



# DIPLOMARBEIT

## **Wirkstärke und möglicher Wirkmechanismus eines neu synthetisierten Resveratrol-Derivates (AST 32) auf isolierte Präparate von Meerschweinchen**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Sarah Lugmayr
Matrikel-Nummer:	0301684
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 449 Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. Christian Studenik
Wien, am 1.10.2008	

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für die Bereitstellung des Diplomarbeitsthemas und die hervorragende Betreuung bedanken, außerdem für den Optimismus und die ermutigenden Worte in den wechselnden Zeiten meiner Labortätigkeit.

Herrn Univ. Prof. Dr. Thomas Erker möchte ich für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz danken.

Herrn Peter Höflich gilt ein herzliches Dankeschön für die Hilfe bei den morgendlichen Versuchsvorbereitungen und bei diversen technischen Problemen.

Ein Dankeschön meinen Kolleginnen und Kollegen für die Einführung ins Labor und die Hilfestellung zu Beginn meiner praktischen Arbeit.

Danke auch meiner Familie für die große Unterstützung während des gesamten Studiums.

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Resveratrol</b>	<b>5</b>
1.1.1 Vorkommen von Resveratrol	5
1.1.2 Biosynthese von Resveratrol	6
1.1.3 Studien zur positiven Wirkung von Resveratrol	8
1.1.4 Pharmakokinetik	11
<b>1.2 Testsubstanz AST 32</b>	<b>12</b>
<b>2 AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Versuchstiere</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Isolierung und Präparation der Organe</b>	<b>13</b>
3.2.1 Isolierung des rechten Vorhofs	13
3.2.2 Isolierung der Papillarmuskeln	14
3.2.3 Isolierung der Arteria pulmonalis	14
3.2.4 Isolierung des terminalen Ileums	14
3.2.5 Isolierung der Aorta	15
<b>3.3 Physiologische Nährlösung / Tyrode</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Versuchsanordnung</b>	<b>17</b>
3.4.1 Versuchsapparatur	17
3.4.2 Apparatur für den Papillarmuskel	18
3.4.3 Schematische Darstellung des Kraftwandlers und seine Registrierung	20
3.4.4 Abb.6: Originalabbildung einer Versuchsapparatur	21
3.4.5 Abb.7: Originalabbildung einer Organzelle	21
3.4.6 Abb.8: Originalabbildung eines Amplifiers	22
<b>3.5 Versuchsablauf</b>	<b>22</b>
3.5.1 Untersuchung der Testsubstanz AST 32	22
3.5.2 Versuche der Testsubstanz AST 32 mit den Agonisten Glibenclamid, Nitro-L-Arginin, Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin am terminalen Ileum	25
<b>3.6 Verwendete Substanz</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Verwendete Agonisten</b>	<b>28</b>
3.7.1 Histamin	28
3.7.2 Acetylcholin	30
3.7.3 Phenylephrin	32
3.7.4 Glibenclamid	33
3.7.5 Nitro-L-Arginin	34
<b>3.8 Messgrößen und Statistik</b>	<b>35</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>

<b>4.1</b>	<b>Wirkung von AST 32 auf das terminale Ileum</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Wirkung von AST 32 auf die isolierte Aorta</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 an der Arteria pulmonalis</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Wirkung von AST 32 auf den Musculus papillaris</b>	<b>45</b>
<b>4.5</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 am Atrium cordis dextrum</b>	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 in Kombination mit Histamin am terminalen Ileum</b>	<b>51</b>
<b>4.7</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Anwesenheit von Acetylcholin</b>	<b>55</b>
<b>4.8</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid</b>	<b>59</b>
<b>4.9</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Kombination mit Glibenclamid</b>	<b>63</b>
<b>4.10</b>	<b>Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter dem Einfluss von Nitro-L-Arginin</b>	<b>68</b>
<b>4.11</b>	<b>Wirkung des Lösungsmittels DMSO</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Strukturvergleich von AST 32 mit Resveratrol</b>	<b>74</b>
<b>5.2</b>	<b>Versuchsreihen an der glatten Muskulatur, Musculus papillaris und Atrium cordis dextrum</b>	<b>75</b>
5.2.1	Versuche an der Aorta	75
5.2.2	Versuche am terminalen Ileum	75
5.2.3	Versuche an der Arteria pulmonalis	76
5.2.4	Versuche am Musculus papillaris	77
5.2.5	Versuche am Atrium cordis dextrum	77
<b>5.3</b>	<b>Wirkung von AST 32 in Kombination mit den Agonisten am terminalen Ileum</b>	<b>78</b>
5.3.1	Wirkung von AST 32 in Kombination mit Histamin auf das terminale Ileum	78
5.3.2	Wirkung von AST 32 in Kombination mit Acetylcholin auf das terminale Ileum	78
5.3.3	Wirkung von AST 32 in Kombination mit Phenylephrin auf das terminale Ileum	78
5.3.4	Wirkung von AST 32 in Kombination mit Glibenclamid am terminalen Ileum	79
5.3.5	Wirkung von AST 32 in Kombination mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum	79
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Resveratrol

### 1.1.1 Vorkommen von Resveratrol

Der Pflanzeninhaltsstoff Resveratrol ist ein natürliches Antioxidans, das in Trauben, Rotwein, Erdnüssen und manchen Beeren zu finden ist. Es wird von der Pflanze zum Schutz vor schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, Insekten- und Pilzbefall, Ozon- und Schadstoffbelastung gebildet (Urena et al. 2003).

Sehr hohe Konzentrationen von Resveratrol konnten im Rotwein nachgewiesen werden. Bei diesem wird, im Gegensatz zum Weißwein, bei der Herstellung die Schale in der Maische mitvergoren. Die Synthese von Resveratrol in den Schalen der *Vitis vinifera*-Beeren wird vor allem nach dem Befall der Pflanze mit dem Schimmelpilz *Botrytis cinerea* induziert. (Frèmont 2000). Auch die Blätter von *Vitis vinifera* enthalten Resveratrol (Langcake und Pryce 1976).

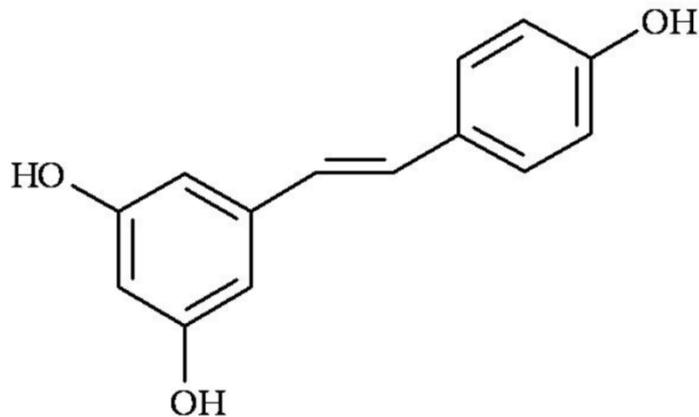
Der Resveratrolgehalt im Wein ist aber abhängig von der Rebsorte, der Stärke des Reizes zur Synthese des Pflanzeninhaltsstoffes, dem Klima, dem Reifegrad der Trauben, den Keltermethoden und der Lagerung (Wolter 2002). Weiters konnte bei Studien in Spanien nachgewiesen werden, dass der Resveratrol Gehalt in den Trauben um das 2-3 fache ansteigt, wenn diese vor der Gärung mit UV-Strahlen behandelt oder gekühlt werden (Cantos et al. 2000).

Neben dem E-Resveratrol kommt in der Natur auch das Z-Resveratrol, sowie deren Glykoside Piceid und Astringin, das 3,5-methylierte Resveratrol Pterostilben und  $\epsilon$ -Viniferin (ein Resveratrolpolymer) vor, wobei das  $\epsilon$ -Viniferin den Hauptanteil im Wein ausmacht (Soleas et al. 1997A).

Die durchschnittliche Resveratrol-Konzentration im Rotwein beträgt 2-40  $\mu\text{M}$  (Elattar & Virji 1999). Erdnüsse hingegen enthalten nur 0,02-1,79  $\mu\text{g/g}$  (Sanders 2000).

### 1.1.2 Biosynthese von Resveratrol

Abb. 1: Chemische Struktur von Resveratrol



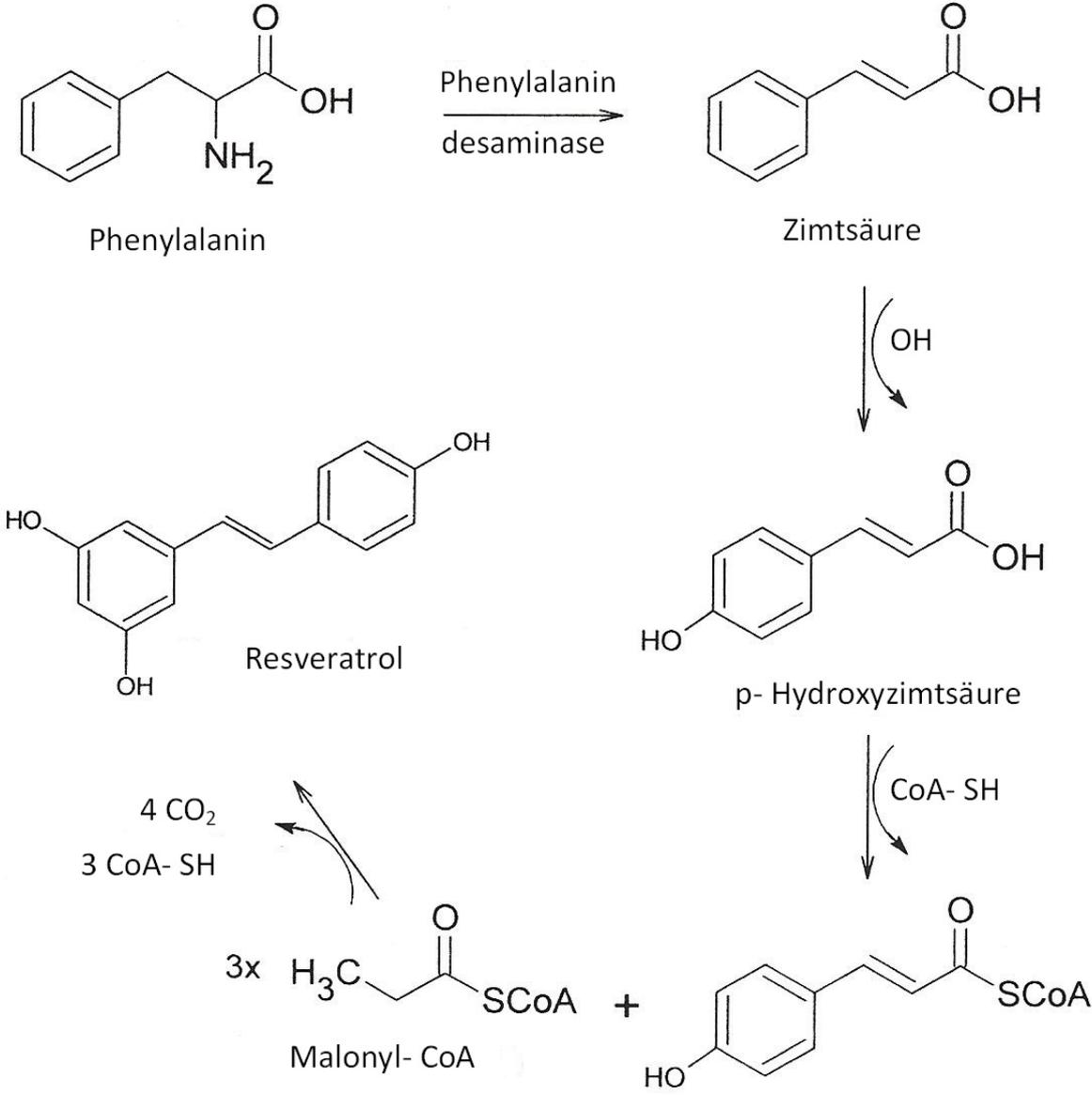
Chemisch gesehen handelt es sich bei Resveratrol um ein Stilbenderivat, nämlich ein 3, 5, 4'-Trihydroxy-E-stilben mit einem Molekulargewicht von 228,2 g/mol.

Der Naturstoff gehört zur Klasse der Flavonoide und ist ein Phytoalexin. „Phyton“ bedeutet im Griechischen „Pflanze“, „alexin“ ist ebenfalls griechisch und heißt „sich schützen, abwehren“. Resveratrol wird also von manchen Pflanzen zum Schutz vor Pilzbefall, UV-Strahlung und anderer chemischer, mechanischer und physikalischer Schädigung gebildet (Urena et al. 2003).

Ein wichtiges Enzym für die Biosynthese von Resveratrol ist die Resveratrol-Synthetase, die nur in wenigen Pflanzen zu finden ist.

Ausgehend von der Aminosäure Phenylalanin kommt es durch oxidative Desaminierung zur Bildung von Zimtsäure. Diese geht durch Hydroxylierung in die p-Hydroxymzimtsäure (p-Cumarinsäure) über. In weiterer Folge wird die Cumarinsäure durch eine spezifische CoA-Ligase zum Thioester umgesetzt. Im letzten Schritt kommt es mit Hilfe der Resveratrol Synthetase zur Kondensation mit drei Molekülen Malonyl-CoA, unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und CoA-SH (Wu et al. 2001).

Abb. 2: Biosynthese von Resveratrol



### 1.1.3 Studien zur positiven Wirkung von Resveratrol

Großes Interesse erweckte Resveratrol bei seiner Entdeckung als einer der Inhaltsstoffe des Rotweins. Seither gab es viele Studien über die positiven Wirkungen des Stilbenderivats, unter anderem auch auf das Herz-Kreislauf-System:

Nach erfolgreichen Versuchsreihen an Hefen, Spulwürmern, Fruchtfliegen und Fischen wurde Resveratrol schließlich auch an übergewichtigen Mäusen getestet. Verglichen wurde die Überlebensrate von fehlernährten Mäusen, die mit Resveratrol behandelt wurden, fehlernährten Mäusen ohne Behandlung und gesunden Mäusen.

Obwohl die fettleibigen Mäuse mit Resveratrol nicht an Gewicht verloren, sank das Risiko negativer Folgekrankheiten wie Herzerkrankungen, hoher Zucker- und Insulin-Werte deutlich. Sie konnten das gleiche Alter erreichen, wie die Kontrollgruppe mit den gesunden Mäusen (Baur et al. 2006).

#### 1.1.3.1 *Antioxidativer Effekt*

Der antioxidative Effekt von Resveratrol beruht auf dem großen Redoxpotential der phenolischen Hydroxylgruppen der Flavonoide. Reaktive Sauerstoffradikale im Organismus können abgefangen und körpereigene antioxidative Enzymsysteme aktiviert werden.

Die schützende Wirkung von Resveratrol vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen lässt sich auf diese Effekte zurückführen. Es verhindert die Oxidation von LDL-Cholesterin und dessen Einlagerung in die Zellmembran. Die Konzentration von „gutem“ Cholesterin (HDL) wird erhöht, dadurch kann der Entstehung von Arteriosklerose und Gefäßschädigungen vorgebeugt werden.

Resveratrol kann auch die Thrombozytenaggregation bei Plaqueruptur hemmen. Dabei war das Flavonoid beispielsweise Substanzen wie Catechin, Epicatechin,  $\alpha$ -Tocopherol oder Hydrochinon überlegen (Hung et al. 2000, Kirk et al. 2000).

An Hand der eben beschriebenen positiven Wirkungen von Resveratrol auf das kardiovaskuläre System lässt sich wahrscheinlich auch das „**Französische Paradoxon**“ erklären:

### ***Das Französische Paradoxon***

Obwohl Franzosen kalorienreiche Kost bevorzugen und viel rauchen, war die Rate von kardiovaskulären Erkrankungen in Frankreich deutlich niedriger als in anderen Ländern. Forscher führten dies schon bald auf den höheren Rotweinkonsum der Bevölkerung zurück.

Untersuchungen ergaben, dass Rotwein die LDL-Oxidation selbst in 1000facher Verdünnung noch signifikant stärker hemmt, als zum Beispiel Vitamin E (Metz 2000).

#### ***1.1.3.2 Antiinflammatorischer Effekt***

Resveratrol hemmt die Translokation des nukleären Faktors kappa-b (NFκ-b).

NFκ-b kommt im Zytoplasma vor. Er kann durch verschiedene Stimuli, wie bakterielle Endotoxine, aktiviert werden und wandert dann in den Zellkern, wo er die Genexpression von Entzündungsmediatoren fördert.

Weiters wurde eine direkte Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und eine Hemmung der Hydroperoxidaseaktivität von COX-1 und COX-2 nachgewiesen. (Jang et al. 1997)

#### ***1.1.3.3 Antikanzerogene und antimutagene Wirkung***

Die antikanzerogene Wirkung wurde an promyelozytischen HL-60 Leukämiezellen nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen mit dem Tumorpromotor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) versetzt. Resveratrol verhinderte die Bildung freier Radikale und minderte somit die Initiation von Tumoren.

Zur Belegung der antimutagenen Wirkung wurde der Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* TM677 mit dem Tumorigen 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) versetzt (Wolter 2002).

Weiters wurde eine antiproliferative Wirkung von Resveratrol an den kolorektalen Karzinomzelllinien CaCo-2 und HCT-116 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Resveratrol auf Kolonkarzinomzellen antiproliferativ wirkt und in höheren Konzentrationen deren Apoptose induziert. Die Zunahme der Zellzahl von CaCo-2 wurde über 72 Stunden konzentrations- und zeitabhängig gehemmt (Wolter 2002).

Die Studien zur antimutagenen bzw. antikarzinogenen Wirkung zeigen, dass Resveratrol die Aktivität der DNA-Polymerase, Ribonukleotidreduktase und Ornithindecaboxylase hemmt. Die Ornithindecaboxylase ist das Schlüsselenzym für die Polyaminbiosynthese. (Fontecave et al. 1998). Polyamine sind wesentlich zur Ermöglichung des Zellwachstums und daher sind Synthese und Aufnahme von Polyaminen in Karzinomzellen stark erhöht. In Kolonkarzinomzellen ist die Ornithindecaboxylaseaktivität im Gegensatz zu normalem Gewebe um das Drei- bis Vierfache erhöht (Löser et al. 1990, Elitsur et al. 1992).

Bei Versuchsreihen an Mäusehepatomzelllinien führte Resveratrol zu einer Induktion des Phase II-Enzyms Quinonreduktase und auch wiederum zu einer Proliferationshemmung. Die Untersuchungen ergaben, dass Resveratrol eine Metastasierung der Krebszellen verhindern konnte (Wu et al. 2004).

Wie bereits in Kapitel 1.1.3.2. erwähnt, ist die Inhibition von NF- $\kappa$ B auch für die Wachstumshemmung von Krebszellen mitverantwortlich. NF- $\kappa$ B kommt als Schlüsselprotein in allen Zellkernen vor, wo es für die Aktivierung jener Gene verantwortlich ist, die das Überleben einer Zelle sichern. Sind diese Schutzmechanismen ausgeschaltet, wird in den Krebszellen Apoptose induziert (Yeung et al. 2004).

Auf Grund der Verwandtschaft von Resveratrol mit dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol, erhofften sich die Forscher vielversprechende Effekte zur Behandlung von Mammatumoren. An Mammacarcinom-Zellkulturen von Mäusen konnte die antikanzerogene Wirkung zwar nachgewiesen werden, jedoch wurde diese an menschlichen Mammatumoren bisher nicht bestätigt (Gehm et al. 1997).

#### 1.1.4 **Pharmakokinetik**

In Folge der vielfältigen Wirkungen von Resveratrol auf Gesundheit und Lebenserwartung erscheint eine Supplementierung des Naturstoffes sinnvoll. Nur so können über einen längeren Zeitraum hohe Dosen zugeführt werden, ohne alkoholtoxische Schäden, vor allem an der Leber, befürchten zu müssen (Kleine-Gunk 2007).

Die Problematik dabei ist, dass Resveratrol nach peroraler Gabe zwar sehr gut aufgenommen, jedoch rasch metabolisiert wird. Bereits nach dreißig Minuten war freies Resveratrol nur mehr in Spuren nachweisbar (Walle et al. 2004).

Die beeindruckenden Ergebnisse der in vitro Studien wurden mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen erzielt.

Besonders Resveratrol-reicher Rotwein enthält rund 10 mg pro Flasche (Pervaiz 2003). Rechnet man die Konzentrationen in den Mausversuchen von Sinclair auf den Menschen hoch, müsste dieser mindestens 120 mg Resveratrol pro Tag zu sich nehmen. Dass diese Menge mit Rotwein alleine nicht schaffbar ist, steht außer Frage.

Das viel propagierte Thema „Rotwein als Allheilmittel“ wird immer noch heftig diskutiert. Dass chronischer Alkoholgenuss schädigend auf den Körper wirkt, ist unbestritten. Dennoch bleibt der Naturstoff Resveratrol eine interessante Substanz mit vielfältigen Wirkungen und großem Potential.

Es bleibt abzuwarten, welche spannenden Ergebnisse weitere Studien, insbesondere solche am Menschen, in Zukunft bringen werden.

## 1.2 Testsubstanz AST 32

Die Substanz AST 32, die am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert wurde, ist ein Derivat des Polyphenols Resveratrol.

Resveratrol kann in zwei Konfigurationen vorkommen. E-Resveratrol ist die stabilere Form, Z-Resveratrol ist instabiler, vermutlich aber stärker wirksam. Nun wurden Derivate entwickelt, die einen Schwefel zur Stabilisierung der Z-Konfiguration enthalten. Durch den sperrigen Schwefel-Rest wird der Aromat sterisch festgehalten und kann nicht mehr in die E-Konfiguration kippen.

## 2 Aufgabenstellung

Untersucht wurde der Einfluss von AST 32 auf die glatte Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum.

An Papillarmuskel und rechtem Vorhof wurde auf eine eventuell positiv oder negativ inotrope bzw. chronotrope Wirkung geprüft.

Da eine deutliche Wirkung am terminalen Ileum zu erkennen war, wurde im Anschluss daran der mögliche Wirkmechanismus getestet. Dazu wurden die Agonisten Glibenclamid, Nitro-L-Arginin, Acetylcholin, Histamin und Phenylephrin herangezogen.

Ziel war es, herauszufinden, ob die Testsubstanz AST 32 ähnliche bzw. bessere Wirkung zeigt, als die Vergleichssubstanz Resveratrol.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Versuchstiere**

Die Versuche wurden an isolierten Organen männlicher und weiblicher Meerschweinchen durchgeführt. Die Tiere kamen vom Department für Toxikologie und Labortierzucht in Dobrá Voda, Universität Bratislava, Slowakei und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 300-600g.

Am Tag vor den Versuchen wurden die Tiere nüchtern gehalten, um die glatte Muskulatur ruhig zu stellen. Die Meerschweinchen wurden durch einen Genickschlag getötet und anschließend der Bauchraum geöffnet.

### **3.2 Isolierung und Präparation der Organe**

#### **3.2.1 Isolierung des rechten Vorhofs**

Zu Beginn wurde gleich das Herz dem Thorax entnommen. Um einen zu langen Sauerstoffmangel zu verhindern, erfolgte die Präparation in einer Nährlösung, die mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid begast wurde. Unter dem Mikroskop wurde zuerst das Perikard, dann anhaftende Lungenteile und Fettgewebe mit einer Federschere entfernt. Anschließend wurde das Herz mit Präpariernadeln an Spitze und Basis in der mit Kork ausgelegten Petrischale fixiert.

Die Abtrennung des rechten Vorhofs vom Ventrikel erfolgte durch einen Schnitt entlang des Sulcus coronarius unter Erhalt des Sinusknotens. Dieser befindet sich in der rechten Vorhofwand an der Eintrittsstelle der Vena cava superior.

Am oberen und unteren Teil des Vorhofs wurde nun mit einem Bindfaden ein Häkchen aus Silberdraht befestigt. Bis zum Einspannen in die Apparatur wurde der fertig präparierte Vorhof wieder in einer begasten Nährlösung aufbewahrt.

### 3.2.2 **Isolierung der Papillarmuskeln**

Beim in der Petrischale befestigten Herz wurde der rechte Ventrikel von der Arteria pulmonalis bis zur Herzspitze entlang des Septums geöffnet, aufgeklappt, und mit Präpariernadeln fixiert. Da für den Versuch die spontane Aktivität der Purkinje Fasern hinderlich gewesen wäre, mussten diese sorgfältig entfernt werden. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde nun wieder mit Bindfaden ein Häkchen befestigt. Nach Durchtrennung dieser Sehne wurde der Muskel vorsichtig herauspräpariert.

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können, wurden ausschließlich Papillarmuskeln mit dem maximalen Durchmesser von 0,87 mm verwendet (Koch-Weser 1963).

### 3.2.3 **Isolierung der Arteria pulmonalis**

Zur Isolierung der Arteria pulmonalis wurde wieder das in der Petrischale mit Nährlösung fixierte Herz verwendet. Unter dem Mikroskop erfolgte die Abtrennung der Pulmonalarterie so nahe wie möglich am Herz. Verwendet wurde nur das kurze Stück bis zur Aufgabelung in rechte und linke Arterie. Das isolierte Organ wurde mit Präpariernadeln am Kork fixiert und mit einer Federschere von anhaftendem Muskel- und Fettgewebe gereinigt. Für die Versuche wurden ringförmige Stückchen in der Größe von 3-4 mm geschnitten.

### 3.2.4 **Isolierung des terminalen Ileums**

Nach Tötung des Versuchstieres, Öffnung des Bauchraums und Entnahme des Herzens wurde ein Teil des terminalen Ileums vor dem Caecum entnommen. Um es nicht zu verletzen, musste darauf geachtet werden, keinen zu starken Druck oder Zug auszuüben. Das „obere“, dem Jejunum zugewandte Ende wurde mit einem Bindfaden markiert, um einer Verwechslung der beiden Enden des Stückes vorzubeugen. Die vor dem Caecum gelegenen Peyer'schen Plaques wurden entfernt und der Darm bis zur Präparation in der begasten Nährlösung aufbewahrt.

Für die Präparation unter dem Mikroskop in einer mit Kork ausgelegten Petrischale wurde vom caecal gelegenen Ende des Darms ein 0,5-1 cm großes Stück abgeschnitten und mit Präpariernadeln fixiert. Eventuell noch anhaftendes Mesenterium wurde mit Hilfe einer Federschere abgetrennt. Zur vollständigen Entfernung des Chymus und Reinigung des Darmlumens wurden die Stücke mit Nährlösung, unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette, gespült. Wichtig dabei war, dass das Darmstück weder verletzt noch überdehnt wurde. Anschließend wurde an jedem Darmende ein Silberdrahthäkchen befestigt. Am oberen Ende mit rotem Bindfaden, am unteren Ende mit schwarzem Bindfaden, um beim Einspannen in die Apparatur eine Verwechslung zu vermeiden.

Es musste darauf geachtet werden, dass das Lumen nicht abgebunden wurde, um ein gleichmäßiges Durchströmen der Substanz gewährleisten zu können. Bis zum Einspannen in die Apparatur wurde das Präparat in einer begasten Nährlösung aufbewahrt.

### **3.2.5 Isolierung der Aorta**

Für die Isolierung der Aorta wurde der Thorax aufgeschnitten, das Herz herausgenommen und die Aorta entlang des Rückgrades mit Pinzette und Schere abgetrennt.

Die Präparation erfolgte wieder in einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale unter dem Mikroskop. Das 2-3 cm lange Stück wurde mit Präpariernadeln am Kork fixiert und mittels Federschere von anhaftendem Fett- und Muskelgewebe befreit. Anschließend wurde die Aorta in 2-3 mm breite Ringe geschnitten, wobei diese wieder nicht zu stark gedehnt oder verletzt werden durften.

Bis zum Einspannen in die Versuchsapparatur wurden die Aortenstückchen in begaster Nährlösung aufbewahrt.

### 3.3 Physiologische Nährlösung / Tyrode

Die verwendete physiologische Nährlösung wurde nach Reiter (1976) hergestellt und entspricht einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Tab. 1: Tyrode für Darm, Aorta, Arteria pulmonalis, Vorhof und Papillarmuskel

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g / 5 l	33,60	114,90
KCl	50,33 g / 5 l	35	4,73
NaHCO <sub>3</sub>	125,00 g / 5 l	83,70	24,90
MgSO <sub>4</sub>	147,02 g / 5 l	3,20	1,18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62,00 g / 250 ml	1,18	1,18
CaCl <sub>2</sub>	34 g / 250 ml	1,18	3,20
Glucose	Reinsubstanz	1,98	10,00

Legende zu Tabelle 1:

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung, die für alle Versuche verwendet wurde. Sie musste an jedem Versuchstag frisch hergestellt werden:

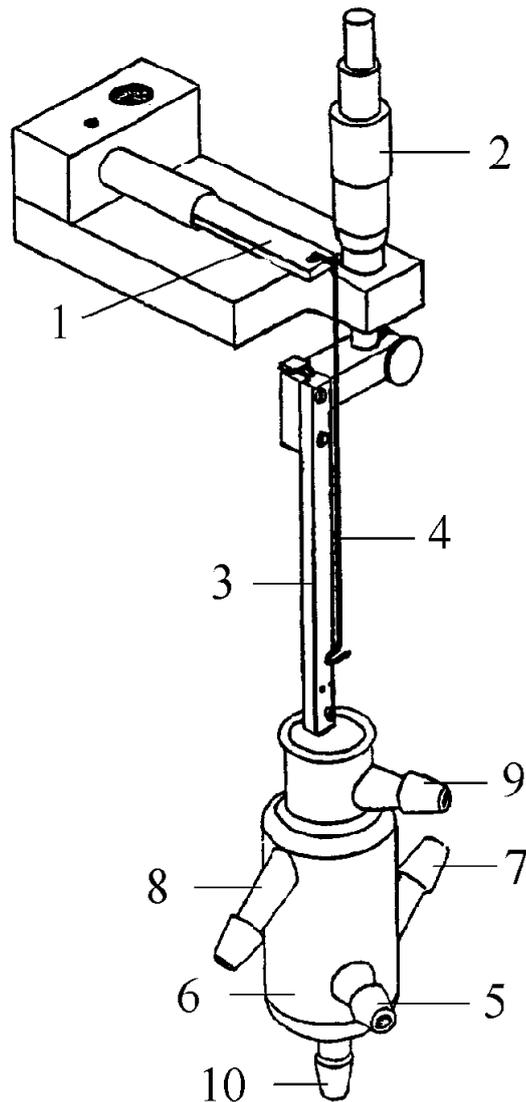
Dazu wurde die entsprechende Menge der Stocklösungen (außer CaCl<sub>2</sub>) mit Hilfe einer Pürette in einen Messkolben gefüllt und mit Aqua bidestillata auf ungefähr  $\frac{3}{4}$  des Endvolumens ergänzt. Nach einer zwanzigminütigen Begasung mit Oxymix (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) erfolgte die tropfenweise Zugabe von CaCl<sub>2</sub>. Diese musste langsam durchgeführt werden, um die Ausfällung schwerlöslicher Calciumsalze zu verhindern. Zuletzt wurde die Nährlösung mit Aqua bidestillata auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.

Die Organbäder wurden jeden Tag mit Aqua bidestillata gereinigt und mit der frisch bereiteten Nährlösung gefüllt.

### 3.4 Versuchsanordnung

#### 3.4.1 Versuchsapparatur

Abb. 3: Aufbau der Versuchsapparatur für Ileum, Aorta, Arteria pulmonalis und Vorhof

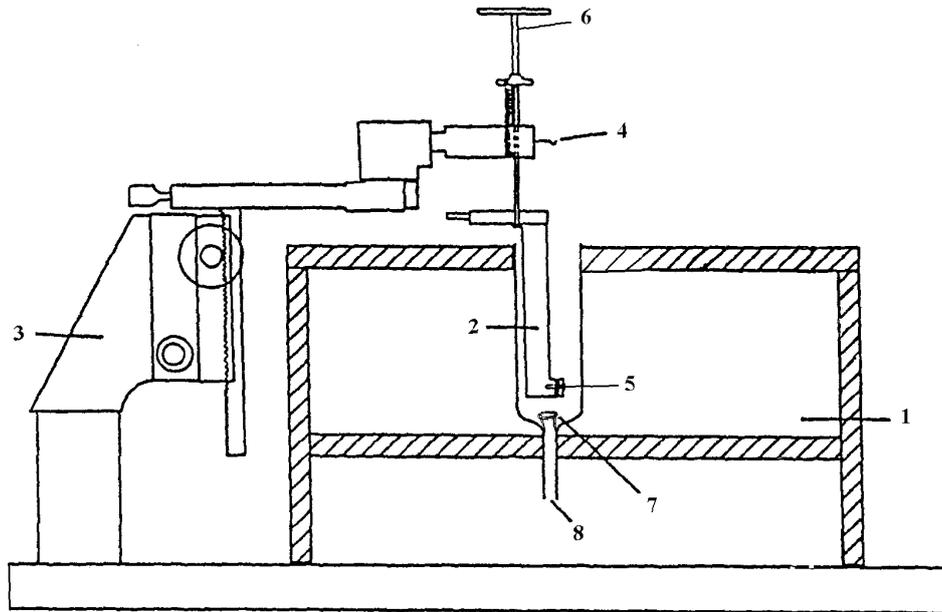


Legende zu Abbildung 3:

1. Kraftwandler
2. Mikrometer
3. Organhalterung
4. Aufhängevorrichtung
5. Gaszufuhr
6. Organbad
7. Zulauf Wasserbad
8. Ablauf Wasserbad
9. Zulauf Nährlösung
10. Ablauf Nährlösung

### 3.4.2 Apparatür für den Papillarmuskel

Abb. 4: Aufbau der Apparatür für den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 4:

1. Wasserbad
2. Organhalterung
3. Stativ
4. Aufhängevorrichtung Organ
5. Fixierung mit Elektrode
6. Feintrieb für Vorspannung
7. Muskelkammer
8. Gaszufuhr Fritte und Abfluss

Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung zur Messung der Kontraktionskraft elektrisch gereizter Papillarmuskeln.

Die Temperatur des Wasserbades (1) wurde mit Hilfe eines Thermostats konstant auf  $35\pm 1^\circ\text{C}$  (Herz) bzw.  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (alle anderen Organe) gehalten, um die physiologischen Bedingungen aufrecht zu erhalten. In dieses Bad wurde die Muskelkammer (7) eingetaucht, die je nach Versuch mit unterschiedlichen Kammervolumina (25 ml oder 8 ml) gefüllt worden war.

Die physiologische Nährlösung in der Muskelkammer wurde kontinuierlich mit Oxymix (95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) begast (8), um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr und den physiologischen pH-Wert zu gewährleisten.

Bei der Papillarmuskel-Apparatur wurde die Spülung bzw. der Wechsel der Nährlösung mit Hilfe einer Kunststoffspritze, an die ein Gummischlauch befestigt worden war, durchgeführt.

Bei den Organpräparaten, Darm und Vorhof musste an den befestigten Häkchen ein Silberdraht eingehängt werden, der die Verbindung zum Kraftwandler (Abb.3 (1)) darstellte.

Aorta und Arteria pulmonalis wurden ohne Silberdrahthäkchen direkt in die Apparatur eingespannt.

Der Papillarmuskel wurde an der Oberseite an einem Draht fixiert und mit dem freien Ende in die Organhalterung (2) zwischen zwei Plexiglasplättchen eingeklemmt, wobei der Muskel auf einer Platin-Kathode auflag.

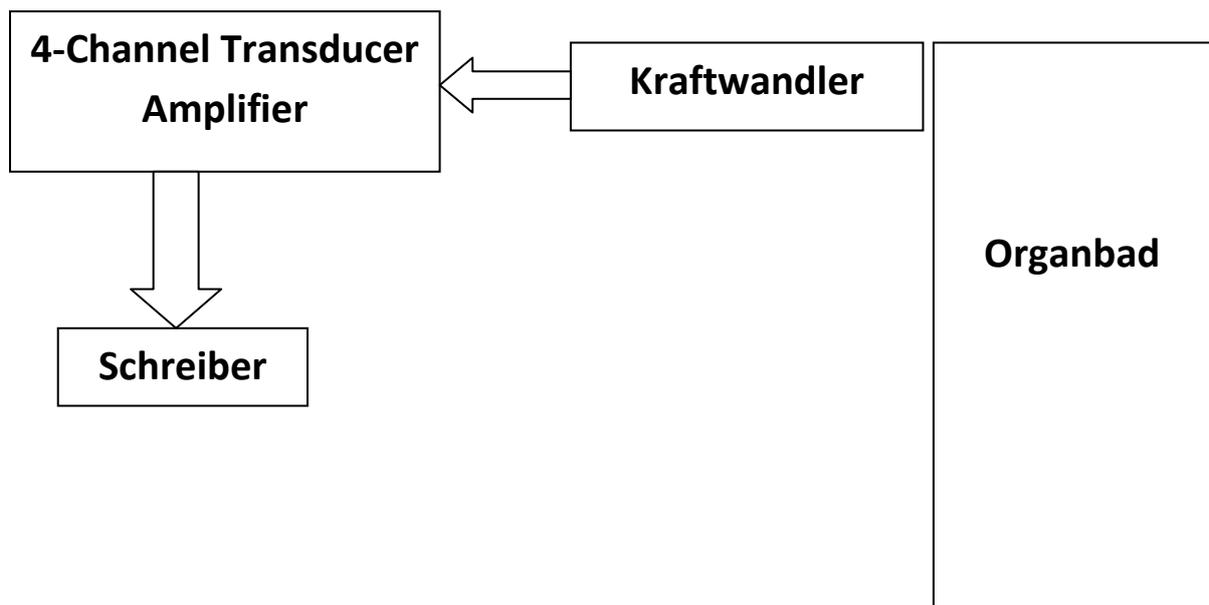
Das Einspannen hatte rasch zu erfolgen, um die Organe möglichst lange funktionsfähig halten zu können. Anschließend wurde die Organhalterung mittels Stativschlitten (Abb.4 (3)) in das Organbad abgesenkt, bis das Präparat vollständig in die Nährlösung eintauchte. Mittels Feintrieb konnte die nötige Vorspannung, die zur Entwicklung der maximalen Kontraktionskraft notwendig war, exakt geregelt werden.

Ein Kraftwandler (Abb. 3), der isometrische Kontraktionen in Stromimpulse transformierte und ein Verstärker (Transbridge<sup>TM</sup> 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) dienten zur Messung der Kraft. Dokumentiert wurden die Messungen mit einem Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

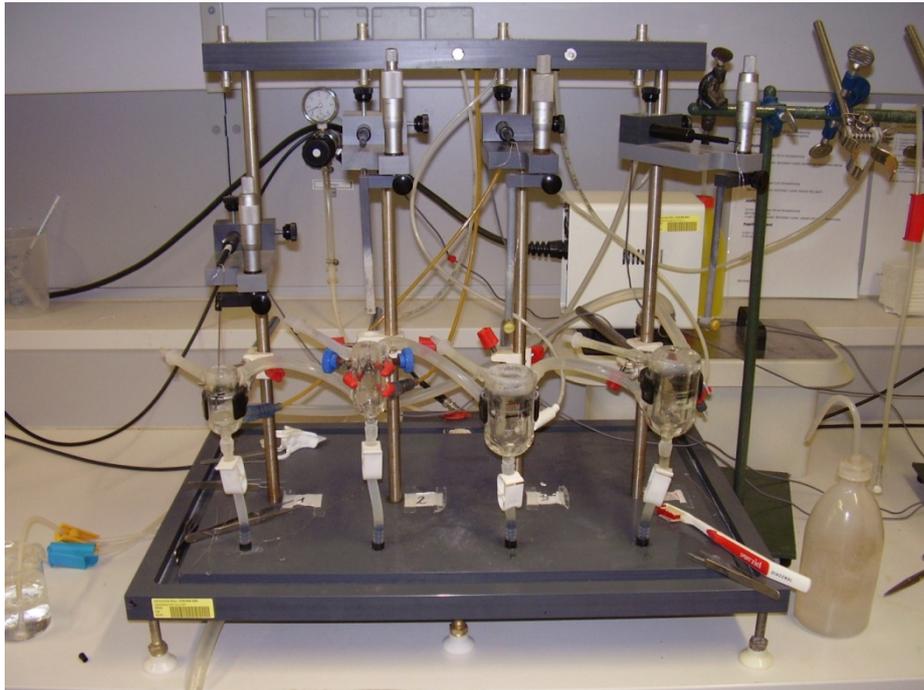
### 3.4.3 Schematische Darstellung des Kraftwandlers und seine Registrierung

Da die Kontraktion ein mechanischer Vorgang ist, wurde für die Umwandlung in eine elektrische Größe die Hilfe eines Wandlers, des sogenannten „Transducers“ benötigt (Widerstandswandler mit Dehnungsmessstreifen in Wheatstonescher Brückenschaltung vom Typ AE875; Firma Aksjeselskapet, Horten, Norwegen). Durch die Dehnung wurde der Widerstand des Messstreifens so verändert, dass Strom proportional dazu fließen konnte. Zwei sechs Volt Batterien (Varta spezial, No.430, EC 4R 25) lieferten die Exzitationsspannung für den Kraftwandler. Die durch die Muskelkontraktionen entstandenen Signale wurden durch den Amplifier verstärkt und vom Schreiber in Form von Kurven aufgezeichnet.

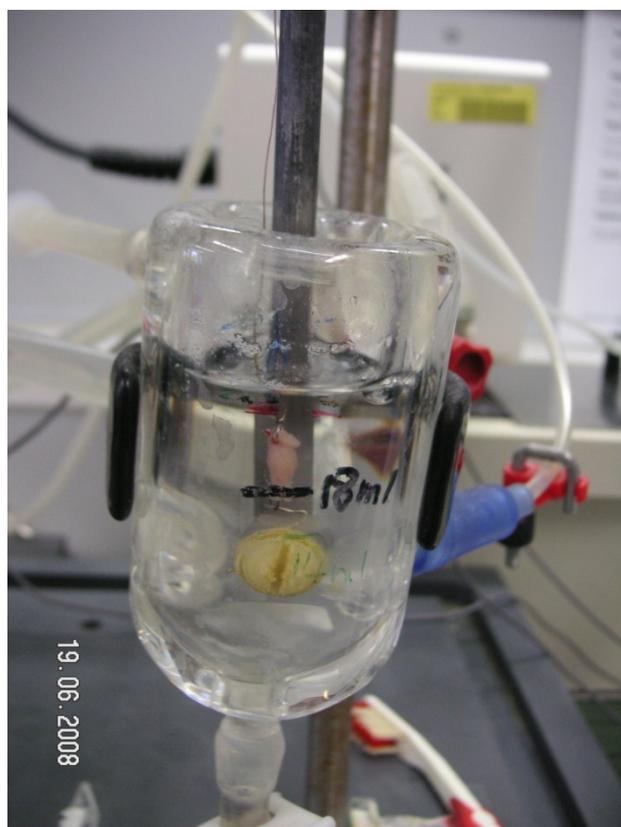
Abb. 5



3.4.4 **Abb.6: Originalabbildung einer Versuchsanordnung**



3.4.5 **Abb.7: Originalabbildung einer Organzelle**



### 3.4.6 Abb.8: Originalabbildung eines Amplifiers



## 3.5 Versuchsablauf

### 3.5.1 Untersuchung der Testsubstanz AST 32

#### 3.5.1.1 *Versuche am rechten Vorhof*

Nach der Präparation (Kapitel 3.2.1) wurde der Vorhof in die Versuchsapparatur eingespannt und in das temperierte Organbad abgesenkt. Um die maximale Kontraktion zu erreichen, wurde er mit 10,4 mN vorgespannt. Diese Kraft sollte konstant gehalten werden und daher war eine kontinuierliche Regulation des Feintriebs während des gesamten Versuchs notwendig. Zu Beginn war es wichtig, die Adaption des Organs an die physiologischen Bedingungen abzuwarten und zu beobachten, ab wann die Schlagfrequenz des Vorhofs annähernd konstant war (30-45min). Anschließend konnte mit der Kontrolle begonnen und alle zehn Minuten eine Aufzeichnung durchgeführt werden. Nach drei konstanten Werten wurde mit der Substanzzugabe mittels Kolbenhubpipette begonnen. Dabei musste darauf

geachtet werden, dass die Substanz immer an der selben Stelle, in Organnähe, eingespritzt wurde, ohne den Vorhof oder den Kraftwandler zu berühren. Die Messung der Schlagfrequenz erfolgte alle fünf Minuten. Nach je 45 min wurde kumulativ die nächste Konzentration zugegeben und wieder alle fünf Minuten aufgezeichnet.

### 3.5.1.2 *Versuche am Papillarmuskel*

Nachdem der eingespannte Papillarmuskel (Kapitel 3.2.2.) in das Organbad eingesenkt worden war, musste er mit 3,92 mN vorgespannt werden. Diese Spannung wurde auch während des Versuches immer wieder nachjustiert, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Um den Papillarmuskel zur Kontraktion anzuregen, musste er, anders als der Vorhof, der Spontanaktivität aufweist, permanent elektrisch gereizt werden. Die kontinuierliche Reizung erfolgte mit dem Gerät Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Isolator A360 (World Precision Instruments, Hamden, FL, USA) über Silberchloridelektroden.

Nach einer Anpassungszeit von 10 Minuten wurde mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Reizstromstärke, die 10% über der minimalen Reizschwelle lag, mit Rechteckimpulsen von  $3\text{ms}^{-1}$  gereizt. Um eine regelmäßige Kontraktion des Muskels zu gewährleisten, durfte die Stromstärke nur knapp über der minimalen Reizschwelle liegen. Bei einer zu hohen Stromstärke wäre es wahrscheinlich zu einer Entleerung der Katecholaminspeicher gekommen und dabei wären die Versuchsergebnisse verfälscht worden (Furchgot et al. 1959).

Während der ca. 45 Minuten andauernden Kontrollphase wurden alle fünf Minuten die Kontraktionen aufgezeichnet und die Amplituden auf Millimeterpapier abgemessen. Bei Erreichen einer konstanten Amplitude wurde mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz AST 32 begonnen und für die Dauer von fünf Kontraktionen alle fünf Minuten die Amplitude aufgezeichnet.

### 3.5.1.3 *Versuche am terminalen Ileum*

Nach Einspannen des terminalen Ileums in die Apparatur und Einsenkung in das Organbad wurde mit 4,9 mN vorgespannt und anschließend eine halbe Stunde zur Anpassung abgewartet. Danach wurde mit dem Feintrieb der Stellschraube auf die definierte Nulllinie nachjustiert und bei Konstanz der Bewegungen des Darms dieser mit einer 60 mM Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion angeregt. Für die Kaliumchloridlösung wurden 0,44 g KCl in 100 ml Tyrode gelöst. Die physiologische Nährlösung im Organbad wurde über einen Schlauchanschluss an der Unterseite durch Öffnen einer Klammer abgelassen und durch die Kaliumchloridlösung ersetzt. Um sofort wieder physiologische Bedingungen zu erreichen, war es wichtig, die neue Nährlösung zuvor am Wasserbad zu erwärmen.

Die Aufzeichnungen mittels Schreiber erfolgten bereits kurz vor dem Wechsel zur Kaliumchloridlösung. Nach der Zugabe der Kaliumchloridlösung kam es zu einer augenblicklichen Kontraktion des Darmstückes und nach ca. 45 Minuten, als die maximale Kontraktion (100%) erreicht war, bildete die Kurve ein Plateau aus. Nun wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen, wobei es wichtig war, darauf zu achten, dass beim Einspritzen weder das Organ, noch der Kraftwandler berührt wurden und die Substanz immer an der selben Stelle zugegeben wurde. Durch die Substanz wurde eine Kontraktionsabnahme bewirkt, die mittels Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet wurde. Im Abstand von 45 Minuten wurde jeweils die nächst höhere Konzentration zugegeben.

### 3.5.1.4 *Versuche an der Aorta*

Nachdem ein Aortenring zwischen zwei Silberdrahthäkchen in die Apparatur eingespannt worden war, wurde dieser in die temperierte Nährlösung eingetaucht und mit 19,6 mN Zug vorgespannt. Die Anpassungszeit dauerte etwa 45 Minuten. Anschließend wurde mit dem Feintrieb wieder auf die vorgegebene Nulllinie nachkorrigiert und die Nährlösung im Organbad durch eine 90 mM Kaliumchloridlösung (wie in Kapitel 3.5.1.3. beschrieben) ersetzt. Der Schreiber wurde bereits vor dem Wechsel der Nährlösung aktiviert. Sobald bei der Kontraktionskurve durch die Kaliumchloridlösung die 100%ige Kontraktion (das Plateau) erreicht war (90-120 min), konnte die erste Konzentration der Substanz zugegeben werden.

Nach je 45 Minuten wurde kumulativ die nächst höhere Konzentration zugesetzt. Eine eventuelle Abnahme der Kontraktion durch die zugespritzte Substanz wurde durch kontinuierliche Aufzeichnung einer Kurve erfasst.

#### 3.5.1.5 *Versuche an der Arteria pulmonalis*

Die Arteria pulmonalis wurde wie die Aorta zwischen zwei Silberdrahthäkchen in die Apparatur eingespannt, in das Organbad abgesenkt, und mit 9,81 mN vorgespannt. Nach einer Anpassungszeit von 30 Minuten wurden die Versuche analog zu denen der Aorta wie in Kapitel 3.5.1.4. beschrieben, durchgeführt.

#### 3.5.2 **Versuche der Testsubstanz AST 32 mit den Agonisten Glibenclamid, Nitro-L-Arginin, Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin am terminalen Ileum**

Die Darmstücke wurden wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben, präpariert und in die Apparatur eingespannt. Nach Absenkung in die temperierte Nährlösung wurde mit einer Kraft von 4,9 mN vorgespannt. Die Anpassungszeit dauerte etwa 30 Minuten, danach konnte mit der Kontrolle begonnen werden.

Für die Versuche wurde mit den Agonisten je eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt. So wurden bei Histamindihydrochlorid und Acetylcholinhydrochlorid die Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  verwendet, bei Phenylephrin die Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3 und zusätzlich die Stammlösung mit 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Glibenclamid wurde in den Konzentrationen 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  getestet, Nitro-L-Arginin nur in einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ .

Die entsprechenden Einwaagen wurden für ein 17 ml Organbad berechnet.

Zu Beginn wurde die niedrigste Konzentration des Agonisten der Nährlösung zugegeben und die Wirkung auf den Darm für 30 Sekunden mittels Schreiber erfasst. Nach jeweils zehn Minuten Ruhephase wurde die nächst höhere Konzentration des Agonisten injiziert, um den

Einfluss auf die Kontraktilität des Ileums aufzuzeichnen. Zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen wurde die Nährlösung abgelassen, um das Organbad zwei Mal mit Tyrode zu spülen und anschließend wieder auf das gleiche Volumen aufzufüllen.

Durch die Versuche mit den reinen Agonisten konnten für jede Konzentration Kontrollwerte ermittelt werden, die zur nachträglichen Auswertung der Ergebnisse mit der AST 32 bestimmt waren.

Für den eigentlichen Versuch mit der Testsubstanz wurde der Nährlösung eine bestimmte Konzentration AST 32 zugesetzt. Nach einer 45-minütigen Einwirkzeit erfolgte die Zugabe der Agonisten in den verschiedenen Konzentrationen wie oben beschrieben.

Bei allen Versuchen wurde die Substanz AST 32 in der Konzentration 30  $\mu\text{mol/l}$  verwendet.

Der Ablauf des Versuches bestand somit aus drei Phasen:

- Kontrollphase
- Einwirkphase mit Tyrode und Agonist
- Auswaschphase

Der Zyklus verlief im Rhythmus von zehn Minuten und wurde mit Hilfe einer Stoppuhr genau eingehalten. Außerdem musste wieder darauf geachtet werden, dass die Agonisten immer an der selben Stelle und mit der gleichen Einspritzgeschwindigkeit zugegeben wurden. Während der Einwirkzeit wurden die Kontraktionen mit dem Schreiber aufgezeichnet.

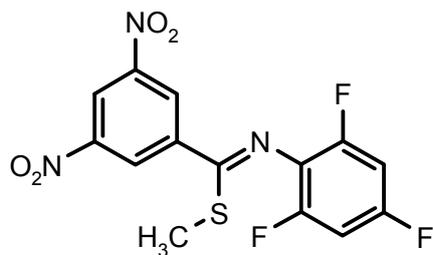
### 3.6 Verwendete Substanz

Für diese Arbeit wurde die Substanz AST 32 an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Sie wurde am Department für Pharmazeutische Chemie synthetisiert und von Herrn Univ. Prof. Dr. Erker zur Verfügung gestellt.

Die Substanz wurde jeden Tag frisch in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Das Kammervolumen des Organbades betrug 25 ml, weshalb eine Einwaage gewählt werden musste, bei der durch kumulative Substanzzugabe maximal eine Badkonzentration von 100 µmol/l erreicht werden konnte.

Als Badkonzentrationen wurden 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l getestet, wobei kumulativ die Volumina 1; 2; 7; 20 und 70 µl mit einer Kolbenhubpipette injiziert wurden. Die Substanzzugabe erfolgte alle 45 Minuten. Bei jeder Konzentration wurde ein Plateau erreicht („steady state Bedingungen“).

Abb. 9: Strukturformel von AST 32

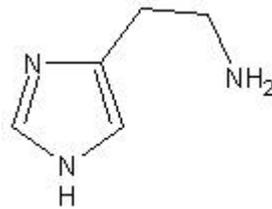


3,5-Dinitro-*N*-(2,4,6-trifluorophenyl)-thiobenzimidic acid methyl ester

## 3.7 Verwendete Agonisten

### 3.7.1 Histamin

Abb. 10: Histamin (MG = 111,15 g/mol)



Das biogene Amin Histamin kommt in Pflanzen, Tieren und im menschlichen Organismus vor. Es ist in allen Geweben vorhanden, vor allem aber in Lunge, Haut und Magen-Darm-Trakt.

Histamin entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Histidin, wird in Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert und bei Zerstörung dieser Zellen freigesetzt. Es fungiert als wichtiger Mediator und Neurotransmitter und ist genauso wie Serotonin, Prostaglandine, Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostacyclin, Leukotriene, lysosomale Enzyme und Komplementfaktoren am Entzündungsgeschehen beteiligt.

Die Histaminfreisetzung erfolgt entweder durch endogene Stimuli oder Verletzungen, Traumen und Toxine, Antibiotika, Alkaloide, Polypeptide, Opiode, Tubocurarin und Barbiturate. Histamin bindet an drei verschiedenen Rezeptoren: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> und H<sub>3</sub>. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Die Stimulierung von H<sub>1</sub>-Rezeptoren bewirkt über eine Aktivierung der Phospholipase C eine starke Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. In weiterer Folge kommt es durch Aktivierung einer NO-Synthase im Endothel zur Vasodilatation mit Blutdruckabfall und Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Diese beiden Faktoren tragen wesentlich zur Entwicklung des anaphylaktischen Schocks bei.

Andere H<sub>1</sub>-vermittelte Reaktionen sind die erleichterte Leukozytenmigration, die Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und Darm und die Stimulation afferenter Neurone, die für den Juckreiz bei allergischen Reaktionen verantwortlich sind.

H<sub>1</sub>-Rezeptoren sind auch im Gehirn zu finden und regeln dort den Wachzustand und die Nahrungsaufnahme. Histamin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, und muss daher in den Zellkörpern des hinteren Hypothalamus eigens aus der Aminosäure L-Histidin synthetisiert werden. Diese gelangt über einen aktiven Transportmechanismus ins ZNS.

Die Interaktion von Histamin mit H<sub>2</sub>-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und zum Anstieg von cyclischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat (cAMP). Die Folgen sind: Vasodilatation, Steigerung von Herzfrequenz und Kontraktionskraft und vermehrte Drüsensekretion vor allem im Magen. Außerdem kommt es zur Blockade des Immunsystems durch Hemmung der T-Zell-Proliferation, Antikörper- und Zytokinfreisetzung.

Bei den H<sub>3</sub>-Rezeptoren handelt es sich um „Autorezeptoren“. Sie sind präsynaptisch lokalisiert und hemmen über einen negativen Feedback-Mechanismus die Histamin-Synthese und -Freisetzung.

Histamin wird nach seiner Freisetzung sehr rasch durch oxidative Desaminierung über eine Histaminase oder auch durch Methylierung der NH-Gruppe im Imidazolring und durch Oxidation der gebildeten Metaboliten, durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO) zu Imidazoly- und Methylimidazolylessigsäure abgebaut (Mutschler et al. 2001).

#### 3.7.1.1 *Pathophysiologische Bedeutung von Histamin*

Histamin spielt eine wesentliche Rolle bei der allergischen Reaktion vom Soforttyp. Wie auch bei Entzündungen und Verbrennungen kommt es zu einer Degranulierung von Mastzellen. Die erhöhte Histaminkonzentration im Blut ruft dann, wie oben beschrieben, einen anaphylaktischen Schock, Urtikaria oder ein Quincke-Ödem hervor.

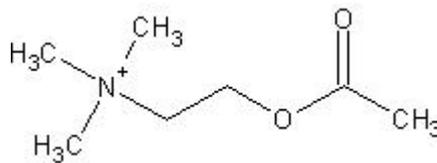
Die typisch histaminergen Symptome wie Flush, Urtikaria, Ödeme und Bronchospasmus treten somit auch bei Mastzell-Tumoren (Mastozytom) und Erhöhung der Mastzellen in Blut und Gewebe (Mastozytose) auf (Mutschler et al. 2001).

### 3.7.1.2 *Therapeutische Bedeutung von Histamin*

Histamin besitzt keine therapeutische Bedeutung. Es dient jedoch als Positivkontrolle bei Allergietests an der Haut (Mutschler et al. 2001).

### 3.7.2 **Acetylcholin**

Abb. 11: Acetylcholin (MG = 146,12 g/mol)



Acetylcholin zählt zu den wichtigsten Neurotransmittern des Nervensystems. Es dient der parasympathischen Erregungsübertragung, vermittelt Effekte auf das vegetative Nervensystem und das Darmnervensystem. Die Biosynthese von Acetylcholin erfolgt über die Cholin-Acetyltransferase aus Cholin und Acetyl-Coenzym A im Zytoplasma cholinergischer Nervenendigungen. Zur Speicherung wird es in Vesikel verpackt und kann bei Erregung rasch in den synaptischen Spalt abgegeben werden. Es gibt unterschiedliche Rezeptoren für Acetylcholin: Bei den Nicotin-Rezeptoren bzw. n-Cholinorezeptoren handelt es sich um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Sie befinden sich in ZNS, vegetativen Ganglien und an der neuromuskulären Endplatte. Muskarin-Rezeptoren oder m-Cholinorezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Sie können unterteilt werden in M<sub>1</sub>-, M<sub>2</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren. Auch M<sub>5</sub>-Rezeptoren wurden gefunden, deren physiologische Bedeutung allerdings noch unklar ist.

M<sub>1</sub>-Rezeptoren kommen hauptsächlich in ZNS und Ganglien vor, M<sub>2</sub>-Rezeptoren am Herzen, M<sub>3</sub>-Rezeptoren an der glatten Muskulatur und an exokrinen Drüsen, M<sub>4</sub>-Rezeptoren in Vorderhirn, Hippocampus und Striatum und M<sub>5</sub>-Rezeptoren im ZNS. Muskarin-Rezeptoren

sind sowohl an der post- als auch an der präsynaptischen Membran zu finden. Durch Bindung an die präsynaptische Membran wird rückkoppelnd die überschießende Freisetzung von Acetylcholin blockiert (negative Feedback-Hemmung).

Nach der Abgabe von Acetylcholin in den synaptischen Spalt erfolgt die Inaktivierung sehr rasch über das Enzym Acetylcholinesterase, das sowohl an der prä-, als auch an der postsynaptischen Membran lokalisiert ist. Es spaltet Acetylcholin zu unwirksamem Cholin und Essigsäure (Mutschler et al. 2001).

### 3.7.2.1 *Die physiologischen Wirkungen von Acetylcholin*

Durch Bindung von Acetylcholin an seine Rezeptoren kommt es zur Änderung der Membranpermeabilität für bestimmte Ionen. So wird die Permeabilität für Natriumionen an glatten Muskeln, Ganglienzellen und der motorischen Endplatte erhöht, und es kommt in weiterer Folge zu einer Depolarisation. An den Schrittmacherzellen des Herzens führt eine Erhöhung der Kalium-Permeabilität zu einer Hyperpolarisation mit Abnahme der Herzfrequenz. Die Drüsensekretion wird über den vermehrten Einstrom von Calcium verstärkt.

Zur Gefäßerschaffung kommt es durch verstärkte Freisetzung von NO aus intaktem Gefäßendothel.

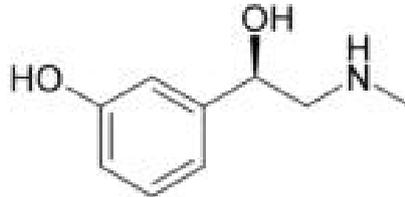
Nach intravenöser Acetylcholin Applikation kommt es zu sehr kurz andauernden Wirkungen:

- Die Herzfrequenz sinkt.
- Der periphere Gefäßwiderstand nimmt ab,
- Speichel-, Magensaft-, Bronchial- und Schweißsekretion werden gesteigert.
- Der Tonus der glatten Muskulatur in Magen-Darm-Trakt, ableitenden Harnwegen und der Bronchialmuskulatur nimmt zu.
- Die Pupille wird verengt und
- Das Auge auf den Nahpunkt akkommodiert.

(Mutschler et. al 2001)

### 3.7.3 Phenylephrin

Abb. 12: Phenylephrin (MG = 167,207 g/mol)



Bei Phenylephrin handelt es sich um einen  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Agonisten ( $\alpha$ -Sympathomimetikum), der zur lokalen Vasokonstriktion eingesetzt wird.

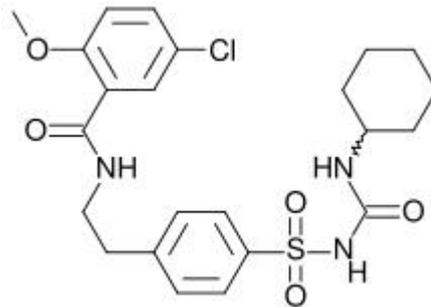
#### 3.7.3.1 *Therapeutische Anwendung von Phenylephrin:*

→ Lokal zur Schleimhautabschwellung bei unspezifischer und allergischer Konjunktivitis, Sinusitis und Nasopharyngitis (Mutschler et. al 2001)

Dabei muss beachtet werden, dass es durch Resorption zu Atemstörungen und komatösen Zuständen kommen kann. Auch Tachykardie, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, pectanginöse Zustände und Miktionsstörungen sind möglich (Mutschler et al. 2001).

### 3.7.4 Glibenclamid

Abb. 13: Glibenclamid (MG = 494,0 g/mol)



Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoff-Derivat, das heute auf Grund seiner blutzuckersenkenden Wirkung als orales Antidiabetikum bei Diabetes Typ II Patienten eingesetzt wird. Es blockiert ATP-abhängige Kalium Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und führt dadurch zu einer Depolarisation der Membran. In weiterer Folge kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Die Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt eine vermehrte Exozytose von Insulin.

Bei der Gabe von Glibenclamid besteht die Gefahr von Hypoglykämien. Darüber hinaus kann es zu gastrointestinalen Beschwerden, allergischen Reaktionen und in seltenen Fällen Leukopenie und Thrombozytopenie kommen (Mutschler et al. 2001).

### 3.7.5 Nitro-L-Arginin

Nitro-L-Arginin wird als NO-Antagonist eingesetzt. NO (Stickstoffmonoxid) kann auch noch als „Endothelium Derived Relaxing Factor“ bezeichnet werden, da es, vom Endothel freigesetzt, entspannend auf den Gefäßtonus wirkt.

NO aktiviert über eine cytosolische Guanylatcyclase die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration und in Folge dessen zu einer relaxierenden Wirkung auf die Gefäße (Rosemann 2002).

Wird durch Nitro-L-Arginin die NO-Synthase gehemmt, sinkt die Konzentration von Stickstoffmonoxid und die gesamte Kaskade über die Aktivierung der Guanylatcyclase wird unterbrochen.

Versuchsreihen an Tieren haben belegt, dass Nitro-L-Arginin über den oben beschriebenen Mechanismus die Kontraktilität des Darms deutlich steigert (Rosemann 2002).

### 3.8 Messgrößen und Statistik

Zur Auswertung der Versuche an Aorta, terminalem Ileum und Arteria pulmonalis wurden in der Kontraktionskurve die Punkte markiert, an denen die entsprechende Konzentration der Substanz zugegeben worden war. Durch Abmessung wurden nun die Abstände in cm zwischen den einzelnen Punkten und der Nulllinie ermittelt und mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert: Bei 5 mV entsprach 1 cm 0,98 mN.

Um die Kontraktionskraft des Papillarmuskels in mN zu bestimmen, wurde die Amplitude mit dem Lineal abgemessen und der in cm erhaltene Wert wieder mit dem Faktor der Kalibration des Kraftwandlers multipliziert.

Bei den Aufzeichnungen des rechten Vorhofs wurden Änderungen in der spontanen Schlagfrequenz ermittelt. Der Schreiber registrierte am Millimeterpapier jeweils die Anzahl der Schläge über eine Dauer von zwölf Sekunden. Dies entsprach bei einem Papiervorschub von 5 mm/sek. einer Aufzeichnungsstrecke von sechs Zentimetern. Um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten, wurden die Schläge dieser Strecke abgezählt und mit dem Faktor fünf multipliziert.

Zur prozentuellen Bestimmung der Abnahme der Schlagfrequenz bzw. Kontraktionskraft wurde ein Kontrollwert herangezogen. Dieser wurde als 100%-Wert definiert und entsprach dem Mittelwert jener Werte, bei denen am Ende der Plateauphase, kurz vor der ersten Substanzzugabe, „steady-state Bedingungen“ herrschten.

Die Messdaten wurden aus einer Anzahl von „n“ Versuchen als arithmetische Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM) graphisch dargestellt. Mit Hilfe der erhaltenen Dosis-Wirkungskurve konnte nun die  $EC_{50}$  bestimmt werden. Die  $EC_{50}$  ist jene Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$ , bei der die Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes absinkt.

Die Signifikanz der Messergebnisse wurde mit dem „ungepaarten Student-t-Test“ beurteilt. Dabei wurden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<5\%$  ( $P<0,05$ ) bzw.  $<1\%$  ( $P<0,01$ ) als signifikant eingestuft und solche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<0,1\%$  ( $P<0,001$ ) als hochsignifikant.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen die Wirkung von AST 32 auf die einzelnen isolierten Organe der Meerschweinchen.

### 4.1 Wirkung von AST 32 auf das terminale Ileum

Wie in Kapitel 3.5.1.3. beschrieben wurde die Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums an fünf Präparaten untersucht. Zur Vorkontraktion wurde der Darm mit einer 60 mM Kaliumchlorid-Lösung versetzt, anschließend AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  zugegeben und getestet. Der zeitliche Abstand zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen betrug 45 Minuten.

Die Testsubstanz führte zu einer eindeutigen Relaxation der glatten Muskulatur des terminalen Ileums. Anhand der Kontrolle wurde der Mittelwert aus fünf Versuchen mit  $13,48 \pm 1,18 \text{ mN}$  definiert und als 100% festgelegt. Ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  war eine deutliche Abnahme der Kontraktion ersichtlich und diese erwies sich auch als statistisch signifikant. Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei einer Konzentration von 28  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

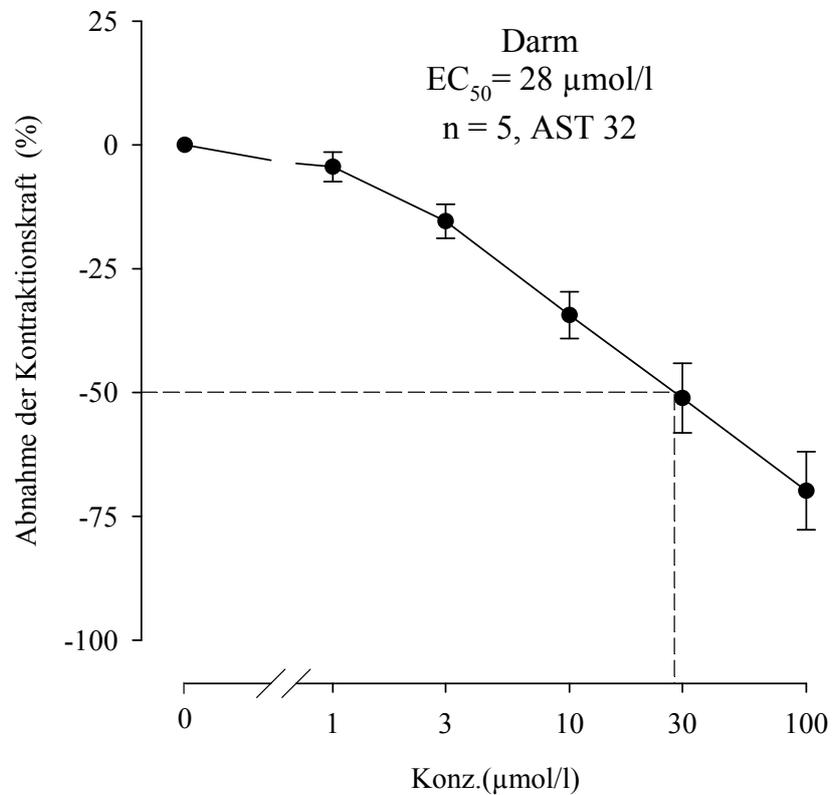
Tab. 2: Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

AST 32 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	$13,48 \pm 1,18$	$0,00 \pm 0,00$	5	--
<b>1</b>	$12,87 \pm 1,19$	$-4,42 \pm 2,98$	5	n.s.
<b>3</b>	$11,43 \pm 1,21$	$-15,42 \pm 3,42$	5	0,01
<b>10</b>	$8,83 \pm 1,03$	$-34,35 \pm 4,72$	5	0,001
<b>30</b>	$4,32 \pm 0,54$	$-51,13 \pm 7,02$	5	0,001
<b>100</b>	$3,74 \pm 0,68$	$-69,84 \pm 7,88$	5	0,001

Legende zu Tabelle 2:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardfehler (SEM) aus fünf Versuchen.

Abb. 14: Konzentrations-Wirkungskurve von AST 32 am terminalen Ileum

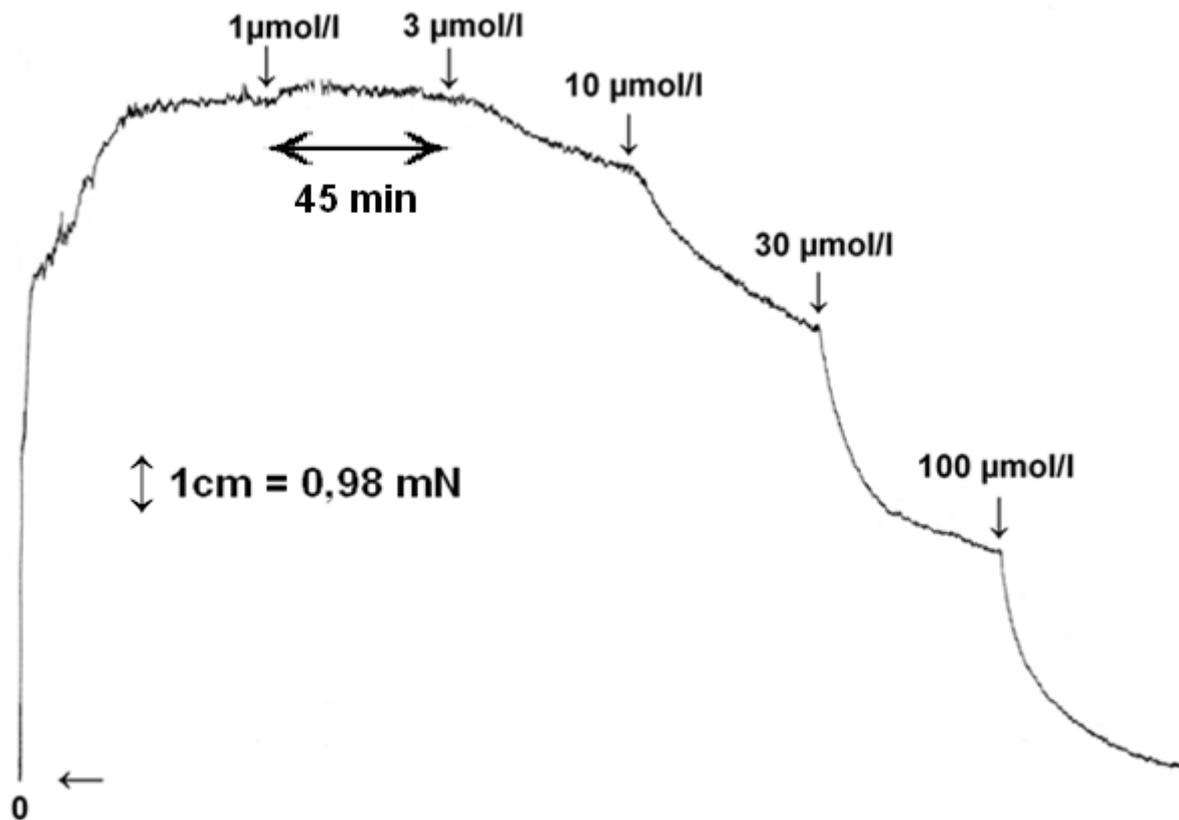


Legende zu Abbildung 14:

Abbildung 14 zeigt die Kontraktionsabnahme des terminalen Ileums nach der kumulativen Zugabe von AST 32. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von AST 32 in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte, die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar. Die  $EC_{50}$  wurde graphisch ermittelt.

Abb. 15: Originalaufzeichnung der Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums:



Legende zu Abbildung 15:

Abbildung 15 zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter Einwirkung von AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l. Der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

## 4.2 Wirkung von AST 32 auf die isolierte Aorta

Die Wirkung von AST 32 auf die Aorta wurde in sechs Versuchen ermittelt. Zum Vorkontrahieren des Organs wurde eine Kaliumchloridlösung (90 mM) zugegeben und anschließend die Testsubstanz in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  im Abstand von 45 Minuten injiziert. Mittels Schreiber wurde der Einfluss auf die Kontraktion der Aorta als Kurve aufgezeichnet.

Am Ende der Kontrollphase wurde als Mittelwert von sechs Versuchen eine Kontraktionskraft von  $9,11 \pm 1,21$  mN ermittelt. Durch Zugabe von AST 32 nahm die Kontraktionskraft kaum ab. Es wurde keine  $EC_{50}$  erreicht.

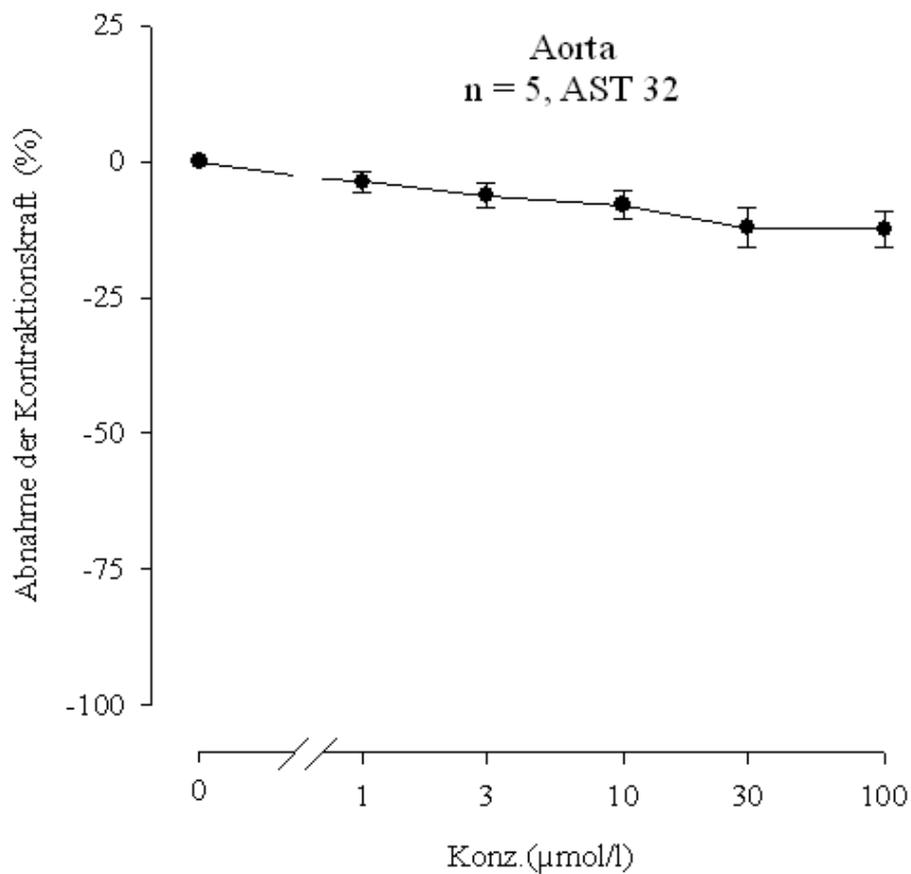
Tab 3: Wirkung von AST 32 auf die Aorta

AST 32 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	$9,11 \pm 1,21$	$0,00 \pm 0,00$	5	--
<b>1</b>	$8,79 \pm 1,19$	$-3,69 \pm 1,99$	5	n.s.
<b>3</b>	$8,56 \pm 1,19$	$-6,28 \pm 2,26$	5	0,05
<b>10</b>	$8,49 \pm 1,33$	$-8,02 \pm 2,51$	5	0,05
<b>30</b>	$8,07 \pm 1,19$	$-12,13 \pm 3,79$	5	0,05
<b>100</b>	$8,0 \pm 1,13$	$-12,46 \pm 3,35$	5	0,05

Legende zu Tabelle 3:

In der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) mit ihrem Standardfehler (SEM) aus sechs Versuchen angegeben. Die Werte wurden sowohl in Prozent als auch in mN berechnet und beziehen sich immer auf die Kontrolle.

Abb. 16: Konzentrations-Wirkungskurve von AST 32 an der Aorta

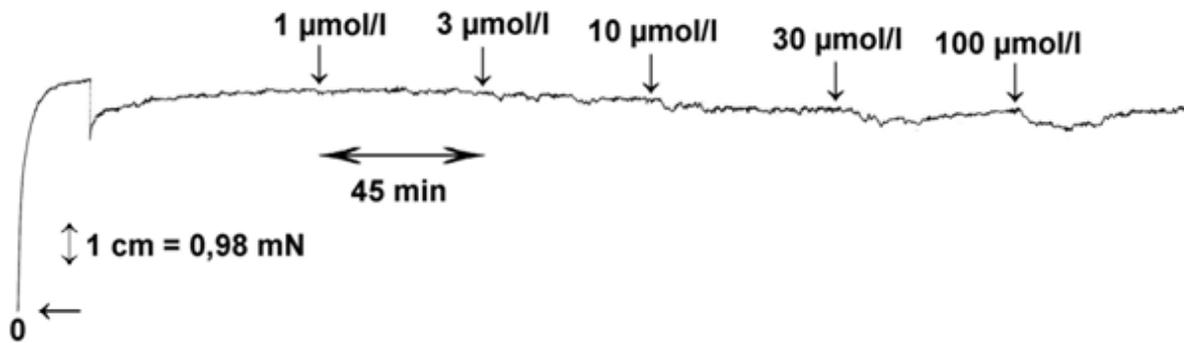


Legende zu Abbildung 16:

Abbildung 16 zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft nach der kumulativen Zugabe von AST 32. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von AST 32 in µmol/l aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte, die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Abb. 17: Originalaufzeichnung der Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta:



Legende zu Abbildung 17:

Abbildung 17 zeigt die leichte Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta unter Einwirkung von AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l. Der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

### 4.3 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 an der Arteria pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft der Arteria Pulmonalis wurde an sechs isolierten Präparaten getestet. Die Substanzzugabe erfolgte alle 45 Minuten. Es wurden die Konzentrationen 1; 3; 10; 30; und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. Als Kontrollwert wurde der Mittelwert aus sechs Versuchen mit  $16,10 \pm 2,16 \mu\text{mol/l}$  berechnet und als 100% definiert. Durch Zugabe der Testsubstanz AST 32 nahm die Kontraktion kontinuierlich ab bis zu einem Endwert von  $7,36 \pm 2,14 \text{ mN}$ .

Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei einer Konzentration von 58  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

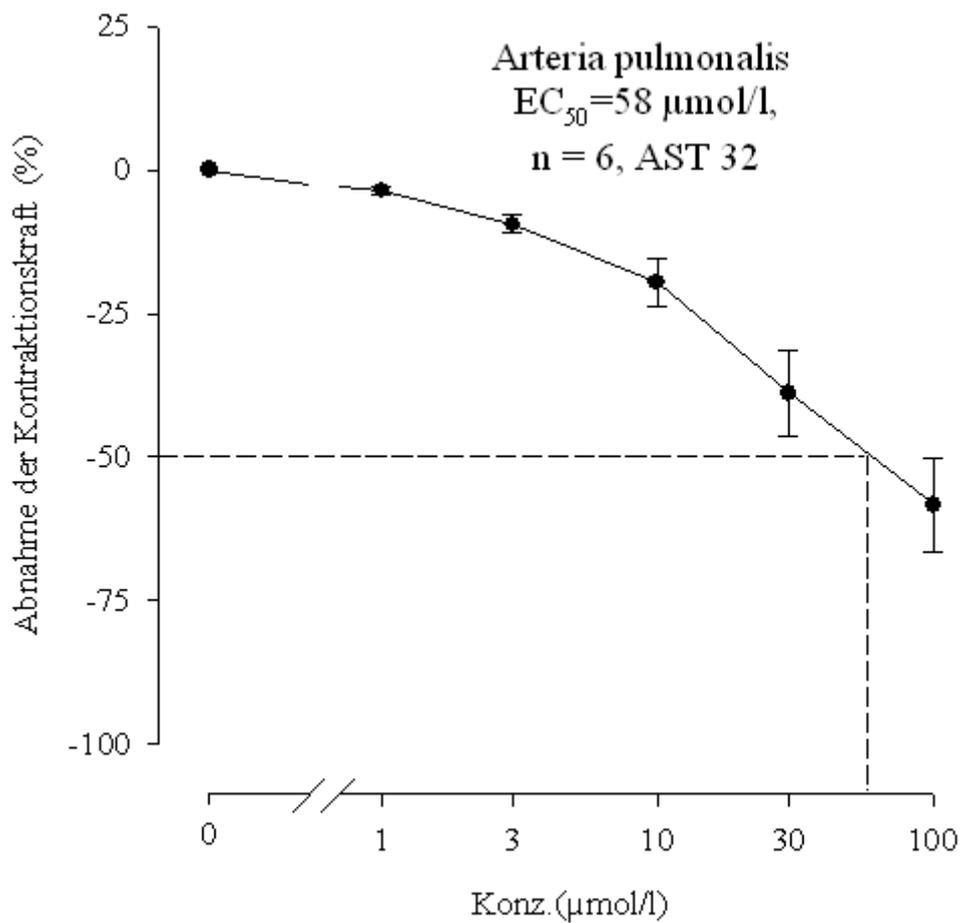
Tab. 4: Wirkung von AST 32 auf die Arteria pulmonalis

AST 32 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	$16,10 \pm 2,16$	$0,00 \pm 0,00$	6	--
<b>1</b>	$15,48 \pm 1,97$	$-3,60 \pm 0,81$	6	n.s.
<b>3</b>	$14,54 \pm 1,87$	$-9,49 \pm 1,57$	6	0,001
<b>10</b>	$13,02 \pm 1,85$	$-19,60 \pm 4,04$	6	0,001
<b>30</b>	$10,32 \pm 2,16$	$-38,85 \pm 7,51$	6	0,001
<b>100</b>	$7,36 \pm 2,14$	$-58,34 \pm 8,22$	6	0,001

Legende zu Tabelle 4:

Die Tabelle zeigt die Wirkung von AST 32 auf die Arteria Pulmonalis. Es wurden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) mit Standardabweichung (SEM) in mN und Prozent berechnet.

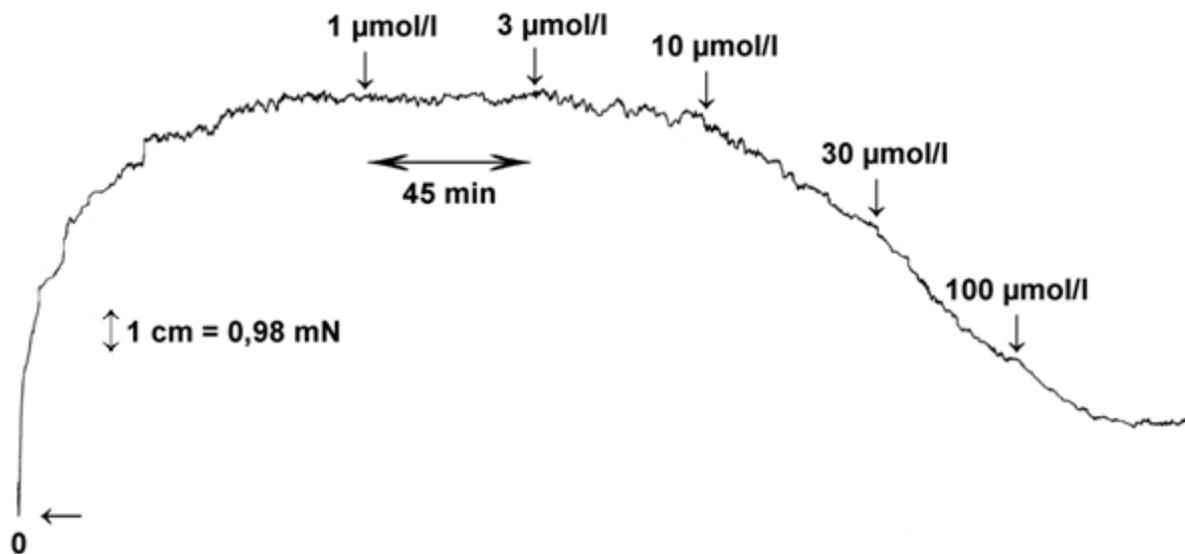
Abb. 18: Konzentrations-Wirkungskurve von AST 32 an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 18:

Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis nach der kumulativen Zugabe von AST 32. Dabei wurden auf der Abszisse die Konzentrationen der Testsubstanz AST 32 in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die Balken deren Standardfehler. Die  $EC_{50}$  wurde graphisch ermittelt.

Abb. 19: Originalaufzeichnung der Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 19:

Mit dem Schreiber wurde die Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis durch kumulative Zugabe der Testsubstanz AST 32 aufgezeichnet. Untersucht wurden die Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol. Die Pfeile markieren die Substanzzugabe, die zeitlichen Abstände zwischen den Substanzzugaben betragen jeweils 45 Minuten.

#### 4.4 Wirkung von AST 32 auf den Musculus papillaris

Es wurden sieben isolierte Präparate zur Untersuchung der Wirkung von AST 32 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels verwendet. In einem Zeitabstand von 45 Minuten wurde die Testsubstanz AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  an dem isolierten Organ untersucht.

Der Mittelwert wurde aus sieben Versuchen mit  $1,37 \pm 0,18$  mN ermittelt und als Kontrollwert (100%) festgelegt. Durch die Zugabe der Testsubstanz AST 32 kam es zu einer leichten Zunahme der Kontraktionskraft, einer schwach inotropen Wirkung. Die Ergebnisse wiesen aber weder Signifikanz auf, noch gab es eine  $\text{EC}_{50}$ .

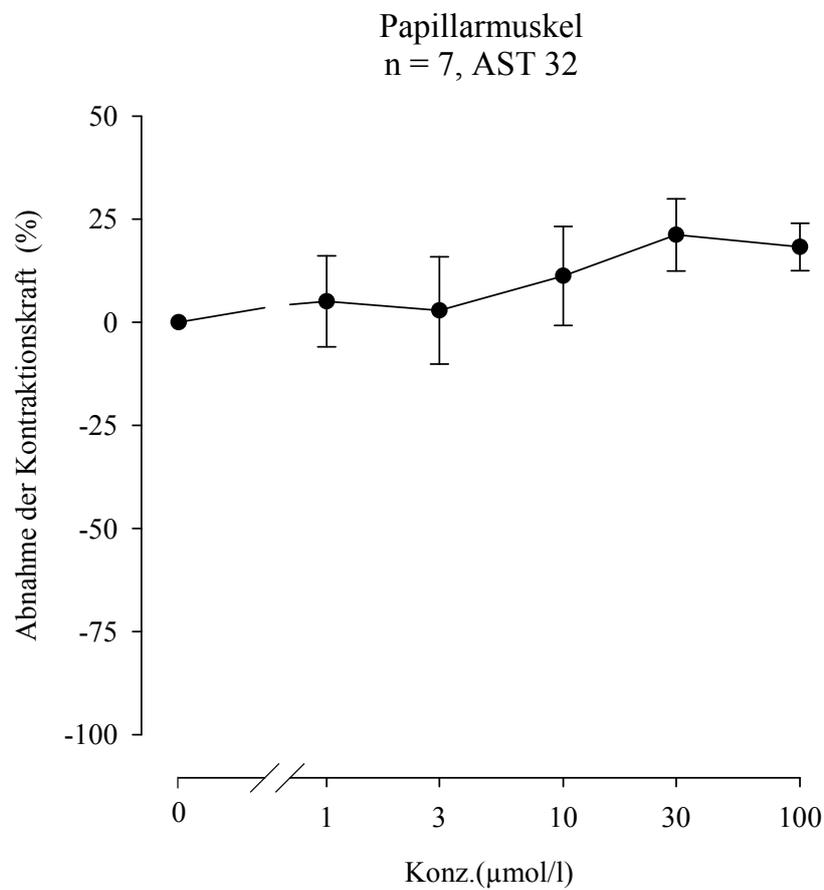
Tab. 5: Wirkung von AST 32 auf den Papillarmuskel

AST 32 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	$1,37 \pm 0,18$	$0,00 \pm 0,00$	7	--
<b>1</b>	$1,40 \pm 0,18$	$5,07 \pm 11,02$	7	n.s.
<b>3</b>	$1,33 \pm 0,13$	$2,85 \pm 13,00$	7	n.s.
<b>10</b>	$1,45 \pm 0,15$	$11,22 \pm 11,99$	7	n.s.
<b>30</b>	$1,64 \pm 0,22$	$21,17 \pm 8,73$	7	0,05
<b>100</b>	$1,59 \pm 0,18$	$18,26 \pm 5,74$	7	0,05

Legende zu Tabelle 5:

Tabelle 5 enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ), sowie deren Standardfehler (SEM) in mN und Prozent, ermittelt aus sieben Versuchen.

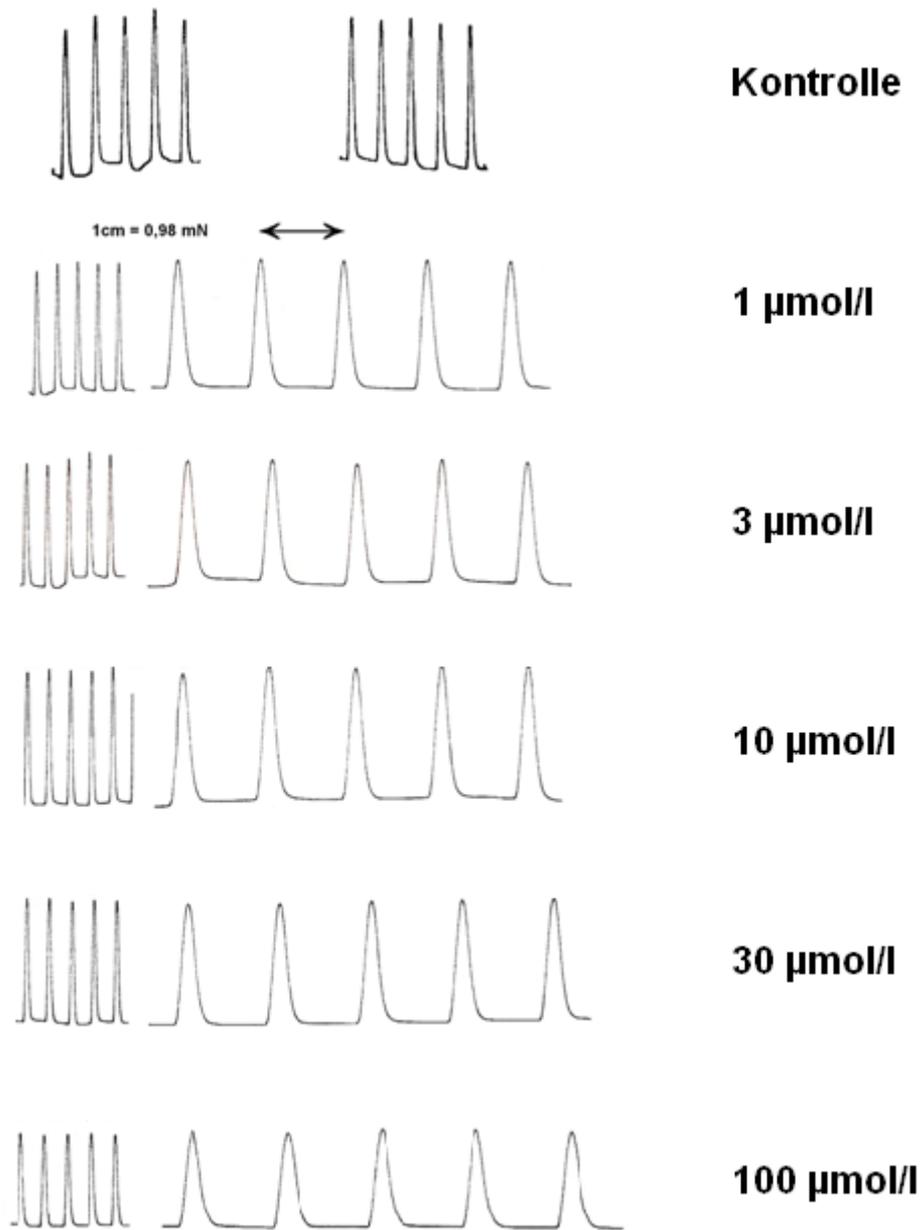
Abb. 20: Konzentrations-Wirkungskurve von AST 32 an isolierten Papillarmuskeln



Legende zu Abbildung 20:

Der Graph in Abbildung 20 zeigt die Änderung der Kontraktionskraft am isolierten Papillarmuskel nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz AST 32. Die Konzentrationen der Testsubstanz wurden auf der Abszisse aufgetragen, die Kontraktionsabnahme in Prozent auf der Ordinate. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte aus sieben Versuchen, die Balken deren Standardabweichungen.

Abb. 21: Originalaufzeichnung des Einflusses von AST 32 auf die Kontraktionskraft des isolierten Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 21:

Abbildung 21 zeigt die Aufzeichnungen des Schreibers nach der Zugabe der Testsubstanz AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l. Der Abstand zwischen den einzelnen Konzentrationen betrug 45 Minuten. Der Einfluss von AST 32 lässt sich an der zunächst leichten Vergrößerung der Amplitude erkennen.

#### 4.5 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 am Atrium cordis dextrum

Der Einfluss der Testsubstanz AST 32 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurde an vier verschiedenen isolierten Präparaten untersucht. Der Versuch wurde wie in Kapitel 3.5.1.1. beschrieben durchgeführt und anschließend der Mittelwert aus den vier Versuchen mit  $197,5 \pm 20,87 \mu\text{mol/l}$  als Kontrollwert definiert.

Die Testsubstanz zeigte eine schwach negativ chronotrope Wirkung, die jedoch keine Signifikanz aufwies. Es konnte keine  $EC_{50}$  ermittelt werden.

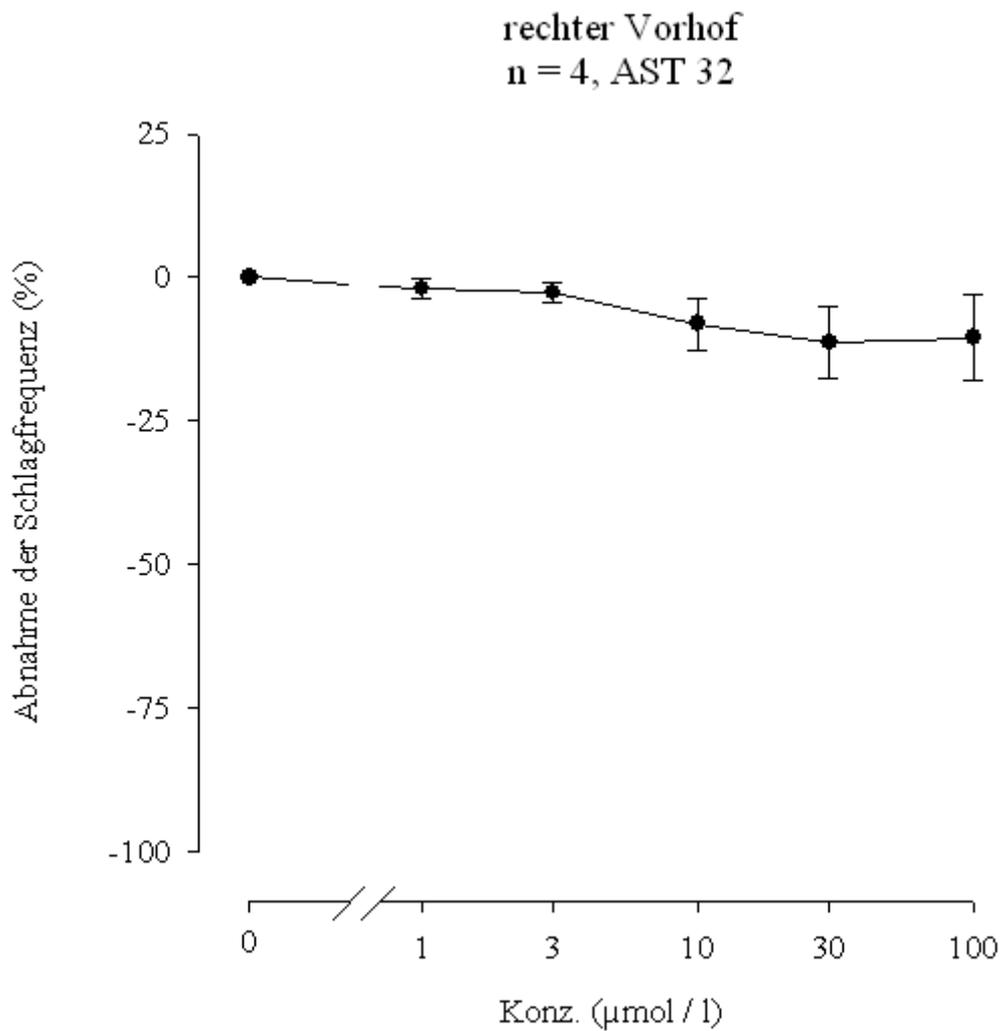
Tab. 6: Wirkung von AST 32 auf das Atrium cordis dextrum

AST 32 [ $\mu\text{mol/l}$ ]	f $\pm$ SEM	f $\pm$ SEM [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	$197,5 \pm 20,87$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
<b>1</b>	$193,75 \pm 20,45$	$-1,90 \pm 1,74$	4	n.s.
<b>3</b>	$192,5 \pm 20,46$	$-2,60 \pm 1,71$	4	n.s.
<b>10</b>	$180,0 \pm 16,46$	$-8,06 \pm 4,48$	4	n.s.
<b>30</b>	$172,5 \pm 14,22$	$-11,34 \pm 6,17$	4	n.s.
<b>100</b>	$171,25 \pm 15,46$	$-10,47 \pm 7,54$	4	n.s.

Legende zu Tabelle 6:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte mit deren Standardfehlern, berechnet aus vier Versuchen. „f“ steht für die Schlagfrequenz pro Minute.

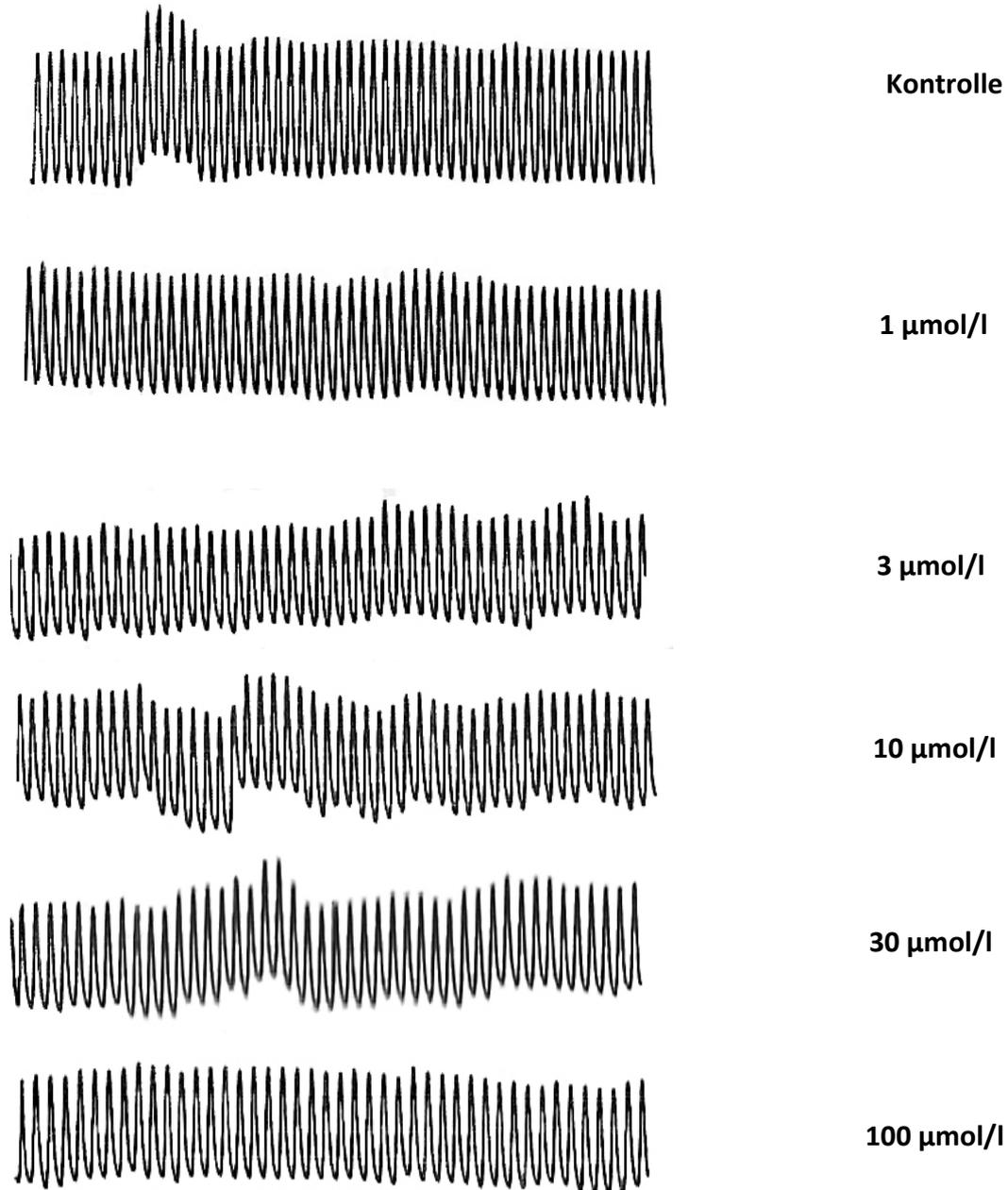
Abb. 22: Konzentrations-Wirkungskurve von AST 32 an rechten Vorhöfen



Legende zu Abbildung 22:

Die Kurve zeigt die Wirkung von AST 32 auf isolierte rechte Vorhöfe. Die Abszisse enthält die Konzentrationen der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$ , die Ordinate die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent. Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Schlagfrequenz aus vier Versuchen, die Balken ihre Standardfehler.

Abb. 23: Originalaufzeichnung der Wirkung von AST 32 auf die Schlagfrequenz rechter Vorhöfe



Legende zu Abbildung 23:

Abbildung 23 zeigt die mittels Schreiber aufgezeichnete Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe. AST 32 wurde in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l getestet. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Konzentrationen betrug 45 Minuten.

#### 4.6 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 in Kombination mit Histamin am terminalen Ileum

Am terminalen Ileum wurde AST 32 in einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  zusammen mit Histamin untersucht.

Dazu wurde mit Histamindihydrochlorid eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  hergestellt. In drei Versuchen wurde überprüft, ob die spasmolytische Wirkung von AST 32 zumindest teilweise im Zusammenhang mit einem antihistaminergen Effekt steht.

Ausgehend von den Kontrollwerten der reinen Histamin-Wirkung am Darm, kam es mit der Testsubstanz AST 32 zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Es war insgesamt eine antihistaminerge Wirkung erkennbar. Die Ausnahme bildete Histamin in der Konzentration 0,03  $\mu\text{mol/l}$ , bei der es sogar zu einer schwachen Zunahme der Kontraktionskraft kam.

Tab. 7: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf das terminale Ileum

Histamindihydrochlorid [ $\mu\text{mol/l}$ ] Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n
0,01	0,36 $\pm$ 0,09	3
0,03	0,39 $\pm$ 0,08	3
0,1	0,85 $\pm$ 0,20	3
0,3	1,63 $\pm$ 0,27	3
1	2,39 $\pm$ 0,55	3
3	2,74 $\pm$ 0,45	3

Legende zu Tabelle 7:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardfehler (SEM) aus drei Kontrollversuchen mit Histamindihydrochlorid.

Tab. 8: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Kombination mit 30  $\mu\text{mol/l}$  AST 32

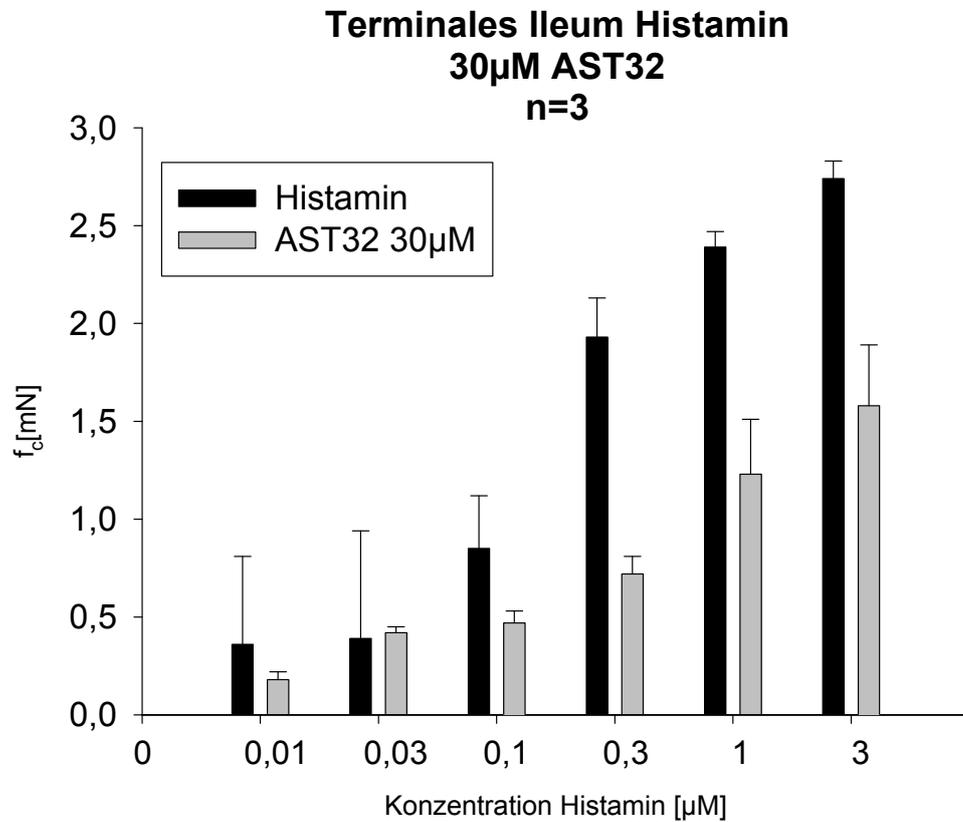
<b>AST 32 [30 <math>\mu\text{mol/l}</math>] + Histamin</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> [mN]</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	0,18 $\pm$ 0,04	3	n.s.
<b>0,03</b>	0,42 $\pm$ 0,03	3	n.s.
<b>0,1</b>	0,47 $\pm$ 0,06	3	n.s.
<b>0,3</b>	0,72 $\pm$ 0,09	3	0,05
<b>1</b>	1,23 $\pm$ 0,28	3	0,05
<b>3</b>	1,58 $\pm$ 0,31	3	0,05

Legende zu Tabelle 8:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM) aus den Versuchen von Histamindihydrochlorid in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 am terminalen Ileum.

Im Gegensatz zu den Kontrollwerten (Tab.7) kam es mit AST 32 zu einer Abnahme der Kontraktionskraft.

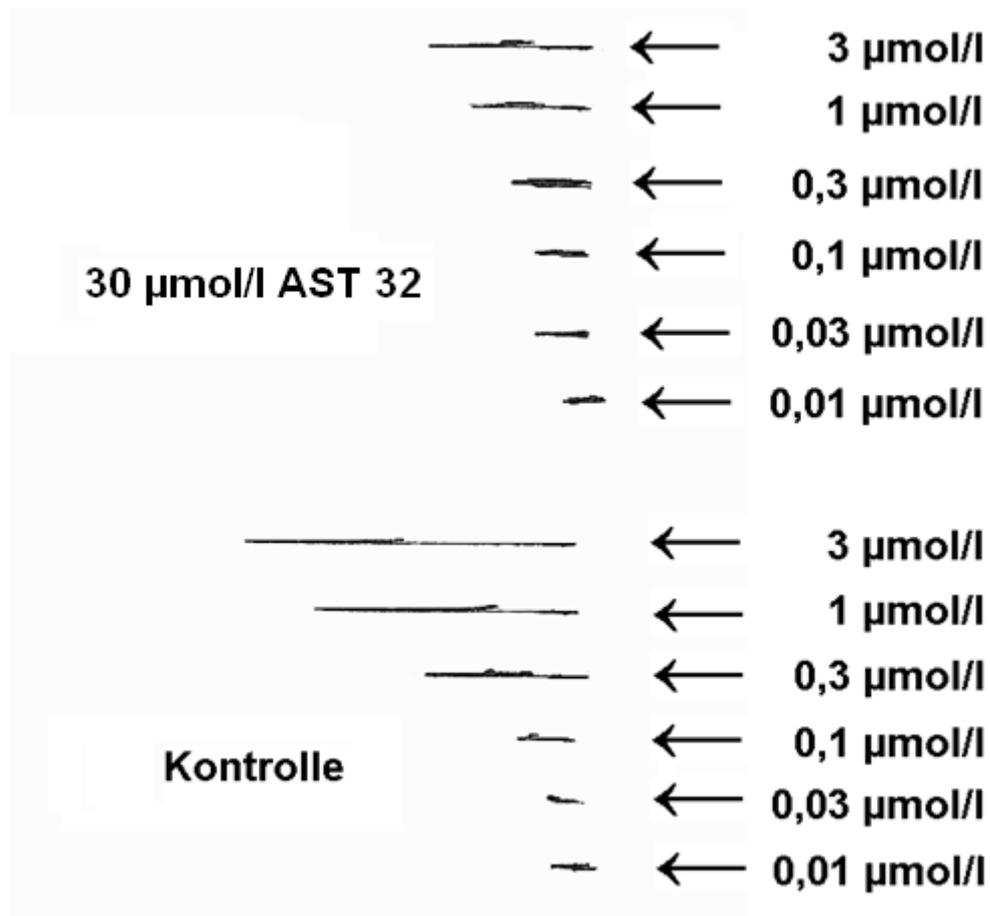
Abb. 24: Graphische Darstellung der Wirkung von Histamindihydrochlorid am terminalen Ileum: Allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ).



Legende zu Abbildung 24:

Die Kontraktionskraft in mN wurde auf der Ordinate aufgetragen, die Konzentration von Histamindihydrochlorid in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse. Die arithmetischen Mittelwerte der untersuchten Konzentrationen wurden als Balken dargestellt, ihre Standardfehler als strichförmige Verlängerungen. Die schwarzen Balken stellen die Kontrollwerte mit Histamin dar, die grauen Balken die Kombination Histamin + AST 32.

Abb. 25: Originalaufzeichnung der Wirkung von AST 32 in Kombination mit Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 25:

Abbildung 25 zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers. Die Pfeile markieren die Zugabe des Agonisten Histamindihydrochlorid in sechs verschiedenen Konzentrationen. Im ersten Schritt wurde Histamindihydrochlorid allein, im zweiten Schritt in Kombination mit AST 32 untersucht.

#### 4.7 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Anwesenheit von Acetylcholin

Am terminalen Ileum wurde die Testsubstanz AST 32 in der Konzentration 30  $\mu\text{mol/l}$  in Kombination mit Acetylcholinhydrochlorid untersucht. Dafür wurden mit Acetylcholinhydrochlorid Verdünnungsreihen in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  hergestellt. In fünf Versuchen wurde die Wirkung von Acetylcholin allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums getestet, um zu ermitteln, ob ein Teil der spasmolytischen Wirkung am Darm durch AST 32 eventuell auf anticholinerge Effekte zurückzuführen ist.

Ab einer Konzentration von 0,03  $\mu\text{mol/l}$  Acetylcholin zeigte sich in Anwesenheit von AST 32 eine Minderung der Kontraktionskraft.

Tab. 9: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf das terminale Ileum

Acetylcholinhydrochlorid [ $\mu\text{mol/l}$ ] Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n
0,01	0,52 $\pm$ 0,07	5
0,03	1,27 $\pm$ 0,34	5
0,1	2,53 $\pm$ 0,58	5
0,3	4,10 $\pm$ 0,71	5
1	4,83 $\pm$ 0,73	5
3	5,42 $\pm$ 0,80	5

Legende zu Tabelle 9:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) mit deren Standardfehlern (SEM) aus drei Versuchen mit Acetylcholinhydrochlorid.

Tab. 10: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 30  $\mu\text{mol/l}$  AST 32

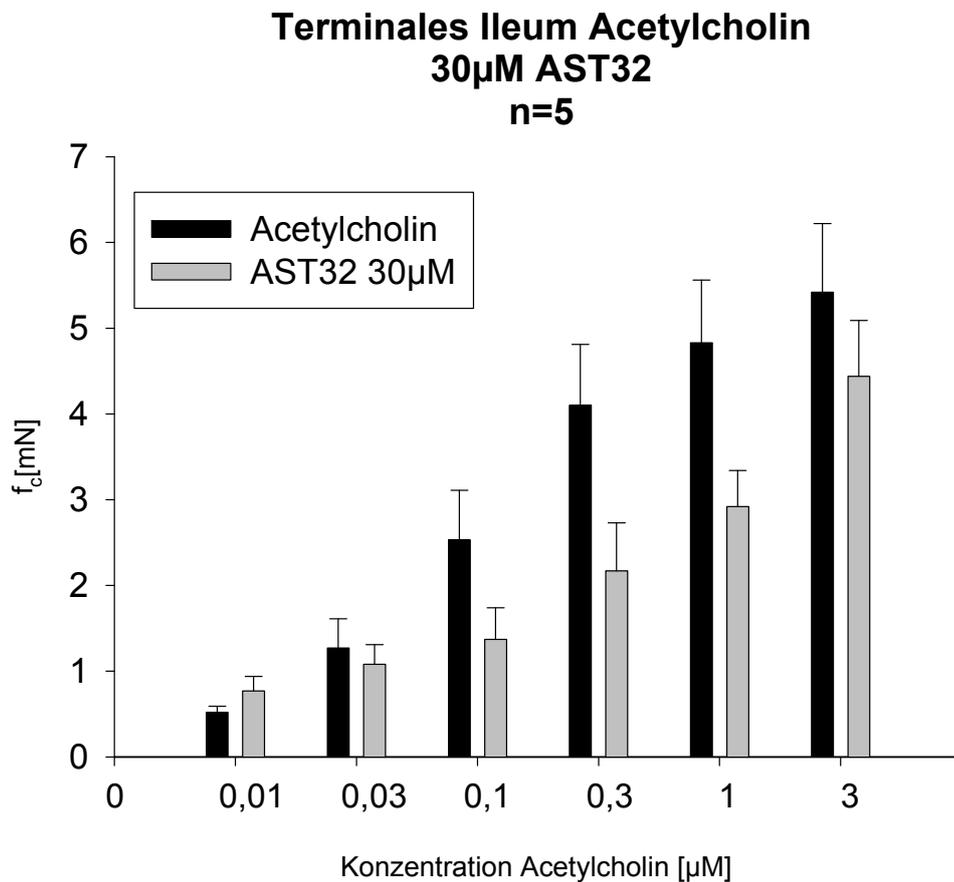
<b>AST 32 [30 <math>\mu\text{mol/l}</math>] + Acetylcholin</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> [mN]</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	0,77 $\pm$ 0,17	5	n.s.
<b>0,03</b>	1,08 $\pm$ 0,23	5	n.s.
<b>0,1</b>	1,35 $\pm$ 0,37	5	0,05
<b>0,3</b>	2,17 $\pm$ 0,56	5	0,05
<b>1</b>	2,92 $\pm$ 0,42	5	0,05
<b>3</b>	4,44 $\pm$ 0,65	5	n.s.

Legende zu Tabelle 10:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse aus den Versuchen mit Acetylcholinhydrochlorid in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 in der Konzentration 30  $\mu\text{mol/l}$ .

Im Gegensatz zu den Kontrollwerten (Tab. 9), kam es in Kombination mit AST 32 zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft. Es konnte also eine anticholinerge Wirkung verzeichnet werden.

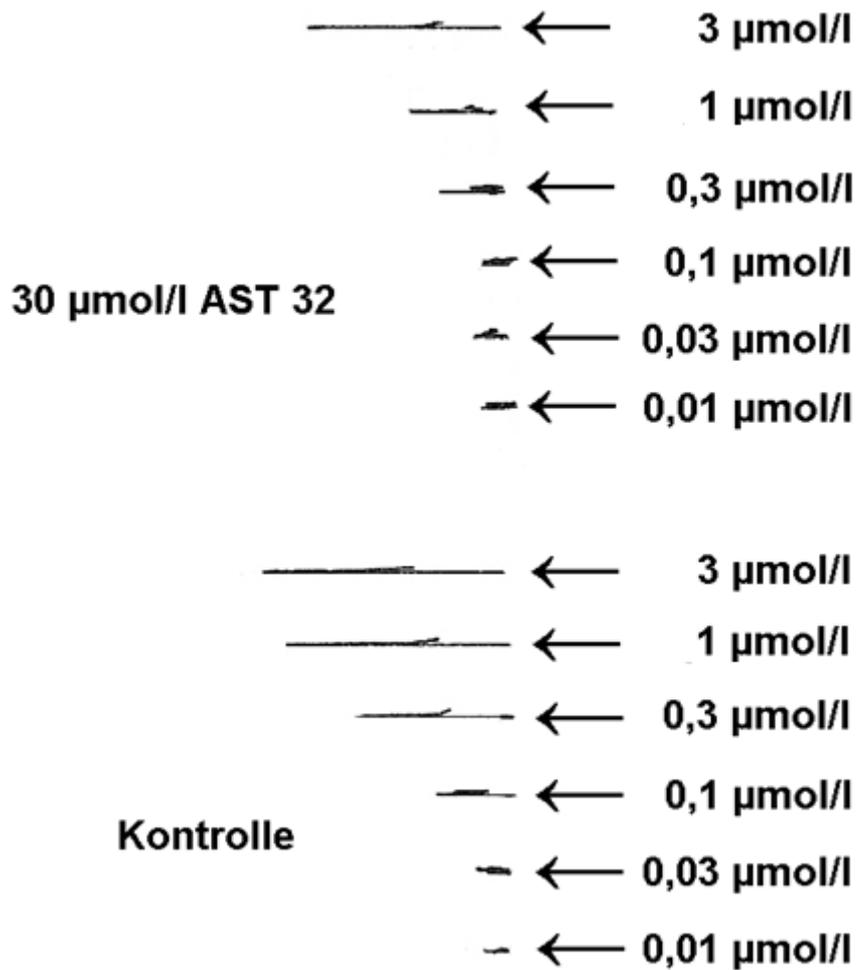
Abb. 26: Graphische Darstellung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums: Alleine und in Kombination mit der Testsubstanz.



Legende zu Abbildung 26:

Auf der Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN angegeben, die Abszisse enthält die Konzentrationsangaben in  $\mu\text{mol/l}$ . Die arithmetischen Mittelwerte wurden als Balken mit strichförmigen Verlängerungen (Standardfehler) dargestellt. Die schwarzen Balken stellen die Kontrollwerte mit Acetylcholinhydrochlorid dar, die grauen Balken zeigen die Ergebnisse aus den Versuchen von Acetylcholinhydrochlorid in Kombination mit der Testsubstanz AST 32.

Abb. 27: Originalaufzeichnung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.



Legende zu Abbildung 27:

Abbildung 27 zeigt die Kontrollwerte mit Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 in einer Konzentration von 30 µmol/l. Die Pfeile markieren die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen Acetylcholinhydrochlorid. Der zeitliche Abstand betrug zehn Minuten.

#### 4.8 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid

Die Testsubstanz AST 32 wurde in der Konzentration 30  $\mu\text{mol/l}$  dem Organbad zugesetzt und mit Phenylephrinhydrochlorid eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$  hergestellt. Diese unterschiedlichen Konzentrationen des Agonisten wurden im zeitlichen Abstand von zehn Minuten in das Organbad injiziert.

Es sollte untersucht werden, ob die spasmolytische Wirkung von AST 32 am Darm eventuell durch eine Hemmung sympathomimetischer Vorgänge zustande kam.

Die Ergebnisse zeigten aber, dass eher das Gegenteil der Fall war.

Tab. 11: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf das terminale Ileum

Phenylephrinhydrochlorid [ $\mu\text{mol/l}$ ] Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n
0,1	0,51 $\pm$ 0,15	3
0,3	0,62 $\pm$ 0,20	3
1	0,92 $\pm$ 0,14	3
3	1,73 $\pm$ 0,43	3
10	2,89 $\pm$ 0,91	3

Legende zu Tabelle 11:

Tabelle 11 zeigt die Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen (SEM) aus drei Kontrollversuchen mit Phenylephrinhydrochlorid.

Tab. 12: Wirkung von AST 32 (30 µmol/l) in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktion des terminalen Ileums

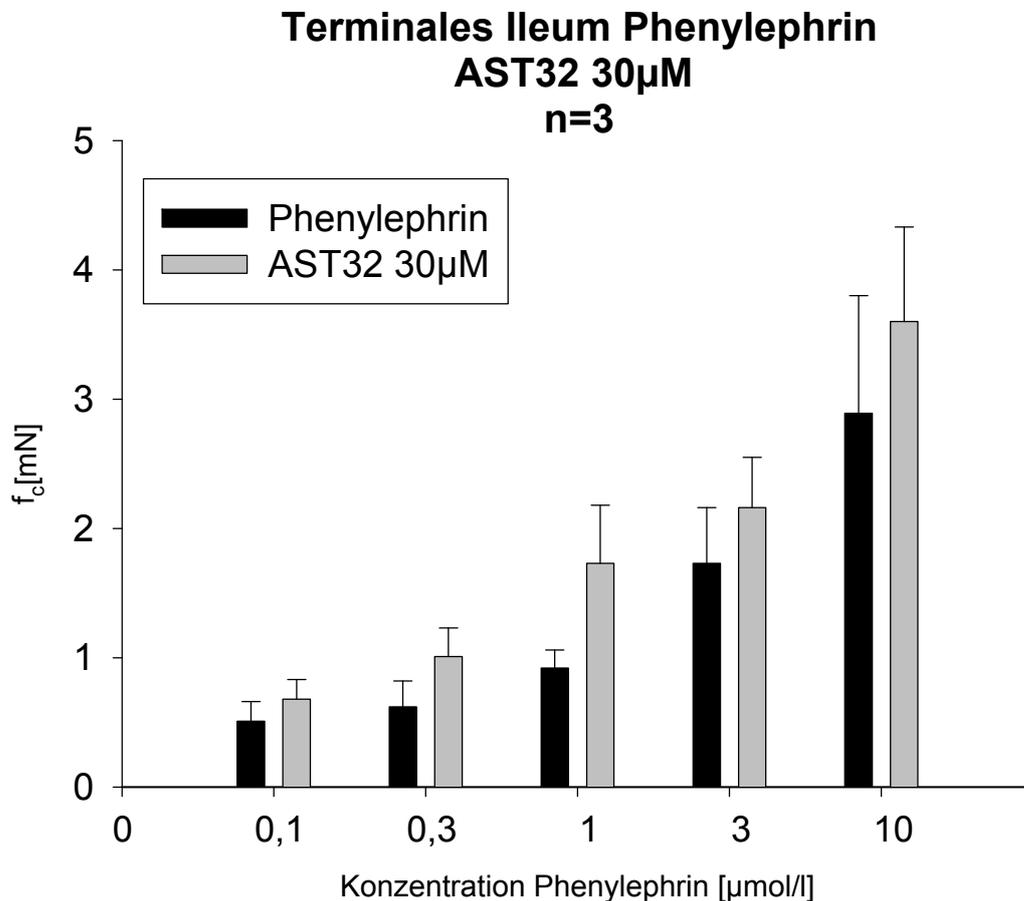
<b>AST 32 [30 µmol/l] + Phenylephrin</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> [mN]</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0,1</b>	0,68 ± 0,15	3	n.s.
<b>0,3</b>	1,01 ± 0,22	3	n.s.
<b>1</b>	1,73 ± 0,45	3	n.s.
<b>3</b>	2,16 ± 0,39	3	n.s.
<b>10</b>	3,60 ± 0,73	3	n.s.

Legende zu Tabelle 12:

Die Tabelle beinhaltet die Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) aus drei Versuchen der Testsubstanz AST 32 (30 µmol/l) in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.

Im Gegensatz zu den Kontrollwerten, kam es mit AST 32 sogar zu einer leichten Zunahme der Kontraktion. Somit konnte eine sympatholytische Wirkung am Darm, als Erklärung für die Spasmolyse, ausgeschlossen werden.

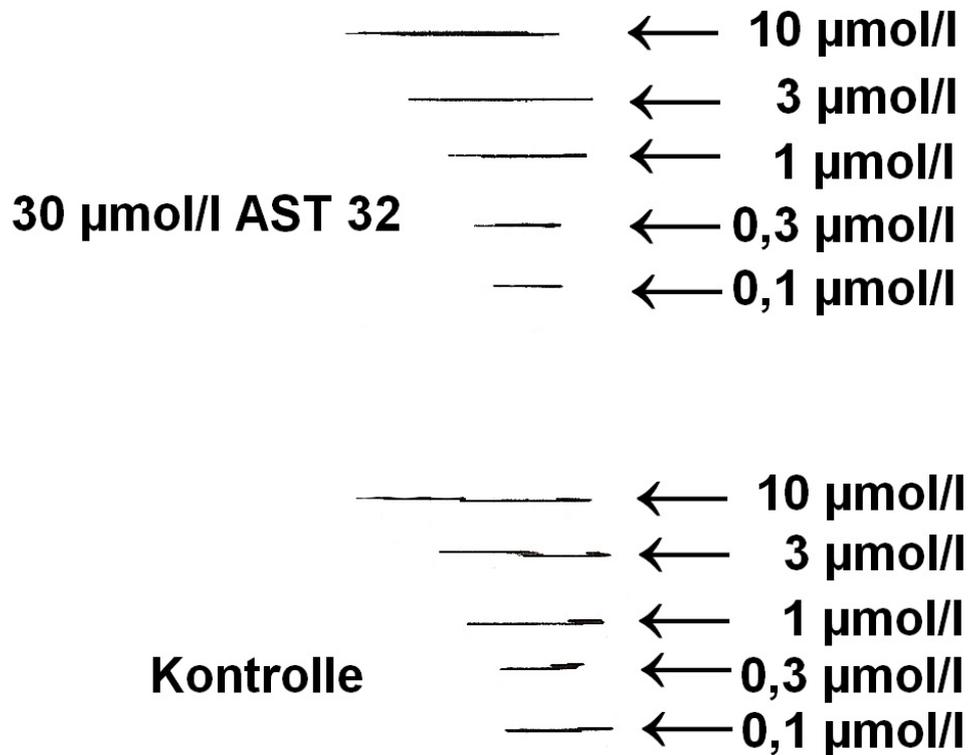
Abb. 28: Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$  allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.



Legende zu Abbildung 28:

Auf der Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN aufgetragen, die Konzentrationen von Phenylephrinhydrochlorid in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse. Die arithmetischen Mittelwerte aus den drei Versuchen wurden als Balken und die dazugehörige Standardabweichung als strichförmige Verlängerungen dargestellt. Die schwarzen Balken stellen die Kontrollversuche mit Phenylephrinhydrochlorid allein dar, die grauen Balken zeigen die Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen (Phenylephrinhydrochlorid + AST 32).

Abb. 29: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.



Legende zu Abbildung 29:

Abbildung 29 zeigt die Originalaufzeichnung der Kontraktionen des terminalen Ileums mittels Schreiber. Die Pfeile zeigen die Zugabe des Agonisten Phenylephrinhydrochlorid in fünf verschiedenen Konzentrationen an. Die Versuche wurden einmal mit dem reinen Agonisten und einmal in Kombination mit der Testsubstanz durchgeführt.

#### 4.9 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Kombination mit Glibenclamid

Bei dieser Versuchsreihe wurde im ersten Schritt der Einfluss von Glibenclamid (Kontrollwerte) in den Konzentrationen 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  auf das terminale Ileum getestet. Es sollte untersucht werden, ob die Wirkung von AST 32 zumindest teilweise durch eine Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle zustande kam. 25 Minuten nach der Zugabe von Glibenclamid wurden im zweiten Schritt 30  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz AST 32 in das Organbad injiziert und Änderungen der Kontraktionskraft des terminalen Ileums mittels Schreiber aufgezeichnet.

Tab 13 + Tab 14: Wirkung von 30 bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid auf das terminale Ileum und in Kombination mit 30  $\mu\text{mol/l}$  AST 32

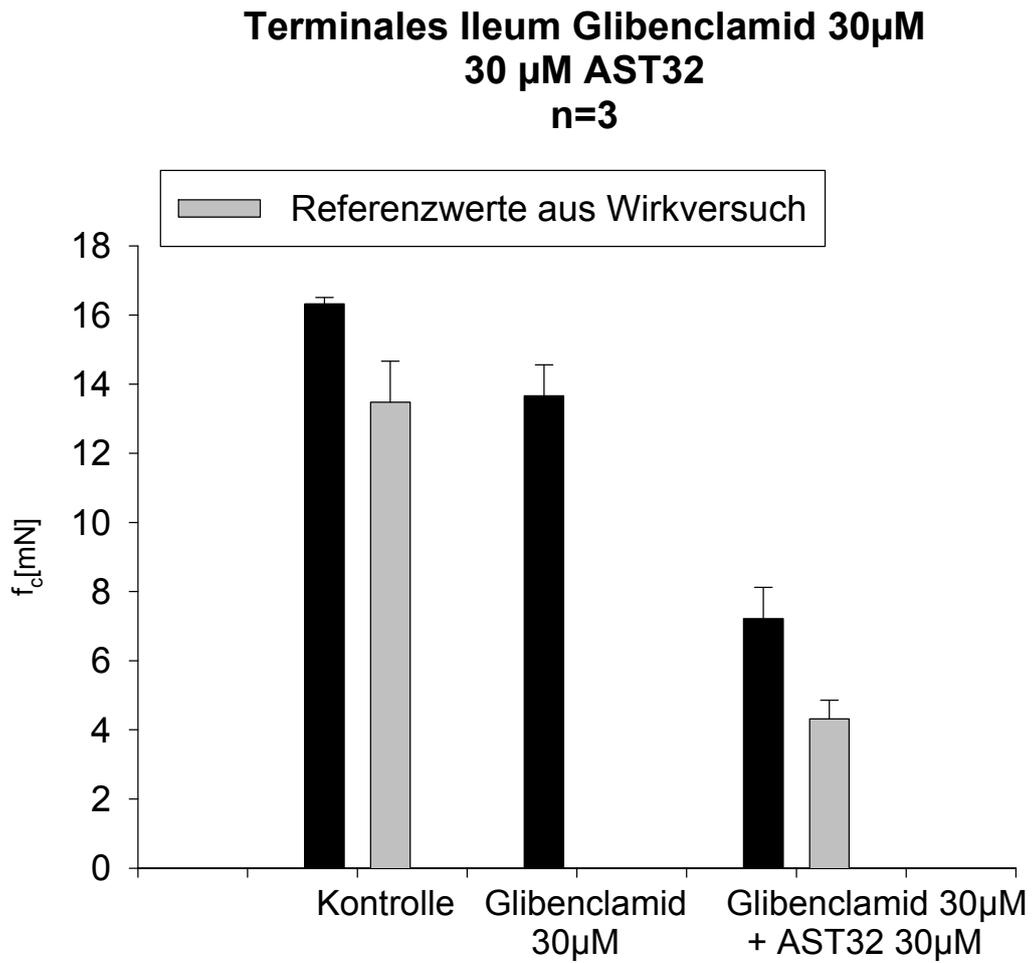
Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	16,32 $\pm$ 0,19	3	--
<b>30 <math>\mu\text{M}</math> Glibenclamid</b>	13,66 $\pm$ 0,90	3	--
<b>+ 30<math>\mu\text{M}</math> AST 32</b>	7,22 $\pm$ 0,90	3	0,001

Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	9,86 $\pm$ 0,17	3	--
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> Glibenclamid</b>	2,91 $\pm$ 0,12	3	--
<b>+ 30<math>\mu\text{M}</math> AST 32</b>	-0,03 $\pm$ 0,90	3	0,001

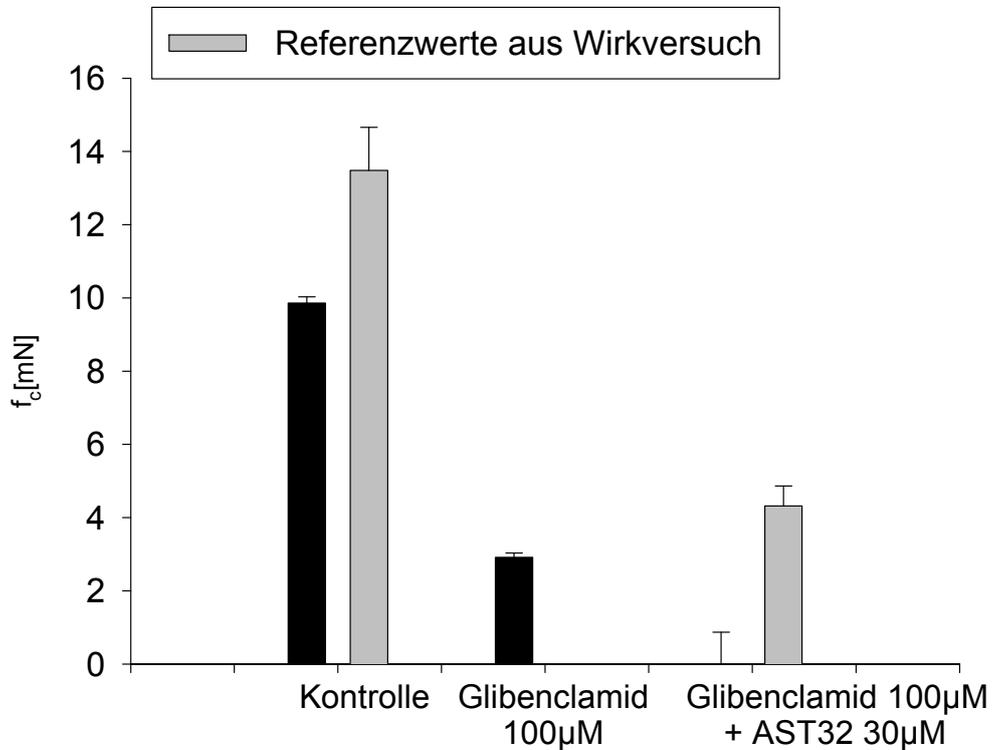
Legende zu Tabellen 13+14:

Die Tabellen enthalten die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ), sowie deren Standardfehler (SEM) in mN, ermittelt aus drei Versuchen.

Abb. 30: Graphische Darstellung der Wirkung von Glibenclamid in den Konzentrationen 30 und 100  $\mu\text{M}$  allein bzw. in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums



**Terminales Ileum Glibenclamid 100 $\mu$ M  
30  $\mu$ M AST32  
n=3**

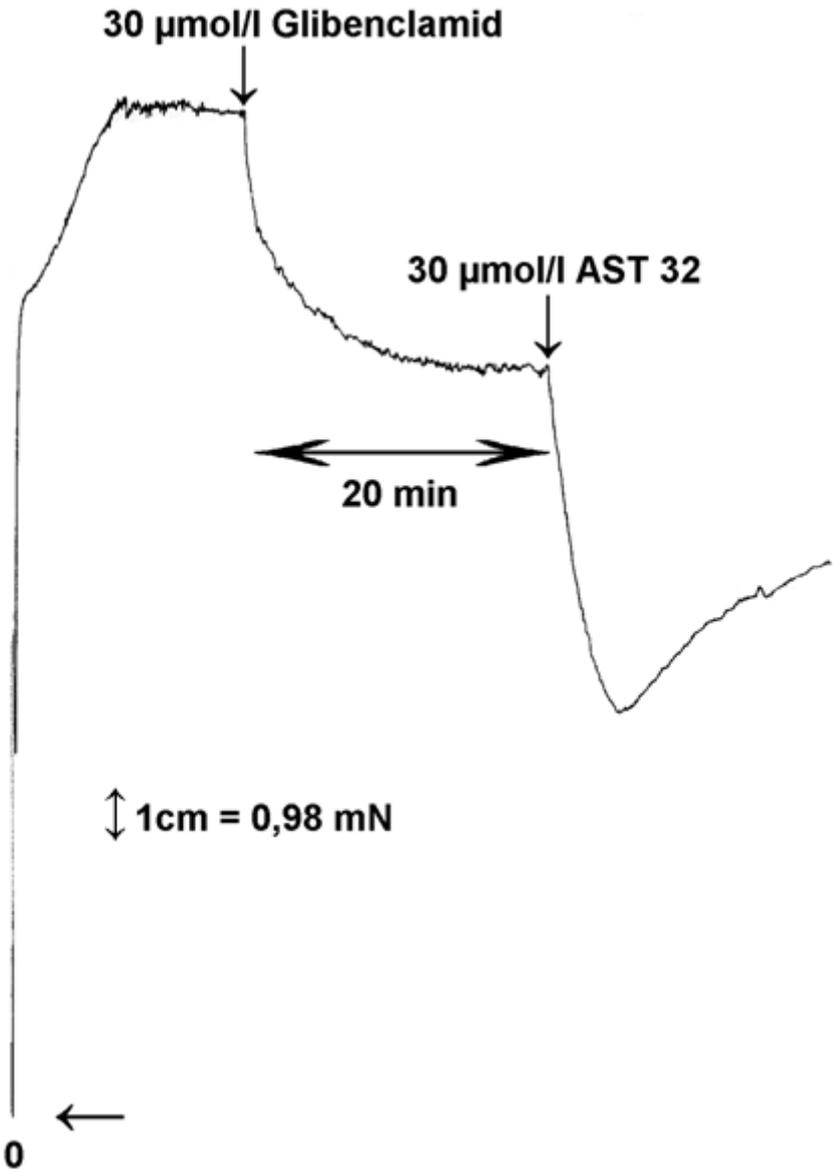


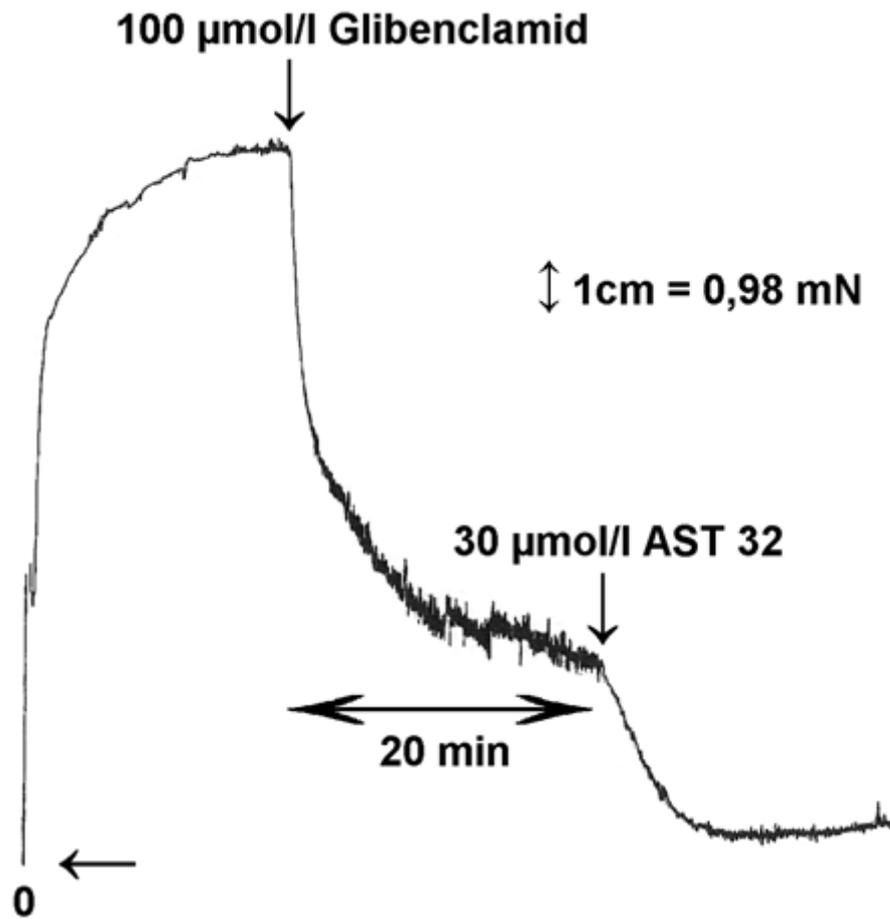
Legende zu Abbildung 30:

Der Graph in Abbildung 30 zeigt die Änderung der Kontraktionskraft am terminalen Ileum nach Zugabe von 30 bzw. 100  $\mu$ mol/l Glibenclamid. Auf der Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN aufgetragen, auf der Abszisse die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in  $\mu$ mol/l. Die Balken zeigen die arithmetischen Mittelwerte aus je drei Versuchen. Die Standardabweichung wurde als strichförmige Verlängerung dargestellt.

Der Kontrollwert nach maximaler Vorkontraktion, der Einfluss von 30 bzw. 100  $\mu$ mol/l Glibenclamid und der Wert unter zusätzlicher Zugabe von 30  $\mu$ mol/l AST 32 sind als schwarze Balken dargestellt. Die grauen Balken dienen als Referenzwerte und stammen aus den Versuchen mit AST 32 am terminalen Ileum (Kapitel 4.1.).

Abb. 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von 30 bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.





Legende zu Abbildung 31:

Abbildung 31 zeigt die Aufzeichnungen des Schreibers nach der Zugabe von Glibenclamid (30 und 100 µmol/l) zum terminalen Ileum und nach Zugabe von 30 µmol/l AST 32.

#### 4.10 Untersuchung der Testsubstanz AST 32 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter dem Einfluss von Nitro-L-Arginin

Bei dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von AST 32 in Kombination mit dem Agonisten Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die spasmolytische Wirkung am Darm zumindest teilweise über das NO-System zustande kommt.

Dazu wurde der Darm mit einer Kaliumchloridlösung vorkontrahiert und nach Plateauausbildung der Agonist Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  zugegeben. Nach weiteren 20-25 Minuten wurde die Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) dem Organbad zugesetzt und der Einfluss auf die Kontraktion des Ileums aufgezeichnet.

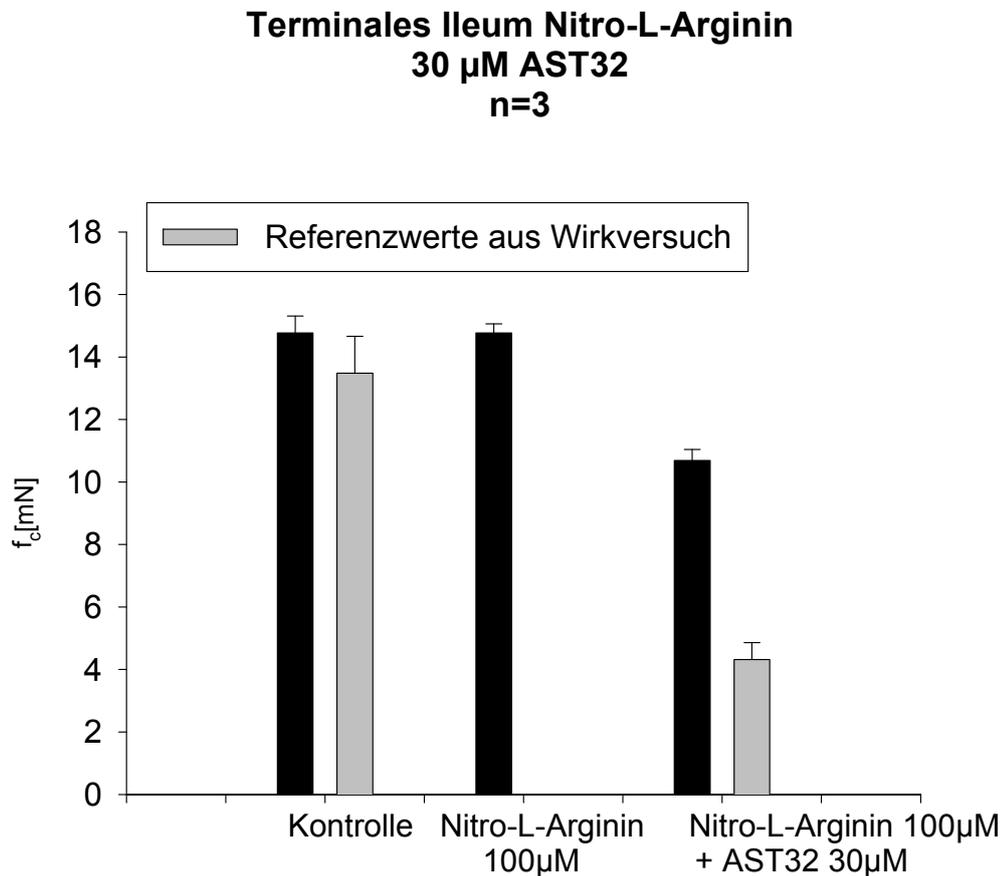
Tab. 15: Wirkung von Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32

Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	14,77 $\pm$ 0,54	3	--
100 $\mu\text{M}$ Nitro-L-Arginin	14,77 $\pm$ 0,29	3	--
+ 30 $\mu\text{M}$ AST 32	10,69 $\pm$ 0,35	3	0,01

Legende zu Tabelle 15:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus drei Versuchen mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin und 30  $\mu\text{mol/l}$  AST 32. Wie in der Tabelle ersichtlich ist, betrug der Kontrollwert 14,77 $\pm$ 0,54 mN. Durch Zugabe von Nitro-L-Arginin kam es zu einer schwachen, in der Kurve ersichtlichen Zunahme der Kontraktionskraft, die aber keine Signifikanz aufwies. Erst unter Zugabe der Testsubstanz AST 32 kam es zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft. Die Endwerte betragen nur mehr 10,69 $\pm$ 0,35 mN.

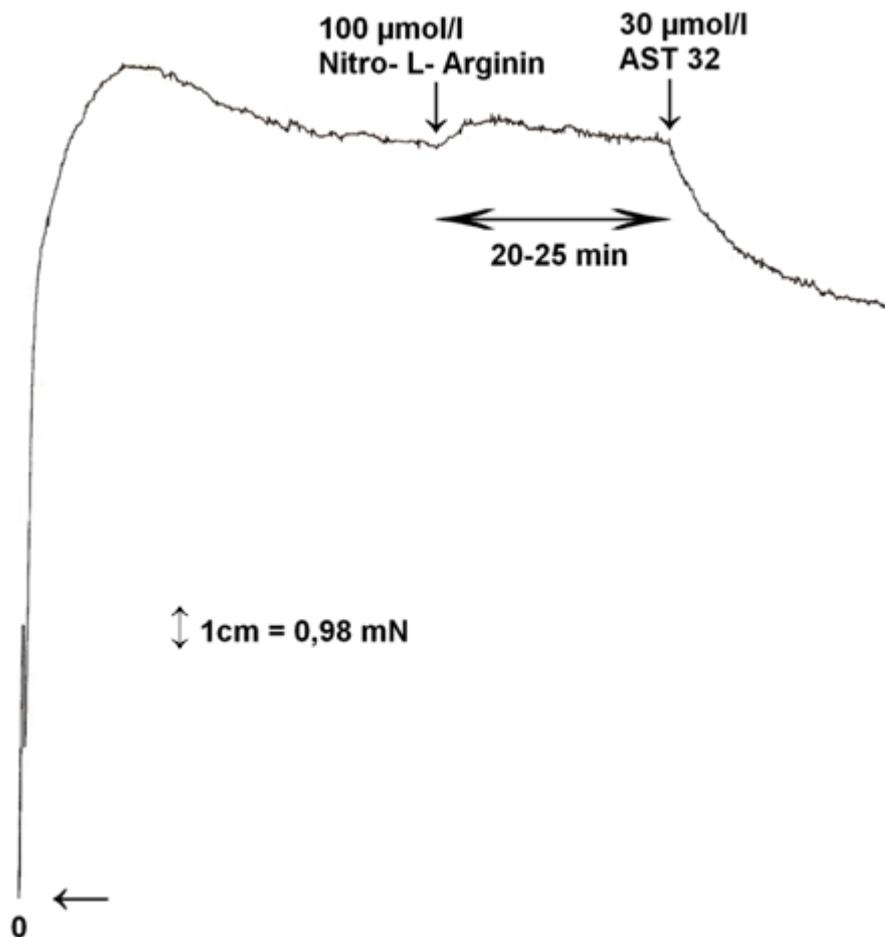
Abb. 32: Graphische Darstellung der Wirkung von Nitro-L-Arginin 100  $\mu\text{M}$  allein und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.



Legende zu Abbildung 32:

Der Graph zeigt die Relation der Kontraktionskraft in mN (Ordinate) zur Konzentration der Testsubstanzen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchen wurden als Balken dargestellt, deren Standardabweichungen als strichförmige Verlängerungen. Ebenso wie bei den Glibenclamid-Versuchen in 4.9. beschrieben, stellen auch hier die schwarzen Balken den Kontrollwert der maximalen Kontraktion, den Effekt unter Zugabe von Nitro-L-Arginin und das Ergebnis nach der Zugabe der Testsubstanz AST 32 dar. Die grauen Balken dienen als Referenzwerte aus den Wirkversuchen mit AST 32 am terminalen Ileum (Kapitel 4.1.).

Abb. 33: Originalaufzeichnung der Wirkung von Nitro-L-Arginin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) und in Kombination mit der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.



Legende zu Abbildung 33:

Die Aufzeichnungen mittels Schreiber zeigen eine anfängliche Zunahme der Kontraktionskraft durch Zugabe von Nitro-L-Arginin zur Nährlösung und eine sofortige Abnahme der Kontraktionskraft in Kombination mit der Testsubstanz AST 32. Die Pfeile markieren die Substanzzugabe. Der zeitliche Abstand zwischen den Zugaben betrug jeweils 20-25 Minuten.

## 4.11 Wirkung des Lösungsmittels DMSO

Bei den Versuchsreihen dieser Arbeit wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) als Lösungsmittel für die Testsubstanz AST 32 verwendet. Um dessen Einfluss auf die Kontraktilität der Organe zu bestimmen, wurden Untersuchungen mit DMSO allein, analog zu den Konzentrationen im jeweiligen Versuch, durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde alle 30 Minuten kumulativ dem Organ in der Nährlösung zugesetzt und je Versuchsreihe wurden drei Blindversuche durchgeführt.

Zur Berechnung der Ergebnisse an den einzelnen Organen mussten schließlich die DMSO Werte von den Werten der Testsubstanz subtrahiert werden.

Tab. 16: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf das terminale Ileum

DMSO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	20,72 $\pm$ 3,56	0,00 $\pm$ 0,00	3	n.s.
<b>1</b>	20,48 $\pm$ 3,65	-1,51 $\pm$ 0,64	3	n.s.
<b>3</b>	19,99 $\pm$ 3,88	-4,65 $\pm$ 24,05	3	n.s.
<b>10</b>	19,31 $\pm$ 4,08	-8,66 $\pm$ 4,03	3	n.s.
<b>30</b>	18,74 $\pm$ 4,11	-11,59 $\pm$ 4,21	3	n.s.
<b>100</b>	17,18 $\pm$ 3,92	-19,35 $\pm$ 4,32	3	0,05

Legende zu Tabelle 16:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen (SEM) aus den Lösungsmittelversuchen am terminalen Ileum.

Tab. 17: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	9,78 $\pm$ 2,14	0,00 $\pm$ 0,00	3	n.s.
<b>1</b>	10,00 $\pm$ 2,23	1,84 $\pm$ 0,95	3	n.s.
<b>3</b>	10,00 $\pm$ 2,21	1,93 $\pm$ 0,91	3	n.s.
<b>10</b>	9,95 $\pm$ 2,20	1,51 $\pm$ 1,38	3	n.s.
<b>30</b>	9,92 $\pm$ 2,20	1,09 $\pm$ 2,46	3	n.s.
<b>100</b>	9,83 $\pm$ 2,15	0,34 $\pm$ 2,57	3	n.s.

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen (SEM) aus den Versuchen mit DMSO an der Aorta.

Tab. 18: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln

DMSO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	0,47 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	3	n.s.
<b>1</b>	0,46 $\pm$ 0,08	-3,70 $\pm$ 3,70	3	n.s.
<b>3</b>	0,43 $\pm$ 0,07	-10,42 $\pm$ 3,84	3	n.s.
<b>10</b>	0,36 $\pm$ 0,05	-23,79 $\pm$ 0,82	3	n.s.
<b>30</b>	0,29 $\pm$ 0,03	-37,40 $\pm$ 2,32	3	0,05
<b>100</b>	0,25 $\pm$ 0,03	-45,95 $\pm$ 2,99	3	0,05

Legende zu Tabelle 18:

Die Tabelle enthält die Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen (SEM) aus drei Versuchen mit dem Lösungsmittel DMSO am isolierten Papillarmuskel.

Tab. 19: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

DMSO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
<b>Kontrolle</b>	8,43 $\pm$ 1,03	0,00 $\pm$ 0,00	3	n.s.
<b>1</b>	8,62 $\pm$ 0,93	2,72 $\pm$ 1,72	3	n.s.
<b>3</b>	8,71 $\pm$ 0,85	4,01 $\pm$ 3,05	3	n.s.
<b>10</b>	8,69 $\pm$ 0,96	3,39 $\pm$ 1,38	3	n.s.
<b>30</b>	8,72 $\pm$ 0,98	3,74 $\pm$ 1,24	3	n.s.
<b>100</b>	8,66 $\pm$ 1,00	2,91 $\pm$ 1,03	3	n.s.

Legende zu Tabelle 19:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen aus drei Versuchen mit dem Lösungsmittel DMSO an der Arteria pulmonalis.

## 5 Diskussion

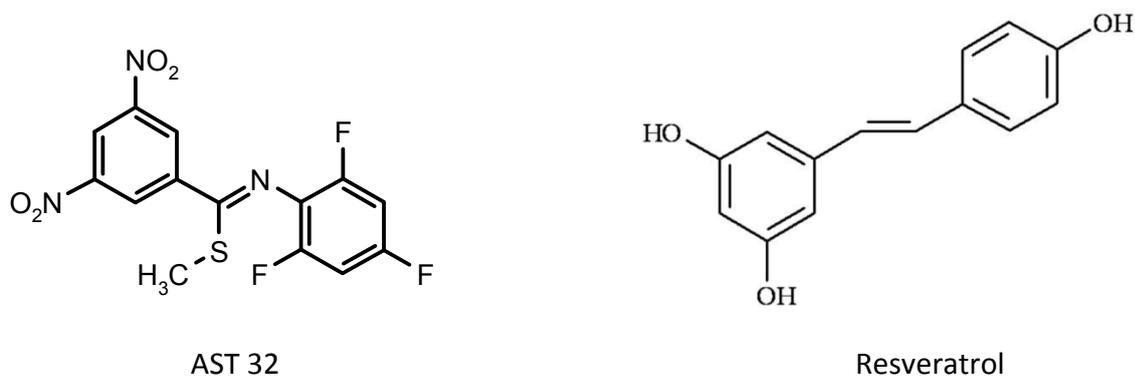
In dieser Diplomarbeit wurde der Einfluss der Testsubstanz AST 32 auf fünf verschiedene Organe des Meerschweinchens untersucht: Terminales Ileum, Aorta, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris. Dazu wurde AST 32 den Organen in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Auf Grund der stark relaxierenden Wirkung auf den Darm, wurde schließlich noch der mögliche Wirkmechanismus dafür untersucht. AST 32 wurde dazu in Kombination mit den Agonisten Histamindihydrochlorid, Acetylcholinhydrochlorid, Phenylephrinhydrochlorid, Glibenclamid und Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum getestet.

Schlussendlich wurden die Ergebnisse mit dem bereits gut untersuchten Naturstoff Resveratrol verglichen.

### 5.1 Strukturvergleich von AST 32 mit Resveratrol

Abb. 34: Strukturformel von AST 32 und Resveratrol



Resveratrol ist ein Stilbenderivat mit drei Hydroxylgruppen in den Stellungen 3, 5 und 4' und einer E-konfigurierten Ethylenbrücke.

Bei AST 32 hingegen sind die Hydroxylgruppen durch Fluor und Nitro-Gruppen, die Ethylenbrücke durch eine Thioformamid-Gruppe ersetzt. Der sterisch sehr sperrige Schwefel ermöglicht eine stabile cisoide-Konfiguration.

## **5.2 Versuchsreihen an der glatten Muskulatur, Musculus papillaris und Atrium cordis dextrum**

### **5.2.1 Versuche an der Aorta**

Die Wirkung von AST 32 wurde an fünf verschiedenen Aorten in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. Obwohl die Kontraktionskraft kontinuierlich leicht abnahm, war die Wirkung statistisch nicht signifikant und es konnte keine  $\text{EC}_{50}$  erreicht werden.

Resveratrol wurde an der Aorta in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30; 100 und 300  $\mu\text{mol/l}$  getestet. Der Naturstoff bewirkte auch eine konzentrationsabhängige Relaxation der glatten Muskulatur. Diese erwies sich ab einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/l}$  als signifikant und es wurde bei 145  $\mu\text{mol/l}$  eine  $\text{EC}_{50}$  erreicht. (Lötsch 2004).

Studien über die Wirkung von Resveratrol an isolierten Aorten von hypertensiven Ratten zeigten, dass durch das Stilbenderivat die Hypertrophie vaskulärer glatter Muskelzellen gehemmt werden konnte, indem die Phosphatidyl-inositol-3-kinase blockiert wurde. (Haider et al. 2002)

Liu und Liu (2004) fanden heraus, dass Resveratrol die LDL induzierte Proliferation in den Aortenzellen hemmt, ebenso wie die Bildung von  $\text{H}_3$ -Thymidin.

In Untersuchungen mit Resveratrol im Zusammenhang mit Arteriosklerose und koronaren Herzerkrankungen konnte der positive Einfluss auf die Gesundheit bestätigt werden. (Wu et al. 2001).

### **5.2.2 Versuche am terminalen Ileum**

Am terminalen Ileum wurde AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. In fünf Versuchen wurde eine stark relaxierende Wirkung auf den Darm nachgewiesen, die sich bereits ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  als signifikant erwies. Bei 100  $\mu\text{mol/l}$  betrug die Relaxation  $30,16 \pm 7,88$  % bezogen auf den Kontrollwert, die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei 28  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

Resveratrol wurde am Darm in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30; 100 und 300  $\mu\text{mol/l}$  untersucht und auch hier wurde eine stark relaxierende Wirkung nachgewiesen. Die Abnahme der Kontraktionskraft war jedoch erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  signifikant, die  $\text{EC}_{50}$  lag bei 46,4  $\mu\text{mol/l}$  (Lötsch 2004).

AST 32 übt also auf den Darm eine etwas stärkere Wirkung aus, als die Vergleichssubstanz Resveratrol.

In China gab es Versuche (Wu et al. 2004), bei denen eine Verbesserung der Prognose bei Leberkarzinom durch Resveratrol bewirkt werden sollte. Zur Veranschaulichung bekamen Mäuse Krebszellen implantiert. Anschließend bekam ein Teil der Mäuse über zehn Tage Resveratrol allein injiziert, wobei die Dosis kontinuierlich gesteigert wurde. Ein anderer Teil der Mäuse erhielt eine Therapie mit dem Zytostatikum 5-Floururacil, das jedoch erhebliche Nebenwirkungen aufweist, in Kombination mit Resveratrol. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl bei der Resveratrol-, als auch bei der Kombinationstherapie der Tumor deutlich kleiner wurde, die starken Nebenwirkungen bei der Resveratrol-Therapie jedoch ausblieben.

### 5.2.3 Versuche an der Arteria pulmonalis

Die Testsubstanz AST 32 wurde an sechs Arteria pulmonalis Präparaten in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. Auch hier konnte eine stark relaxierende Wirkung bereits ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  mit statistischer Signifikanz erreicht werden. Die Kontraktion nahm konzentrationsabhängig kontinuierlich ab und bei 58  $\mu\text{mol/l}$  wurde die  $\text{EC}_{50}$  erreicht.

Resveratrol hingegen zeigte in Versuchen erst eine leichte Zunahme der Kontraktion, die allerdings ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  stark abzufallen begann und bei 300  $\mu\text{mol/l}$  nur mehr 18% vom Kontrollwert betrug (Lötsch 2004).

Tab. 20: Vergleich der Wirkungen von Resveratrol mit AST 32 auf die glatte Muskulatur

Präparat	Resveratrol EC <sub>50</sub> [µmol/l]	AST 32 EC <sub>50</sub> [µmol/l]
<b>Aorta</b>	145	--
<b>Terminales Ileum</b>	46,4	28
<b>Arteria pulmonalis</b>	126	58

#### 5.2.4 Versuche am Musculus papillaris

Die Versuchsreihe mit AST 32 am Papillarmuskel in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l zeigte eine leicht positiv inotrope Wirkung, ebenso wie Resveratrol (Lötsch 2004).

Es wurde aber weder bei der Testsubstanz AST 32 noch bei Resveratrol eine EC<sub>50</sub> erreicht und die Ergebnisse zeigten keine statistische Signifikanz.

#### 5.2.5 Versuche am Atrium cordis dextrum

Die Untersuchung der Wirkung von AST 32 wurde mit den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l an vier Vorhöfen durchgeführt. Es konnte nur ein sehr schwach negativ chronotroper Effekt nachgewiesen werden, der weder statistische Signifikanz, noch eine EC<sub>50</sub> aufwies.

Bei Resveratrol wurden die Versuche mit den Konzentrationen 1; 3; 10; 30; 100 und 300 µmol/l durchgeführt. Nach einer anfänglich schwach positiv chronotropen Wirkung, begann die Schlagfrequenz ab einer Konzentration von 30 µmol/l zu sinken. Statistische Signifikanz und EC<sub>50</sub> konnten auch nicht erreicht werden (Lötsch 2004).

## **5.3 Wirkung von AST 32 in Kombination mit den Agonisten am terminalen Ileum**

### **5.3.1 Wirkung von AST 32 in Kombination mit Histamin auf das terminale Ileum**

Bei der Untersuchung von AST 32 in einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  in Kombination mit Histamindihydrochlorid in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  am terminalen Ileum konnte eine gering antihistaminerge Wirkung nachgewiesen werden.

AST 32 verringerte die Kontraktionskraft des terminalen Ileums auffallend ab der Kombination mit 0,3  $\mu\text{mol/l}$  Histamindihydrochlorid. Bei der Kombination von AST 32 mit 0,03  $\mu\text{mol/l}$  Histamindihydrochlorid kam es nur kurzfristig zu einer schwachen Zunahme der Kontraktion.

### **5.3.2 Wirkung von AST 32 in Kombination mit Acetylcholin auf das terminale Ileum**

30  $\mu\text{mol/l}$  AST 32 wurden in Kombination mit Acetylcholinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  am terminalen Ileum untersucht. Bereits ab 0,1  $\mu\text{mol/l}$  zeigte sich in fünf Versuchen eine anticholinerge Wirkung, die bis 1  $\mu\text{mol/l}$  statistische Signifikanz aufwies.

### **5.3.3 Wirkung von AST 32 in Kombination mit Phenylephrin auf das terminale Ileum**

Bei den Versuchen von AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) mit Phenylephrinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$  am terminalen Ileum, kam es zu keinen signifikanten Veränderungen, außer eventuell einer leichten Verstärkung der  $\alpha$ -sympathomimetischen Wirkung von Phenylephrin.

#### **5.3.4 Wirkung von AST 32 in Kombination mit Glibenclamid am terminalen Ileum**

Bei den Versuchen von AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) in Kombination mit Glibenclamid wurde überprüft, ob die relaxierende Wirkung von AST 32 zumindest teilweise durch die Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle zustande kam. Den Darm- Präparaten wurde daher die Kalium-Kanal blockierende Substanz Glibenclamid in den Konzentrationen 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  zugefügt. Die Wirkung von AST 32 auf die nun geschlossenen Kalium-Kanäle war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001 statistisch signifikant. Es kam sofort nach Zugabe von AST 32 zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft.

#### **5.3.5 Wirkung von AST 32 in Kombination mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum**

Die Versuchsreihe von AST 32 in Kombination mit dem NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin am Darm zeigte statistisch signifikante Ergebnisse. Während Nitro-L-Arginin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) zu einer leichten Zunahme der Kontraktionskraft führte, kam es nach Zugabe der Testsubstanz AST 32 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft von  $14,77 \pm 0,29$  auf  $10,69 \pm 0,35$  mN. Diese wies mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 statistische Signifikanz auf. Ein Teil der spasmolytischen Wirkung wird daher wahrscheinlich durch NO-Freisetzung verursacht.

## 6 Zusammenfassung

Das Thema dieser Diplomarbeit war die Untersuchung der Wirkungen des neu synthetisierten Resveratrol-Analogons AST 32 auf den Organismus. Dazu wurden isolierte Meerschweinchen-Organe herangezogen und AST 32 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  an Aorta, terminalem Ileum, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris getestet.

In weiterer Folge wurde auch noch die Wirkung von AST 32 in Kombination mit den Agonisten Histamin, Acetylcholin, Phenylephrin, Glibenclamid und Nitro-L-Arginin auf das terminale Ileum untersucht, um auf mögliche Wirkmechanismen, im Zusammenhang mit der Spasmolyse am Darm, schließen zu können.

Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem strukturell sehr ähnlichen Flavonoid Resveratrol verglichen und es zeigte sich, dass beide Substanzen eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur des Darms und der Arteria pulmonalis ausüben. An der Aorta konnte nur bei Resveratrol eine Abnahme der Kontraktionskraft verzeichnet werden, dafür war die Wirkung von AST 32 an Darm und Arteria pulmonalis wesentlich stärker als die der Vergleichssubstanz.

Die Untersuchungen von AST 32 am rechten Vorhof ließen eine schwach negativ chronotrope Wirkung erkennen. Resveratrol hingegen führte zuerst zu einer leichten Zunahme der Schlagfrequenz und erst in höheren Konzentrationen zu einer negativ chronotropen Wirkung.

Am Papillarmuskel führten sowohl AST 32 als auch Resveratrol zu einer schwach positiv inotropen Wirkung.

Als mögliche Wirkmechanismen kommen sowohl schwach antihistaminerge, als auch anticholinerge Effekte, NO-Freisetzung und die Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle in Frage.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wirkung der Testsubstanz AST 32 an Darm und Arteria pulmonalis ähnlich aber stärker ist als bei Resveratrol. Die relaxierende Wirkung von Resveratrol an der Aorta fehlt bei AST 32, dafür sind die Ergebnisse der Versuche an den Herzmuskelpräparaten wieder vergleichbar.

## 7 Literaturverzeichnis

Baur J A, Pearson K J, Price N L, Jamieson H A, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard J S, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell P J, Poosala S, Becker K G, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein K W, Spencer R G, Lakatta E G, Le Couteur D, Shaw R J, Navas P, Puigserver P, Ingram D K, Rafael de Cabo, David A Sinclair (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* Vol 444: 337-342

Cantos E, García-Viguera C, De Pascual-Teresa S, Tomás-Barberán F A (2000) Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem* 48: 4606-4612

El Attar T und Virji A (1999) The effects of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res* 19: 5407-5414

Elitsur Y, Moshier J A, Murthy R, Barbish A, Luk G D (1992) Polyamine levels, ornithine decarboxylase (ODC) activity, and ODC-mRNA expression in normal and cancerous human colonocytes. *Life Sci* 50: 1417-1424

Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E (1998) Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 421: 277-279

Frémont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66: 663-73

Furchgott RF, De Gubareff T, Grossmann A (1959) Release of autonomic mediators in cardiac tissue by suprathreshold stimulation. *Science* 129: 328-329

Gehm B D, McAndrews J M, Chien P Y, Jameson J L (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci* 94: 14138-43

Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM (2002) Resveratrol suppresses angiotensin-2-induced Akt/protein kinase B and p70S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 62: 772-777

Hung L M, Chen J K, Hung S S (1997) Cardioprotective effect of Resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Science* 275: 218-220

Jang M, Cai L, Udeani G O, Slowing K V, Thomas C F, Beecher C W W, Fong H H S, Farnsworth N R, Kinghorn A D, Mehta R G, Moon R C, Pezzuto J M (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-20

Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM (2000) Resveratrol decreases early signalling events in washed platelets but has little effect on platelet aggregation in whole blood. *Blood Cells Mol Dis* 26: 144-150

Kleine-Gunk B (2007) Resveratrol- Schlüssel für ein langes Leben?. *Pharmazeutische Zeitung* 29

Koch-Weser J (1963) Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. *Am J Physiol* 204: 451-457

Langcake P and Pryce R J (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol* 9: 77-86

Liu Y, Liu G (2004) Isorhapontigenin and resveratrol suppress ox.LDL induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen activate protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 67: 777-785

Löser C, Fölsch U R, Paprotny C, Creutzfeldt W (1990) Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum, and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer* 65: 958-966

Lötsch V (2004) Diplomarbeit Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivats STPAR29A auf verschiedene isolierte Präparate von Meerschweinchen. 47; 51; 55; 58; 62

Metz G (2000) Phytamine -Rotwein und mediterrane Küche sind ein potentes Duo. Pharmazeutische Zeitung 34

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001) Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Pervaiz S (2003) Resveratrol. From grapevines to mammalian biology. FASEB J 17: 1975-1985

Przemyslaw G (2006) Untersuchung der gewebspezifischen Wirkung eines neu synthetisierten Phenylbenzocarbothiamids an isolierten Organen von Meerschweinchen. Diplomarbeit Universität Wien

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. Arzneim Forsch 17: 1249-1253

Rosemann S (2002) Verbesserung der Kontraktilität von Dünndarmstreifen bei nekrotisierender Pankreatitis durch NO-Antagonismus und Einfluss von Endotoxin. Dissertation Freie Universität Berlin

Sanders T H, McMichael Jr R W, Hendrix K W (2000) Occurrence of resveratrol in edible peanuts. J Agric Food Chem 48: 1243-1246

Soleas G J, Diamandis E P, Goldberg D M (1997A) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? Clin Biochem 30: 91-113

Urena G (2003) Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans resveratrol. *Journal of Agricultural Food Chem* 51: 82-89

Walle T, Hsieh F, DeLegge M H, Oatis J E, Walle U K (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32: 1377-1382

Wolter F, Clausnitzer A, Akoglu B, Stein J (2002) Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. *J Nutr* 132: 298-302

Wolter F (2002) Molekulare Mechanismen der antiproliferativen Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe am Beispiel von Resveratrol. Dissertation Justus Liebig Universität Gießen

Wolter F, Stein J (2002) Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in Caco-2 colon cancer cells. *J Nutr* 132: 2082-2086

Wu S, Sun ZJ, Liang Yu, Ke-Wie Meng, Xing-Lei Qin, Cheng-En Pan (2004) Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World J Gastroenterol* 10: 3048-3052

Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ (2001) Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int J Mol Med* 8: 3-17

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* Bd 23: 2369-2380

## ***Curriculum vitae***

---

**Name:** Lugmayr Sarah

### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 21.12.1984

Geburtsort: Wels

Wohnort: Müllnergasse 31/9; 1090 Wien

Staatsbürgerschaft: Österr.

Eltern: Univ.-Prof. Dr. Herbert Lugmayr und Luise Lugmayr

**Ausbildung:**

1991-1995	Volksschule 3, Wels
1995-2003	Wirtschaftskundliches Realgymnasium der Franziskanerinnen; Wels
Juni 2003	Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
Okt. 2003	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
April 2008	Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien