

„Bei definierten chemischen und physikalischen Bedingungen verhält sich ein biologisches System so, wie es eben will.“ (7. Gesetz von Murphy)

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
im Klinikum München-Großhadern
der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Christian G. Stief

**Untersuchungen zur Bedeutung
der cAMP- und cGMP-abhängigen Signaltransduktion
in der Kontrolle der glatten Muskulatur
des humanen Ureters
– Eine funktionelle Studie –**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Kühn (Arzt)
aus Leer / Ostfriesland

Anno 2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian G. Stief

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stephan Nees

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Reinhard Lorenz

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2008

Danksagung

Die Durchführung und Niederschrift dieser Doktorarbeit wäre ohne die uneingeschränkte Unterstützung der im Folgenden genannten Personen nicht möglich gewesen. Diesen gilt daher mein besonderer Dank:

Herrn Professor Dr. med. Christian G. Stief, ehemals Leitender Oberarzt der Urologischen Klinik & Poliklinik der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), heute Direktor der Urologischen Klinik & Poliklinik der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität im Klinikum Großhadern, München, danke ich für die Überlassung des Themas und dafür, daß ich diese Promotion in seiner Arbeitsgruppe *Urologisch-Physiologische Forschung* unter hervorragenden Bedingungen durchführen konnte.

Herrn Dr. Stefan Ückert, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Urologischen Klinik der MHH und Leiter der *Urological Research Unit* der IPF PharmaCeuticals GmbH (An-Institut der MHH, ehemals Niedersächsisches Institut für Peptidforschung GmbH), Hannover, gilt mein Dank für seine kontinuierliche, engagierte Betreuung und die motivierende Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Wolf G. Forssmann, geschäftsführender Direktor der IPF PharmaCeuticals GmbH, danke ich dafür, daß ich die Laboreinrichtungen der Abtl. *Funktionsanalyse* seines Institutes uneingeschränkt nutzen durfte.

Frau Susanne Skubich, Biologisch-technische Assistentin (BTA) in der Abteilung *Funktionsanalyse* der IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover, gebührt mein Dank für ihre ausgezeichnete technische Assistenz bei der Ausführung einiger der beschriebenen Experimente.

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Anatomische Grundlagen	1
1.2	Funktionelle Bedeutung des Ureters	4
1.3	Physiologie des Ureters	4
1.4	Zelluläre Mechanismen der Tonusregulation glatter Muskulatur: Die Bedeutung von Ca ²⁺ , K ⁺ und zyklischen Nucleosidmonophosphaten	6
1.5	Stickoxid (NO) und seine Bedeutung im unteren Harntrakt	9
1.6	Die Phosphodiesterase (PDE)-Isoenzyme	12
1.7	Urolithiasis	14
2.	Fragestellung	16
3.	Material und Methoden	17
3.1	Gewebeasservierung	17
3.2	Funktionelle Organbad-Studien	17
3.3	Bestimmung der Gewebekonzentrationen zyklischer Nucleotide	19
3.3.1	Expositionsexperiment	19
3.3.2	Radioimmunochemische Quantifizierung von cAMP und cGMP	19
3.4	Proteinbestimmung	20
3.5	Auswertung der Experimente	20
3.6	Chemikalien & Antikörper	21
4.	Ergebnisse	22
4.1	Organbad-Studien	22
4.2	Quantifizierung zyklischer Nucleotide	27

	Seite
5. Diskussion	33
5.1 In vitro - Organbad-Studien	34
5.2 Quantifizierung zyklischer Nukleotide	37
5.3 Selektive PDE-Inhibitoren: Eine neue Option in der Pharmakotherapie der Urolithiasis?	39
6. Zusammenfassung	42
6.1 Rationale	42
6.2 Ziel der Arbeit	42
6.3 Material & Methoden	43
6.4 Ergebnisse	43
6.5 Schlussfolgerung	43
7. Literatur	44
8. Anhang	
Original Publikationen / Kongresskontributionen	
Original Paper (engl.)	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Anatomische Grundlagen

Die Harnleiter sind retroperitoneal gelegene, beim Erwachsenen etwa 25 cm - 35 cm lange Tuben mit einem luminalen Durchmesser von 4 mm - 7 mm (1,2). Auf jeder Körperseite verbindet ein Harnleiter die jeweilige Niere mit dem Hohlorgan Harnblase. Die Einteilung des Verlaufs der Harnleiter erfolgt in eine *Pars abdominalis* und eine *Pars pelvina*, die *Pars abdominalis* ist etwa 14 cm lang und beginnt am Übergang des Nierenbeckens in den Ureter, eine exakte Trennung dieser beiden Strukturen ist nicht eindeutig möglich. Die *Pars abdominalis* reicht bis zur *Linea terminalis* des Beckens, liegt auf dem *Musculus psoas* auf, wird in ihrem Verlauf von den *Vasa testicularia* überkreuzt und kreuzt selbst die *Vasa iliaca*. Die *Radix mesenterii* zieht über den rechten, das *Mesokolon sigmoideum* über den linken Ureter. Die *Pars pelvina* ist ebenfalls etwa 14 cm lang und erstreckt sich von der *Linea terminalis* bis zum *Ostium ureteris*. In ihrem Verlauf liegt sie der seitlichen Beckenwand an, durchbricht schräg von dorsal die Blasenwand und mündet mit dem schlitzförmigen *Ostium ureteris* in das Blasenlumen.

Im Harnleiterverlauf finden sich drei physiologische Einengungen: Die erste befindet sich am Übergang vom Nierenbecken zum Harnleiter, die zweite an der Überkreuzung der *Vasa iliaca*, die dritte und engste Stelle bildet die Mündung des Ureters in die Blase.

Die Blutversorgung des Harnleiters erfolgt aus den Arterien, die seinem Verlauf am nächsten liegen. Der obere Teil des Ureters wird durch ein oder zwei Äste der *Arteria renalis*, manchmal auch über Äste der Aorta, der Nierenpol-, Nierenkapsel- oder Nierenrindenarterie versorgt. In der Beckenregion ziehen Äste aus der *A. iliaca interna* und *externa*, *A. testicularis* bzw. *A. ovarica*, der *A. pudenda interna*, *A. rectalis superior* und der *A. vesicalis inferior* zum Ureter. Der venöse Blutabstrom erfolgt über Venen, die in ihrem Verlauf die Arterien begleiten sowie über im Beckenbereich vorhandene Venengeflechte.

Die neuronale Innervation des Ureters erfolgt durch Fasern aus dem *Ganglion coeliacum*, *Ganglion mesentericum* und *Ganglion aortico renale*, außerdem aus dem *Plexus Aortae*, *Plexus hypogastricus superior* und *Plexus inferior*. Das Zentrum der sympathischen Innervation des Ureters sind die präganglionären Rückenmarksegmente Th11, Th12 und L1. Die parasympathische Innervation des oberen Segments des Ureters erfolgt aus dem *Plexus coeliacus*. Der untere Anteil wird aus den Sakralsegmenten S2, S3 und S4 versorgt. Die afferenten Fasern des oberen Teils erreichen den Spinalkanal mit den sympathischen Nervenfasern bei Th11, Th12 und L1, die afferenten Fasern aus dem unteren Teil treten über den *Plexus pelvicus* bei S2, S3 und S4 in den Spinalkanal ein (2).

Über die Wertigkeit der verschiedenen autonomen Nerven in der Kontrolle der Ureterfunktion besteht keine eindeutige Klarheit. HERTLE & NAWRATH (3) vermuten eine Dominanz des Sympathicus und geben ein Verhältnis von sympathischer zu parasympathischer Innervation von 50:1 an. Da im Ureter vor allem exzitatorische α -Rezeptoren nachgewiesen worden sind, postulieren sie, daß dem parasympathischen System keine physiologische Bedeutung für die Kontrolle der Harnleiterperistaltik zukommt. GENESER (1990) vermutet, daß weder sympathische noch parasympathische Nerven die motorische Aktivität des Ureters regulieren, während DAVIS (1981) von einer Dominanz des cholinergen Systems im unteren Anteil des Ureters ausgeht (2,4).

Die Wandung des Ureters wird von innen nach außen von einer Schleimhaut (*Tunica mucosa*), einer Muskelschicht (*Tunica muscularis*) und einer Bindegewebshülle (*Tunica adventitia*) gebildet. Die *Tunica mucosa*, deren faltige Oberflächenstruktur die glatte Muskulatur beim Verschluss des Harnleiterlumens unterstützt, ist von einem Übergangsepithel bedeckt, welches ein charakteristisches Grenzflächengewebe der ableitenden Harnwege ist. Da das Übergangsepithel für lösliche Substanzen nahezu impermeabel ist, bildet es eine Barriere zwischen dem hypertonen Harn und dem Gewebe, welche den osmotischen Verlust von Wasser aus den Gewebestrukturen in den Harn verhindert. Diese Funktion des Epithels wird durch besondere physiologische Eigenschaften der Zellmembran und des Zytoplasmas der Deckzellen gewährleistet.

Die *Tunica muscularis* wird von einer inneren, longitudinal angeordneten, und einer äußeren, zirkulär orientierten Muskelschicht gebildet, die im letzten Drittel des Ureterverlaufs durch eine äußere Längsmuskelschicht ergänzt wird (5-8). Am Ort des Eintritts in die Blase gehen die Muskulatur und Adventitia der beiden Harnleiter in die des Blasendreiecks (*Trigonums*) über. Während der Blasenentleerung kontrahiert sich diese Muskulatur und zieht die Muskel- und Bindegewebsschicht des Harnleiters nach innen, was zu einem terminalen Verschluss des Ureters führt (4). Die *Tunica adventitia*, die von einem Geflecht aus Gefäßen und Nervenfasern durchzogen wird, ist eine lose, mit der Muskulatur und dem Peritoneum verbundene Bindegewebsschicht mit einem hohen Anteil an Fett (9).

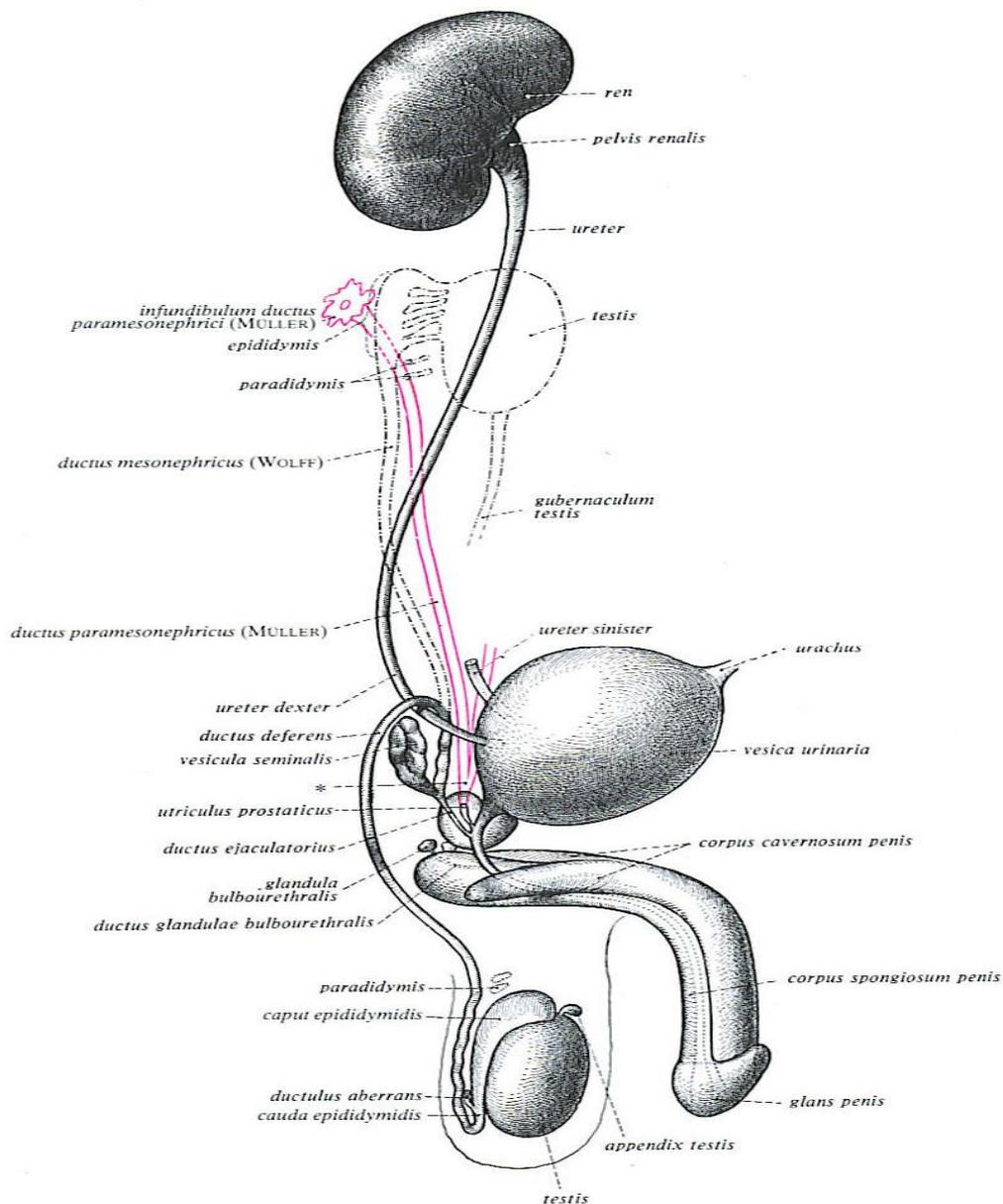


Abb. 1: Anatomische Übersichtszeichnung des männlichen Urogenitaltrakts. Dargestellt sind neben den Reproduktionsorganen (*corpus cavernosum/spongiosum penis*, *testis*, *vesicula seminalis*, *ductus deferens*) die Organe der ableitenden Harnwege (*ren*, *ureter*, *vesica urinaria*, *urethra*) und der Verlauf eines Harnleiters (*ureter*) durch das Retroperitoneum vom Nierenbecken (*pelvis renalis*) bis zur Einmündung in die Ostien der Harnblase (*detrusor*, *vesica urinaria*). Modifiziert nach: Waldeyer A., Mayet A. Die Organe des Retroperitonealraums. In: Anatomie des Menschen. Teil I, 13. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin 1976.

1.2 Funktionelle Bedeutung des Ureters

Der Ureter wurde in der Vergangenheit in der Regel als einfacher Muskelschlauch beschrieben, der durch die Füllung mit Urin zu peristaltischen Kontraktionen angeregt wird. Im Zusammenhang mit Erkrankungen des Harntraktes fand er als eigenständiges Organ kaum Beachtung. Die Zunahme des Wissens über den anatomischen Aufbau, die physiologischen Abläufe und die Komplexizität der pathologischen Veränderungen, welche den Ureter betreffen können, ließ das Interesse an diesem Organ rasch zunehmen (10). Da der Ureter der einzige Weg für den Transport des Urins von der Niere zum Speicher- und Entleerungsorgan Blase ist, kann jede pathologische Veränderung des Harnleiters die Niere in ihrer Morphologie und Funktion entscheidend beeinflussen. Dysfunktionen des Ureters bewirken einen Harnstau, der zur Beeinträchtigung der Nierenfunktion und in der Folge zum Verlust des Organs führen kann. So können Fehlbildungen in der Embryonalentwicklung zur ektopen Harnleitermündung oder der Entstehung von Megaureteren führen. Als Folge der Obstruktion des Ureter oder eines Refluxes kann es so bereits intrauterin zu einer Harnstauungsniere mit komplettem renalen Funktionsverlust kommen. Häufiger sind nach der Geburt erworbene Harnwegsobstruktionen, die nach einem chronischen Verlauf zu einer Hydronephrose als Zeichen einer supravvesikalen Abflußbehinderung führen können (11).

1.3 Physiologie des Ureters

Der Ureter wird heute als peristaltisch arbeitendes, autonomes Organ beschrieben, dessen Funktion an die des Gesamtorganismus adaptiert ist und dessen Physiologie sich grundsätzlich von der anderer glattmuskulärer Hohlorgane wie Arterien, Venen oder dem Darm unterscheidet. Die Funktion des Organs Ureter unterliegt zahlreichen Einflüssen wie der Urinsekretion der Nieren, der Blasenfunktion, der retroperitonealen Umgebung, der Körpertemperatur - bereits ein Absinken der Temperatur um 2° C führt zu einer Abnahme oder zum völligen Stillstand der Peristaltik (12) - und der Aktivität des vegetativen Nervensystems. Im Gegensatz zum Darm, der durch eine Pendelperistaltik charakterisiert ist, erfolgt der Transport (des Urins) im Harnleiter nur in eine Richtung, nämlich vom Nierenbecken zur Blase. Eine peristaltische Welle verläuft ausschließlich orthograd, von proximal nach distal, unkoordinierte antiperistaltische Bewegungen werden inhibiert (13).

Diese gerichtete Motilität ist das Resultat einer myogenen Erregungsbildung und -leitung in der glatten Muskulatur des Ureters. Spezialisierte Myozyten mit besonderen elektrophysiologischen Eigenschaften im Bereich der *Fornices* der kleinen Kelche übernehmen eine Schrittmacherfunktion. Deren Präpotentiale (= Schrittmacherpotentiale) depolarisieren die Membran bis zum Schwellenwert und lösen damit ein Aktionspotential aus. Beim Menschen beträgt die Zahl der in diesem Bereich spontan ausgelösten Depolarisationen 6 - 8 pro min., an isolierten Ureterstreifen wurde eine wesentlich niedrige Kontraktionsfrequenz registriert (1 pro min.) Die Depolarisationen bewirken über zytoplasmatische Verbindungen zwischen glatten Muskelzellen, den sogenannten Nexus (*Gap junctions*), eine Erregung der benachbarten Zellen. Diese niederohmigen Zellkontakte gewährleisten die elektrotonische Übertragung der Depolarisation einer erregten Zelle auf benachbarte Zellen. Auf diese Weise folgt der Muskelverband synchron der Aktivität der Schrittmacherzelle (14). Die kontinuierliche Fortleitung einer solchen Erregung der Kelch- und Nierenbeckenmuskulatur über den pyeloureteralen Übergang führt zu einer peristaltischen Kontraktionswelle, die den Harnleiter entlang läuft und so einen Urinbolus von der Niere zur Harnblase transportiert (3). Dieser autonom arbeitende myogene Mechanismus kann von α - und β -adrenergen, cholinergen oder nicht-adrenergen, nicht cholinergen (NANC) Transmittern des vegetativen Nervensystems im Sinne einer Stimulation oder Hemmung moduliert werden. Dadurch ändert sich die spontane Kontraktionsfrequenz, die Erregungsleitung und/oder die Kontraktionskraft der Zellen. Sogenannte *En passant*-Synapsen variköser Nervenfasern, welche glatte Muskelzellen erreichen, schütten ihre Transmittersubstanzen bei Erregung in das Interstitium aus, durch Diffusion gelangen diese zu entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran. Auch die Urinsekretion der Nieren und der Abflußwiderstand haben einen Einfluß auf die Ureter-Peristaltik (15). Der im Nierenbecken gesammelte Urin formt sich zu einem Tropfen (Urinbolus), der durch seine Ausdehnung die glatte Wandung des Harnleiters dehnt. Diese Dehnung induziert eine zunehmende Depolarisierung der Schrittmacherzellen, wodurch sich die Frequenz der Aktionspotentiale erhöht. Mit der Erhöhung der Urinsekretion kommt es zum Anstieg der peristaltischen Frequenz. Kommt es aufgrund eines Abflußhindernisses, z.B. bei steigendem infravesicalen Druck, zum Rückstau von Urin in den Ureter, so reagiert dieser mit einer Ausdehnung und/oder einer Verdopplung der Kontraktionskraft und einem Anstieg der Frequenz (15). Pathologische Veränderungen der retroperitonealen Umgebung, u.a. eine retroperitoneale Fibrose (*Morbus Ormond*) oder maligne Metastasen eines Mamma-, Magen-, oder Ovarialkarzinoms, können ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Ureters und zu einer einseitigen oder beidseitigen Harnstauung führen.

1.4 Zelluläre Mechanismen der Tonusregulation glatter Muskulatur:

Die Bedeutung von Ca^{2+} , K^+ und zyklischen Nukleosidmonophosphaten

Der kontraktile Apparat glatter Muskelzellen wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freien Ca^{2+} über einen definierten Schwellenwert (ca. $0.1 \mu\text{M}$) aktiviert. Es besteht eine Kopplung zwischen der Ca^{2+} -abhängigen mechanischen Kraftentwicklung und der elektrischen Aktivität glatter Muskulatur, der Muskeltonus korreliert mit der Frequenz der Aktionspotentiale. Ursache eines Aktionspotentials ist die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Membran der glatten Muskelzelle durch die Depolarisierung der Membran und die damit verbundene Bewegung extrazellulären Ca^{2+} in das Zytoplasma, die eine Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle und damit eine Bewegung von K^+ in den extrazellulären Raum auslöst (16). Daß die kontraktile Wirkung depolarisierender Agentien, z.B. des K^+ , in vitro durch die Applikation geringer Konzentrationen von Ca^{2+} -Antagonisten blockiert wird, bestätigt die Notwendigkeit eines anhaltenden Ca^{2+} -Einstroms in das Zytoplasma der Muskelzelle während des Kontraktionsvorgangs.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Muskelkontraktion wird von einer Gruppe spezifischer Proteine vermittelt, die eng mit den Actinfilamenten der Zelle assoziiert sind. Die Ca^{2+} -Wirkung wird durch Calmodulin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein vermittelt. Der Komplex aus Ca^{2+} und Calmodulin aktiviert die Myosin Light Chain Kinase (MLCK), welche die Phosphorylierung der leichten 20 KD Kette des Myosins katalysiert. Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Aktivierung der Mg^{2+} ATPase-Aktivität des Myosins durch Actin, die zur zyklischen ATP-Hydrolyse während der Muskelkontraktion führt. Um einen entspannten Zustand der Muskulatur zu erreichen, ist es notwendig, daß die intrazelluläre Konzentration des freien Ca^{2+} unter $0.1 \mu\text{M}$ sinkt. Dazu wird zytosolisches Ca^{2+} innerhalb der Zelle an Proteine und Membranstrukturen gebunden, in zelluläre Kompartimente aufgenommen oder über Ionenkanäle der Zellmembran in den extrazellulären Raum verbracht. Der Transport von Ca^{2+} über die Zellmembran in den extrazellulären Raum erfolgt in der Regel gegen den elektrischen und chemischen Gradienten des Ions, ist also ein energieabhängiger Vorgang, der ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen benötigt. Als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher dienen das Sarcoplasmatische Reticulum (SR) und die Mitochondrien. Das SR glatter Muskelzellen kann bis zu $30 \text{ mmol Ca}^{2+}/\text{kg}$ Trockengewicht akkumulieren, diese Menge ist ausreichend, um bei einer dem Konzentrationsgradienten folgenden, passiven Freisetzung in das Zytoplasma den kontraktile Apparat zu aktivieren. Der Transport des Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in das SR erfolgt durch ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen in der Membran des SR (17).

Seit mehr als 25 Jahren ist bekannt, daß die zyklischen Nukleosidmonophosphate cAMP und cGMP als universelle intrazelluläre *Second Messenger* auch an der Regulation der Kontraktion und Relaxation glatter Muskulatur beteiligt sind. Für die Aktivierung der cNMP-Synthese ist ein System membrangebundener Proteine verantwortlich, das aus einem Rezeptor, einem Bindungsprotein und den Enzymen Adenylatzyklase (AC) und Guanylatzyklase (GC) besteht. Dieses System setzt die Bindung eines externen Liganden - dabei kann es sich um einen Neurotransmitter, ein Hormon oder einen anderen primären Botenstoff handeln - an einen (Membran)Rezeptor voraus. cAMP vermittelt die durch β -Sympathomimetika und andere Aktivatoren der AC (z.B. Forskolin) induzierte Relaxation, cGMP vermittelt die relaxierende Wirkung zahlreicher NO-freisetzender Vasodilatoren wie Natriumnitroprussid und die endogener Hormone und regulatorischer Substanzen wie des Atrial Natriuretic Peptide (ANP). Die Wirkung von cAMP und cGMP beruht auf deren Bindung an regulatorische Untereinheiten cNMP-abhängiger Proteinkinasen (cAK, cGK), wodurch die katalytische Untereinheit dieser Enzyme für die Phosphorylierung zellulärer Proteine aktiviert wird. Es wird vermutet, daß Proteinkinasen im aktivierten Zustand eine Untereinheit der MLCK und integrale Proteine des Sarcoplasmatischen Reticulums phosphorylieren. Bei den SR-Proteinen handelt es sich wahrscheinlich um Ca^{2+} -Kanäle und um Phospholamban, ein regulatorisches Protein SR-assoziiertes Ca^{2+} -bindendes ATPasen, die den Ca^{2+} -Transport aus dem Myoplasma in das Lumen des SR energetisch vermitteln. Diese Phosphorylierungsreaktionen führen über eine Inaktivierung der MLCK, die Änderung der räumlichen Struktur von Ionenkanäle oder eine Aktivierung der ATPasen zu einer Verringerung der intrazellulären Konzentration freien Ca^{2+} . Die Verarmung des zytosolischen Raumes an Ca^{2+} teilt sich dem kontraktilem Apparat der Muskelzelle mit und induziert eine Relaxation. Die Effekte einer Erhöhung der intrazellulären cNMP-Konzentrationen variieren innerhalb verschiedener Gewebe. Während in der glatten Muskulatur der Atemwege eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes zu einer Relaxation führt, ist es in der Gefäßmuskulatur die Erhöhung des cGMP-Gehaltes, die diese Reaktion auslöst. Im Gegensatz dazu führt ein cAMP-Anstieg im Herzmuskel nicht zu einer Relaxation, sondern induziert einen positiv inotropen Effekt. Von wesentlicher Bedeutung für die intrazelluläre Signalübertragung bei der Tonusregulation ist neben der AC/GC - cAMP/cGMP - cAK/cGK-Kaskade das Phosphatidylinositol (PI), ein Phospholipid der Membranninnenseite. Nach einem externen Signal, z.B. der Bindung eines kontraktilem Agonisten an einen Rezeptor der Membran, wird PI zum Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) phosphoryliert und anschließend von einer Phospholipase zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DG) hydrolysiert. Das wasserlösliche IP_3 diffundiert ins Zytoplasma und bindet sich an Rezeptoren des SR, was einen Ca^{2+} -Efflux aus dem SR bewirkt.

Das auf diese Weise mobilisierte Ca^{2+} aktiviert dann als *Third Messenger* die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige MLCK, die durch die Phosphorylierung ihrer Zielproteine eine kontraktile Reaktion auslöst. Das DG verbleibt in der Membran und aktiviert dort die Proteinkinase C (PKC), ein in eukaryontischen Zellen ubiquitäres phosphorylierendes Enzym. Zu den von der PKC phosphorylierten Proteinen gehören in glatten Muskelzellen u.a. Mikrotubuli-assoziierte Proteine des Cytoskeletts und das Myosin. Eine Aktivierung der PKC bewirkt synergistisch mit dem durch IP_3 mobilisierten Ca^{2+} eine kontraktile Reaktion (14,18).

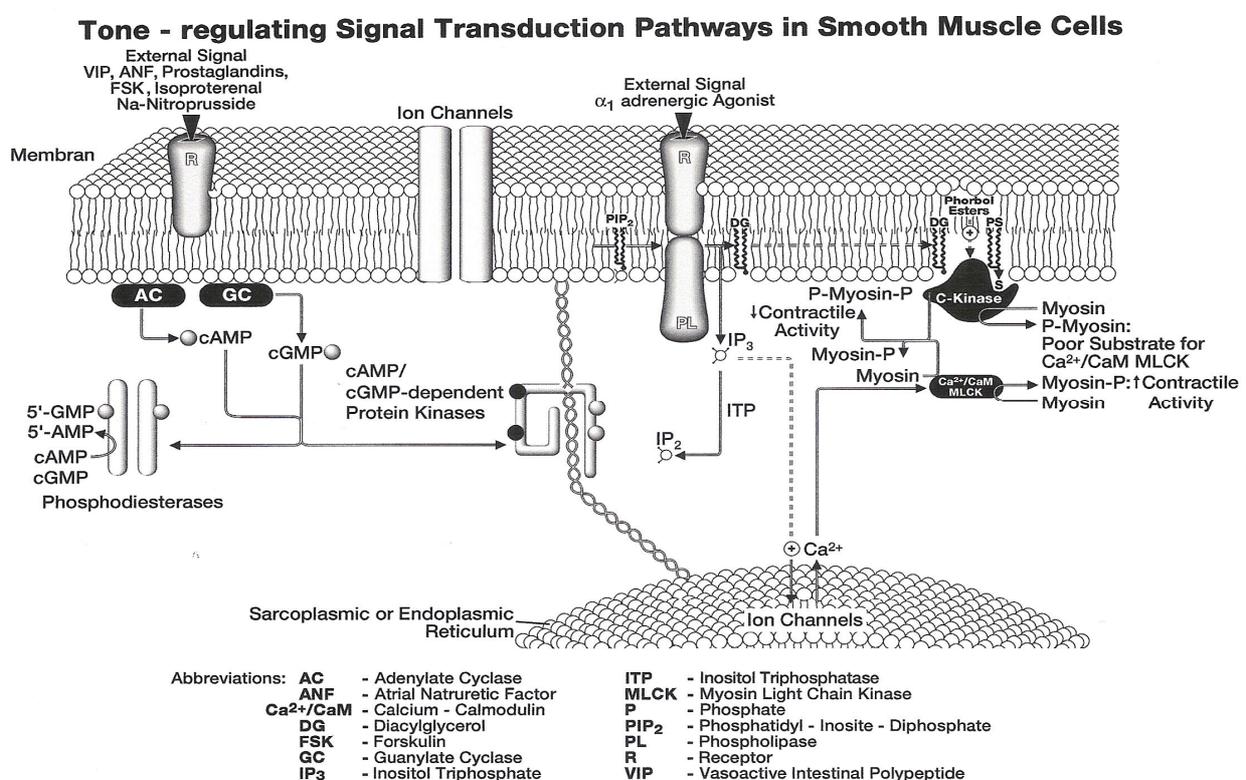


Abb.2: Intrazelluläre Mechanismen der Tonusregulation glatter Muskelzellen: Durch Bindung externer Liganden an Membranrezeptoren (R) erfolgt zunächst die Aktivierung GTP-bindender Proteine. Diese stimulieren entweder die Aktivität membran-assoziiierter Zyklasten oder die der Phospholipase C. Die Phospholipase C hydrolysiert PIP_2 zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin. IP_3 diffundiert ins Cytoplasma und verursacht die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarcoplasmatischen Reticulum. Ca^{2+} aktiviert als Third Messenger die MLCK, eine Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase, die durch die Phosphorylierung ihres Zielproteins eine kontraktile Reaktion auslöst. Die durch Zyklastenaktivität gebildeten zyklischen Nucleosidmonophosphate cAMP und cGMP binden sich an die regulatorischen Untereinheiten cNMP-abhängiger Proteinkinasen, die im aktivierten Zustand Ionenkanäle des SR oder regulatorische Proteine membranständiger ATPasen phosphorylieren. Die Phosphorylierungsreaktionen führen letztlich zu einer Herabsetzung der zytosmatischen Konzentration freien Ca^{2+} und somit zu einer Relaxation der Muskelzelle. Externe Signalmoleküle sind z.B. das Adrenalin, das an α - und β -adrenergen Rezeptoren bindet, das an Muscarin-Rezeptoren bindende Acetylcholin, das β -Sympathomimetikum Isoproterenol und die bioaktiven Peptide VIP und ANP. (Mit Genehmigung aus: Ückert S.: Untersuchungen zur funktionellen Relevanz cAMP- und cGMP-abhängiger Signalübertragungswege bei der Tonusregulation des porcinen Detrusormuskels. Dissertation zum Dr. rer. biol. hum., Medizinische Hochschule Hannover, 1998)

1.5 Stickoxid (NO) und seine Bedeutung im unteren Harntrakt

Eine Relevanz von Stickoxid-Synthasen (NOS) und des gasförmigen Signalmoleküls NO in der Kontrolle biologischer Funktionen wird für die Organe des männlichen und weiblichen Harntrakts postuliert. So wird eine Beteiligung von NO in der Regulation der Nierenfunktion, der Speicherphase der Harnblase, Einleitung der Miktion, sowie der Kontrolle der glatten Muskulatur in der Transitionalzone der Prostata vermutet (19).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten NOS-Aktivität in den Geweben und Organen der ableitenden Harnwege, NO ist hier wahrscheinlich Teil des komplexen Mechanismus der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur (20). MAMAS et al. (2003) postulieren eine Rolle des NO für die Relaxation der Urethralmuskulatur während des Miktionsvorgangs (21). Auch im Urothel des prostatistischen Anteils der männlichen Harnröhre sowie im sekretorischen Epithel glandulärer Bereiche der Prostata konnte mittels Bindungsstudien, welche den radioaktiv markierten Liganden L-NOARG, einen Inhibitor der NOS, verwendeten, die Expression der neuronalen und endothelialen Isoform des NO generierenden Enzyms nachgewiesen werden (22). Ebenso präsentieren Nervenfasern, die das Urothel der Harnblase sowie die äußere der drei Lagen glatter Muskulatur des *Musculus detrusor vesicae* innervieren, Immunreaktivität gegen die nNOS. Die Exposition isolierter Streifenpräparate der Detrusormuskulatur gegen den NO-Donor SIN-1 führte zwar zu einer Stimulation der Produktion des *Second Messenger* cGMP in dem Gewebe, verursachte allerdings lediglich eine marginale Reversion der durch muskarinerge Agonisten induzierten tonischen Kontraktion der glatten Muskulatur. Im Gegensatz dazu zeigten sich Wirksubstanzen, die zu einer intrazellulären Akkumulation von cAMP führen, wesentlich effektiver (23). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die NO/cGMP-Kaskade und ihre Schlüsselenzyme wahrscheinlich nicht die ultimativen Mediatoren der Relaxation der Detrusormuskulatur sind, sondern synergistisch mit anderen Signalübertragungswegen wirken.

In Dünnschnitten der Prostata konnte Immunaktivität gegen die nNOS in varikosen Nervenfasern und ganglionartigen Strukturen der Übergangszone gezeigt werden. Im glandulären Epithel und in den Zellen des subepithelialen Bereichs fand sich NADPH-Diaphorase, ein wichtiger immunzytochemischer Marker für die Expression von NOS, lokalisiert. Diesen Immunreaktionen konnte bisher jedoch keiner der bekannten Isoformen der NOS eindeutig zugeordnet werden.

Eine Beteiligung von NO und cGMP an der Kontrolle der glatten Muskulatur der Prostata ergibt sich aus funktionellen Studien, die demonstrierten, daß die durch transmurale elektrische Feldstimulation induzierte phasische Relaxation isolierter Streifenpräparate aus der Übergangszone der Drüse durch den NOS-Inhibitor L-N^G-Nitroarginin (L-NNA) antagonisiert, durch die exogene Gabe des NO-Donors Natriumnitroprussid (NNP) oder des NOS-Substrats L-Arginin dagegen potenziert wurde (24). Die Verwendung von NO-Donatoren und anderen Wirksubstanzen, welche eine intrazelluläre Akkumulation von cGMP induzieren, in der Pharmakotherapie des Benigen Prostata-Syndroms (BPS) einschließlich der *Lower Urinary Tract Symptomatology* (LUTS) und Benigen Prostatahyperplasie (BPH) ist daher gegenwärtig Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion und klinischer Studien (25-28).

Auch die Funktion der mit der Prostata assoziierten akzessorischen Reproduktionsorgane, der *Vesicula seminalis*, setzt offensichtlich die Aktivität der NO-Kaskade voraus: ÜCKERT et al. (2003) konnten im sekretorischen Epithel lakunärer Bereiche der Samenblase mit immunzytochemischen Methoden NADPH-Diaphorase nachweisen. Darüber hinaus fand sich nNOS in zahlreichen subepithelial verlaufenden Nervenfasern sowie in Faserbündeln, welche die glatte Muskulatur der *Vesicula seminalis* innervieren (29). Diese Beobachtungen werden als Hinweis auf einen durch NO und cGMP vermittelten Sekretionsmechanismus und eine inhibitorische Wirkung der NO-Signaltransduktion auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur der Samenblasen gewertet. So zeigten HEUER et al. (2002) und MACHTENS et al. (2003) eine Antagonisierung der durch alpha-adrenerge Agonisten oder elektrische Feldstimulation induzierten Kontraktion isolierter Streifenpräparate der *Vesicula seminalis* durch die Nitrovasodilatoren NNP und Linsidomin (SIN-1) und die S-Nitrosothiole GSNO und SNACET, die mit einer Erhöhung des Gewebegehalts von cGMP einherging (30,31).

Die Stickoxid (NO) - cGMP Signalkaskade

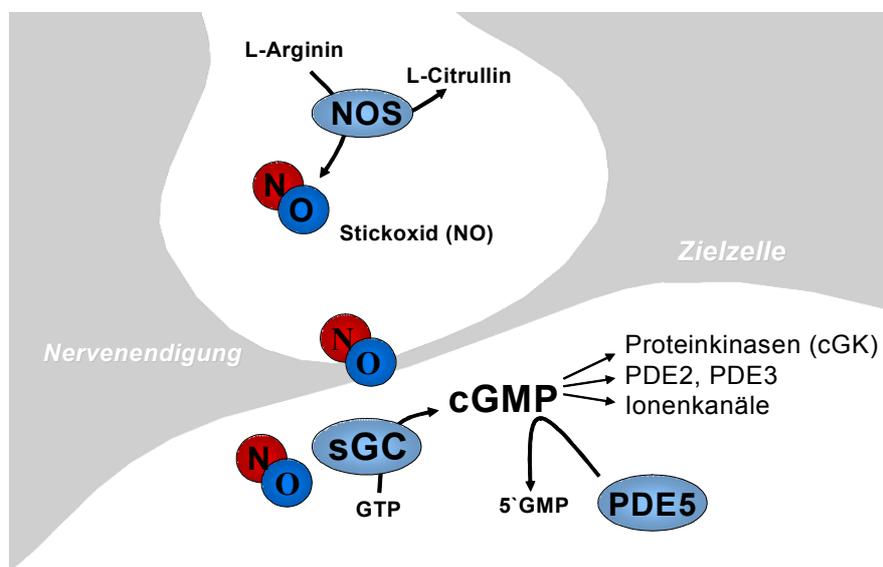


Abb. 3: Schematische Darstellung der zellulären Übertragungswege und ihrer Funktionsproteine, die in der glatten Muskulatur des Urogenitaltrakts an der Kontrolle der durch cGMP vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Das von der endothelialen und neuronalen Isoform der Stickoxid-Synthase (eNOS, nNOS) produzierte gasförmige Molekül Stickstoffmonoxid (NO) bindet an die im Zytoplasma der Zielzelle lokalisierte lösliche Form der Guanylatzyklase (sGC) und stimuliert die Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP. Wesentliche Funktionskomponenten der Mechanismen der Kontrolle des Tonuszustands glatter Muskulatur durch cGMP sind Phosphodiesterase-Enzyme (PDEn), Ionenkanäle cGMP-bindende Protein-kinasen (PK). Die intrazellulären Konzentrationen zyklischer Nucleotide werden durch PDE-Isoenzyme reguliert, welche die Hydrolyse zyklischen 3'5'-Guanosinmonophosphats zu nicht-zyklischem 5'-Guanosinmonophosphat katalysieren. Sechs (6) cGMP-hydrolysierende PDE-Isoenzyme sind beschrieben (PDE1, PDE5, PDE6, PDE9, PDE10, PDE11) (Verwendung mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Petter Hedlund, Universitätsklinik Lund, Abtl. Klinische & Experimentelle Pharmakologie, Lund, Schweden).

1.6 Die Phosphodiesterase (PDE)-Isoenzyme

Die intrazellulären Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP werden durch das Verhältnis zwischen ihrer Produktion durch zelluläre Adenylat- und Guanylatzyklasen und der Degradierung durch Phosphodiesterasen (PDE, EC 3.1.4.17), einer heterogenen Gruppe hydrolytischer Enzyme, reguliert. Das humane Genom enthält 21 Gene, die für 11 verschiedene Familien von PDE-Proteinen (Isoenzymen) codieren. Durch die Aktivität multipler Genpromotoren und einem alternativen Splicing nach der Translation kodiert jedes Gen für mehr als ein Isoenzym. Bisher sind mehr als 40 PDE-Isoformen beschrieben, die sich in ihren kinetischen Eigenschaften, ihrer Affinität für die Substrate cAMP und cGMP, ihrer Sensitivität gegen allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren und ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Jede PDE verfügt über eine hochkonservierte katalytische Domäne, die von 270 Aminosäuren gebildet wird und in der Nähe des Carboxyl (-CO₂H)-Terminus des Proteins lokalisiert ist (32,33).

Zu den cAMP-spezifischen PDE (cAMP-PDE) zählen die Isoenzym-Familien PDE2, PDE3, PDE4, PDE7 und PDE8, cGMP-spezifisch Isoenzyme (cGMP-PDE) sind die PDE5, PDE6 und PDE9, während die PDE1, PDE10 und PDE11 beide Substrate mit gleicher Affinität binden und umsetzen [63,64]. Die PDE1, die sich vor allem im zentralen Nervensystem und in Blutgefäßen lokalisiert findet, ist eine Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Isoform, die cAMP und cGMP mit equivalenter Affinität hydrolisiert. Die PDE 2, die ebenso wie die PDE3 als ein Leitenzym des Myokards und der glatten Muskulatur des Gefäßsystems gilt, ist eine cAMP-spezifische PDE, deren Aktivität durch cGMP stimuliert wird. Im Gegensatz zur PDE2 wird die Hydrolyseaktivität der PDE3 durch cGMP inhibiert. Beschrieben sind außerdem die PDE4 (cAMP-PDE) und die PDE5 (cGMP-PDE), letztere ist eines der wichtigsten Funktionsenzyme in der Kontrolle des Tonuszustands der vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskulatur des *Corpus cavernosum penis*. Die PDE6, die in erster Linie cGMP degradiert, wurde bisher ausschließlich in den Zapfen- und Stäbchenzellen der Retina gefunden, wo sie wesentlich am Mechanismus der Photorezeption beteiligt ist. Die Aktivität der PDE7, einem Isoenzym mit hoher Affinität für cAMP, das aber insensitiv gegen den (cAMP-) PDE-Inhibitor Rolipram ist, konnte in der quergestreiften Skelettmuskulatur und in immunkompetenten Zellen, den T-Lymphozyten, nachgewiesen werden. Die PDE8, ebenfalls eine cAMP-PDE, wird vor allem in den Testes, im Ovar und in der intestinalen glatten Muskulatur des Menschen exprimiert. Charakteristisch für diese Isoform ist die Eigenschaft, daß ihre hydrolytische Aktivität ausschließlich durch den dualen PDE5/PDE1-Inhibitor Dipyridamol, nicht jedoch durch den unspezifischen PDE-Inhibitor Isobutylmethylxanthin (IBMX) hemmbar ist.

Die Aminosäuresequenz der PDE9, ein Isoenzym, das aus der Milz, der Niere, dem Dünndarm und dem Gehirn des Menschen isoliert wurde, ist zu 34% mit derjenigen der PDE8 identisch (34,35). Das Isoenzym ist hochspezifisch für cGMP, sensibel gegen die PDE5-Inhibitoren Zaprinast und SCH 51866, allerdings unempfindlich gegen alle anderen selektiven und nicht-selektiven PDE-Inhibitoren (36). Die funktionelle Relevanz der sogenannten Dual Substrate Phosphodiesterasen PDE10 und PDE11, die sowohl cAMP als auch cGMP mit hoher Affinität binden, ist bisher noch nicht umfassend aufgeklärt (33,37).

Arbeiten zur Verteilung der PDE-Isoenzyme in Geweben und Organen haben markante spezies- und gewebespezifische Unterschiede ergeben. Mehr als 90% der cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase-Aktivität wird im Gehirn des Rindes von der PDE1, in humanen Thrombozyten von der PDE3 und in der menschlichen Niere von der PDE4 repräsentiert (38,39). Während einige Isoenzyme in zahlreichen Organsystemen vorkommen, ist die Verteilung anderer limitiert: Die PDE3 ist ein physiologisch relevantes Isoenzym der humanen Hepatocyten, der Thromozyten und des Herzmuskels, während die hydrolytische Aktivität der PDE6 lediglich in den Zellen der Retina nachgewiesen werden kann (40,41,42). In den Gewebe- und Organsystemen einer Spezies können außerdem verschiedene Isoformen einer Isoenzym-Familie präsent sein: Die PDE1 aus Leber-, Hirn- und Fettgewebe einiger Säugetiere sind durch eine hohe Affinität für cGMP und eine geringe Affinität für cAMP charakterisiert, die Isoformen des Herzmuskels und der Nieren durch eine hohe Affinität zu beiden Substraten. Aus der Leber, den Nieren und der glatten Muskulatur der Atemwege wurden Subtypen der PDE4 separiert, deren Sensitivitäten gegen die selektiven Inhibitoren Rolipram und Ro 20-1724 um einen Faktor 5 - 15 variieren.

Die Anwesenheit eines PDE-Isoenzym in einem Gewebe ist nicht unbedingt ein Hinweis auf eine physiologische Bedeutung in den Zellen. So entfällt z.B. in Gewebehomogenaten glatter Muskulatur der Atemwege des Hundes 85% der cAMP-Hydrolyse auf die PDE1C, 10% auf die PDE3 und lediglich 5% auf die PDE4, obwohl die PDE4 das regulatorisch relevante Isoenzym bei der Kontrolle des cAMP-Gehaltes und des Muskeltonus im intakten Gewebe zu sein scheint (43,44,45). Es wird vermutet, dass die Ursache für diese Diskrepanz eine Kompartimentierung der Isoenzyme innerhalb der Zelle ist, die ein wichtiger Faktor für die Definition der regulatorischen Bedeutung eines Isoenzym sein kann. Deutliche Unterschiede zwischen der relativen PDE-Aktivität der zytosolischen und partikulären Fraktionen verschiedener Gewebe sind beschrieben: 50% - 70% der PDE-Aktivität in Herzmuskel-, Leber-, und Fettzellen ist membrangebunden, 80% - 90% der PDE-Aktivität in glatter Muskulatur, Nierenzellen und Thrombozyten findet sich in der zytosolischen Fraktion.

Während einige Gewebe fast alle PDE-Subtypen exprimieren, finden sich in anderen nur wenige Isoenzyme. Selbst in solchen Organen und Geweben, in denen zahlreiche PDE exprimiert werden, dominieren nur wenige die Kontrolle der zellulären Funktionen. Diese relative Gewebespezifität und die Sensitivität gegen selektive Inhibitoren macht die PDE zu einem interessanten Ziel der pharmakologischen Beeinflussung.

1.7 Urolithiasis

Eine der häufigsten Ursachen einer supravvesikalen Obstruktion ist die intraluminale Verlegung des Ureters durch einen Harnleiterstein, was meist mit dem akuten Symptom der Kolik verbunden ist. Die Prävalenz des Harnsteinleidens in den westlichen Industrienationen ist mit 4% - 12 % angegeben, die Zahl der Patienten, die aufgrund einer chronischen Niereninsuffizienz, verursacht durch Urolithiasis, dialysepflichtig werden, macht 5% der Gesamtzahl der pro Jahr der Dialyse zugeführten Patienten aus (46). Die Urolithiasis hat somit epidemiologisch den Charakter einer Volkskrankheit, vergleichbar dem *Diabetes mellitus*. In der Regel führt eine Urolithiasis nicht zu renalen Folgeschäden, da es bei einem Durchmesser des Konkrements von weniger als 4 mm bei ca. 80 % der Patienten zu einem spontanen Abgang des Steins kommt, auch bei einer Größe zwischen 4 mm und 6 mm beträgt die Rate des spontanen Abgangs unter konservativer Therapie noch 50 %, bei einer Steingrößen von mehr als 10 mm jedoch nur noch etwa 2% - 23% (47,48).

Die Harnleiterkolik, die unabhängig von der Größe des Konkrements auftreten kann, ist durch einen schlagartig einsetzenden stechenden, als vernichtend beschriebenen Schmerz charakterisiert, der wellen- oder wehenartig in kurzen Intervallen auftritt. Zu den Begleitsymptomen gehören Übelkeit, Erbrechen und Meteorismus, durch vasovagale Reaktionen kann es zu Dysregulationen des Kreislaufs bis zum Kollaps kommen. Es wird postuliert, daß der Kolikschmerz durch die spastische Kontraktion der Uretermuskulatur um den Fremdkörper ausgelöst wird (49). Andere Autoren bezweifeln diesen pathophysiologischen Mechanismus und sehen in einer Überdehnung der Wandung des Harnleiters durch die Stauung der Harnsäule und einer durch die Reibung des Steins verursachten lokalen Entzündung (Ödem) der *Tunica mucosa* die Ursache der Schmerzereignisse (50).

Während es in den letzten 20 Jahren auf dem Gebiet der nicht-invasiven Zertrümmerung von Harnleitersteinen, der sogenannten extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie (ESWL), und der endoskopischen Desintegration und Extraktion von Konkrementen innovative technische Neuerungen gegeben hat, ist die konservative medikamentöse Therapie der Harnleiterkolik nach wie vor wenig standardisiert und von einer gewissen Stagnation geprägt. Mittel der Wahl sind in erster Linie potente Analgetika wie das Metamizol (Novalgin[®]) oder Morphine, sowie Diclofenac-Natrium und Indomethacin, welche die Produktion pro-inflammatorischer Prostaglandine durch das Enzym Prostaglandin-Synthetase inhibieren (51,52). Auch die Kombination von Novalgin[®] mit Scopolaminbutylbromid (Buscopan[®]) mit dem Ziel einer synergistischen Spasmoanalgesie wird verwendet, die Wirkung des Scopolaminbutylbromid sieht man in einer postganglionären Inhibition des parasympathischen Einflusses auf die ableitenden Harnwege und die dadurch verursachte Dämpfung der spasmodischen Aktivität der Uretermuskulatur (53). Die spasmolytische Komponente des Buscopan[®] ist jedoch umstritten, der Erfolg einer Therapie der Kolikereignisse mit dem Medikament wird uneinheitlich beurteilt (54). Die physiologische Ursache der marginalen Effektivität des Scopolaminbutylbromid könnte eine bereits von HERTLE & NAWRATH (1986) postulierte Dominanz der sympathischen Innervation in der Kontrolle der kontraktilen Aktivität der glatten Muskulatur des Harnleiters sein (3). Auch die Wirkungen anderer spasmolytischer Substanzen, darunter der K⁺-Kanalöffner S 0121, der NO-Donor Glyceryltrinitrat (GTN), der Ca²⁺-Kanalblocker Nifedipin, der alpha_{1A/1D}-Adrenozeptorantagonist Tamsulosin und das Parasympatholytikum Rociverin, auf den Tonus der Uretermuskulatur, die Passage distal lokalisierter Konkreme und die Koliksymptomatik waren in den vergangenen Jahren Gegenstand wissenschaftlicher und klinischer Studien, keiner dieser Wirkstoffe hat sich als Goldstandard in der klinischen Routine durchgesetzt (55-60). Effektive spasmolytische und anti-inflammatorische pharmakologische Therapieoptionen, welche auf die Ursachen der Schmerzsymptomatik, nämlich die lokalen Spasmen und Entzündungsreaktionen, zielen, sind somit bisher nicht verfügbar.

2. Fragestellung

Voraussetzung für Fortschritte in der medikamentösen Therapie von Dysfunktionen des oberen Harntrakts ist das Verständnis der zellulären Mechanismen, welche die Funktion der Organe regulieren. Zahlreiche Arbeiten haben eine Bedeutung der cGMP- und cAMP-abhängigen intrazellulären Signalübertragung und ihrer Schlüsselenzyme, den Stickoxid-Synthasen (NOS), Guanylatzyklen (sGC) und Phosphodiesterasen (PDE), in der Kontrolle der glatten Muskulatur des *Corpus cavernosum penis*, Detrusors, der Urethra und der Transitionalzone der Prostata gezeigt. In der Urologie hat die Verwendung von selektiven Inhibitoren der PDE5 (cGMP-PDE) die orale Pharmakotherapie der Erektile Dysfunktion (ED) revolutioniert. Theoretisch wäre die Modulation der Aktivität intrazellulärer Schlüsselenzyme der Tonusregulation (Adenylatzyklen, NOS, sGC, Phosphodiesterase-Isoenzyme) eine interessante Option der Behandlung des mit der Urolithiasis verbundenen Kolikleidens.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin, der NO-Donatoren Natriumnitroprussid (NNP) und Dihydropyridin (DHP) sowie selektiver Inhibitoren der PDE-Isoenzyme PDE1, PDE3, PDE4 und PDE5 auf tonische Kontraktion isolierter Ringsegmente des humanen Ureters zu untersuchen. Außerdem wurden radioimmunchemische Untersuchungen zur Wirkung der Testsubstanzen auf die intrazelluläre Akkumulation der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in der glatten Muskulatur des Ureters durchgeführt.

3. Material & Methoden

3.1 Gewebeasservierung

Längliche Exzidate aus dem medianen Bereich des Ureters wurden unter Beachtung der Regularien der lokalen Ethik-Kommission der Medizinischen Hochschule Hannover im Rahmen von Tumornephrektomien von insgesamt 40 Patienten im Alter von 30 bis 80 Jahren entnommen, sofort in eine eisgekühlte organprotektive Lösung (CUSTODIOL[®], HTK-Lösung nach Bretschneider zur Kardioplegie und Multiorganprotektion, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach) verbracht und zur weiteren Präparation in das Labor transportiert.

3.2 Funktionelle Organbad-Studien

Nach sorgfältiger Entfernung von Fett- und Bindegewebsanteilen wurden etwa 2 mm - 3 mm starke zirkuläre Segmente präpariert und unter Standardbedingungen in den Meßkammern eines horizontalen und vertikalen Organbad-Systems (Mayflower Organbad-System, Hugo Sachs Elektronik GmbH, March; IOA 5306, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim) fixiert. Die Badkammern (Füllvolumen 10 ml) waren mit einer modifizierten KREBS-RINGER-Lösung gefüllt (NaCl 128 mM, NaHCO₃ 15 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 1.2 mM, Glucose 22 mM, 2Na⁺ (Ca²⁺) EDTA 0.1 mM, pH 7.2 - 7.4), die auf 37°C temperiert war und kontinuierlich mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen) oxigeniert wurde. Dem Anlegen einer passiven Vorspannung von 10 mM (1 g) folgte eine Äquillierungsphase von 60 min. Anschließend wurde die kontraktile Aktivität der Uretermuskulatur durch KCl (80 mM) stimuliert. Nach dem Erreichen einer stabilen tonischen Kontraktion wurden die Testsubstanzen - der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin, die NO-Donatoren Natriumnitroprussid (NNP) und Dihydropyridin (DHP) sowie die PDE-Inhibitoren Quazinon (Ro 13-6438) und Trequinsin (HL 725) (PDE3-Inhibitoren), Rolipram (ZK 62711, PDE4-Inhibitor), Zaprinast (M&B 22984), Diethylaminosulfonylpyrazolopyrimidin (BAY 12-7714 = DASPP), E 4021 (BAY 15-5619) und Morpholinosulfonylpyrazolopyrimidin (BAY 12-7715 = MSPP) (PDE5-Inhibitoren) in kumulativer Dosierung (0.01 µM - 10/100 µM). zugegeben. Mechanische Spannungsänderungen der Muskulatur wurden mit Kraftaufnehmern (HSE F30 Force Transducer, Hugo Sachs Elektronik GmbH, March; Force Displacement Transducer FT03, Grass Instrument Co., Quincy, USA) registriert, mit Verstärkereinheiten amplifiziert (DBA DC Bridge Amplifier Type 66, Hugo Sachs Elektronik GmbH, March; Transducer FT 03, Grass Instrument Co., Quincy, USA)

und mit einem Analog-Schreiber (Graphtec Linearcorder Mark 8, Graphtec Corp. Tokio, Japan) oder einem analog-digitalen Meßdatenerfassungssystem (MacLab[®], AD Instruments, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet. Stammlösungen (10 mM) der verwendeten Testsubstanzen wurden mit Polyethylenglykol (DHP), Methanol (Ro 13-6438), Ethanol (HL 725), Dimethylsulfoxid (Forskolin, E 4021, DASPP, MSPP), 0.1 M NaOH (Zaprinast) oder 0.9%iger NaCl-Lösung (NNP) hergestellt und mit isotonischer NaCl-Lösung zum weiteren Gebrauch verdünnt. In den Organbad-Experimenten war die Konzentration der nichtwässrigen Lösungsmittel < 1%.



Abb. 4: Detaildarstellung einer Einheit des horizontalen MAYFLOWER Organbad-Systems (Hugo Sachs Elektronik GmbH, March): Abgebildet ist eine Badkammer mit Oxygenierungsfritte, Komponenten des die Pufferlösung zuführenden und ableitenden Umlaufsystems sowie ein Kraftaufnehmer des Typs HSE F30 mit Feintrieb.

3.3 Bestimmung der Gewebekonzentrationen zyklischer Nukleotide

3.3.1 Expositionsexperimente

Zur Bestimmung der Effekte der Testsubstanzen auf die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP wurden die Ureterringe analog zu den Organbad-Experimenten in 2 ml Reaktionsgefäßen, die mit KREBS-RINGER Lösung gefüllt waren, zunächst unter kontinuierlicher Oxigenierung für 60 min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Exposition gegen Forskolin und NNP (0.01, 1.0 und 100 µM) für 2 min., 5 min. und 10 min. sowie gegen DHP und die PDE-Inhibitoren (1 µM, 10 µM und 100 µM) für 10 min. Als Kontrolle dienten Gewebestreifen nach Inkubation mit äquivalenten Volumina RINGER-Lösung oder 0.9% Saline. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Gewebe in vorbereitete Reaktionsgefäße transferiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend pulverfein homogenisiert.

3.3.2 Radioimmunochemische Quantifizierung von cAMP und cGMP

Die Extraktion zyklischer Nukleotide erfolgte durch Resuspendierung der Gewebehomogenate in 1 ml 80% Ethanol, Sonifizierung der Suspensionen für 5 min. und anschließender Zentrifugation (5 min. bei 1.700 g). Die alkoholischen Überstände wurden abgezogen und gefriergetrocknet, die Lyophilisate in 1 ml RIA-Puffer (50 mM NaAc pH 6.0) aufgenommen. Jeweils 200 µl der resuspendierten Proben wurden in Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit jeweils 6.7 µl eines Gemisches aus Triethylamin/Essigsäure (Verhältnis 2:1) bei Raumtemperatur acetyliert. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Aliquots von 5 µl der acetylierten Proben wurden in RIA-geeigneten Reaktionsröhrchen vorgelegt, mit NaAc-Puffer 1:50 verdünnt (keine Verdünnung der Proben zur Bestimmung von cGMP) und zunächst mit 100 µl der Suspension eines Kaninchen-Antikörpers gegen acetyliertes cAMP (Verdünnung 1:50.000) bzw. cGMP (Verdünnung 1:200.000) in einer 0.15% Gammaglobulin-Lösung in RIA-Puffer, dann mit 50 µl Tracer (¹²⁵J cAMP / cGMP in RIA-Puffer, eingestellt auf 5.000 - 7.000 cpm) versetzt, gut durchmischt und 12 h bei 4°C inkubiert. Die Fällung des gebundenen Antikörpers erfolgte nach dem Ende der Inkubationszeit durch Zugabe von jeweils 100 µl einer 0.8% Gammaglobulin-Lösung (in RIA-Puffer) und 750 µl einer 15% PEG-Lösung (in 10 mM Tris/HCl pH 7.4), gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 4°C.

Nach Zentrifugation (20 min. bei 3.000 rpm), dem Absaugen des Überstandes, erneuter Zentrifugation (5 min. bei 3.000 rpm) und dem vollständigen Absaugen des noch verbliebenen Überstandes wurde die Aktivität der Pellets in einem Gammacounter (1470 Wizard Automatic Gamma Counter, WALLAC, Turku, Finnland) bestimmt. Durchgeführt wurden Doppelbestimmungen, die gegen eine Standardreihe acetylierten cAMP/cGMP im Konzentrationsbereich von 20 nM/l - 0.08 nM/l (20, 10, 5.0, 2.5, 1.25, 0.63, 0.3, 0.16 und 0.08 nM/l) gemessen wurden. Alle Meßwerte wurden um den Betrag der unspezifischen Bindung des Antikörpers, der sich aus der Aktivität einer Nullprobe ergab, in der 50 µl acetylierter RIA-Puffer, 100 µl 0.15% Gammaglobulin-Lösung und 50 µl Tracer vorgelegt waren, korrigiert.

3.4 Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung löslicher Proteine erfolgte mit einem PIERCE BCA Protein Assay® (Pierce Chemical Company, Rockford, USA) entsprechend der Gebrauchsvorschrift gegen einen Standard bovines Serumalbumins (1 mg/ml - 0.0078 mg/ml). Der Test beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine in einem alkalischen Medium (Biuret - Reaktion) und der zeitabhängigen Bildung eines Cu^{+} - Bicinchoninat Komplexes, dessen Extinktion bei 562 nm gemessen wird.

3.5 Auswertung der Experimente

Die Organbad-Experimente wurden 8 - 12 mal an Uretersegmenten wiederholt, die von mindestens zwei (2) verschiedenen Patienten stammten. Alle Daten sind als Mittelwerte (MW) \pm der Standardabweichung (SD) vom Mittelwert angegeben. Dargestellt ist die um Lösungsmittel-Effekte korrigierte Reversion (%) der tonischen Kontraktion nach Substanzzugabe, bezogen auf die maximale KCl-induzierte Tension (100%). EC_{50} -Werte (Substanzkonzentration, die zu einer 50%igen Reversion der maximalen, KCl-induzierten Kontraktion führte) wurden graphisch nach nicht-linearer Regression bestimmt. Zur Validierung der radioimmunchemischen Untersuchungen wurden pro Substanz und Konzentration jeweils 3 - 5 ringförmige Uretersegmente inkubiert. Nach der unter 3.3.2 beschriebenen Aufarbeitung wurden dann mit den resuspendierten Lyophilisaten Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ermittlung signifikanter Erhöhungen von cAMP und cGMP gegen eine Negativkontrolle erfolgte mit dem Student's t-Test.

3.6 Chemikalien & Antikörper

Forskolin, Natriumnitroprussid (NNP), Dimethylsulfoxid und Acetylcholin wurden von der Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), kristallines bovines Serumalbumin und Gamma-Globulin von Serva Feinchemikalien GmbH (Heidelberg) bezogen. Rolipram wurde von der Schering AG (Berlin), U 46619, DHP und die PDE-Inhibitoren Trequinsin (HL 725), Zaprinast (M&B 22984), E 4021 (BAY 15-5619), DASPP (BAY 12-7714) und MSPP (BAY 12-7715) von der Bayer HealthCare AG, Geschäftsbereich Bayer Vital GmbH (Wuppertal) überlassen, der Kaninchen-Antikörper gegen acetyliertes cAMP/cGMP von der Abteilung Molekularpharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) zur Verfügung gestellt. Quazinon (Ro 13-6438) stammte von der Biomol GmbH, Hamburg, ^{125}J cAMP und ^{125}J cGMP von der Fa. Immundiagnostik GmbH, Benzheim, und Norepinephrin (Arterenol[®]) von der Sanofi-Aventis AG, Frankfurt am Main. Alle anderen in den Experimenten verwendeten Laborchemikalien stammten, soweit dies im Text nicht näher bezeichnet ist, entweder von der Merck KGaA (Darmstadt) oder Mallinckrodt-Baker BV (Deventer, Niederlande).

4. Ergebnisse

4.1 Organbad-Studien

Kein Ringsegment der Uretermuskulatur zeigte nach der Fixierung in die Badkammern eine spontane mechanische Aktivität. Die durch 80 mM KCl induzierte Depolarisierung der Membran der Myozyten verursachte reproduzierbare, stabile tonische Kontraktionen. Eine phasische kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur nach der Applikation des depolarisierenden Agens wurde nicht beobachtet. Die kumulative Zugabe des alpha-Adrenozeptoragonisten Norepinephrin, Muskarinrezeptor-Agonisten Acetylcholin und Thromboxan A₂ – Analogons U 46619 (1 nM - 100 µM) resultierte nicht in einer kontraktile Kraftentwicklung der Muskelsegmente.

In den Organbad-Experimenten verursachten alle Testsubstanzen eine dosis-abhängige Reversion der durch KCl induzierten tonischen Kontraktion, es ergab sich die folgende Reihe der Substanzeffektivität (R_{max} = mittlere Reversion der tonischen Kontraktion nach Zugabe der höchsten Substanzkonzentration): Rolipram ($R_{max} = 100 \pm 0\%$) > Quazinon ($R_{max} = 87 \pm 4\%$) > Zaprinast ($R_{max} = 76 \pm 7\%$) \geq BAY 12-7715 ($R_{max} = 67 \pm 10.6\%$) \geq NNP ($R_{max} = 62 \pm 5\%$) \geq E 4021 ($R_{max} = 59 \pm 12\%$) \geq HL 725 ($R_{max} = 49 \pm 3\%$) > Forskolin ($R_{max} = 39 \pm 2\%$) > DHP ($R_{max} = 35 \pm 12\%$) > BAY 12-7714 ($R_{max} = 12.6 \pm 7\%$). Mit Ausnahme des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin, NO-Donors DHP und PDE5-Inhibitors DASPP führte die kumulative Zugabe der Testsubstanzen innerhalb des getesteten Konzentrationsintervalls zu einer 50%igen Reversion der tonischen Kontraktion, folgende EC₅₀-Werte (mittlere Substanzkonzentration, die eine 50%ige Reversion der initialen, durch KCl induzierten tonischen Kontraktion verursacht) wurden abgeleitet: NNP = 4 µM, HL 725 = 100 µM, Rolipram = 0.1 µM, Zaprinast = 40 µM, MSPP = 20 µM, E 4021 = 50 µM. Aus der Stoffgruppe der PDE5-Inhibitoren war, bezogen auf den EC₅₀-Wert, MSPP der effektivste Antagonist der Tension der Streifenpräparate. Dennoch ergab ein direkter Vergleich mit dem Zaprinast keine signifikanten Unterschiede der *in vitro* - Wirkungen. Es wurden keine relevanten relaxierenden Effekte der in den Experimenten verwendeten Konzentrationen der nicht-wässrigen Lösungsmittel Polyethylenglykol, Methanol, Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die KCl-induzierte Tension der Uretermuskulatur registriert. Die Ergebnisse der Organbad-Experimente sind in den **Abbildungen 5 (A - C)** und **6 (A - C)** sowie in der **Tabelle 1** zusammengefasst.

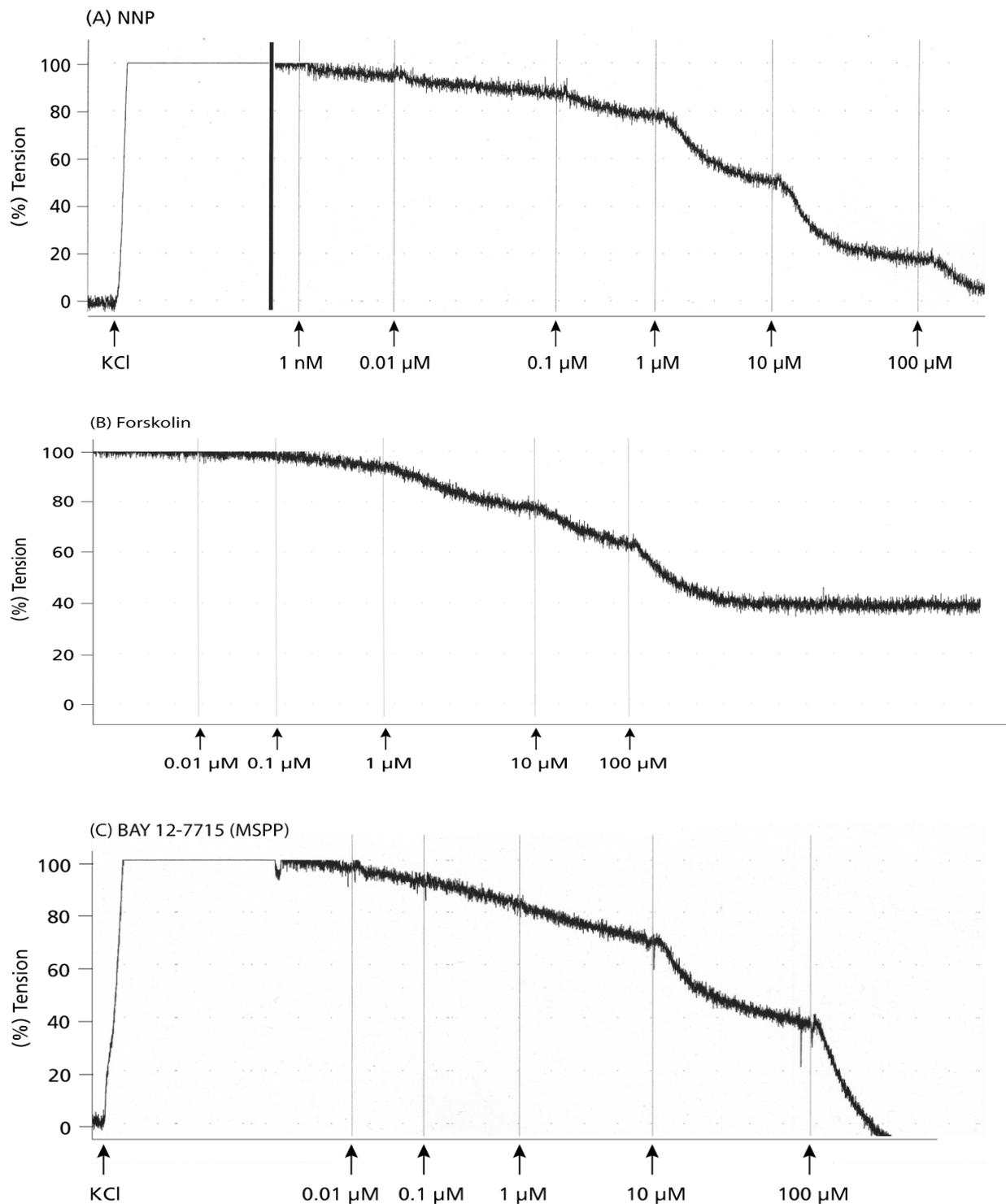
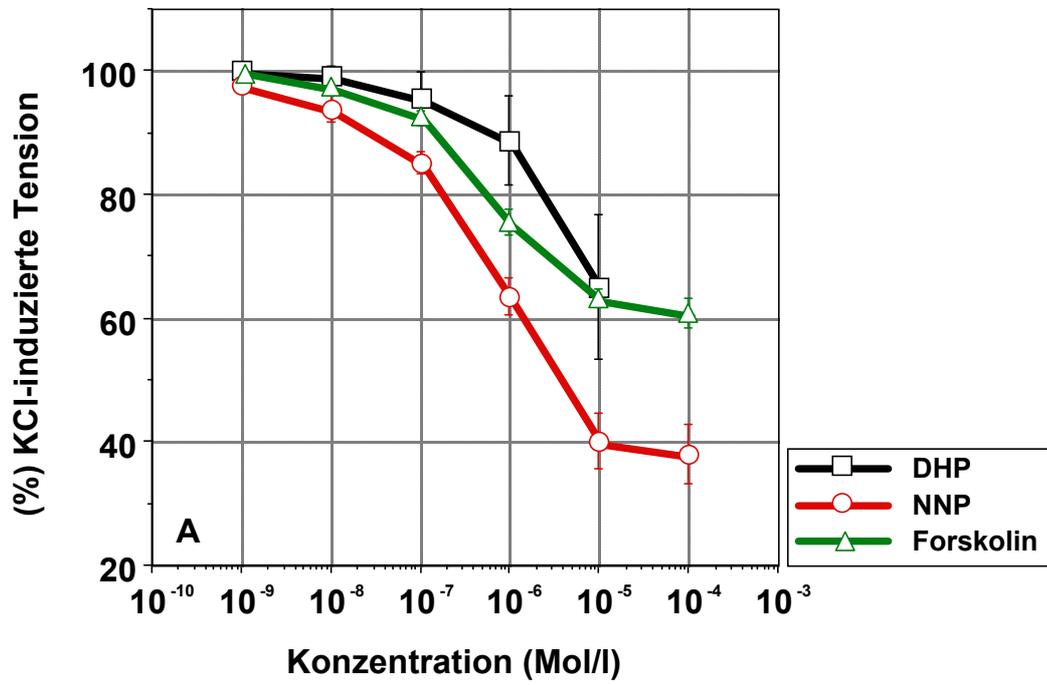
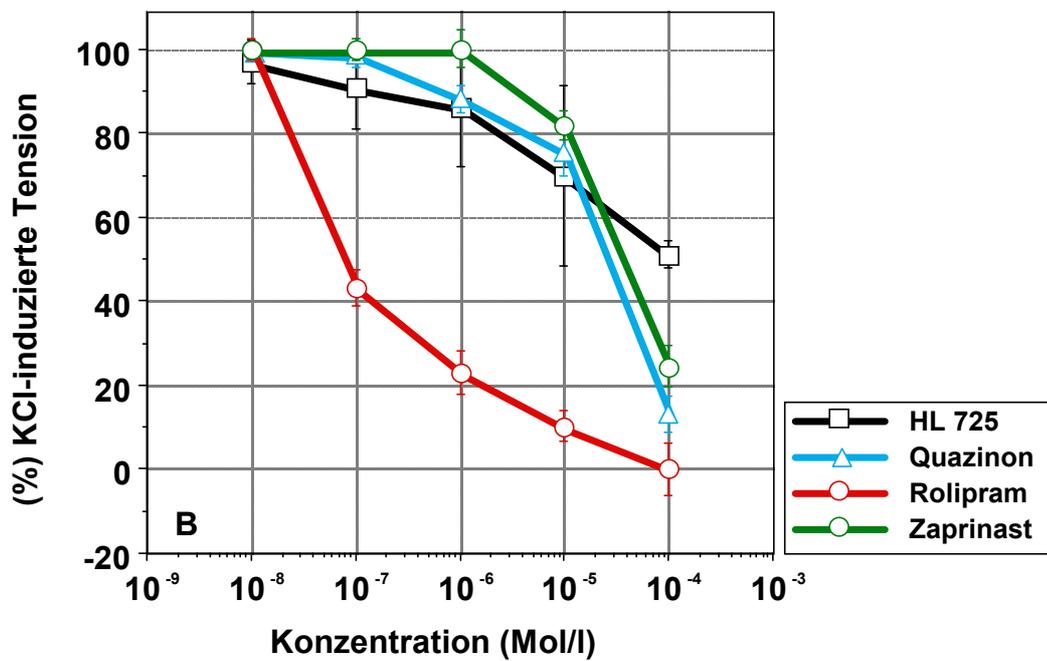


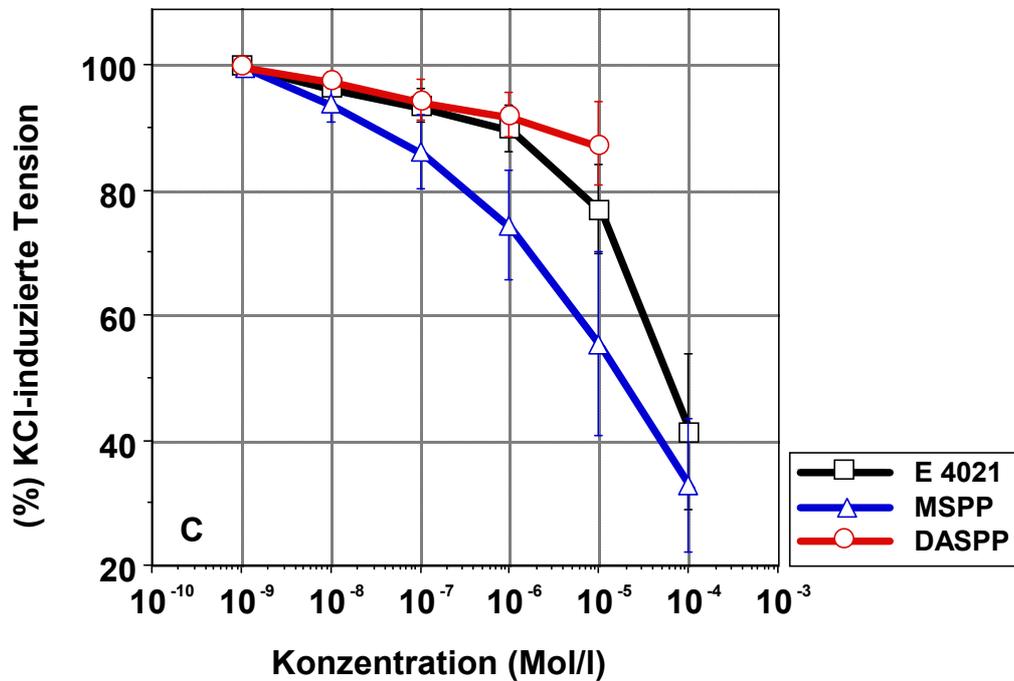
Abb. 5 A - C: Originalregistrierungen von Organbad-Experimenten zur Wirkung der kumulativen Zugabe des Nitrovasodilators (NO-Donors) NNP (**A**), Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin (**B**) und PDE5-Inhibitors MSPP (BAY 12-7715) (**C**) auf die durch 80 mM KCl induzierte tonische Kontraktion isolierter ringförmiger Segmente des humanen Ureters. Die Zeitpunkte der Zugabe von Substanz sind durch \uparrow markiert.



(Abb. 6 A)



(Abb. 6 B)



(Abb. 6 C)

Abb. 6 A - C: Reversion der durch 80 mM KCl induzierten tonischen Kontraktion isolierter Segmente glatter Muskulatur des humanen Ureters durch die kumulative Zugabe (1 nM / 10 nM - 10 μ M/100 μ M) des Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin, der NO-Donatoren Natriumnitroprussid (NNP) und Dihydropyridin (DHP) (A) und der PDE-Inhibitoren Trequinsin (HL 725), Quazinon (Ro 13-6438) (PDE3-Inhibitoren), Rolipram (PDE4-Inhibitor) und Zaprinast (PDE5-Inhibitor) (B) sowie E 4021 (BAY 15-5619), DASPP (BAY 12-7714) und MSPP (BAY 12-7715) (PDE5-Inhibitoren) (C) Für jede Dosis-Wirkungskurve wurden n = 8 - 12 Ringsegmente verwendet, die von mindestens zwei verschiedenen Individuen stammten.

Substanz	R _{max} ± SD (%)	EC ₅₀ (µM)
Quazinon (Ro 13-6438) (PDE3-Inhibitor)	87 ± 4.0	25
Trequinsin (HL 725) (PDE3-Inhibitor)	49 ± 3.0	100
Rolipram (ZK 62711) (PDE4-Inhibitor)	100	0.1
Zaprinast (M&B 22948) (PDE5-Inhibitor)	76 ± 7.0	40
E 4021 (BAY 15-5619) (PDE5-Inhibitor)	59 ± 12.5	50
DHP (Dihydropyridin) (NO-Donor)	35 ± 11.8 (10 µM)	NB
BAY 12-7715 (MSPP, PDE5-Inhibitor)	67.3 ± 10.6	20
BAY 12-7714 (DASPP, PDE5-Inhibitor)	12.6 ± 7.0 (10 µM)	NB
Forskolin (AC-Aktivator)	39.2 ± 2.3	NB
NNP (Natriumnitroprussid) (NO-Donor)	62 ± 5.0	4.0

Tabelle 1: Effekte der Testsubstanzen auf die durch KCl (80 mM) induzierte tonische Kontraktion isolierter ringförmiger Segmente glatter Muskulatur des humanen Ureters. Angegeben sind die aus jeweils 8 - 12 Experimenten kalkulierten R_{max}- und EC₅₀-Werte (R_{max} = mittlere Reversion der tonischen Kontraktion nach Zugabe der höchsten Substanzkonzentration, EC₅₀ = mittlere Substanzkonzentration, die eine 50%ige Reversion der initialen, durch KCl induzierten tonischen Kontraktion verursacht). NB = nicht bestimmbar, d.h. EC₅₀ >> 100µM

4.2 Quantifizierung zyklischer Nukleotide

Die Inkubation isolierter zirkulärer Segmente der glatten Muskulatur des Ureters mit 0.01 μM , 1 μM und 100 μM des AC-Aktivators Forskolin resultierte in einer von der Expositionszeit und der verwendeten Substanzkonzentration abhängigen Erhöhung des Gewebegehalts von cAMP. Nach Exposition gegen 100 μM Forskolin wurde eine Stimulation der Produktion des *Second Messenger* gemessen, die um einen Faktor 22 (2 min.), 42 (5 min) und 51 (10 min) über der mittleren Basiskonzentration der Kontrollen lag (Kontrolle = 31.9 ± 2.7 pmol cAMP / mg Protein) (**Abb. 7**). Zwar wurde in Gegenwart von Forskolin auch eine Akkumulation von cGMP beobachtet, diese zeigte sich jedoch unabhängig von der Inkubationszeit und der verwendeten Substanzkonzentration (**Ergebnisse nicht dargestellt**).

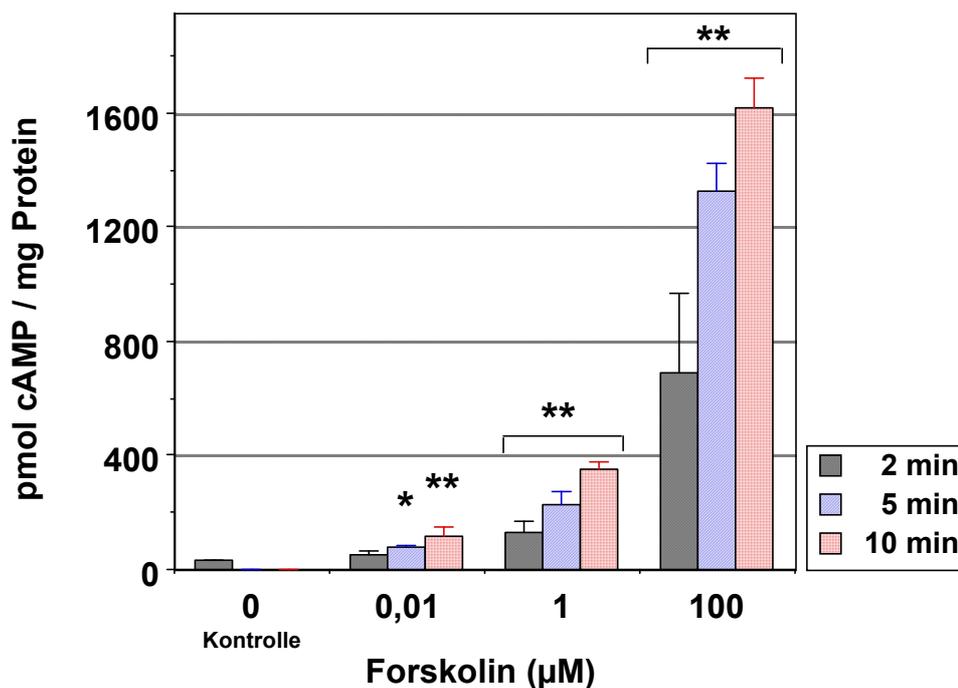


Abb. 7: Stimulation der zellulären Produktion des *Second Messenger* cAMP in isolierten zirkulären Präparaten glatter Muskulatur des humanen Ureters durch den Adenylyl cyclase-Aktivator Forskolin (0.01 μM , 1 μM und 100 μM). 0 = Kontrolle, basale cAMP-Produktion in Abwesenheit pharmakologisch aktiver Substanz. Asterikse (*) markieren signifikante Unterschiede von der Kontrolle. Jede Substanzkonzentration wurde an n = 3 - 5 Gewebesegmenten getestet. (*p < 0.05, **p < 0.01)

Die Exposition der Uretermuskulatur gegen den Nitrovasodilator NNP (0.01 μM , 1 μM und 100 μM) führte erwartungsgemäß zu einer linearen Stimulation der zellulären Produktion von cGMP. Die gemessenen Werte lagen innerhalb eines Intervalls, das einer Erhöhung der Konzentration um einen Faktor 13 (nach 2 min. Exposition gegen 0.01 μM NNP) bis 90 (nach 10 min. Exposition gegen 100 μM NNP) über die Basiskonzentration (1.7 ± 1.16 pmol cGMP/ mg Protein) entsprach (**Abb. 8**). Der Effekt von NNP auf die zelluläre Konzentration von cAMP zeigte sich, ebenso wie die Wirkung von Forskolin auf den Gewebegehalt des *Second Messenger* cGMP, ebenfalls unabhängig von der Inkubationszeit und der Substanzkonzentration (**Ergebnisse nicht dargestellt**).

Die zu vernachlässigenden Effekte des Dihydropyridin (DHP) auf den Gewebegehalt von cGMP (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigen, daß die Wirkung der Substanz wohl ausschließlich über die Antagonisierung von Ca^{2+} -Kanälen des Subtyps L vermittelt wird.

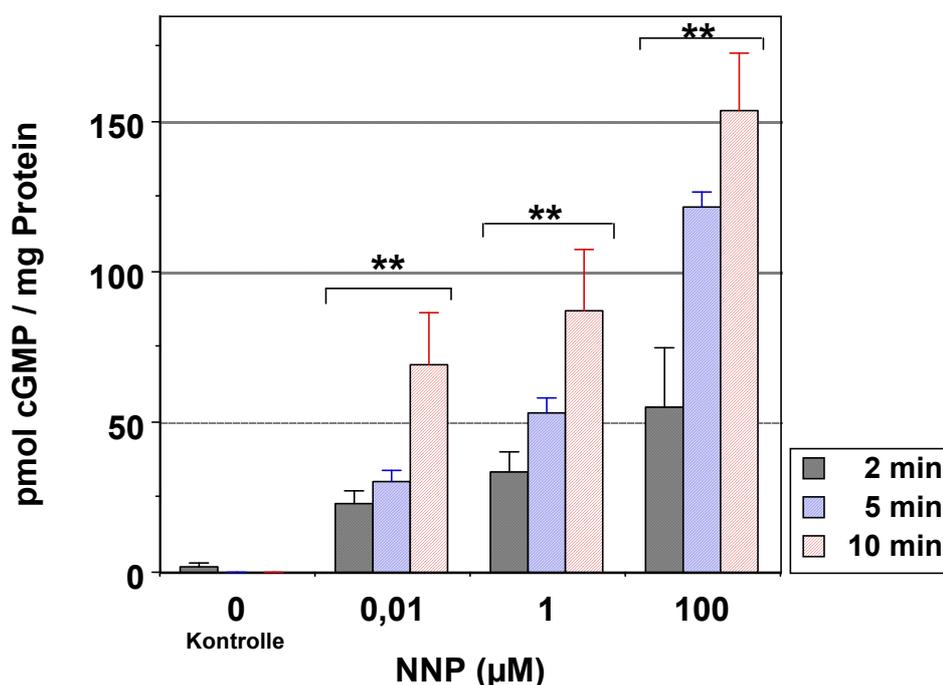
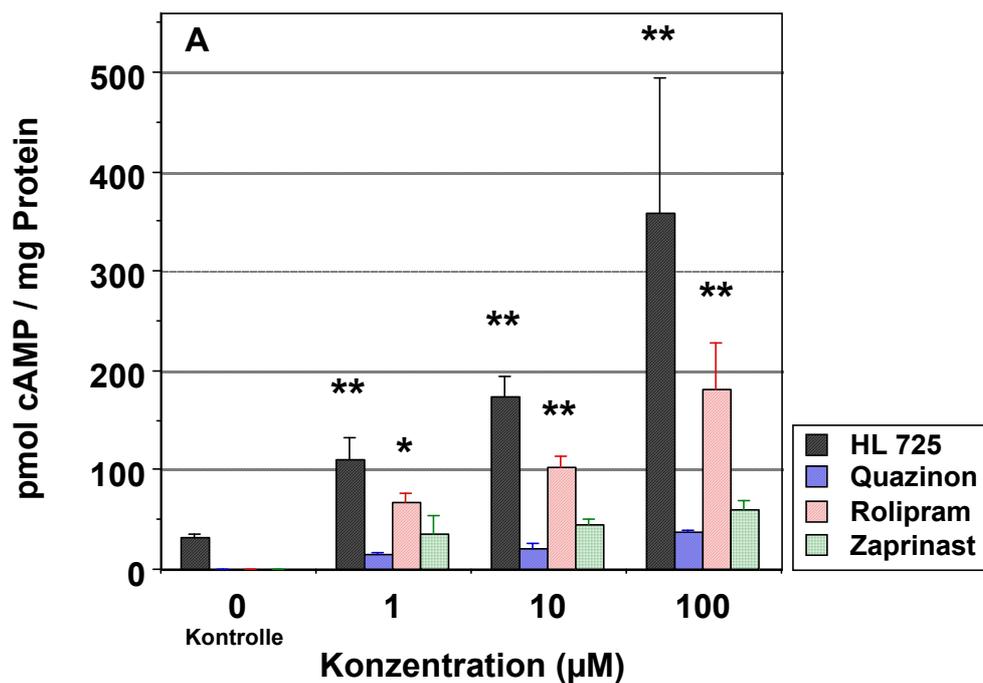
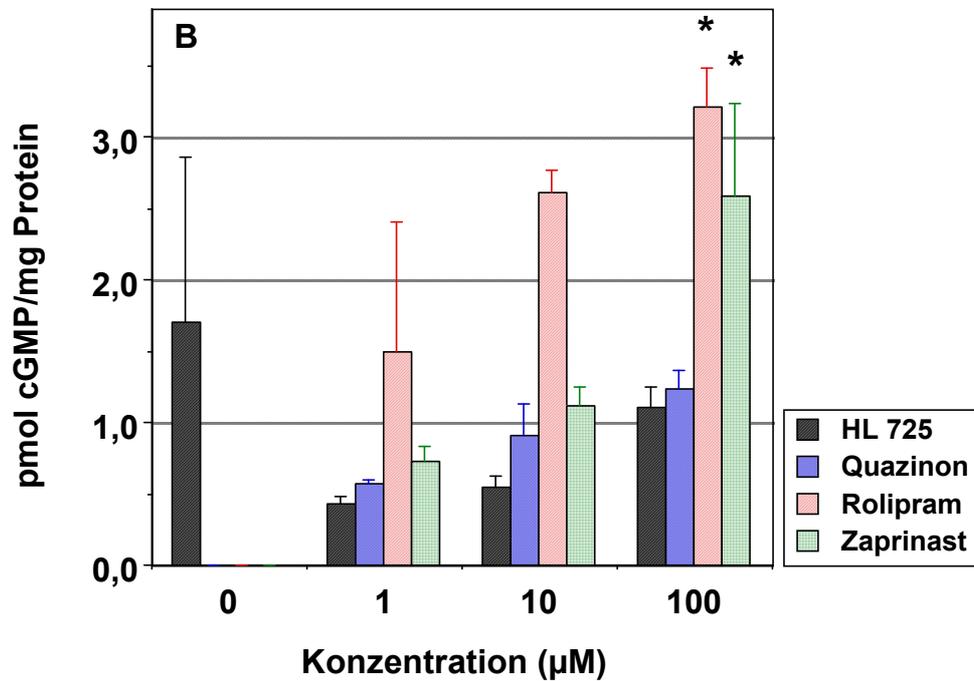


Abb. 8: Stimulation der zellulären Produktion des *Second Messenger* cGMP in isolierten zirkulären Präparaten glatter Muskulatur des humanen Ureters durch den Nitrovasodilator Natriumnitroprussid (NNP, 0.01 μM , 1 μM und 100 μM). 0 = Kontrolle, basale cGMP-Produktion in Abwesenheit pharmakologisch aktiver Substanz. Asterikse (*) markieren signifikante Unterschiede von der Kontrolle. Jede Substanzkonzentration wurde an n = 3 - 5 Gewebesegmenten getestet. (*p < 0.05, **p < 0.01)

Während die Inkubation der isolierten Muskelsegmente mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram und dem PDE3-Inhibitor HL 725 zu einer relevanten linearen Erhöhung des cAMP-Gehalts um einen Faktor 3 - 11 führte, waren die Effekte des PDE3-Inhibitors Quazinon zu vernachlässigen. Auch in einer Konzentrationen von 100 μM führten die Substanz nicht zu einer Erhöhung der mittleren Basiskonzentration des cAMP. Im Konzentrationsbereich von 0.01 μM - 100 μM ergaben sich keine relevanten Wirkungen von HL 725 und Quazinon auf die Akkumulation von cGMP, allerdings induzierte Rolipram in einer Konzentration von 100 μM eine Erhöhung des intrazellulären cGMP um einen Faktor 2 (**Abb. 9 A und B**).



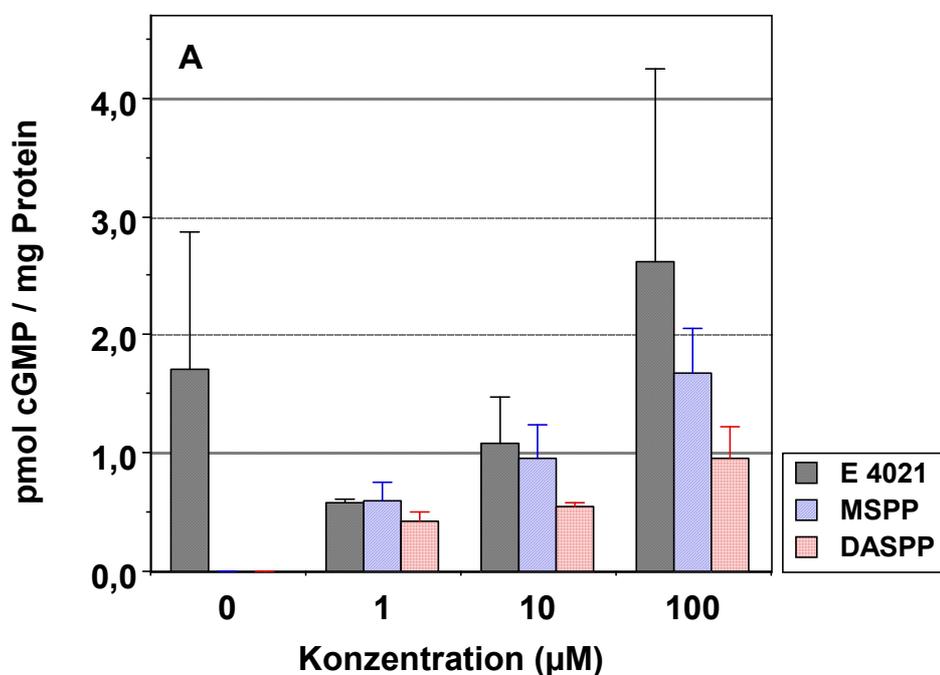
(Abb. 9 A)



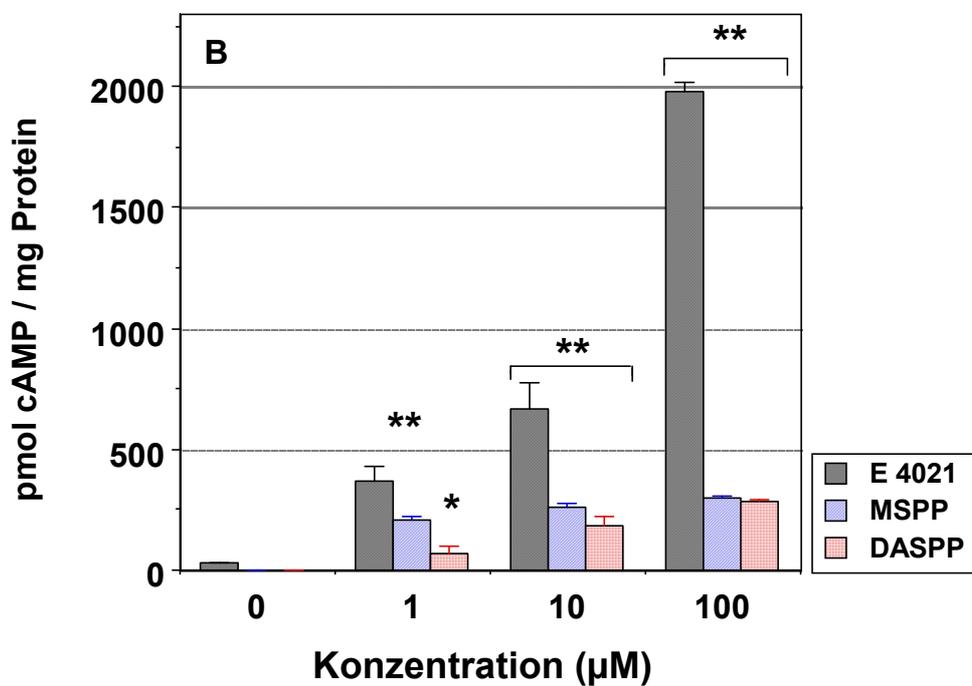
(Abb. 9 B)

Abb. 9 A und B: Effekte der PDE3-Inhibitoren Trequinsin (HL 725) und Quazinon (Ro 13-6438), des PDE4-Inhibitors Rolipram und PDE5-Inhibitors Zaprinast (0.01 µM, 1 µM und 100 µM) auf die zelluläre Akkumulation der *Second Messenger* cAMP (**A**) und cGMP (**B**) in isolierten zirkulären Präparaten glatter Muskulatur des humanen Ureters 0 = Kontrolle, basale cAMP-/cGMP-Konzentration in Abwesenheit pharmakologisch aktiver Substanz. Asterikse (*) markieren signifikante Unterschiede von der Kontrolle. Jede Substanzkonzentration wurde an n = 3 - 5 Gewebesegmenten getestet. (*p < 0.05, **p < 0.01)

Nach der Exposition der Uretermuskulatur gegen die PDE5-Inhibitoren E 4021, DASPP, MSPP und Zaprinast wurden lineare Anstiege des cGMP registriert, diese zeigten sich allerdings nach der Inkubation mit E 4021, DASPP und MSPP nicht signifikant unterschiedlich vom Mittelwert der Kontrollen (1.7 ± 1.16 pmol cGMP/mg Protein) (**Abb. 10 A**). Lediglich unter der Wirkung von Zaprinast in einer Konzentration von 100 μ M kam es zu einer Stimulation der Akkumulation von cGMP, die das zweifache der Basiskonzentration betrug. Eine Elevation von cAMP in Gegenwart von Zaprinast wurde nicht festgestellt (**Abb. 9 A und B**). Wie nach Exposition des Gewebes gegen den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin beobachtet, ergab sich auch in Gegenwart von E 4021, DASPP und MSPP eine deutliche konzentrations-abhängige Elevation des zellulären cAMP. Diese betrug für das E 4021 das 12- bis 62-fache, für das MSPP das 7- bis 31-fache der Basiskonzentration des zyklischen Nukleotids (31.9 ± 2.7 pmol cAMP / mg Protein) (**Abb. 10 B**).



(Abb. 10 A)



(Abb. 10 B)

Abb. 10 A und B: Effekte der PDE5-Inhibitoren E 4021 (BAY 15-5619), DASPP (BAY 12-7714) und MSPP (BAY 12-7715) (0.01 µM, 1 µM und 100 µM) auf die zelluläre Akkumulation der *Second Messenger* cGMP (A) und cAMP (B) in isolierten zirkulären Präparaten glatter Muskulatur des humanen Ureters 0 = Kontrolle, basale cAMP-/cGMP-Konzentration in Abwesenheit pharmakologisch aktiver Substanz. Asterikse (I) markieren signifikante Unterschiede von der Kontrolle. Jede Substanzkonzentration wurde an n = 3 - 5 Gewebesegmenten getestet. (*p < 0.05, **p < 0.01)

5. Diskussion

Das primäre Ziel der Pharmakotherapie des mit der Urolithiasis verbundenen Kolikleidens ist eine schnelle, adäquate anti-inflammatorische und spasmolytische Wirkung auf das Zielorgan, welche die Schmerzereignisse dämpft oder vollständig beseitigt und die spontane Passage des den Ureter verlegenden Konkrements in die Harnblase fördert, ohne gravierende systemische Nebenwirkungen zu verursachen. Dieser Maxime werden die bisher in dieser Indikation verwendeten Substanzen, darunter Diclofenac-Natrium und das vermeintlich spasmolytisch wirkende Scopolaminbutylbromid (Buscopan®), nicht gerecht.

Die zyklischen Nucleosidmonophosphate cAMP und cGMP und die diesen zugeordneten Funktionsproteine - die generierenden NOS, sGC und Adenylatzyklen und die degradierenden PDE-Isoenzyme - sind wesentliche Komponenten im Mechanismus der Kontrolle des Tonuszustands der glatten Muskulatur des humanen Urogenitaltrakts. Nachdem Inhibitoren der PDE-Isoenzyme 3 und 4 bisher vor allem als Antidepressiva, positiv inotrope Wirkstoffe oder Bronchodilatoren Verwendung gefunden haben, hat die Einführung der selektiven PDE5-Inhibitoren Sildenafil (VIAGRA®), Vardenafil (LEVITRA®) und Tadalafil (CIALIS®) in die Therapie der häufigsten sexuellen Funktionsstörung des Mannes, der Erektile Dysfunktion, dem pharmakologischen Konzept der Inhibition von Phosphodiesterasen und der damit verbundenen zellulären Akkumulation zyklischer Nucleotide auch in der Urologie allgemeine Akzeptanz verschafft (62). Der klinische (und kommerzielle) Erfolg dieser Substanzen und die putative physiologische Bedeutung von Phosphodiesterasen in anderen Organen des menschlichen Harntrakts ist die Grundlage dafür, selektive PDE-Inhibitoren auch in der Behandlung von Leitungs-, Speicher- und Entleerungsfunktion der ableitenden Harnwege einschließlich der mit dem sogenannten Benigen Prostata-Syndrom (BPS) assoziierten irritativen Symptomatik, der sogenannten *Lower Urinary Tract Symptomatology* (LUTS), und Blasenauflaß-Obstruktion (*Bladder Outlet Obstruction* = BOO) zu verwenden (26,27,28,63). Theoretisch wäre die Inhibition der Aktivität regulatorisch relevanter PDE-Isoenzyme eine interessante Option der Behandlung des mit der Urolithiasis verbundenen Kolikleidens.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effekte der selektiven PDE-Inhibitoren Quazinon (Ro 13-6438) und Trequinsin (HL 725) (PDE3-Inhibitoren), Rolipram (ZK 62711, PDE4-Inhibitor), Zaprinast (M&B 22984), Diethylaminosulfonylpyrazolopyrimidin (BAY 12-7714), E 4021 (BAY 15-5619) und Morpholinosulfonylpyrazolopyrimidin (BAY 12-7715) (PDE5-Inhibitoren) auf die tonische Kontraktion isolierter Ringsegmente des humanen Ureters und die

intrazelluläre Akkumulation der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in der glatten Muskulatur zu untersuchen. Die Effekte der Testsubstanzen wurden mit denen des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin und der NO-Donatoren Na⁺-Nitroprussid (NNP) und Dihydropyridin (DHP) verglichen.

5.1 In vitro - Organbad-Studien

Wie unter 4.1 beschrieben, verursachte die kumulative Gabe der PDE-Inhibitoren dosisabhängige Reversionen der durch 80 mM KCl induzierten tonischen Kontraktion der Uretermuskulatur. Das Maximum der Reversion der initialen Tension (R_{max}) lag in einem Intervall von 12 % (BAY 12-7714) bis 100% (Rolipram). Innerhalb des in den Experimenten verwendeten Konzentrationsintervalls (1 nM - 100 μ M) konnten für den PDE3-Inhibitor Quazinon (Ro 13-6438), den PDE4-Inhibitor Rolipram und die PDE5-Inhibitoren Zaprinast, MSPP (BAY 12-7715) und E 4021 EC_{50} -Werte abgeleitet werden. Während diese für die PDE5-Inhibitoren zu > 10 μ M bestimmt wurden, betrug der Wert für Rolipram 100 nM (0.1 μ M). Der PDE4-Inhibitor war somit die effektivste der in diesem experimentellen Modell getesteten Wirksubstanzen. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse einer Arbeit von STIEF & TAHER ET AL. (1995). Sie isolierten mit chromatographischen Methoden die hydrolytischen Aktivitäten der PDE-Isoenzyme 1 (Ca²⁺/Calmodulin -abhängige PDE, hydrolysiert cAMP und cGMP), 2 (cAMP-PDE, wird durch cGMP stimuliert) 4 (cAMP-spezifische PDE) und 5 (cGMP-spezifische PDE) aus zytosolischen Überständen der Rohhomogenate glatter Muskulatur des humanen Ureters und zeigten in Organbad-Experimenten eine Antagonisierung der tonischen, durch KCl induzierten Kontraktion zirkulärer Gewebeselemente durch den PDE4-Inhibitor Rolipram, der sich auch in ihrem Modell der Wirkung des PDE5-Inhibitors Zaprinast überlegen zeigte (64). Experimentelle Arbeiten, die mit der Organbad-Methode die Effekte der PDE5-Inhibitoren Zaprinast, Tadalafil, Sildenafil und Vardenafil auf den humanen Ureter untersuchten, beschreiben wesentlich geringere *In vitro* - Effekte dieser Substanzen auf die tonische Kontraktion der glatten Muskulatur, als in der vorliegenden Dissertation für die ebenfalls als Inhibitoren der PDE5 charakterisierten Verbindungen BAY 12-7715 und E 4021 bestimmt worden sind (X,Y). SAIGHI ET AL. (2000) registrierten nach kumulativer Gabe von Zaprinast (10 nM -100 μ M) lediglich eine marginale Reversion des Tonus isolierter proximaler Segmente des Ureters, beobachteten allerdings eine Potenzierung der relaxierenden Wirkung des NO-Donor NNP in Gegenwart des PDE5-Inhibitors (65). GRATZKE ET AL. (2006) bestimmten für das Tadalafil einen R_{max} von lediglich $6.0 \pm 4\%$, für das Sildenafil ergab sich ein Wert von $20 \pm 4\%$, für Vardenafil betrug dieser $23 \pm 12\%$.

Keine der Substanzen führte zu einer 50%igen Reversion des initialen Tonus der zirkulären Uretersegmente (66). Eine Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse könnte die durch die individuellen physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen PDE5-Inhibitoren determinierte Fähigkeit zur Penetration von Membrangrenzflächen und die Distribution der Wirksubstanzen in distinkten intrazellulären Kompartimenten des Zielgewebes sein. Diese Kompartimentierung der Inhibitoren - und möglicherweise auch ihres Zielenzym, der PDE5 - könnte durchaus Konsequenzen für die *In vitro* - Effektivität haben. Darüber hinaus ist bei der Interpretation von Organbad-Experimenten zu berücksichtigen, daß der Umsatz zyklischer Nukleotide in isolierten Segmenten glattmuskulärer Organe gering ist, und daher durchaus superphysiologische Konzentrationen eines PDE-Inhibitors notwendig sein können, um eine Gewebereaktion zu erreichen. *In vivo* kann der pharmakologische Effekt eines PDE-Inhibitors auf ein Organsystem, das durch eine höhere Nettoproduktion zyklischer Nukleotide charakterisiert ist - z.B. die vaskuläre glatte Muskulatur oder das *Corpus cavernosum penis* - deshalb wesentlich ausgeprägter sein (67,68). Da STIEF & TAHER ET AL. (1992) (64) in ihrer Studie keine hydrolytische Aktivität der PDE3 (cAMP-PDE, cGMP-sensibel) identifizieren konnten, erscheint die in den Organbad-Experimenten beobachtete effektive Reversion der tonischen Kontraktion der Uretermuskulatur durch den PDE3-Inhibitor Quazinon (Ro 13-6438, $EC_{50} = 25 \mu\text{M}$) zunächst nur schwer nachvollziehbar. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß lediglich ein zytosolischer Überstand, nicht jedoch ein Lysat der mikrosomalen Fraktion Gegenstand der biochemischen Analysen von TAHER ET AL. war. Die Gegenwart der PDE3 im mikrosomalen Anteil des von ihnen einer Ultrazentrifugation unterzogenen Rohhomogenats kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die effektive Reversion der durch KCl induzierten Tension der Gewebeselemente in Gegenwart der PDE5-Inhibitoren BAY 12-7715 und E 4021 sowie des Nitrovasodilators NNP ($EC_{50} = 4 \mu\text{M}$) ist ein Hinweis darauf, daß die von NO und cGMP abhängige Signaltransduktion an der Antagonisierung der kontraktiven Aktivität des Ureters beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von STIEF ET AL. (1996) bestätigt, die zeigten, daß die dosis-abhängige Relaxation der tonischen Kontraktion zirkulärer Segmente der glatten Muskulatur des humanen Ureters durch den NO-Donor SIN-1 (Linsidomin) in Gegenwart von Methylenblau, einem Inhibitor der zytosolischen (löslichen) Guanylatzyklase, und Rp-8-pCPT-cGMPS, einem Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (cGK), blockiert wurde. Darüber hinaus zeigten STIEF ET AL. mit immunhistochemischen Methoden einzelne NOS-enthaltende Nervenendigungen und Axon-ähnliche Strukturen in der *Muscularis* des Ureters (69).

Neben dem Ureter ist die Harnblase ein glattmuskuläres Hohlorgan, das ebenfalls wesentlich für die Gewährleistung der normalen Entleerungs- und Speicherfunktion des Systems der ableitenden Harnwege ist. Experimente an isolierter glatter Muskulatur des Detrusors zeigten, daß auch dieses Organ unter der Kontrolle zyklischer Nukleosidmonophosphate und assoziierter zellulärer Funktionsproteine steht. TRUSS ET AL. (1996) detektierten nach chromatographischer Aufreinigung eines zytosolischen Überstandes, der aus der Ultrazentrifugation eines Homogenates humaner Detrusormuskulatur resultierte, die Aktivitäten der PDE-Isoenzyme PDE1, PDE2, PDE3, PDE4 und PDE5. In Organbad-Experimenten an Streifenpräparaten, die sie aus den Bereichen des Blasendachs und der lateralen Wände des Detrusors entnommen hatten, registrierten sie eine Reversion der durch den Muscarin-Agonisten Carbachol (1 μ M) induzierten Tension der glatten Muskulatur nach Zugabe des unspezifischen PDE-Inhibitors Papaverin ($R_{\max} = 56 \pm 9\%$) und des selektiven PDE1 - Inhibitors Vinpocetin ($R_{\max} = 47 \pm 6\%$). Die Inhibition der muscarinergen Tension durch die Testsubstanzen in einer Konzentration von 10 μ M und 100 μ M korrelierte mit einem dosis-abhängigen Anstieg des Gewebegehalts der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP über die Messwerte der Kontrollen, d.h. solchen Streifenpräparaten, die keiner aktiven Substanz, sondern lediglich einem Volumenaliquot isotonischer NaCl-Lösung exponiert worden waren. Trotz der Identifizierung hydrolytischer Aktivität der PDE-Isoenzyme 3, 4 und 5 in der Muskulatur des humanen Detrusors hatten physiologische und supraphysiologische Konzentrationen des PDE3-Inhibitors Milrinon, PDE4-Inhibitors Rolipram und der PDE5-Inhibitoren Zaprinast und Dipyridamol nur geringe relaxierende Wirkungen auf die muscarinerg induzierten Kontraktionen der isolierten Streifenpräparate (70,71).

Die Ergebnisse der Organbad-Experimente zeigen, daß pharmakologisch aktive Substanzen, welche die Produktion von NO und cGMP stimulieren (NNP) oder die hydrolytische Degradierung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP inhibieren (Quazinon, Rolipram, BAY 12-7715, E 4021), zu einer Reversion der durch KCl induzierten Tension isolierter ringförmiger Gewebepreparate des Ureters führen. Das läßt vermuten, daß beide Signalübertragungswege an der Kontrolle des Tonuszustands beteiligt sind. Die Resultate lassen jedoch keine Aussage darüber zu, welches PDE-Isoenzym - PDE3, PDE4 oder PDE5 - die Kontrolle der glatten Muskulatur des Ureters dominiert.

5.2 Quantifizierung zyklischer Nukleotide

In den unter 4.2 beschriebenen Experimenten kam es sowohl in Gegenwart des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin als auch des Nitrovasodilators NNP zu einem vielfachen, linearen Anstieg der zellulären Konzentrationen von cAMP bzw. cGMP. Während die Stimulation der Produktion des zyklischen Nukleotids cGMP durch den NO-Donor NNP mit einer deutlichen Reversion der tonischen Kontraktion der glatten Muskulatur des Ureters korrespondierte, stand der vielfachen Erhöhung der Basiskonzentration von cAMP durch Forskolin lediglich eine geringe Relaxation des durch 80 mM KCl induzierten Tonus gegenüber, für das Forskolin wurde ein mittlerer R_{\max} -Wert von 39% bestimmt. Diese Diskrepanz kann mit einer Kompartimentierung zyklischer Nukleotide innerhalb der glatten Muskelzellen des Ureters erklärt werden. Eine relevante Erhöhung des intrazellulären Gehalts von cAMP in einem vom Zytosol isolierten Kompartiment hätte dann nur eine mäßige Änderung der Konzentration freien Ca^{2+} und somit des Tonus der glatten Muskulatur zur Folge (72). Während der PDE3-Inhibitor Trequinsin (HL 725) und der PDE4-Inhibitor Rolipram erwartungsgemäß die zelluläre Akkumulation von cAMP stimulierten, kam es in Gegenwart des PDE3-Inhibitors Quazinon (Ro 13-6438) nicht zu einer relevanten Erhöhung von cAMP. Auch die Exposition der Uretermuskulatur gegen die PDE5-Inhibitoren BAY 12-7714, BAY 12-7715 und E 4021 resultierte lediglich in einem marginalen Anstieg der Konzentration von cGMP, stattdessen ergab sich eine deutliche konzentrationsabhängige Elevation des zellulären cAMP, die das 7-fache bis 62-fache der mittleren Basiskonzentration des zyklischen Nukleotids betrug.

Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch GRATZKE ET AL. (2006) in ihrer bereits unter 5.1 zitierten *In vitro* - Studie. Einer durch eine Einzeldosis (10 μ M) des PDE5-Inhibitors Vardenafil induzierten Erhöhung von cGMP um einen Faktor 3.3 über die mittlere Basiskonzentration (hier: 1.7 ± 1.2 pmol cGMP/mg Protein) stand keine relevante Akkumulation des zyklischen Nukleotids nach Exposition des Gewebes gegen Sildenafil und Tadalafil gegenüber. Allerdings wurde nach der Inkubation mit Tadalafil eine Verdoppelung der Gewebekonzentration von cAMP registriert (66).

Wahrscheinlich kann auch die unter 4.2 gezeigte marginale Akkumulation von cAMP in Gegenwart von Quazinon mit dem Phänomen einer intrazellulären Kompartimentierung zyklischer Nukleotide erklärt werden: Hier könnten bereits geringe Änderungen der Konzentration von cAMP zu einer Ca^{2+} -Desensibilisierung durch Stimulation des Enzyms *Myosin Light Chain* - Phosphatase (MLCP) oder einer durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (cGK) vermittelten Depletion intrazellulären Ca^{2+} und einer dadurch verursachten Antagonisierung der Kontraktion führen (73).

Die Akkumulation von cAMP nach der Exposition gegen die PDE5-Inhibitoren BAY 12-7714, BAY 12-7715 und E 4021 führt zu der Frage möglicher Wechselwirkungen zwischen der cGMP- und cAMP-abhängigen Signaltransduktion in den Myozyten des Ureters. Diese Interaktion könnte durch die wechselseitige Beeinflussung der Synthese, Degradierung oder Aktivität von Funktionsproteinen vermittelt werden, etwa eine sogenannte *Cross-Aktivierung* der Proteinkinasen eines Transduktionsweges durch das funktionell dominierende zyklische Nukleotid der anderen Übertragungskaskade (74,75). Derartige, auch als *Cross Talk* bezeichnete, Wechselwirkungen konnten bereits in der Urethra und der Trabekularmuskulatur des *Corpus cavernosum penis* gezeigt werden. PERSSON ET AL. (2000) untersuchten die Wirkung von Forskolin auf die durch das Peptid Arginin-Vasopressin (AVP) induzierte Kontraktion isolierter Streifenpräparate der Urethra, die cGK-defizienten *Knock out* - Mäusen oder Wildtyp-Tieren entnommen worden waren. Während Forskolin eine Reversion der tonischen Kontraktion der Gewebestreifen des Wildtyps um bis zu 73% verursachte, zeigte sich, daß der Effekt des Diterpens auf das Gewebe der *Knock out* - Tiere blockiert wurde, der physiologische Effekt von Forskolin auf die Urethra also in erster Linie von einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch cAMP vermittelt wird (76).

Auch an der Kontrolle der normalen Funktion der nicht-vaskulären glatten Muskulatur des *Corpus cavernosum penis* sind wahrscheinlich Mechanismen der Kreuzaktivierung beteiligt. ÜCKERT ET AL. (2005) zeigten, daß die durch den Nitrovasodilator NNP verursachte Reversion der Norepinephrin-induzierten Tension isolierter Trabekularmuskulatur durch Rp-8-pCPT-cAMPS, einen Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK), blockiert wurde, ebenso zeigte sich die relaxierende Wirkung von Forskolin auf das Gewebe sensibel gegen eine Inhibition der cGK (77). In Experimenten, die ebenfalls peniles erektilen Gewebe verwendeten, zeigten STIEF ET AL. (2000) eine Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentrationen nach Inkubation der cavernösen glatten Muskulatur mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafilcitrat. Sie erklären diesen Effekt mit einer Inhibition der hydrolytischen Aktivität der cAMP-degradierenden PDE3, einem neben der cGMP-spezifischen PDE5 ebenfalls im *Corpus cavernosum penis* identifizierten PDE-Isoenzym, infolge der Bindung von cGMP an eine außerhalb des katalytischen Zentrums lokalisierte Bindungsstelle des Enzymproteins (78). Diese Schlußfolgerung wird durch eine Arbeit von KIM ET AL. (2000) unterstützt, die über eine Akkumulation von cGMP in kultivierten cavernösen Myozyten als Reaktion auf die Zugabe von Forskolin oder Prostaglandin E₁ (PGE₁) zum Kulturmedium berichten. Offensichtlich sind beide Signalübertragungswege synergistisch an der Kontrolle des Tonuszustands der cavernösen glatten Muskelzellen beteiligt (79).

Die Ergebnisse der Quantifizierung zyklischer Nukleotide zeigt, daß eine Erhöhung der zellulären Konzentration von cGMP und cAMP durch vasoaktive Substanzen gleiche Effekte auf die tonische Kontraktion der glatten Muskulatur des humanen Ureters hat. Die Akkumulation von cAMP in Gegenwart der PDE5 - Inhibitoren E 4021 und BAY 12-7715 ist ein Hinweis darauf, daß die von cGMP oder cAMP vermittelten Mechanismen der Signaltransduktion in der Uretermuskulatur nicht unabhängig voneinander sind und wahrscheinlich durch einen *Cross Talk* synergistisch agieren.

5.3 Selektive PDE-Inhibitoren:

Eine neue Option in der Pharmakotherapie der Urolithiasis?

Die pharmakologische Bedeutung der PDE-Isoenzyme hat zur Entwicklung zahlreicher Inhibitorsubstanzen geführt, deren therapeutisches Potential in der selektiven Beeinflussung von Organ- und Gewebefunktionen gesehen wird. Der wichtigste Anwendungsbereich für PDE-Inhibitoren ist heute neben der Inneren Medizin die Urologie: Die Präsentation der ersten klinischen Daten zur Wirksamkeit und Verträglichkeit des PDE5-Inhibitors Sildenafilcitrat (VIAGRA®) in der oralen Pharmakotherapie der Erektile Dysfunktion (ED) anlässlich der Jahrestagung der *American Urological Association* (AUA) im Jahre 1996 und der kommerzielle Erfolg der Substanz mit der zwei Jahre später erfolgten Einführung in den internationalen Markt hat dem Konzept der PDE-Inhibition in der Urologie allgemeine Anerkennung verschafft (80). Weitere Anwendungen für PDE5-Inhibitoren in der Sexualmedizin sieht man in den Indikationen *Ejaculatio praecox*, die neben der ED die häufigste sexuelle Funktionsstörung des erwachsenen Mannes ist, und Störungen der weiblichen Sexualität (*Female Sexual Dysfunction*, FSD) einschließlich der *Female Sexual Arousal Disorder* (FSAD) (81-84). Die Daten klinischer Arbeiten weisen darauf hin, daß das Prinzip der Inhibition funktionell relevanter PDE-Isoenzyme auch auf die Behandlung von Erkrankungen der ableitenden Harnwege - zu nennen sind hier Störungen der Speicher- und Entleerungsfunktion der Harnblase oder Beeinträchtigungen der Miktion infolge des sogenannten Benignen Prostata-Syndroms (BPS) - anwendbar ist.

TRUSS ET AL. (2000) untersuchten auf der Grundlage der Resultate eigener experimenteller Arbeiten an isolierter humaner Detrusormuskulatur in einer multizentrischen, randomisierten, doppel-blinden und Plazebo-kontrollierten Studie die Wirksamkeit und Verträglichkeit des PDE1-Inhibitors Vinpocetin (Cavinton®) in der Behandlung der Drangsymptomatik (mit oder ohne urodynamisch belegten Detrusorinstabilitäten), Dranginkontinenz und Pollakisurie.

Nach der Gabe von dreimal täglich 10 mg Cavinton® über einen Zeitraum von 4 Wochen registrierten sie klinische Effekte des Präparats auf die Symptomatik, die denen des Anticholinergikums Oxybutynin (Dridase®) entsprachen, ohne daß die Patienten über die für antimuskarinerge Substanzen typischen Nebenwirkungen berichteten, die häufig zu einem Abbruch der Therapie führen (63,85).

Auch auf die mit dem Benignen Prostata-Syndrom (BPS) assoziierte Miktions-symptomatik, die sogenannte *Lower Urinary Tract Symptomatology* (LUTS), sind positive Effekte von PDE-Inhibitoren belegt. SAIRAM ET AL. (2002) untersuchten die Effekte des PDE5-Inhibitors Sildenafil auf die Parameter des *International Prostate Symptom Score* (IPSS) in einer Gruppe von 112 Patienten mit ED und LUTS und zeigten eine Linderung der irritativen Symptomatik unter der Therapie mit Sildenafil. Diese Beobachtungen wurden später von MULHALL ET AL. (2006), die ein ähnliches Studiendesign verwendeten, bestätigt. Sie stellten in ihrem Kollektiv von 48 Patienten nach einer Therapie mit Sildenafil (zweimal wöchentlich 50 mg - 100 mg) über einen Zeitraum von 3 Monaten eine Änderung des IPSS-Scores um bis zu 4.6 Punkte fest. Ebenso wie die Gabe von Sildenafil führte auch die Applikation des PDE5-Inhibitors Tadalafil (CIALIS®) im Rahmen einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten Studie zu einer deutlichen Linderung der irritativen Symptomatik bei Patienten mit ED und symptomatischer BPH (26,27,28). Es wird vermutet, daß die klinischen Effekte der PDE5-Inhibitoren auf eine Antagonisierung des Tonus der glatten Muskulatur des Blasen-halses sowie der Transitionalzone und des periurethralen Bereich der Prostata zurückzuführen sind. Darüber hinaus wird vermutet, daß die ED und das BPS durch eine gemeinsame Pathophysiologie verbunden sind, und daher eine Gruppe von Wirkstoffen - in diesem Fall Inhibitoren der PDE5 wie das Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil - zur Therapie beider Erkrankungen verwendet werden kann.

Die aus den Ergebnissen der vorliegenden Doktorarbeit abgeleitete Hypothese einer Verwendung selektiver PDE-Inhibitoren in der akuten Therapie des Kolikereignisses und der Förderung der Steinpassage wird durch eine Reihe von klinischen und tierexperimentellen Arbeiten unterstützt: Bereits NAGUIB untersuchte 1951, etwa 2 Dekaden vor dem ersten in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlichten Nachweis von PDE-Aktivität, in einem Homogenat eines Organs des humanen Urogenitaltrakts, die klinische Wirkung des unspezifischen PDE-Inhibitors Aminophyllin, einem Derivat des Theophyllin, auf den Verlauf des Kolikereignisses (86,87).

Dieses Konzept wurde 30 Jahre später von KATEVUO ET AL. (1981) erneut aufgegriffen, indem sie sechs Patienten, welche infolge eines Harnleitersteins unter Kolikschmerzen litten, 3 mg/kg KG i.v. Aminophyllin verabreichten und eine rasche Linderung der subjektiven Schmerzsymptomatik beobachteten, die jedoch nur 30 min. bis 120 min. nach der Bolusinjektion andauerte. Sie zeigten, daß für eine anhaltende analgetische Wirkung der Substanz ein Serumspiegel von $< 12 \mu\text{g/ml}$ aufrechtzuerhalten ist, und schlugen daher statt einer einmaligen Injektion eine intravenöse Infusion des Aminophyllin vor (88). BECKER ET AL. beschrieben am Modell des Kaninchens die Effekte der unspezifischen PDE-Inhibitoren Theophyllin (5.000 $\mu\text{g/kgKG}$) und Papaverin (300 $\mu\text{g/kgKG}$), sowie des selektiven PDE4-Inhibitors Rolipram (20 $\mu\text{g/kg}$), einem Racemat des 4-(3'-Cyclopentyloxy-4'-methoxyphenyl)-2-pyrrolidon, und des Spasmolytikums Scopolaminbutylbromid (Buscopan[®], 667 $\mu\text{g/kg}$) auf die Amplitude und Frequenz der Ureterperistaltik. In ihren Experimenten führten außer Buscopan[®] alle Testsubstanzen in der verwendeten Dosierung zu einer Dämpfung der Frequenz der Ureterkontraktilität, die jedoch im Falle der unspezifischen PDE-Inhibitoren mit dramatischen, z.T. lebensbedrohlichen Effekten auf die Kreislaufparameter der Versuchstiere verbunden war. Folglich postulieren BECKER ET AL. die intravenöse oder orale Gabe des Rolipram als selektives Spasmolytikum in der Pharmakotherapie steinbedingter Koliken (89). Während die emetische Wirkung des Rolipram, das neben dilatatorischen und antiphlogistischen Effekten auch antidepressive und positiv psychotrope Wirkungen vermittelt, und anderer PDE4-Inhibitoren noch in den 1990er Jahren eine breite klinische Anwendung dieser Substanzgruppe verhindert hat, sind inzwischen Verbindungen synthetisiert worden, deren chemische Struktur ein besseres Verhältnis von pharmakologischer Wirkung zu unerwünschten Nebenwirkungen gewährleistet. Dazu zählt das Roflumilast, dessen broncho-dilatatorische und entzündungshemmende Eigenschaften in der Therapie von Asthma und *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) in Studien der Phase II und III demonstriert werden konnten (90,91,92).

Es sind drei Eigenschaften der PDE4- und PDE5-Inhibitoren, die eine Anwendung dieser Wirksubstanzen in der Therapie der Urolithiasis und des Kolikleidens attraktiv erscheinen läßt: (1) Die Antagonisierung der kontraktilen Aktivität des Ureters am Ort des das Lumen verlegenden Konkrements sollte in Verbindung mit den antiphlogistischen Eigenschaften die Kolik-bedingten Schmerzen lindern oder beseitigen und außerdem die distale Passage des Steins fördern, (2) selektive Inhibitoren der PDE-Isoenzyme 4 und 5 verursachen in therapeutischer Dosierung lediglich minimale systemische Nebenwirkungen und ermöglichen dadurch (3) eine Fokussierung der pharmakologischen Wirkung auf das Zielorgan.

6. Zusammenfassung

6.1 Rationale

Die Phosphodiesterase (PDE)-Isoenzyme sind als Schlüsselenzyme der cAMP- und cGMP-abhängigen Signaltransduktion an der Kontrolle zahlreicher Gewebe und Organe beteiligt. Die Inhibition ihrer hydrolytischen Aktivität durch entsprechende Wirksubstanzen, den PDE-Inhibitoren, hat sich in der Medizin als attraktives Konzept der selektiven pharmakologischen Beeinflussung zur Normalisierung beeinträchtigter Organfunktionen durchgesetzt. In der Urologie markieren die selektiven PDE5-Inhibitoren Sildenafil (VIAGRA[®]), Vardenafil (LEVITRA[®]) und Tadalafil (CIALIS[®]) den Goldstandard in der oralen Pharmakotherapie der Erektile Dysfunktion (ED). Die Resultate klinischer Studien lassen vermuten, daß das Konzept der PDE-Inhibition auch auf andere urologische Erkrankungen wie Störungen der Speicher- und Entleerungsfunktion der Harnblase, das Benigne Prostata-Syndrom (BPS), die *Ejaculatio praecox* und Beeinträchtigungen der weiblichen Sexualfunktion (*Female Sexual Dysfunction*, FSD) anwendbar ist. Die Urolithiasis und das mit ihr assoziierte Kolikleiden hat in den Industrienationen den Charakter einer Volkskrankheit. Eine allgemein akzeptierte, effektive Pharmakotherapie im Falle eines Kolikereignisses, welche die Schmerzsymptomatik lindert und die distale Passage des Konkrements fördert, ist bisher nicht verfügbar. Eine Modulation der Aktivität intrazellulärer Schlüsselenzyme, z.B. regulatorisch relevanter PDE-Isoenzyme, könnte hier eine interessante neue Strategie der Behandlung repräsentieren.

6.2. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Evaluierung funktioneller Effekte selektiver PDE-Inhibitoren auf die tonische Kontraktion der glatten Muskulatur des humanen Ureters und die Akkumulation der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in dem isolierten Gewebe unter dem Einfluß der Testsubstanzen.

6.3. Material & Methoden

Mit der Organbad-Technik wurden die Effekte des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin, des Stickoxid (NO)-Donors Natriumnitroprussid (NNP) und der PDE-Inhibitoren Quazinon (Ro 13-6438), Trequinsin (HL 725) (PDE3-Inhibitoren), Rolipram (ZK 62711, PDE4-Inhibitor), Zaprinast (M&B 22984), BAY 12-7714, E 4021 (BAY 15-5619) und BAY 12-7715 (PDE5-Inhibitoren) auf die tonische, durch 80 mM KCl induzierte Kontraktion zirkulärer Segmente des humanen Ureters untersucht. Die Charakterisierung der Wirkung der Testsubstanzen auf die zellulären Konzentrationen von cAMP und cGMP in der glatten Muskulatur des Ureters erfolgte mit radioimmunchemischen Methoden (RIA).

6.4. Ergebnisse

Die tonische Kontraktion der Uretermuskulatur wurde durch den PDE4-Inhibitor Rolipram ($R_{max} = 100 \pm 0\%$), den PDE3-Inhibitor Quazinon ($R_{max} = 87 \pm 4\%$), die PDE5-Inhibitoren Zaprinast ($R_{max} = 76 \pm 7\%$) und BAY 12-7715 ($R_{max} = 67 \pm 10.6\%$) und den Nitrovasodilator NNP ($R_{max} = 62 \pm 5\%$) am effektivsten antagonisiert. Diese Reversion des Tonus korrespondierte mit einer Erhöhung der Gewebekonzentration von cAMP oder cGMP um einen Faktor 2 bis 90 über die jeweilige mittlere Basiskonzentration der zyklischen Nukleotide.

6.5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen geben eine Rationale für die klinische Verwendung selektiver Inhibitoren der PDE4 (cAMP-spezifische PDE) und PDE5 (cGMP-spezifische PDE) in der Pharmakotherapie der Urolithiasis und des durch Harnleitersteine verursachten Kolikleidens.

Literatur

1. Waldeyer A., Mayet A. Die Organe des Retroperitonealraums. In: Anatomie des Menschen. Teil I, 13. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin 1976, pp 248 - 260
2. Davis J.E., Hagedorn J.P., Bergman L.L. Anatomy and Ultrastructure of the Ureter. In: Bergmann H. (Ed.) The Ureter. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1981, pp 55 - 70
3. Hertle L., Nawrath H. (1986) Wirkungen von Pharmaka am oberen Harntrakt des Menschen. Urologe [A] 25: 252 - 258
4. Geneser F.: Das Harnsystem. In: Geneser F. (Hrsg.): Histologie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1990, pp 425 - 529
5. Laberke G., Baur R. (1986) Der normale proximale Ureter des Menschen. Urologe [A] 25: 238 - 240
6. Junqueira L.C., Carneiro J. Harnorgane. In: Histologie. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1989, pp 549 - 578
7. Thews G., Mutschler E., Vaupel P. Ableitende Harnwege. In: Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1991, pp 341 - 342
8. Stevens A., Lowe J. Der Harnapparat. In: Histologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992, pp 271 - 303
9. Velardo J.T. Histology of the Ureter. In: Bergman H. (Ed.) The Ureter. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1981, pp 13 - 54
10. King L.R., Stephens F.D. Foreword. In: Bergman H. (Ed.) The Ureter. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1981
11. Kuhlmann U., Truninger B. Pathologische Urinbefunde und Zeichen abnormaler Nierenfunktion. In: Siegenthaler W. (Hrsg.) Differentialdiagnose Innerer Krankheiten. 16. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1988, Kapitel 25 - 25.63
12. van Mastrigt R., van de Wetering J., Glerum J.J. (1986) Influence of temperature and stimulus interval variations on the propagation of contractions in the pig ureter. Urol. Int. 41: 266 - 269
13. Golenhofen K. Physiologie der Uretermuskulatur. In: Lutzeyer W., Melchior H. (Hrsg.) Ureterdynamik (Urodynamisches Symposium, Aachen, 04.12. und 05.12.1969). Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971, pp 46 - 59

-
14. Shepherd G.M. Neurobiology, 2nd Edition, Chapter 8: Neurotransmitters and neuro-modulators. Oxford University Press, Oxford, New York 1988, pp 117 - 141
 15. Boyarsky S., Labay P. Principles of Ureteral Physiology. In: Bergman H. (Ed.) The Ureter. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1981, pp 71 - 104
 16. Mostwin J.L. (1986) The action potential of guinea pig bladder smooth muscle. J. Urol. 135: 1299 - 1303
 17. Itoh T. (1991) Pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle cells: an overview. Japan. J. Pharmacol. 55: 1 - 9
 18. Golenhofen K. Untersuchungen am isolierten glatten Muskel. In: Wienbeck M., Lux G. (Hrsg.) Gastrointestinale Motilität - Klinische Untersuchungsmethoden. Verlag Edition Medizin, Weinheim, Deerfield Beach, Basel 1983, pp 139 - 149
 19. Thippeswamy T., McKay J.S., Quinn J.P., Morris R. (2006) Nitric oxide, a biological double-faced janus - is this good or bad? Histol. Histopathol. 21: 445-458
 20. Ehren I., Adolfsson J., Wilklund N.P. (1994) Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. Urol. Res. 22: 287 - 290
 21. Mamas M.A., Reynard J.M., Brading A.F. (2003) Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. UROLOGY 61: 1079 - 1085
 22. Mumtaz F.H., Khan M.A., Thompson C.S., Morgan R.J., Mikhailidis D.P. (2000) Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. BJU Int. 85: 567 - 578
 23. Persson K., Andersson K.E. (1992) Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. Br. J. Pharmacol. 106: 416 - 422
 24. Takeda M., Tang R., Shapiro E., Burnett A.L., Lepor H. (1995) Effects of nitric oxide on human and canine prostates. UROLOGY 45: 440 - 446
 25. Klotz T., Mathers M.J., Bloch W., Nayal W., Engelmann U. (1999) Nitric oxide based influence of nitrates on micturition in patients with benign prostatic hyperplasia. Int. Urol. Nephrol. 31: 335 - 341
 26. Sairam K., Kulinskaya E., McNicholas T.A., Boustead G.B., Hanbury D.C. (2002) Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. BJU Int. 90: 836 - 839
 27. Mulhall J.P., Guhring P., Parker M., Hopps C.J. (2006) Assessment of the impact of sildenafil citrate on lower urinary tract symptoms in men with erectile dysfunction. J. Sex. Med. 3: 662 - 667

-
28. Gonzalez R.R., Kaplan S.A. (2006) Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms in men with benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2: 609 - 617
 29. Ückert S., Stanarius A., Stief C.G., Wolf G., Jonas U., Machtens S. (2003) Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human seminal vesicle: a light and electron microscopical study. *Urol. Res.* 31: 262 - 266
 30. Heuer O., Ückert S., Machtens S.A., Stief C.G., Tsikas D., Frölich J.C., Jonas U. (2002) Effects of various nitric oxide donating agents on the contractility and cyclic nucleotide turnover of human seminal vesicles in vitro. *UROLOGY* 59: 958 - 962
 31. Machtens S., Ückert S., Stief C.G., Tsikas D., Frölich J.C., Jonas U. (2003) Effects of various nitric oxide-donating drugs on adrenergic tension of human seminal vesicles in vitro. *UROLOGY* 61: 479 - 483
 32. Conti M., Jin S.L. (1999) The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63: 1 - 38
 33. Essayan D.M. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 108: 671 - 680
 34. Beavo J.A., Houslay M.D. (Eds.) *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action.* John Willey & Sons, West Sussex 1990
 35. Soderling S.H., Beavo J.A. (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12: 174 - 179
 36. Soderling S.H., Bayuga S.J., Beavo J.A. (1998) Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA* 95: 8991-8996
 37. Gupta R., Kumar G., Kumar R.S. (2005) An update on cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: phosphodiesterase and drug selectivity. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27: 101 - 118
 38. Beavo J.A., Reifsnyder D.H. (1990): Primary sequences suggest selective inhibition of individual cyclic nucleotide phosphodiesterase is possible. *TIPS* 11: 150 - 15568
 39. Beavo J.A. (1998) Multiple isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. Sec. Mess. Phos. Res.* 22: 1 - 38
 40. Silver P.J., Hamel L.T., Perrone M.H., Bentley R.G., Bushover C.R., Evans D.B. (1988) Differential pharmacologic sensitivity of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes isolated from cardiac muscle, arterial and airway smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 150: 85 - 94
 41. Simpson A.W., Reeves M.L., Rink T.J. (1988) Effects of SK&F 94120, an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type III, on human platelets. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2315 - 2320

-
42. Hurwitz R.L., Burt-Milam A.H., Chang M.L., Beavo J.A. (1985) Cyclic GMP phosphodiesterase in rod and cone outer segments of the retina. *J. Biol. Chem.* 260: 568 - 573
 43. Hall I.P., Hill S.J. (1992) Effect of isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors on bovine tracheal smooth muscle tone. *Biochem. Pharmacol.* 43: 15 - 17
 44. Harris A.L., Connell M.J., Ferguson E.W., Wallace A.M., Gordon R.J., Pagani E.D., Silver P.J. (1989) Role of low K_M cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in tracheal relaxation and bronchodilation in the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 199 - 206
 45. Lipworth B.J. (2005) Phosphodiesterase 4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 365: 167 - 175
 46. Burns J.R., Finlayson B. (1984) Management of the stone former. *Semin. Urol.* 2: 34 - 44
 47. Hartmann M. Urologische Notfallsituationen. In: Altwein J.E., Rübgen H. (Hrsg.) *Urologie*. 3. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1991, pp 395 - 424
 48. Ibrahim A.I., Shetty S.D., Awad R.M., Patel K.P. (1991) Prognostic factors in the conservative treatment of ureteric stones. *Br. J. Urol.* 67: 358 - 361
 49. Alken P. Urologische Leitsymptome. In: Alken P., Walz P.H. (Hrsg.) *Urologie*. VCH Verlag, Weinheim 1992, pp 51 - 60
 50. Montague D.K., Sraffon R.A. Ureteral Calculi. In: Bergmann H. (Ed.) *The Ureter*. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981, pp 247 - 269
 51. Lehtonen T., Kellokumpu I., Permi J., Sarsila O. (1983) Intravenous indomethacin in the treatment of ureteric colic. A clinical multicentre study with pethidine and metamizol as the control preparations. *Ann. Clin. Res.* 15: 197 - 199
 52. Rinnab L., Gottfried H.W., Hautmann R.E., Straub M. (2005) Rationale Diagnostik und Therapie der Nierenkolik im Jahr 2005 - Was gibt es Neues? *Zentralbl. Chir.* 130: 505 - 513
 53. Hannappel J., Rohrmann D., Lutzeyer W. (1986) Pharmakologische Beeinflussung der Harnleiteraktivität. *Urologe [A]* 25: 246 - 251
 54. Tomiak R.H., Barlow R.B., Smith P.J. (1985) Are there valid reasons for using antimuscarinic drugs in the management of renal colics? *Br. J. Urol.* 57: 498 - 499
 55. Stief C.G., Ückert S., Becker A.J., Meyer M., Truss M.C., Jonas U. (1995) Selective ureteral relaxation by potassium channel openers in vitro and in vivo. *J. Urol.* 153 (4) (Suppl.): 345A (Abstract)

-
56. Iversen H.H., Ehren I., Gustafsson L.E., Adolfsson J., Wiklund N.P. (1995) Modulation of smooth muscle activity by nitric oxide in the human upper urinary tract. *Urol. Res.* 23: 391 - 394
 57. Porpiglia F., Destefanis P., Fiori C., Fontana D. (2000) Effectiveness of nifedipine and deflazacort in the management of distal ureter stones. *UROLOGY*_56: 579 - 582
 58. Cervenakov I., Fillo J., Mardiak J., Kopecny M., Smirala J., Lepies P. (2002) Speedy elimination of ureterolithiasis in lower part of ureters with the alpha₁-blocker tamsulosin. *Int. Urol. Nephrol.* 34: 25 - 29
 59. Dellabella M., Milanese G., Muzzonigro G. (2003) Efficacy of tamsulosin in the medical management of juxtavesical ureteral stones. *J. Urol.*_170: 2200 - 2205
 60. Marsala F. (1982) [Therapy of acute spastic pain of the biliary and urinary tracts with rociverine] *Minerva Med.* 73: 2179 - 2182
 61. Gengo P., Su C.M., Yousif F.B., Triggle D.J. (1987) In vitro and in vivo characterization of 2,6-dimethyl-3,5-dicarbomethoxy-4-(2-isothiocyano)phenyl-1,4-dihydropyridine as a Ca²⁺ channel antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 2472 - 2482
 62. Carson C.C., Lue T.F. (2005) Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU Int.* 96: 257 - 280
 63. Truss M.C., Stief C.G., Ückert S., Becker A.J., Schultheiss D., Machtens S., Jonas U. (2000) Initial clinical experience with the selective phosphodiesterase (PDE) 1 isoenzyme inhibitor vinpocetine in the treatment of urge incontinence and low compliance bladder. *World J. Urol.* 18: 439 - 443
 64. Stief C.G., Taher A., Meyer M., Schulz-Knappe P., Becker A., Truss M.C., Ückert S., Forssmann W.G., Jonas U. (1995) Phosphodiesterase isoenzymes in human ureteral smooth muscle: identification, characterization, and functional effects of various phosphodiesterase inhibitors in vitro. *Urol. Int.* 55: 183 - 189
 65. Saighi D., Zerbib M., Thiounn N., Flam T., Conquy S., Jacob L., Dall'Ava-Santucci J., Debre B., Dinh-Xuan A.T. (2000) [In vitro study of the modulation of human ureteral tonus by nitric oxide and zaprinast, a phosphodiesterase inhibitor] *Prog. Urol.* 10: 1161- 1168
 66. Gratzke C., Ückert S., Kedia G., Reich O., Schlenker B., Seitz M., Becker A.J., Stief C.G. (2007) In vitro effects of PDE5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil on isolated human ureteral smooth muscle. *Urol. Res.* 35: 49 - 54
 67. Hayes J.S., Brunton L.L. (1982) Functional compartments of cyclic nucleotide action. *J Cyclic Nucleotide Res.* 8: 1 – 16
 68. Buxton I.L., Brunton L.L. (1983) Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 258: 10233 – 10239

-
69. Stief C.G., Ückert S., Truss M.C., Becker A.J., Machtens S., Jonas U. (1996) A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro. *Urol. Res.* 24: 333 - 337
 70. Truss M.C., Ückert S., Stief C.G., Kuczyk M.A., Jonas U. (1996) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human detrusor smooth muscle: I. Identification and characterization. *Urol. Res.* 24: 123 - 128
 71. Truss M.C., Ückert S., Stief C.G., Kuczyk M.A., Jonas U. (1996) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human detrusor smooth muscle: II. Effect of various PDE-inhibitors on smooth muscle tone and cyclic nucleotide levels in vitro. *Urol. Res.* 24: 129 - 134
 72. Katsuki S., Arnold W., Mittal C., Murad F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 23 - 35
 73. Maurice D.H., Haslam R.J. (1990) Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol. Pharmacol.* 37: 671 - 681
 74. Lincoln T.M., Cornwell T.L. (1993): Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7: 328 - 338
 75. Jiang H., Colbran J.L., Francis S.H., Corbin J.D. (1992): Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J. Biol. Chem.* 267: 1015 - 1019
 76. Persson K., Pandita R.K., Aszodi A., Ahmad M., Pfeifer A., Fässler R., Andersson K.E. (2000): Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 279: R1112 - R 1120
 77. Ückert S., Hedlund P., Waldkirch E., Sohn M., Jonas U., Andersson K.E., Stief C.G. (2004) Interactions between cGMP- and cAMP-pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. *World J. Urol.* 22: 261 - 266
 78. Stief C.G., Ückert S., Becker A.J., Harringer W., Truss M.C., Forssmann W.G., Jonas U. (2000) Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *UROLOGY* 55: 146 - 150
 79. Kim N.N., Huang Y.H., Moreland R.B., Kwak S.S., Goldstein I., Traish A. (2000) Cross-regulation of intracellular cGMP and cAMP in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 4: 10 - 14

-
80. Boolell M., Gepti-Attee S., Gingell C.J., Allen M. (1996) UK 92480, a new oral treatment for erectile dysfunction. A double-blind, placebo-controlled cross-over study demonstrating dose-response with Rigiscan and efficacy with outpatient diary. *J. Urol.* 155 (Suppl.): 495A (Abstract)
 81. Abdel-Hamid I.A. (2004) Phosphodiesterase 5 inhibitors in rapid ejaculation: potential use and possible mechanisms of action. *Drugs* 64: 13 - 26
 82. McMahon C.G., Stuckey B.G., Andersen M., Purvis K., Koppiker N., Haughie S., Boolell M. (2005) Efficacy of sildenafil citrate (Viagra) in men with premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 2: 368 - 375
 83. Caruso S., Intelisano G., Lupo L., Agnello C. (2001) Premenopausal women affected by sexual arousal disorder treated with sildenafil: a double-blind, cross-over, placebo-controlled study. *Br. J. Obstet. Gynaecol. (BJOG)* 108: 623 - 628
 84. Berman J.R., Berman L.A., Toler S.M., Gill J., Haughie S. and the Sildenafil Study Group (2003) Safety and efficacy of sildenafil citrate for the treatment of female sexual arousal disorder: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Urol.* 170: 2333 - 2338
 85. Truss M.C., Becker A.J., Ückert S., Schultheiss D., Machtens S., Jonas U., Stief C.G. (1999) Selective pharmacological manipulation of the smooth muscle tissue of the genitourinary tract: a glimpse into the future. *BJU Int.* 83 (Suppl. 2): 36 - 41
 86. Kuciel R., Ostrowski W. (1970) Phosphodiesterase from human prostate gland. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 52: 1051 - 1060
 87. Naguib M. (1951) Clinical observations on the action of aminophylline on renal colic. *J. Egypt. Med. Assoc.* 34: 690 - 702
 88. Katevuo K., Kanto J., Kleimola T. (1981) Aminophylline in ureterolithiasis: preliminary report *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 19: 512 - 513
 89. Becker A.J., Stief C.G., Meyer M., Truss M.C., Forssmann W.G., Jonas U. (1998) The effect of the specific phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on the ureteral peristalsis of the rabbit in vitro and in vivo. *J. Urol.* 160: 920 - 925
 90. Zeller E., Stief H.J., Pflug B., Sastre-y-Hernandez M. (1984) Results of a phase II - study of the antidepressant effect of rolipram. *Pharmacopsychiatry* 17: 188 - 190
 91. Zhu J., Mix E., Winblad B. (2001) The antidepressant and anti-inflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev.* 7: 387 - 398
 92. Rabe K.F., Bateman E.D., O'Donnell D., Witte S., Bredenbrocker D., Bethke T.D. (2005) Roflumilast - an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled trial. *Lancet* 366: 563 - 571

Originalpublikationen / Kongreßkontributionen

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in der im Folgenden genannten Fachzeitschrift (Journal) veröffentlicht und anlässlich der angegebenen Fachkongresse präsentiert:

Originalpublikationen

Kühn R., Ückert S., Stief C.G., Truss M.C., Lietz B., Bischoff E., Schramm M., Jonas U. (2000) Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide dependent pathways. Urol. Res. 28: 110 - 115

zitierfähige Abstracts

Kühn R., Ückert S., Stief C.G., Truss M.C., Jonas U., Forssmann W.G.: Pharmakologische Modulation des Uretertonus in vitro: Zusammenhang zwischen Relaxation und zyklischen Nukleotiden. 49. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) e.V., Wiesbaden, 24.09. - 27.09.1997, Urologe [A] 37 (Suppl.1): S21, 1997

Ückert S., **Kühn R.**, Stief C.G., Truss M.C., Lietz B., Neuhaus L., Borkowski M., Jonas U.: Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide dependent pathways. 13th Congress of the European Association of Urology (EAU), Barcelona, Spanien, 21.03. - 25.03.1998, Eur. Urol. 33 (Suppl. 1): 81, 1998

nicht-zitierfähige Abstracts

Ückert S., **Kühn R.**, Stief C.G., Truss M.C., Jonas U.: Beeinflussung der Ureterkontraktilität in vitro durch Modulation cNMP-abhängiger Signalübertragungswege. 44. Tagung der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie e.V., Köln, 23.04. - 25.04.1998

ORIGINAL PAPER

Rainer Kühn · Stefan Ückert · Christian G. Stief
Michael C. Truss · Burkhard Lietz · Erwin Bischoff
Matthias Schramm · Udo Jonas

Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways

Received: 27 April 1999 / Accepted: 13 October 1999

Abstract Phosphodiesterases (PDE) are key enzymes regulating intracellular cyclic nucleotide turnover and, thus, smooth muscle tension. Recent reports have indicated the presence of PDE isoenzymes 1, 2, 4, and 5 in cytosolic supernatants prepared from human ureteral smooth muscle homogenates and the ability of second-generation inhibitors of PDE 3, 4, and 5 to relax KCl-induced tension of human ureteral muscle in vitro. The aim of the present study was to evaluate the functional effects of recently developed, third-generation isoenzyme-selective PDE inhibitors, the nitric oxide (NO)-donating agents sodium nitroprusside (SNP) and dihydropyridine (DHP), which is also described as an antagonist of L-type calcium channels, and the adenylyl cyclase-stimulating drug forskolin on tissue tension and cyclic nucleotide levels of human ureteral smooth muscle segments in vitro. Relaxant responses of human ureteral smooth muscle were investigated in vitro using the organ bath technique. Cyclic nucleotides cAMP and cGMP were determined by specific radioimmunoassay following time and dose-dependent incubation of the ureteral tissue with the drugs. The most pronounced relaxing effects on KCl-induced tension of ureteral smooth muscle were exerted by nitrovasodilator SNP, PDE4 inhibitor rolipram, and PDE5 inhibitors E 4021 and morpholinomethyl-pyrazolopyrimidine (MSPP). Relaxing potency of the drugs was paralleled by their ability to elevate intracellular levels of cGMP and

cAMP, respectively. Our data suggest the possibility of using selective inhibitors of PDE isoenzymes 4 and 5 in the treatment of ureteral stones and ureteral colic.

Key words Human ureter · Phosphodiesterases · Phosphodiesterase inhibitors · Cyclic nucleotide monophosphates

Introduction

Cyclic nucleotide monophosphates (cNMP) cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP) are ubiquitous intracellular second messengers also involved in the relaxation of smooth muscle cells. The fundamental role of cNMP in the regulation of muscle tone is well established in various tissues such as vascular smooth muscle [10, 11], myocardium [16, 17], and airway smooth muscle [20, 21]. cNMP are synthesized from their corresponding nucleoside triphosphate by adenylyl cyclase (AC) and guanylyl cyclase (GC) and are degraded by phosphodiesterases (PDE), a heterogeneous group of hydrolytic enzymes, through cleavage of the 3'-ribose phosphate bond. Because of their central role in smooth muscle tone regulation and the considerable variation of PDE isoenzymes regarding their distribution and functional importance in certain tissues, PDE have become an attractive target for drug development. Currently, nine families of PDE isoenzymes can be distinguished: Ca²⁺/calmodulin-stimulated PDE (PDE1), cGMP-stimulated PDE (PDE2), cGMP-inhibited PDE (PDE3), cAMP-specific PDE (PDE4), cGMP-specific PDE (PDE5), and cGMP-binding, cGMP-specific PDE of mammalian rods and cones (PDE6) [1]. A type 7 PDE was isolated in a screen for human proteins that completed a deficiency in endogenous PDE in *Saccharomyces cerevisiae*. PDE7 was described to hydrolyze only cAMP with low K_m and to be insensitive to inhibition by PDE4 inhibitor rolipram [14]. PDE7 is abundant in skeletal muscle [14, 8] and has been found in human kidney, brain, and

R. Kühn · S. Ückert · C. G. Stief (✉) · M. C. Truss · U. Jonas
Hannover Medical School, Department of Urology,
Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany
e-mail: stief.christian@mh-hannover.de
Tel.: +49-511-5323437; Fax: +49-511-5328437

B. Lietz
St. Vincent Hospital, Department of Urology,
30559 Hannover, Germany

E. Bischoff · M. Schramm
Bayer AG, Pharmaceutical Division,
42113 Wuppertal, Germany

pancreas, too. More recently, the cloning, expression, and molecular characterization of two novel human phosphodiesterases, cAMP-specific PDE 8 and cGMP-specific PDE9, was reported [5, 6]. The identification of different PDE-families has been paralleled by the synthesis of selective inhibitors. Theoretically, partial pharmacological tissue selectivity of a drug may be achieved by selective inhibition of PDE isoenzymes [16]. The role of cyclic nucleotides and PDE enzymes was investigated in various tissues and the use of isoenzyme-selective inhibitors to modulate tissue function was proposed in patients with refractory congestive heart failure [3, 4], asthma [20], and urge incontinence [22, 23]. However, the importance of cyclic nucleotides and PDE in the regulation of smooth muscle tone of the upper urinary tract is less clear. Urinary stone disease is an indication where pharmacological relaxation of ureteral smooth muscle would present an attractive therapeutic alternative. In the case of an uncomplicated renal or ureteral concretion, the intravenous administration of analgesics is the most effective way to relieve pain [9]. With respect to the potential beneficial effect of ureteral relaxation on stone passage, some spasmolytic agents such as phentolamine and orciprenaline have been shown to dilate the ureteral lumen at the position of an artificial concretion to allow increased fluid flow beyond the concretion. Many drugs have been used in ureteral colic management, but a drug that can relieve pain and facilitate stone passage with minimal side effects is not yet available. Recently, we demonstrated the presence of PDE isoenzymes 1, 2, 4, and 5 in cytosolic supernatants prepared from human ureteral smooth muscle homogenates and the ability of inhibitors of PDE 4 and 5 to relax KCl-induced tension of ureteral segments *in vitro* [19]. To further elucidate the relevance of cNMP-mediated pathways in ureteral tone regulation, we investigated the functional effects of recently developed selective inhibitors of PDE isoenzyme 5 E 4021, morpholinosulfonyl-pyrazolopyrimidine (MSPP), and diethylaminosulfonyl-pyrazolopyrimidine (DASPP) on KCl-induced tension and on cNMP levels of human ureteral tissue. Effects were compared with those of AC-stimulating agent forskolin, NO-releasing substance Na^+ -nitroprusside (SNP), and dihydropyridine (DHP), which was originally described as being an antagonist of L-type calcium channels but recently has been found to release NO (Bayer, personal communication), and second-generation PDE inhibitors quazinone (Ro 13-6438), trequinsin (HL 725), rolipram (ZK 62711), and zaprinast (M&B 22948).

Materials and methods

Tissue preparation

Human ureters were obtained from patients who had undergone nephrectomy surgery for malignant renal tumors. Macroscopically normal tissue specimens were excised and immediately placed in a chilled organ-protective solution (Custodiol; Dr. Franz Köhler

Chemie GmbH, Alsbach, Germany). Prior to the functional experiments, the ureteral smooth muscle wall was carefully freed of fat and connective tissue.

Organ-bath studies

Circular ureteral segments were mounted in 10-ml chambers of a vertical organ-bath system (Isolated Organ Apparatus IOA 5306; Föhr Medical Instruments, Seeheim, Germany), containing a modified Ringer-Krebs solution (pH 7.4) of the following composition: 120 mM NaCl, 25.6 mM NaHCO_3 , 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 22 mM glucose, 0.1 mM 2Na^+ (Ca^{2+}) EDTA. The solution was continuously gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 , and the temperature maintained at 37 °C. The tissue segments were mounted between two hooks, one of which was connected to an isometric force transducer (Radnoti Glass Technology, Monrovia, Calif., USA). A pretension of 10 mN (1 g) was applied and the tissue was allowed to equilibrate for 60 min without further mechanical manipulation. The musculature was then stimulated with KCl (80 mM), which ensured stable and reproducible contractions. After stable contraction plateaus had been reached, increasing doses of forskolin, SNP, DHP, and PDE inhibitors were added to the bath chambers in a cumulative manner (0.01–10/100 μM). Isometric responses of the tissue were amplified and recorded with a MacLab data recording and analysis system (Analog Digital Instruments, Castle Hill, NSW, Australia).

Assays for cyclic nucleotides

To determine dose- and time-dependent effects of the drugs on cyclic nucleotide levels, circular segments were incubated in 2-ml reaction vials containing Krebs-Ringer solution continuously gassed with carbogen. Tissue preparations were incubated with forskolin and SNP (0.01, 1, and 100 μM) for 2, 5, and 10 min. PDE inhibitors (1, 10, and 100 μM) were allowed to incubate the tissue for 10 min. Incubation of the muscle segments with forskolin and SNP was performed in the presence of 1 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) to prevent degradation of cyclic nucleotides by PDE activity. Following the incubation period, the tissue was rapidly frozen in liquid nitrogen. The tissue was homogenized in a frozen state and camp were extracted using 70% ethanol. After centrifugation at 3000g for 10 min at 4 °C, the ethanolic phase was removed and lyophilized, and the remaining dry particulate fraction was resuspended in 50 mM sodium acetate buffer. Aliquots of the samples were acetylated and assayed for cAMP and cGMP contents by specific radioimmunoassays (RIA). The protein content of the particulate fractions was measured according to the method of Lowry [12] using bovine serum albumin as a standard.

Data analysis

Relaxant responses of ureteral segments during organ-bath experiments are expressed as percentage of the maximum contraction induced by 80 mM KCl. Mean EC_{50} values were determined graphically from the linear plot of the percentage of response versus drug concentration by nonlinear regression and represent 50% relaxation of the KCl-induced contraction plateau. The magnitude of drug effect at maximum concentration (R_{max}) is given as percentage relaxation of maximum tension. All data are given as the mean \pm SD. Statistical analysis was conducted by Gosset *t*-test. A probability (*P*) value of less than 0.05 was accepted as significant. All experiments were repeated eight to ten times on tissue segments originating from at least two different tissue preparations. In RIA experiments, each concentration was tested threefold and assayed in duplicate for cAMP and cGMP. Stimulating effects of IBMX on cNMP levels were subtracted when processing the data. Statistical analysis was also conducted using the Gosset *t*-test. There were only negligible effects of the highest concentration of the solvent vehicles on tissue tension and cNMP content.

Drugs

Forskolin, SNP, and IBMX were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA. Rolipram was kindly provided by Schering AG, Berlin, Germany, zaprinast by Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham, UK, and quazinone was obtained from Biomol, Hamburg, Germany. 125 I]cAMP and 125 I]cGMP were obtained from Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany. Antibodies raised in rabbits against cAMP and cGMP were generously provided by the Lower Saxony Institute of Peptide Research, Hannover, Germany. All other drugs were supplied by the Pharmaceutical Division of Bayer AG, Wuppertal, Germany. Drugs were made up as stock solutions (0.5–10 mM, depending on the solubility properties of the individual drugs) using saline, methanol, ethanol, or dimethylsulfoxide (DMSO) and were further diluted with saline or Krebs solution.

Results

Effects of drugs on KCl-induced tension

None of the ureteral smooth muscle segments showed any spontaneous activity. All substances tested induced dose-dependent relaxation of different potency and efficacy. Rolipram, an inhibitor of PDE4, as well as semi-selective and selective inhibitors of PDE5 turned out to be the most potent relaxing compounds: KCl-induced tension was significantly reversed by PDE4 inhibitor rolipram ($EC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$, $R_{\text{max}} = 100\%$), dual PDE5/1 inhibitor zaprinast ($EC_{50} = 40 \mu\text{M}$, $R_{\text{max}} = 76 \pm 7.0\%$), and selective PDE5 inhibitors E 4021 ($EC_{50} = 50 \mu\text{M}$, $R_{\text{max}} = 59 \pm 12\%$) and MSPP ($EC_{50} = 20 \mu\text{M}$, $R_{\text{max}} = 67 \pm 10.6\%$). PDE3 inhibitors quazinone and HL 725 induced relaxant effects with EC_{50} values of $25 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$, respectively. Nitrovasodilator SNP reversed KCl-induced tension of the ureteral segments with an EC_{50} of $4 \mu\text{M}$; R_{max} was determined as $62 \pm 5\%$. In contrast, effects of forskolin and NO-donating substance DHP on tissue tension were significantly less potent. R_{max} values were determined as $39 \pm 2\%$ (forskolin) and $22.5 \pm 11\%$ (DHP). Figs 1–3 and Table 1 summarize the data of the functional organ-bath studies.

Effects of drugs on cyclic nucleotide levels

Forskolin significantly increased cAMP levels dose-dependently and time-dependently starting at a concentration of $0.01 \mu\text{M}$. Maximum concentration of forskolin ($100 \mu\text{M}$) increased cAMP level 22-fold, 42-fold, and 51-fold over control (control $31.9 \pm 2.7 \text{ pmol/mg protein}$) after 2, 5, and 10 min of incubation, respectively (Fig. 4). No time- and dose-dependent effects of forskolin on cGMP level were noted (data not shown). Incubation with SNP resulted in an increase in cGMP level (control $1.7 \pm 1.16 \text{ pmol/mg protein}$) 13-fold after 2 min of incubation with $0.01 \mu\text{M}$ SNP to 90-fold after 10 min incubation with $100 \mu\text{M}$ SNP ($P < 0.01$ for each; Fig. 5). No effects of SNP on cAMP levels with respect to dose and time were noted (data not

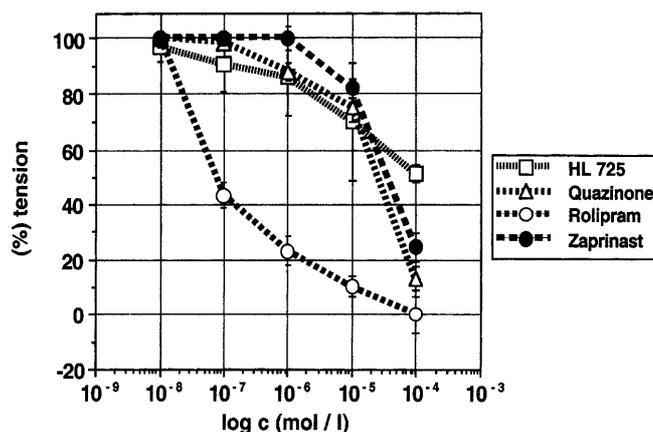


Fig. 1 Relaxation of human ureteral segments in vitro induced by cumulative addition of phosphodiesterase 3 (PDE3) inhibitor HL 725 and second-generation PDE inhibitors rolipram, quazinone, and zaprinast. Each point is expressed as percentage of maximum KCl-induced tension and represents mean \pm standard deviation (SD) of the mean of $n = 8$ –10 determinations

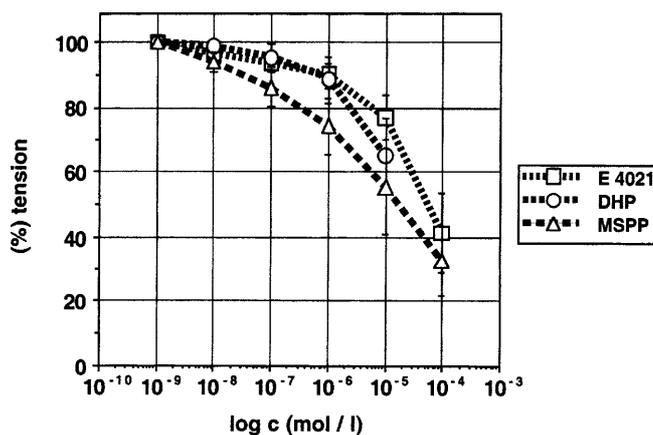


Fig. 2 Relaxing effects of PDE5 inhibitors E 4021 and morpholin-sulfonyl-pyrazolopyrimidine (MSPP), and NO-donor dihydropyridine (DHP) on KCl-induced tension of circular human ureteral segments. Each point is expressed as a percentage of maximum KCl-induced tension and represents mean \pm SD of $n = 8$ –10 determinations

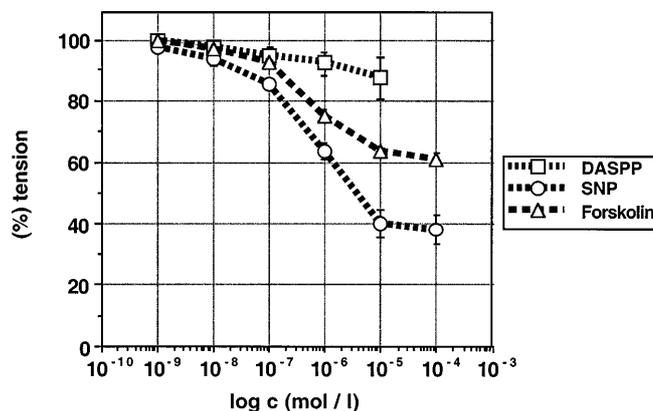


Fig. 3 Relaxing effects of PDE5 inhibitor diethylaminosulfonyl-pyrazolopyrimidine (DASPP), NO-donor sodium nitroprusside (SNP), and adenylyl cyclase stimulating agent forskolin on KCl-induced tension of circular human ureteral segments

Table 1 Effects of drugs on KCl-induced tension of human ureteral segments by means of EC_{50} ($EC_{50} > 100 \mu\text{M}$) and R_{max} values (EC_{50} drug concentration inducing 50% reversion of KCl-induced tension, R_{max} relaxation at final drug concentration, *ND* not determined, *SNP* sodium nitroprusside)

Substance	$R_{max} \pm \text{SD} (\%)$	$EC_{50} (\mu\text{M})$
Quazinone (Ro 13-6438)	87 ± 4.0	25.0
HL 725	49 ± 3.0	100.0
Rolipram (ZK 62711)	100	0.1
Zaprinast (M&B 22948)	76 ± 7.0	40.0
E 4021 (PDE5 inhibitor)	59 ± 12.5	50.0
DHP (dihydropyridine)	$35 \pm 11.8 (10 \mu\text{M})$	ND
Morpholinosulfonyl-pyrazolopyrimidine (MSPP, PDE5 inhibitor)	67.3 ± 10.6	20.0
Diethylaminosulfonyl-pyrazolopyrimidine (DASPP, PDE5 inhibitor)	$12.6 \pm 7.0 (10 \mu\text{M})$	ND
Forskolin	39.2 ± 2.3	ND
SNP	62 ± 5.0	4.0

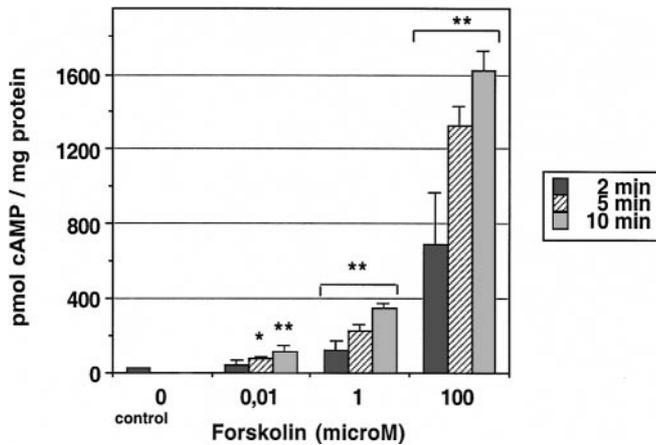


Fig. 4 Time course of cAMP accumulation in the presence of forskolin in human ureteral segments. Each bar represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

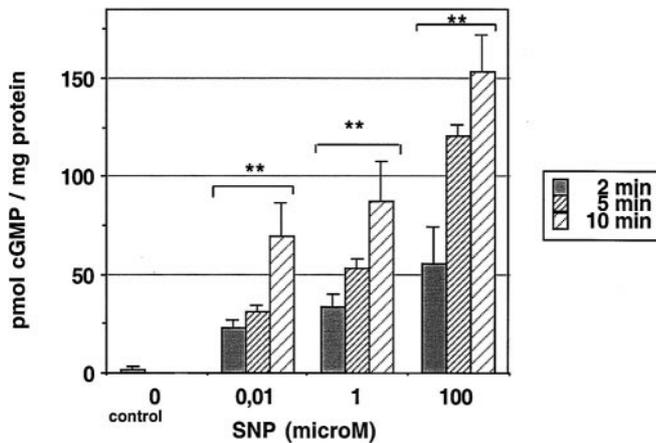


Fig. 5 Time course of cGMP accumulation in the presence of SNP in human ureteral segments. Each bar represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

shown). Ten minutes of incubation with $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ rolipram caused increases in cAMP threefold and sixfold, respectively (Fig. 6). Stimulation by HL 725 was 3-fold, 5-fold, and 11-fold at $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, and

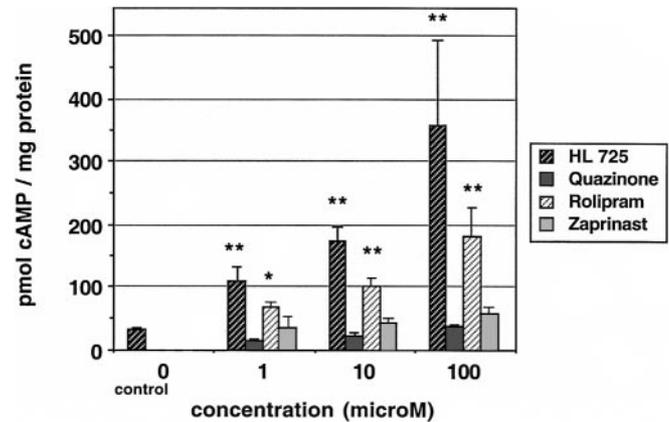


Fig. 6 Levels of cAMP in isolated human ureteral segments incubated with PDE inhibitors HL 725, rolipram, quazinone, and zaprinast. Each bar represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

$100 \mu\text{M}$ (Fig. 6). E 4021 increased cAMP levels dose-dependently 12-fold to 62-fold; stimulation by MSPP was 7-fold to 31-fold. All values were significant ($P < 0.05$). cGMP levels were elevated twofold by $100 \mu\text{M}$ rolipram, zaprinast, and E 4021 (Figs. 7, 8).

Discussion

cAMP and cGMP are important intracellular second messengers formed following stimulation of AC and GC, respectively. The action of many hormones and neurotransmitters involved in the regulation of smooth muscle tone is mediated through specific receptors coupled to these enzymes. The degradation of cNMP is regulated by the activity of cyclic nucleotide PDE. The major clinical focuses for selective PDE inhibitors were determined as positive inotropic agents, antidepressants, anti-inflammatory agents, and bronchodilators. Recent basic and clinical research has confirmed that the concept of PDE inhibition is also applicable in the treatment of male erectile dysfunction [2, 7, 13]. The aim of the present study was to further delineate the functional importance of cAMP- and cGMP-

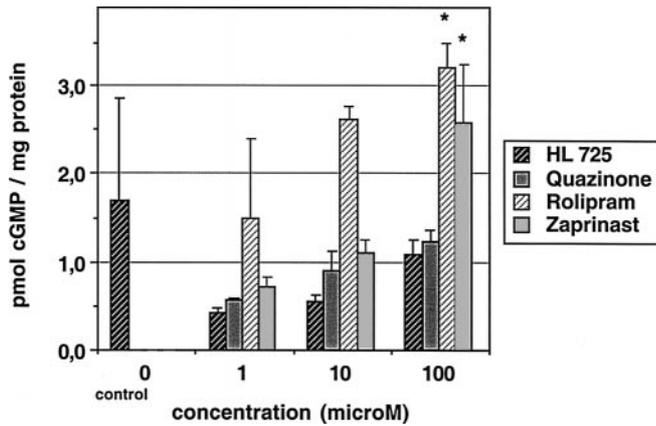


Fig. 7 Levels of cGMP in isolated human ureteral segments incubated with PDE inhibitors HL 725, rolipram, quazinone, and zaprinast. Each *bar* represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* P < 0.05, ** P < 0.01)

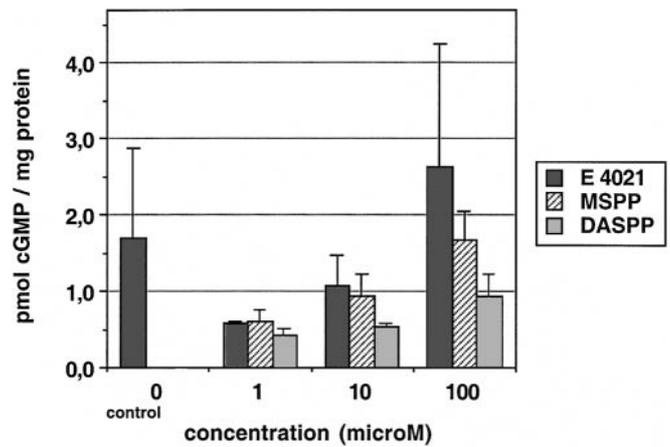


Fig. 9 Levels of cGMP in isolated human ureteral segments after 10 min of incubation with PDE5 inhibitors E 4021, MSPP, and DASPP. Each *bar* represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* P < 0.05, ** P < 0.01)

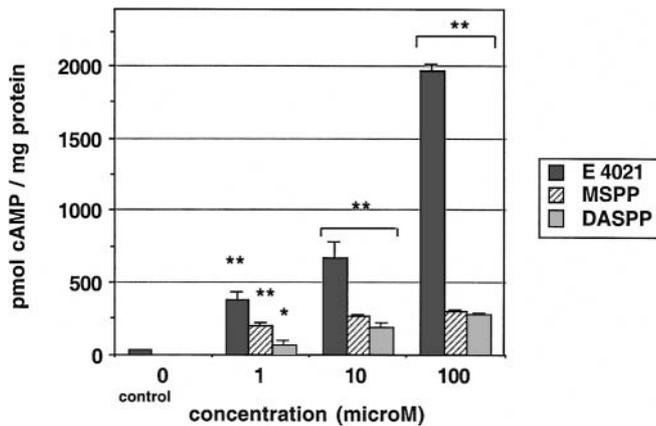


Fig. 8 Levels of cAMP in isolated human ureteral segments after 10 min of incubation with PDE5 inhibitors E 4021, MSPP, and DASPP. Each *bar* represents the mean \pm SD of three individual determinations. *Values significantly different from control (* P < 0.05, ** P < 0.01)

mediated pathways in human ureteral smooth muscle. Therefore, we examined the effects of various third-generation isoenzyme-selective PDE inhibitors on ureteral tension and cyclic nucleotide levels in vitro.

As previously shown, the PDE4 inhibitor rolipram, PDE3 inhibitor quazinone, and dual PDE5/1 inhibitor zaprinast strongly reversed KCl-induced tension of human ureteral segments. We were able to demonstrate that these relaxing properties are paralleled by the ability of the drugs to elevate cAMP and cGMP levels. Our organ-bath studies revealed the relaxing potency of nitrovasodilator SNP, PDE3 inhibitor HL 725, and PDE5 inhibitors E 4021 and MSPP. While inhibitors of PDE3, which act on cAMP-hydrolyzing PDE isoenzymes, significantly increased cAMP levels, E 4021 and MSPP, selective inhibitors of cGMP-specific PDE5, did not exert major effects on cGMP levels – unexpected from their mode of action – but considerably elevated

cAMP. This fact gives rise to the speculation that, in ureteral smooth muscle, cAMP might be the main mediator of muscle relaxation. In contrast, the low relaxing potency of forskolin, despite its remarkable effects on intracellular cAMP and the pronounced relaxant response to SNP in combination with the dramatic increase in cGMP levels after incubation with SNP, demonstrates that cGMP is also involved in the relaxation of human ureteral smooth muscle. This is in accordance with previous findings that ureteral relaxation may involve the NO/cGMP pathway [18]. Therefore, in the human ureter, cGMP and cAMP either appear to have similar physiological effects and work synergistically or a slight increase in cGMP may exert an inhibitory effect on PDE3, leading to an elevation of cellular cAMP and finally ureteral relaxation. A comparable mechanism has already been assumed by Maurice and Haslam from experiments on rat aortic smooth muscle [15]. Although PDE3 was not revealed in the cytosolic fraction of ureteral smooth muscle [19], it might be localized in cellular compartments of the microsomal fraction. This may explain the in vitro effects of PDE3 inhibitor HL 725 on ureteral smooth muscle. The apparent discrepancy between cAMP and cGMP levels and functional responses may also be explained by possible intracellular compartmentation of cyclic nucleotides and important regulatory PDE isoenzymes. Thus, different inhibitors may elevate cyclic nucleotide levels in different intracellular compartments. Cyclic nucleotides could act in such a way that very small, compartmentalized changes, e.g., in cGMP, could cause calcium desensitization by stimulation of light chain myosin phosphatase activity or major changes in intracellular calcium by activation of cGMP-dependent protein kinase, thus resulting in changes of smooth muscle tone. Penetration and distribution of some PDE inhibitors may vary within the cell. The present data demonstrate that pharmacological modulation of in-

tracellular cNMP-dependent signal transduction pathways resulted in changes of ureteral tension in vitro, which is accompanied by an increase in cNMP levels. The effects of PDE5 inhibitors E 4021 and MSPP on cAMP levels indicate that cGMP and cAMP-dependent signal transduction pathways are not generally parallel or independent in smooth muscle tissue, and manipulation of cGMP-downstream might interfere with regulatory cAMP cascades. It is important to emphasize that cyclic nucleotide turnover in isolated tissue preparations is low, since only basal cyclase activity is maintained, thus high concentrations of PDE inhibitors are needed to elevate cyclic nucleotides in order to produce a significant tissue response. In contrast to this situation, cyclic nucleotide turnover rates are much higher in vivo systems where PDE inhibitors tend to be much more effective [16]. Therefore, future studies on ureteral smooth muscle relaxation and determination of cyclic nucleotide levels under better physiological conditions, i.e., by addition of subsaturating concentrations of SNP or forskolin and various concentrations of PDE inhibitors, would gain importance.

Generally, there are three characteristics of PDE4 and PDE5 inhibitors that might be beneficial in the treatment of ureteral colic: (1) relaxation of ureteral muscle at the site of the concretion might relieve colic pain and facilitate stone passage; (2) inhibitors of PDE isoenzymes 4 and 5 are thought to induce minimal systemic side-effects at the dosage needed; and (3) improved isoenzyme selectivity of third-generation PDE inhibitors will help to focus drug effects on the target tissue. Clinically, the use of inhibitors PDE4 and 5 seems promising due to the anti-inflammatory effect as well as the favorable effect to side-effects ratio of the drugs.

Acknowledgement The authors are indebted to Miss Susanne Skubich, Lower Saxony Institute of Peptide Research, Hannover, Germany, for her skillful technical assistance.

References

- Beavo J, Houslay MD (1990) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: structure, regulation and drug action. Wiley & Sons, Chichester
- Boolell M, Allen M, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IA, Gingell C (1996) Sildenafil: an orally active type V cyclic GMP-specific phosphodiesterase-inhibitor for the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 8: 47–52
- Braunwald E (1991) Intravenous milrinone: therapeutic responses in heart failure. *Am Heart J* 121: 1937
- Bristol JA, Sircar L, Moos WH, Evans DB, Weishaar RE (1984) 4,5-Dihydro-[4-(1H-imidazole-1-yl)phenyl]-3(2H)-pyridazinones: novel positive inotropic agents for the treatment of congestive heart failure. *J Med Chem* 27: 1099–1101
- Fisher AD, Smith JF, Pillar JS, St Denis S, Cheng JB (1998) Isolation and characterization of PDE9A, a novel cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 273: 15559–15564
- Fisher AD, Smith JF, Pillar JS, St Denis S, Cheng JB (1998) Isolation and characterization of PDE8A, a novel cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 570–577
- Gardner BP, Mandeville S, Glass C, Fraser M, Dinsmore WW, Muirhead G, Mayton MC, Orr M (1997) Sildenafil (Viagra): a double-blind, placebo-controlled, single-dose, two-way crossover study in men with erectile dysfunction caused by traumatic spinal cord injury. *J Urol* 157(4): 181
- Han P, Zhu X, Michaeli T (1997) Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J Biol Chem* 272: 16152–16157
- Hartmann M (1991) Urologische Notfallsituationen. In: Altwein JE, Rübgen H (eds) *Urologie*. Enke, Stuttgart, pp 395–424
- Komas N, Lugnier C, Stoclet JC (1991) Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 104: 495–503
- Lincoln TM (1989) Cyclic CMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 41: 479–484
- Lowry OH, Rosebrough H, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 165–275
- Lue TF (1997) A study of sildenafil (Viagra™), a new oral agent for the treatment of male erectile dysfunction. *J Urol* 157(4): 181
- Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA, Wigler M (1994) Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268(191): 12925–12932
- Maurice DH, Haslam RJ (1990) Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 191: 471–475
- Nicholson CD, Chaliss RAJ, Shahid M (1991) Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 12: 19–2
- Opie LH (1982) Role of cyclic nucleotides in heart metabolism. *Cardiovasc Res* 16: 483–507
- Stief CG, Ückert S, Truss MC, Becker AJ, Machtens S, Jonas U (1996) A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro. *Urol Res* 24: 333–337
- Taher A, Schulz-Knappe P, Meyer M, Truss MC, Forssmann WG, Stief CG, Jonas U (1994) Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in the human ureter and their functional role in vitro. *World J Urol* 12: 286–291
- Thorphy TJ, Udem BJ (1991) Phosphodiesterase inhibitors: new opportunities for the treatment of asthma. *Thorax* 46: 512–523
- Thorphy TJ, Udem BJ, Cieslinski LB, Luttman MA, Reeves ML, Hay DWP (1993) Identification, characterization and functional role of phosphodiesterase isoenzymes in human airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1213–1222
- Truss MC, Ückert S, Stief CG, Forssmann WG, Jonas U (1996) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in human detrusor smooth muscle. II. Effect of various PDE inhibitors on smooth muscle tone and cyclic nucleotide levels in vitro. *Urol Res* 24: 129–134
- Truss MC, Stief CG, Ückert S, Becker AJ, Forssmann WG, Jonas U (1997) Phosphodiesterase inhibition in lower urinary tract dysfunction: a possible new concept of treatment. *Br J Urol [Suppl 2]* 80: 6

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Rainer Kühn
Geburtsdatum / -ort 06.11.69 in Leer / Ostfriesland
Adresse Hausen 6 c
85551 Kirchheim b. München
Telefon 0171 622 5678
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Konfession evang.-luth.
Eltern Rudolf Kühn, Ingenieur für Maschinenbau, (+ 08.05.92)
Wilhelmine Kühn, geb. Hilgert, Sekretärin und Hausfrau
Geschwister Karsten Kühn, geb. 05.01.1975 in Leer

Schulbildung

07/76 – 06/82 Grundschule und Orientierungsstufe (Leer)
08/82 – 05/89 Ubbo-Emmius-Gymnasium (Leer)
05/89 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

05/89 – 08/91 Sanitätsdienst der Bundeswehr in Leer (Sanitätsbataillon 11)

Studium

10/91 – 11/98 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover

Ärztliche Prüfungen

08/93 Ärztliche Vorprüfung
08/94 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
09/97 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
11/98 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10/97 – 02/98 Radiologie an der MHH
02/98 – 05/98 Innere Medizin im Borromäushospital Leer
05/98 – 09/98 Chirurgie an der MHH
- Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie
- Urologie
- Allgemeine Chirurgie und HTG im Oststadt-Krankenhaus

Famulaturen

02/94 – 03/94 Chirurgische Abteilung im Borromäushospital Leer (CA Dr. Möller)
02/95 – 03/95 Allgemeinmedizin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Gerlach / Wilcke, Leer
03/95 – 04/95 Orthopädie in der Praxis Dr. Kuhlmann, Leer
08/95 – 10/95 Urologische Klinik und Poliklinik der Medizinischen Hochschule Hannover
10/96 – 11/96 University of California San Francisco (UCSF), Department of Urology

Beruf

12/98 Erlaubnis als Arzt im Praktikum (AiP)
 11/00 Approbation als Arzt (Landesprüfungsamt Hannover)
 01/02 Fachkundenachweis Rettungsdienst (Notarzt)
 01/04 Facharzt für Allgemeinmedizin (Bayerische Landesärztekammer)
 11/07 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Arbeitsstellen

01/99 – 12/01 Innere Medizin im Borromäushospital Leer (CA Dr. Reckels)
 01/02 – 12/02 Allgemeinmedizinische Praxis Dr. med. Meiler in Erding als Assistenzarzt
 01/03 – 06/03 Chirurgische Praxis Dr. med. Gersing in Poing als Assistenzarzt
 seit 01/04 Freiberufliche Tätigkeit als selbständiger Facharzt und Notarzt in den Bereichen Praxis, org. Bereitschaftsdienst (KVB), Rettungsdienst (Rotes Kreuz, Malteser) und ärztliche Flugbegleitung (ADAC)

Promotion

Thema Untersuchungen zur Bedeutung der cAMP- und cGMP- abhängigen Signaltransduktion in der Kontrolle der glatten Muskulatur des humanen Ureters – eine funktionelle Studie –

Betreuung Prof. Dr. med. C. G. Stief, Urologische Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. med. U. Jonas)
 Projekt in Kooperation mit der BAYER AG, Geschäftsbereich Pharma;
 PD Dr. rer. Nat. M. Schramm

Veröffentlichungen

Kühn R., Ückert S., Stief C.G., Truss M.C., Jonas U., Forssmann W.G.:
 Pharmakologische Modulation des Uretertonus in vitro: Zusammenhang zwischen Relaxation und zyklischen Nukleotiden.
 49. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) e.V.,
 Wiesbaden, 24.09. - 27.09.1997, Urologe [A] 37 (Suppl.1): S21, 1997

Ückert S., Kühn R., Stief C.G., Truss M.C., Lietz B., Neuhaus L., Borkowski M., Jonas U.:
 Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide dependent pathways.
 13th Congress of the European Association of Urology (EAU), Barcelona, Spanien, 21.03. - 25.03.1998, Eur. Urol. 33 (Suppl. 1): 81, 1998

Sonstiges

seit 10/06 glücklicher Vater einer Tochter mit Namen Isabel Anna Sofie