacol* 2003, 81(2):120-124.
121. Pesic A, Madden JA, Pesic M, Rusch NJ: High blood pressure upregulates arterial L-type Ca<sup>2+</sup> channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res* 2004, 94(10):e97-104.
122. Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC, Bailey BA, Karliner JS, Camacho SA, Long CS, Simpson PC: Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem* 1996, 271(10):5839-5843.
123. von Euler US, Lishajko F: Effects of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on noradrenaline release and uptake in adrenergic nerve granules in differential media. *Acta Physiol Scand* 1973, 89(3):415-422.
124. Sigma-Aldrich: L-(-)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt monohydrate [N 5785], [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (zuletzt abgerufen am 19.06.2011). Mit freundlicher Genehmigung der Sigma-Aldrich GmbH.

125. Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G: Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab* 2003, 14(3):107-113.
126. Maignan E, Legrand M, Aboulfath I, Safar M, Cuhe JL: Norepinephrine kinetics in freely moving rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 281(4):E726-735.
127. Sigma-Aldrich: Phenoxybenzamine hydrochloride [B 019], [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (zuletzt abgerufen am 19.06.2011). Mit freundlicher Genehmigung der Sigma-Aldrich GmbH.
128. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P: Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 2002, 25(12):1600-1603.
129. Thonen H, Mueller RA, Axelrod J: Neuronally dependent induction of adrenal phenylethanolamine-N-methyltransferase by 6-hydroxydopamine. In., vol. *Biochem. Pharmacol.* 19; 1990: 669-673.
130. Weiner N: Drugs That Inhibit Adrenergic Nerves and Block Adrenergic Receptors. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edited by Goodman L, Gilman A, vol. 6. New York: Macmillian Publishing Co.; 1980: 179-182.
131. Sigma-Aldrich: Urapidil hydrochloride [U 100], [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (zuletzt abgerufen am 19.06.2011). Mit freundlicher Genehmigung der Sigma-Aldrich GmbH.
132. König J, Meier-Dorzenbach ED, Menge HG, Müller H, Padberg G, Petersen-Knoche C, Schafer H: [Toxicologic study on the antihypertensive agent urapidil]. *Arzneimittelforschung* 1977, 27(10):1919-1932.
133. Sigma-Aldrich: Nitrendipine [N 144], [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (zuletzt abgerufen am 19.06.2011). freundlicher Genehmigung der Sigma-Aldrich GmbH.
134. Teranishi Y, Ozono R, Yoshimizu A, Ueda A, Kurisu S, Tsuru H: Vasodilating effect of benidipine hydrochloride in the renal and hindquarter vascular regions (supplied by terminal aorta) of spontaneously hypertensive rats. *Gen Pharmacol* 1999, 33(2):127-136.
135. Karasawa A, Kubo K, Oka T, Nakamizo N: Antihypertensive effects of intravenous administration of benidipine hydrochloride and some other calcium antagonists in conscious, spontaneously hypertensive rats. *Arzneimittelforschung* 1988, 38(11A):1691-1694.
136. Hoffmann K: Toxicological Studies with Nitrendipine. In: *Nitrendipine*. Edited by Scriabine A. Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1984: 25-32.

137. Sigma-Aldrich: Nifedipine [U 7634],  
[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (zuletzt abgerufen am 19.06.2011).  
Mit freundlicher Genehmigung der Sigma-Aldrich GmbH.
138. Hirata A, Igarashi M, Yamaguchi H, Suwabe A, Daimon M, Kato T, Tominaga M: Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2. *Br J Pharmacol* 2000, 131(8):1521-1530.
139. Michaluk J, Karolewicz B, Antkiewicz-Michaluk L, Vetulani J: Effects of various Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on morphine analgesia, tolerance and dependence, and on blood pressure in the rat. *Eur J Pharmacol* 1998, 352(2-3):189-197.

## **Danksagung**

Zahlreiche Menschen haben entscheidend dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit in der Endokrinologie der Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg erstellen konnte. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Allolio für die umfassende Betreuung, Unterstützung und die persönliche Anerkennung.

Vielen Dank, dass mich ein bisschen rheinischer Humor während meiner Arbeit begleitet hat.

Die Zeit, die ich in der Endokrinologie Würzburg verbringen durfte, hat entscheidend dazu beigetragen, dass ich mich für Endokrinologie und experimentelle Arbeiten begeistern kann.

Herr Dr. med. D. Weismann übernahm den größten Teil meiner praktischen Betreuung; dafür möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ob in Würzburg, oder während des Forschungsaufenthalts in den USA, stand er als Ansprechpartner immer zur Verfügung. Vielen Dank für die geäußerte konstruktive Kritik durch die ich vieles lernen konnte und mein Ehrgeiz immer wieder neu geweckt wurde.

Neben der fachlichen Betreuung, kam aber auch die persönliche Unterstützung nicht zu kurz.

PD Dr. med. Martin Fassnacht stand mir immer mit unterstützenden Ratschlägen und auch menschlich zur Seite, herzlichen Dank dafür.

Vielen Dank Heidi Linss für das uneigennützig Erklären von Methoden und Praktiken. Es hat mir sehr geholfen und mir das Erlernen zahlreicher Techniken ermöglicht.

Ohne die entscheidende Mithilfe der Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg um Prof. Dr. med. S. Maier und seine Forschungskräfte wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. S. Maier für die Mitbetreuung und Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. med. K. Hu mit dessen Hilfe und Arbeit es überhaupt erst möglich wurde den tierexperimentellen Teil zu gestalten.

Herzlichen Dank Marco Abesser für die manchmal auch stundenlange Mitarbeit an nicht enden wollenden Versuchen und dafür, dass ich so vieles lernen durfte.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch von ganzem Herzen bei meiner Familie und Freunden: meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern und meinem Freund. Sie alle haben mich all die Jahre immer selbstlos und aufrichtig unterstützt, auch wenn sie mich Monate nicht zu Gesicht bekamen.

Ohne sie hätte ich es sicher nicht so weit geschafft und könnte heute nicht auf eine schöne, erfolgreiche Zeit in Würzburg zurück blicken.

Vielen Dank Harald Depner für die Unterstützung und Geduld.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen „Endokrinos“, die ich jetzt nicht namentlich erwähnen konnte, von Doktoranden über die Routine zu Forschung und Ärzten. Ich habe mich immer sehr wohl gefühlt und bin schon ein bisschen traurig, dass diese Zeit vorbei ist. Vielen Dank auch allen für die tolle Atmosphäre.

## **Lebenslauf**

### ■ PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Kathrin Kleinbrahm

### ■ SCHULAUSSBILDUNG , STUDIUM UND BERUFLICHE AUSBILDUNG

---

1994-2003	Erzbischöfliche Marienschule Leverkusen-Opladen Abitur im Juni 2003
2000	Teilnahme an der Global Young Leaders Conference (GYLC) in den USA
2003-2009	Medizinstudium an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
09/2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2010	2. Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 2 CK)
seit 03/2010	Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Krankenhaus Köln-Merheim der Kliniken der Stadt Köln, Lehrstuhl II der Universität Witten/Herdecke
10/2010	2. Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 2 CS)

■ **DOKTORARBEIT UND WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN**

---

Titel	„Prävention hypertensiver Krisen in einem Rattenmodell für das Phäochromozytom mit akutem und chronischem Katecholaminexzess“
Doktorvater	Prof. Dr. med. B. Allolio Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Würzburg, Leiter des Schwerpunkts Endokrinologie und Diabetologie
Publikation	Weismann D, Kleinbrahm K, Hu K, Fassnacht M, Frantz S, Ertl G, Allolio B, Maier SK: <b>Prevention of hypertensive crises in rats induced by acute and chronic norepinephrine excess.</b> <i>Horm Metab Res</i> 2010, <b>42</b> (11):803-808.
09/2006	Teilnahme an der „Young Endocrinologist Research Conference“ in Würzburg
03/2007	Posterpräsentation auf dem „51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie“ in Salzburg und Eintritt in die Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)
03/2007	Posterpräsentation und Posterpreis auf der „Bad Brückenauer Wintertagung“ der Universitätsklinik Würzburg
04/2007	Posterpräsentation auf der „73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie“ in Mannheim
10/2007	Teilnahme und Vortrag auf der „Young Endocrinologist Research Conference“ in Lübeck

## Lebenslauf

### ■ PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

---

#### PRAKTISCHES JAHR

08/2008-12/2008	Chirurgie am University of Texas Health Science Center San Antonio, Texas, USA
12/2008-01/2009	Innere Medizin am Kantonspital Luzern, Schweiz
02/2009-03/2009	Innere Medizin an der Universitätsklinik Würzburg
03/2009-06/2009	Anästhesiologie an der Universitätsklinik Würzburg

Köln, den 26. April 2012

Kathrin Kleinbrahm