



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening von zwei neu synthetisierten
Diarylimidazolen (PGU 112 und PGU 179) an isolierten Organen von
Meerschweinchen

Verfasserin

Maida Begovic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im April 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Mein größter Dank gilt zu allererst meinen Eltern, Medina und Vernes, die mir die Ausbildung ermöglicht haben. Während der gesamten Studiendauer haben sie mich sowohl finanziell als auch moralisch unterstützt meinen Weg zu gehen.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinem einzigartigen Bruder Homen, der mir mit seinem fachlichen Wissen immer zur Seite stand und mich auf eine besondere Art immer wieder neu zu Motivieren wusste.

Ein herzliches Dankeschön meinen Freunden Amela und Damir, die mich bei der technischen Anfertigung meiner Diplomarbeit so kräftig unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön auch allen meinen Freunden und Studienkollegen, die meine Studienzeit in Wien unvergesslich gemacht haben und mich während meines Studiums in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht dem äußerst hilfsbereiten A.o. Univ.-Prof. Dr. Christian für die Betreuung meiner Diplomarbeit und den motivierenden Beistand bei den letzten Prüfungen.

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

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Zielsetzung und Aufbau	1
1.2 Resveratrol	2
1.2.1 Die protektiven Wirkungen des Resveratrol.....	4
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Versuchstiere	9
2.2 Präparate	10
2.2.1 Isolierung und Präparation	10
2.2.2 Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum	11
2.2.3 Isolierung und Präparation des Musculus papillaris	12
2.2.4 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis	12
2.2.5 Isolierung und Präparation der Aorta descendes.....	13
2.2.6 Isolierung und Präparation des Ileum terminalis	14
2.3 Physiologische Nährlösung (Tyrode)	15
2.4 Versuchsanordnung	16
2.4.1 Aufbau der Versuchsaapparaturen	16
2.4.1.1 Versuchsaapparatur A	18
2.4.1.2 Versuchsaapparatur B	19
2.4.2 Die Gaszufuhr	20
2.4.3 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber	21
2.5 Testsubstanzen	21
2.6 Versuchsablauf	22
2.6.1 Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum	23
2.6.2 Versuchsablauf am Musculus papillaris	24
2.6.3 Versuch an der Arteria pulmonalis.....	24
2.6.4 Versuchsablauf an der Aorta descendes.....	25
2.6.5 Versuch am Ileum terminalis	25

2.7	Auswertung der Ergebnisse.....	26
2.7.1	Auswertung am Atrium dextrum	26
2.7.2	Auswertung am Musculus papillaris	26
2.7.3	Auswertung an der Aorta, A. Pulmonalis und Ileum terminalis.....	27
2.8	Darstellung der Ergebnisse und Statistik	27
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Ergebnisse der Testsubstanz PGU 112	29
3.1.1	Wirkung von PGU 112 am Atrium cordis dextrum.....	29
3.1.2	Wirkung von PGU 112 am Musculus papillaris	32
3.1.3	Wirkung von PGU 112 an Aorta descendes.....	35
3.1.4	Wirkung von PGU 112 an Arteria pulmonalis	38
3.1.5	Wirkung von PGU 112 am Ileum terminalis	40
3.2	Ergebnisse der Testsubstanz PGU 179	44
3.2.1	Wirkung von PGU 179 am Atrium cordis dextrum	44
3.2.2	Wirkung von PGU 179 am Musculus papillaris	47
3.2.3	Wirkung von PGU 179 an Aorta descendes	50
3.2.4	Wirkung von PGU 179 an Arteria pulmonalis	53
3.2.5	Wirkung von PGU 179 am Ileum terminalis	56
4.	DISKUSSION	59
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
6.	LITERATURVEZEICHNIS	67
7.	CURRICULUM VITAE	73

1. EINLEITUNG

1.1. Zielsetzung und Aufbau

Diese Arbeit untersucht die Wirkung von zwei Diarylimidazolen, deren Leitsubstanz das Resveratrol war. Die Diarylimidazole (PGU 112 und PGU 179) wurden am Department für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert. Es wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf die glatte Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum überprüft. Desweiteren wurde auch der Einfluss auf die quergestreifte Muskulatur des Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris untersucht.

Über isometrische Kontraktionsmessungen konnte an den Versuchspräparaten die spasmolytische Wirkung, sowie der Einfluss auf die Inotropie und Chronotropie des Herzens überprüft werden.

Das erste Kapitel stellt die Grundsubstanz Resveratrol mit Herkunft, Biosynthese und mögliche zu erwartende Wirkungen dieser Grundsubstanz vor.

Im Kapitel 2. dieser Arbeit wird im Detail die Durchführung der Versuche, sowie der kompletten Vorbereitung und die verwendeten Materialien veranschaulicht.

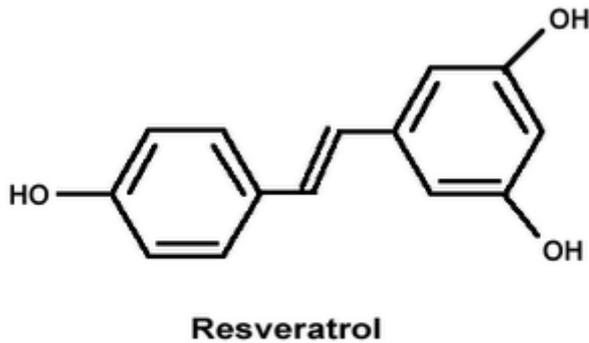
Die Ergebnisse dieser Studie werden im Kapitel 3. vorgestellt. Mit Hilfe von Tabellen und graphischen Darstellungen wird der Effekt der zu überprüfenden Testsubstanzen auf die Organe präsentiert.

Die Analyse, Interpretation und Diskussion der Ergebnisse dieser Studie befindet sich im Kapitel 4. dieser Arbeit, wo die Testsubstanzen untereinander, aber auch mit der Grundsubstanz Resveratrol verglichen werden.

Eine Zusammenfassung und ein kurzer Überblick über die komplette Arbeit findet sich im Kapitel 5.

1.2. Resveratrol

Abbildung 1: Struktur von Resveratrol



Resveratrol ist im Allgemeinen als „der Wirkstoff des Rotweins“ bekannt.

Als natürliche Quellen für Resveratrol gelten Traubenschalen, in geringeren Konzentrationen lässt es sich in mehr als 70 verschiedenen Pflanzenarten u.a. den Traubenkernen, Stielen, Reben und Wurzeln des Weinstocks, aber auch in Erdnüssen und Maulbeeren nachweisen. Die größten Mengen konnten aus der Kulturpflanze *Vitis vinifera* aus der Familie der Vitaceae isoliert werden, welche seit Jahrtausenden in der Weinproduktion verwendet wird. Erstmals wurde Resveratrol im Jahre 1940 aus den Blättern der weißen Lilie isoliert (Kleine-Gunk 2007). Seit langer Zeit gilt Resveratrol als fester Bestandteil traditioneller Medizin im orientalischen und asiatischen Raum, vor allem in China und Japan (Schmandke 2002). Erstmals wurde es von Nonomura et al. 1963 aus *Polygonum cuspidatum* (Knöterich) isoliert. Langcake und Pryce konnten im Jahr 1976 Resveratrol in Weintraubenblättern nachweisen. Seinen großen Ruhm erlangte Resveratrol als Bestandteil der Polyphenol-Gruppe des Rotweins (Soleas et al. 1997).

Chemisch betrachtet handelt es sich um ein trans-3,5,4'-Trihydroxystilben, welcher der Gruppe der Phytoalexine zuzordnen ist. Die höchsten Konzentrationen an Resveratrol findet man in der Weintraubenschale, wo ein Resveratrolgehalt von 50-60 µg/g gemessen werden konnte (Celotti et al. 1996). Im Rotwein lassen sich Konzentrationen von 1,5-3 mg/l nachweisen (Jang et al. 1997). Der Resveratrolgehalt ist größtenteils von der Herstellung, der Dauer der Extraktion der Hülsen abhängig. Vergleichsweise sind bei Weißwein und

Traubensaft aufgrund des kürzeren Fermentierungsprozesses geringere Mengen an Resveratrol zu finden. Resveratrol löst sich besonders gut in Alkohol, was ein zusätzlicher Grund ist warum ein höherer Gehalt im Wein als im Traubensaft zu finden ist.

Den großen internationalen Ruhm erreichte Resveratrol erst in den 90er Jahren, weil es eine mögliche Erklärung für das französische Paradoxon bot (Renaud et al. 1992). Das französische Paradoxon ist die außergewöhnliche Beobachtung dass Rotweinkonsum, trotz des für den menschlichen Körper giftigen Alkohols, offenbar gesund ist. Epidemiologen hatten Anfang der 90er Jahre beobachtet, dass in Frankreich, bevorzugt in den südlichen Teilen des Landes die Herzinfarktrate um rund 30 bis 40 Prozent niedriger als in vergleichbaren europäischen Ländern und den USA lag, trotz vorhandener ausgeprägter Risikofaktoren wie der cholesterinreichen Ernährung und des Nikotinabusus (Criqui et al. 1994). Es sollen auch die Alterungsprozesse weniger ausgeprägt sein. Dieses Phänomen wurde erstmals 1819 vom irischen Arzt Samuel Black beschrieben. Als Begriff wurde es von Dr. Serge Renaud, einem Forscher der Universität Bordeaux eingeführt.

Resveratrol wird zur großen Gruppe der Polyphenole gezählt. Biologisch wirksam ist das Molekül Phytoalexin. Man kann Resveratrol als funktionellen Bestandteil des pflanzeigenen Immunsystems verstehen, welches dem Schutz der Weintraube vor Pilz-, Bakterien- und Virusinfektionen, aber auch als Schutz gegen schädliche Umwelteinflüsse und Toxine dient (Ignatowicz et al. 2001). Daraus lässt sich auch der unterschiedlich hohe Gehalt an Resveratrol in verschiedenen Rotweinen erklären. Hohe Konzentrationen an Resveratrol lassen sich in Reben nachweisen, deren Immunsystem stark beansprucht wird und welche unterschiedlichen Witterungsbedingungen ausgesetzt sind. Rein sonnenverwöhnte Weine werden von ihrer Umwelt eher „verwöhnt“ und bilden weniger Resveratrol (Kleine-Gunk 2007).

Als Ausgangssubstanz für die Synthese von Resveratrol dient die Aminosäure Phenylalanin. Die Synthese läuft über den Shikimisäure-Weg, wobei Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammoniumlyase desaminiert wird und in die trans-Zimtsäure überführt. Als nächstes kommt es zur Hydroxylierung am Phenylring zur p-Hydroxyzimtsäure durch die Hydroxylase. Das wichtigste Enzym der Resveratrolsynthese ist die Stilbensynthase, welche auch als Resveratrol-Synthase bezeichnet wird. Durch die Resveratrolsynthase wird ausgehend von der p-Hydroxyzimtsäure die Zyklisierung aus einem Cumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA und damit die Bildung des Polyphenols katalysiert (Schröder et al., Austin et al. 2004).

1.2.1. Die protektiven Wirkungen des Resveratrol

Resveratrol gilt als Pflanzenimmunstoff, welcher bei Infektionen, hoher UV-Belastung oder Stress durch die Pflanze gebildet wird. Weil es zu der Gruppe der Phytoalexine gehört, wird dem Resveratrol auch eine fungizide Wirkung zugeschrieben. (Soleas et al. 1997, Hipskind und Paiva 2000, Becker et al. 2003). Resveratrol zeigt jedoch nicht nur in der Pflanze, sondern auch im menschlichen Körper abwehrstärkende Funktionen, was in einer großen Anzahl publizierter Studien bereits nachgewiesen werden konnte. Demnach soll ein mäßiger Weinkonsum im Vergleich zur kompletten Weinabstinenz das Risiko früher zu sterben um die Hälfte vermindern (Gronbaek et al. 1995). Für die lebensverlängernde Wirkung ist der antioxidative Effekt des Resveratrols und sein Einfluss auf den Fettstoffwechsel verantwortlich. Hierbei wird nur zusammenfassend über die wichtigsten Untersuchungen und Wirkungen von Resveratrol eingegangen.

Polyphenole besitzen ausgeprägtes antioxidatives Potenzial. Demnach wird Resveratrol ebenfalls eine hohe antioxidative Wirksamkeit zugeschrieben. Das hohe Redoxpotenzial ist den Hydroxylgruppen zu verdanken, die als ideale Radikalfänger fungieren. Es dichtet ähnlich wie das Koenzym Q10 unmittelbar an Mitochondrien die sogenannten Protonenleaks ab und neutralisiert reaktive Sauerstoffradikale (Leonard et al. 2003). Resveratrol verfügt zusätzlich über die Fähigkeit körpereigene antioxidative Enzymsysteme wie die Superoxiddismutase und einige Katalasen zu stimulieren. (Martinez et al. 2000). Die antioxidative Eigenschaften sind besonders für die gefäßprotektive Wirkung wichtig. Resveratrol verhindert als Antioxidans die Lipidperoxidation bzw. die Oxidation von LDL-Cholesterol, denn erst in seiner oxidativen Form wird LDL-Cholesterol in der Gefäßwand eingelagert, wodurch letztlich die Makrophagen im Endothel aktiviert werden, was als Schlüsselpunkt für die Bildung atheromatöser Plaques verstanden wird (Steinberg et al. 1989). Bei der Entstehung atheromatöser Plaques an der Gefäßwand spielen prooxidative Kupferionen eine wichtige Rolle. Resveratrol inhibiert als kupferbindender Chelator die Cholesterinoxidation, sowie die Plättchenaggregation, wodurch die gefäßprotektive Wirkung erklärt wird (Frankel et al. 1993, Olan et al. 1999). Die kardioprotektive Wirkung von Resveratrol basiert auf der antioxidativen, aber auch auf dem vasodilatierenden Effekt, sowie dem Einfluss auf die Blutgerinnung. Resveratrol hemmt die Bildung der Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels und die Thrombozytenaggregation im Unterschied zum Ethanol

im Rotwein, welches nur die thrombininduzierte Aggregation hemmt (Kimura et al. 1985, Pace Asciak et al. 1995).

Dem Resveratrol wird neben der gefäßprotektiven, auch eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Das Gehirn als besonders lipidreiches Organ unterliegt ebenfalls oxidativem Stress. Resveratrol überwindet die Blut-Hirn-Schranke und konnte in mehreren in-vivo-Studien im Gehirn nachgewiesen werden (Virgili et al. 2000). Nach neueren Erkenntnissen soll Resveratrol die Prozessierung von β -Amyloid, dem pathogenen Faktor der Alzheimer-Demenz beschleunigen (Savaskan et al. 2003).

Die chronisch niederschwellige Entzündung ist aufgrund der Beteiligung am Alterungsprozess in den letzten Jahren Gegenstand vieler Diskussionen. Die Entzündungsreaktion ist eine der wichtigsten Funktionen biologischer Organismen, welche die Verteidigung und Abwehrreaktionen gegen verschiedene exogene und endogene Krankheitserreger ermöglicht. Die Persistenz der Entzündungsreaktion nach erfolgreicher Abwehr der Krankheitserreger begünstigt jedoch die Entstehung von chronischen und degenerativen Erkrankungen. In vielen Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die stille Entzündungsreaktion (engl. „silent inflammation“) die Schlüsselrolle im Pathomechanismus und der Genese vieler Erkrankungen spielt. Erkrankungen wie die Arteriosklerose, Neurodegeneration, sowie maligne Erkrankungen können auf dem Boden chronischer Entzündungsprozesse entstehen (Willerson et al. 2004, McGeer et al. 2003, Philip et al. 2004). Seitdem wird antiinflammatorischen Therapiekonzepten eine immer größere Bedeutung verliehen, wie es zum Beispiel bei der neueren Generation der COX-2-Hemmer der Fall ist. Jedoch werden diese aufgrund ernstzunehmender Nebenwirkungen wieder zurückhaltender angewendet, wodurch immer mehr die antiinflammatorisch wirksamen Phytotherapeutika in den Fokus gebracht werden. Zu antiinflammatorisch ausgeprägt wirksamen Phytotherapeutika zählt insbesondere Resveratrol, welches direkt sowohl die Cyclooxygenase (COX-2), als auch die intrinsische Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) hemmt. Somit inhibiert Resveratrol zwei Schlüsselenzyme der Entzündungsreaktion wodurch die mögliche lebensverlängernde Wirkung erklärt werden kann (Subbaramaiah et al. 1999, Tsai et al. 1999). Die vermehrte Produktion inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF-alpha) basiert auf dem intrazellulären Signalweg über den nukleären Faktor kappa-B (NFk-B), welches in der Regel als inaktives Dimer im Zytoplasma vorliegt und durch viele verschiedene Stimuli wie z.B. die UV-Strahlung, Bakterientoxine aktiviert werden kann und darauffolgend in den Zellkern einwandert. In weiterer Folge kommt es zur Steigerung der Genexpression unterschiedlicher proinflammatorischer Enzyme. Somit wird NFk-B als die

entscheidende Schaltstation für die Verknüpfung oxidativer und inflammatorischer Prozesse verstanden. Resveratrol hemmt *in vitro* die nukleäre Translokation von NFκ-b und verhindert den Schlüsselmechanismus in der Entstehung proinflammatorischer Mediatoren (Kundu et al. 2004). Auf diesem Mechanismus basieren die positiven Wirkungen des Resveratrol auf diverse Krankheitsbilder.

Vor 15 Jahren wurde in *Science* eine Arbeit veröffentlicht, in der an Krebsmodellen die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol nachgewiesen werden konnte. Resveratrol soll inhibitorisch auf alle drei Stadien (Initiation, Promotion, Progression) der Krebsentstehung wirken (Jang et al. 1997). Die karzinoprotektive Wirkung von Resveratrol basiert auf den antioxidativen und antiinflammatorischen Effekten. Wie bereits erwähnt gilt die oxidative Belastung schon seit längerer Zeit als karzinogener Faktor (Marx 2004). Die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol geht sogar einen Schritt weiter. In experimentellen Arbeiten erwies sich Resveratrol als sehr potenter Apoptose-Induktor und ihm konnte damit die Fähigkeit Krebszellen in den programmierten Zelltod zu zwingen zugeschrieben werden (Dorrie et al. 2001, Mahyar-Roemer et al. 2002). Durch verschiedene Studien konnte eine signifikante Hemmung der Tumorgenese durch Resveratrol gezeigt werden. Desweiteren konnte ein modulierender Einfluss von Resveratrol auf die essentiellen Kinasen, Transkriptionsfaktoren und deren Regulatoren und damit auf verschiedene Stellen von intrazellulären Signaltransduktionswegen, die Regulation des Zellwachstums und die Proliferation nachgewiesen werden (Kundu et al 2008).

Es konnte im Rahmen eines *ex-vivo* Experiments nachgewiesen werden, dass Resveratrol die Produktion von proinflammatorischen (TNF-α und IL-1β), aber auch der antiinflammatorischen (IL-6) Zytokine hemmt (Marier et al. 2005). Unter Resveratrol kam es zur Abnahme der Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und der Angiogenese und damit auch zur Hemmung des Tumorwachstums (Yu et al. 2010).

In weiteren Forschungsarbeiten wird Resveratrol als möglicher „Sensitizer“ bzw. die Fähigkeit bestimmte Karzinomtypen gegenüber von Schadeffekten der Chemo- und Strahlentherapie zu sensibilisieren überprüft. Diese zusätzliche Eigenschaft könnte die Effektivität der Krebstherapien deutlich steigern, die Resistenzentwicklung reduzieren und damit die Langzeitprognose möglicherweise verbessern (Fulda et al. 2004). Im Tierversuch konnten bis jetzt positive Ergebnisse erzielt werden, jedoch stecken die Studien am Menschen noch in den Kinderschuhen. Es ist sehr schwer und problematisch, vielleicht sogar unmöglich eine direkte Korrelation zwischen dem Rotweinkonsum und der Karzinomprävalenz herzustellen, weil die Resveratrolkonzentration in den verschiedenen Rotweinsorten stark

schwankt. Im Wein sind auch weitere wirksame Polyphenole zu finden. Ein zusätzliches Problem ist die unterschiedliche, teils inhibitorische, teils aber promovierende Wirkung des Alkohols auf verschiedenen Krebsformen. Aussagekräftige Studien können nur mit Resveratrol-Supplementen durchgeführt werden. Hierzu gibt es den ersten Überblick über die Studien zum Einsatz in der Prävention und Zusatztherapie bei Krebserkrankungen in der Übersichtsarbeit von Aggarwal (Aggarwal et al. 2004).

Die mögliche lebensverlängernde Wirkung von Resveratrol wurde bereits erwähnt. Resveratrol besitzt jedoch eine für diese Substanz hoch spezifische Wirkung, welche vor allem in der Anti-Aging-Medizin für immer mehr Aufsehen sorgt. Es soll auf unterschiedliche Organismen den gleichen lebensverlängernden Effekt haben wie eine anhaltende Kalorienrestriktion (Calorie restriction) und wird dadurch zu den Calorie-restriction-Mimetika gezählt. Die Kalorienrestriktion gilt als am längsten bekannter, am besten untersuchter und umfassend dokumentierter Therapieansatz in der Anti-Aging-Medizin. Es gilt bis heute als die einzige interventionelle Maßnahme bei der experimentell eine tatsächliche lebensverlängernde Wirkung nachgewiesen werden konnte (Kleine-Gunk B 2007).

Clive McCay berichtete in den 30er Jahren bereits von Versuchen, in denen Laborratten, deren Nahrungsaufnahme um 30 Prozent reduziert wurde, eine um bis zu 50 Prozent verlängerte Lebenserwartung hatten (McCay et al. 1935). Diese Ergebnisse konnten seitdem in verschiedenen Studien an unterschiedlichsten Spezies, vom Fadenwurm bis zum Primaten wiederholt und ein gleicher Effekt wurde ausnahmslos für alle biologischen Organismen bestätigt (Kleine-Gunk B). Es war lange Zeit unbekannt auf welche Weise die Kalorienrestriktion lebensverlängernd wirkt. Erst in den letzten Jahren konnte der Mechanismus aufgeklärt werden. Der lebensverlängernde Effekt basiert auf dem „gene silencing“. Die Kalorienrestriktion wirkt lebensverlängernd über die Induktion von Nicotinamid und die Aktivierung sogenannter Sirtuine. Unter dem Einfluss der Sirtuine kommt es in der Zelle zur vermehrten DNA-Reparatur, wodurch das längere Überleben der Einzelzelle ermöglicht wird. Konsequenterweise verlängert sich die Lebensspanne des kompletten Organismus (Lin et al. 2000, Anderson et al. 2003). Dieser universelle Sirtuin-Mechanismus konnte auch an Humanzellen nachgewiesen werden (Langley et al. 2002).

Die chemische Struktur von Resveratrol lässt vermuten, dass es auf zwei verschiedenen Wegen mit den Plasmaproteinen interagiert. Über seinen lipophilen Teil kommt es zur vermehrten Anhäufung in Plasmaproteinen abhängig vom Fettgehalt. HDL hat im Vergleich zu LDL weniger Fettgehalt, wo auch demnach die Polyphenolkonzentration geringer ist. Mit

dem hydrophilen Anteil von Resveratrol werden die freien Radikale abgefangen, noch bevor sie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren angreifen können (Belguendouz et al. 1998, Frèmont et al. 1999). Eine direkte Senkung der Triglyceride im Serum, des VLDL und des LDL-Spiegels konnte in einer Studie mit Hepatom-infizierten Ratten nachgewiesen werden (Miura et al. 2003). Die Senkung des Gesamtcholesterins durch Resveratrol und die im Rotwein befindlichen Flavonoide konnte bereits im Jahre 2000 nachgewiesen werden (Kollar et al. 2000). Dies wurde in einer weiteren Arbeit damit erklärt, dass Resveratrol die Fähigkeit besitzt spezifisch die Squalen-Monooxygenase, ein essentielles Enzym der Cholesterinbiosynthese, zu hemmen (Laden et al 2001).

Über die Senkung des Blutzuckers, sowie der Triglyceridkonzentration hat Resveratrol einen positiven Effekt auf den Diabetes mellitus (Su et al. 2006). Studien belegen auch eine Steigerung der Expression des Glucosetransporters GLUT 4 bei Diabetes mellitus Typ 2, woraus eine Besserung der Glucoseaufnahme resultiert (Lekli et al. 2008). Die diabetesbedingten, neuropathischen Symptome konnten über den modulierenden Einfluss von Resveratrol auf die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (NO und TNF α) vermindert werden (Sharma et. al 2007). An Mäusen, die kalorienreich ernährt wurden konnte mit Resveratrol die Insulin-Sensibilität, sowie die AMP-aktivierte Proteinkinase erhöht und die Konzentration des IGF-1 (insulin-like growth-factor) gesenkt werden. Über diesen Mechanismus konnte ebenfalls eine lebensverlängernde Wirkung des Naturstoffs nachgewiesen werden (Baur et al. 2006).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Für diese Studie wurden fünf Organe männlicher und weiblicher Meerschweinchen des Stammes „TRIK“ mit einem Körpergewicht von 250 bis 600 Gramm isoliert. Für die Durchführung dieser Studie war es sehr wichtig dass als Versuchstiere sehr junge Tiere ausgesucht wurden. Die aus den Versuchstieren isolierten Organe waren der rechte Vorhof (Atrium cordis dextrum), der Pappilarmuskel (Musculus papillaris) des Herzens, die Aorta descendens und die Arteria pulmonalis, sowie das terminale Ileum. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen ausgesucht, weil die Ionenkanäle dieser Tiere denen des Menschen am ehesten entsprechen und sich am besten zur Überprüfung der Testsubstanzen eignen.

Abbildung 2: Versuchstiere



2.2. Präparate

2.2.1. Isolierung und Präparation

Vor der Entnahme der Organe wurden die Versuchstiere durch einen gezielten Genickschlag getötet. Darauffolgend wurde der Thorax der Tiere mit einer Schere eröffnet und das noch schlagende Herz, sowie die thorakale Aorta und das terminale Ileum möglichst schnell entfernt und in eine vorbereitete physiologische Nährlösung gelegt. Um ein Absterben der Organe zu verhindern wurde besonders geachtet, dass die entnommenen Organe in der Nährlösung direkt mit einer Gasmischung aus 95% igem Sauerstoff und 5 % igem Kohlendioxid versorgt werden.

Aufgrund der geringen Größe wurde die Präparation der Organe der Versuchstiere mit Hilfe eines Lichtmikroskopes in einer mit Elektrolytlösung gefüllten mit Kork ausgelegten Petrischale durchgeführt. Auf der Korkunterfläche konnten die isolierten Organe für die Präparation optimal mit Präpariernadeln fixiert werden. Die Korkplatte wurde mit Hilfe eines Gummiring in der Petrischale fixiert und so wurde ein Aufschwimmen verhindert.

Für die Präparation wurden Pinzetten, Spitzscheren, Federscheren, Präpariernadeln und Pasteurpipetten verwendet. Nach Beendigung der Präparation wurden die in der Studie verwendeten Organe bis zu ihrer Fixierung weiterhin in mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid versorgter Elektrolytlösung gehalten.

Abbildung 3: Lichtmikroskop und Präparierbesteck



2.2.2. Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum

Nach Isolierung des Herzens aus dem Thorax der Versuchstiere wurde es zuerst vom überschüssigen Blut befreit und wie im Vorfeld beschrieben in die Petrischale überführt. Die Fixierung wurde mit je einer Nadel an der Herzspitze und Herzbasis durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde das Perikard, Fettgewebe und das Lungengewebe entfernt. Es erfolgte entlang des Sulcus coronarius ein Schnitt um den rechten Vorhof von der rechten Herzkammer trennen zu können. Dieser Schritt wurde mit großer Vorsicht durchgeführt, um die Funktion des primären Schrittmachers des Herzens, nämlich des Sinusknotens, welcher für die Chronotropie und damit für die optimale und aussagekräftige Versuchsdurchführung enorm wichtig war, nicht zu beeinträchtigen. An der unteren Spitze, sowie am oberen Fettgewebe des Vorhofs wurde mit einem Bindefaden ein Silberhäkchen fixiert. Mit Hilfe dieser Häkchen war es anschließend möglich das Präparat optimal in der Versuchsanordnung zu befestigen.

Abbildung 4: Präparierter Vorhof



2.2.3. Isolierung und Präparation des Musculus papillaris

Nachdem der rechte Vorhof entfernt wurde, konnten im nächsten Schritt der rechte Ventrikel bis zur Herzspitze eröffnet, weiter aufgeklappt und auf diese Art und Weise die Papillarmuskeln dargestellt, sowie mit Nadeln fixiert werden. Als nächstes war es von großer Bedeutung die Purkinjefasern mit großer Vorsicht und Sorgfalt zu entfernen ohne den Versuchsablauf durch die spontane Aktivität der Fasern zu beeinträchtigen. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde mit einem weiteren Bindfaden ein Silberhäkchen befestigt, darauffolgend die Muskelsehne durchtrennt und der Muskel sorgfältig herauspräpariert ohne dabei überdehnt zu werden.

Abbildung 5: Präparierter Papillarmuskel



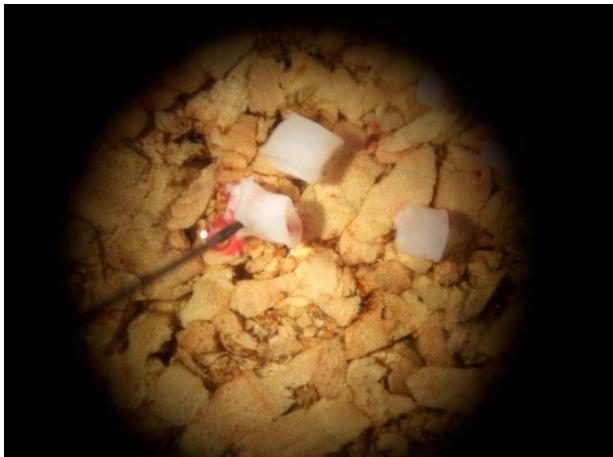
2.2.4. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis

Nach der Entfernung der Lungenanteile, der am Herzen anhaftenden Fettreste und des Perikards mit der Federschere wurde die Arteria pulmonalis durchtrennt. Die Arteria pulmonalis wurde in unmittelbarer Nähe zum Herzen abgeschnitten, da nur ein kleiner Teil bis zur Aufteilung in die rechte und linke Arterie für den Versuch verwendet werden konnte. Nach erfolgreicher Isolierung der A. pulmonalis wurde diese ebenfalls in der Petrischale mit Hilfe von zwei Nadeln aufgehängt und von anhaftenden Fett- oder Muskelresten befreit. Die Arteria pulmonalis wurde in 3-4 mm breite ringförmige Stücke geschnitten, welche ohne weitere Hilfsmittel in der Versuchsanordnung fixiert werden konnten.

2.2.5. Isolierung und Präparation der Aorta descendens

Hierfür wurde nicht der Aortenbogen (lat. Arcus aortae), sondern der an der Wirbelsäule liegende thorakale Anteil der Aorta (lat. Aorta thoracica) verwendet. Nach durchgeführter Thorakotomie wurde die Aorta entlang der Wirbelsäule mit großer Sorgfalt und Vorsicht mit einer Pinzette und Spitzschere herausgeschnitten. Hierbei musste die Wirbelsäule stark nach vorne gedrückt werden, um die Aorta optimal darstellen und erreichen zu können, sowie ein ca. 3 cm langen Teil der Aorta entnehmen zu können. Die herausgeschnittene Aorta thoracica wurde in die physiologische Nährlösung gelegt. Das weitere Vorgehen wurde unter Mikroskopsicht durchgeführt. Als nächstes wurde die Aorta in einer mit physiologischer Nährlösung gefüllter Petrischale mit ausgelegtem Korkboden gelegt und an ihren beiden Enden mit je einer Nadel fixiert. Unter Mikroskopsicht wurden vorsichtig mit einer Pinzette und Federschere Fettgewebsreste entfernt ohne dabei die Aorta zu verletzen. Anschließend wurde die Aorta in 2-3 mm breite ringförmige Stücke geschnitten, welche später direkt ohne Hilfsmittel in der verwendeten Versuchsanordnung eingespannt werden konnten.

Abbildung 6: Präparierte Aorta



2.2.6. Isolierung und Präparation des Ileum terminalis

Die Bauchdecke wurde mit Hilfe einer Schere aufgeschnitten und ein ca. 20 cm langer Abschnitt des Dünndarms entfernt. Hierbei war es mehrmals notwendig das Mesenterium einzuschneiden, um das Ileum herauszuziehen. Der entfernte Darm wurde an seinem jejunalen Ende mit Hilfe eines Bindfadens abgebunden, am caecalen Ende durchtrennt und anschließend in die mit Gas versorgte Nährlösung gelegt. Im weiteren Verlauf wurde ein ca. 0,5-1 cm langes Stück von der caecalen Seite schräg abgetrennt und darauffolgend in eine Petrischale überführt. Das Ileum wurde am jejunalen und caecalen Ende mit Hilfe von Präpariernadeln befestigt und sorgfältig mit der Pasteurpipette durchgespült um die Chymusreste zu beseitigen ohne dabei das Ileum zu überdehnen oder zu verletzen. Nun konnten mit einem Bindfaden zwei Drahhäkchen an den schrägen Enden fixiert werden. Es musste darauf geachtet werden die Öffnungen nicht zu verschließen. Diese mussten ausreichend weit sein, damit die zugeführte Testsubstanz gleichmäßig durch die Innenseite das Präparat passieren kann. Die Darmstücke wurden in der mit Gas versorgten Nährstofflösung gehalten bis sie in der Versuchsanordnung aufgehängt werden konnten.

Abbildung 7: Präparierter Darm



2.3. Physiologische Nährlösung (Tyrode)

Tabelle 1: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,442	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,550	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO₃	84,010	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO₄	120,370	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH₂PO₄	136,090	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
CaCl₂	110,980	34,00 g/250 ml	3,20	3,92
Glucose	180,160	Reinsubstanz	1,98	-

In dieser Studie wurde als physiologische Nährstofflösung die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, welche nach Reiter (1967) hergestellt wurde verwendet. Besonders wichtig war es diese physiologische Nährlösung für die Präparate täglich frisch zuzubereiten. Dazu wurde wie in der Tabelle beschrieben vorgegangen. Die notwendigen Bestandteile wurden in der vorgeschriebenen Menge mit Ausnahme des CaCl₂ in einen Messkolben gemischt. Im nächsten Schritt wurde der Messkolben mit Aqua bidestillata auf ca. $\frac{3}{4}$ des Volumens aufgefüllt. Die Bestandteile wurden durch gründliches Schütteln des Messkolbens ausreichend miteinander vermischt. Als nächstes wurde 20 Minuten lang die Mischung mit Oxy mix (Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) begast und währenddessen langsam tröpfchenweise mit Hilfe einer Pipette das CaCl₂ hinzugefügt um damit ein Ausfallen schwerlöslicher Calciumsalze zu unterbinden, was zu einer Trübung der Lösung geführt hätte und diese für die Durchführung der Studie unbrauchbar gemacht hätte. Das Ziel war es die Nährlösung mit O₂ zu sättigen und damit einen möglichst konstanten physiologischen pH-Wert von 7,2-7,4 zu erreichen. Im letzten Schritt wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit Aqua bidest. aufgefüllt und mehrmals geschwenkt um eine optimale Durchmischung zu erzielen, nachdem es über 20 Minuten mit Oxy mix versorgt wurde. Die fertige Nährlösung konnte für die Versuche verwendet werden.

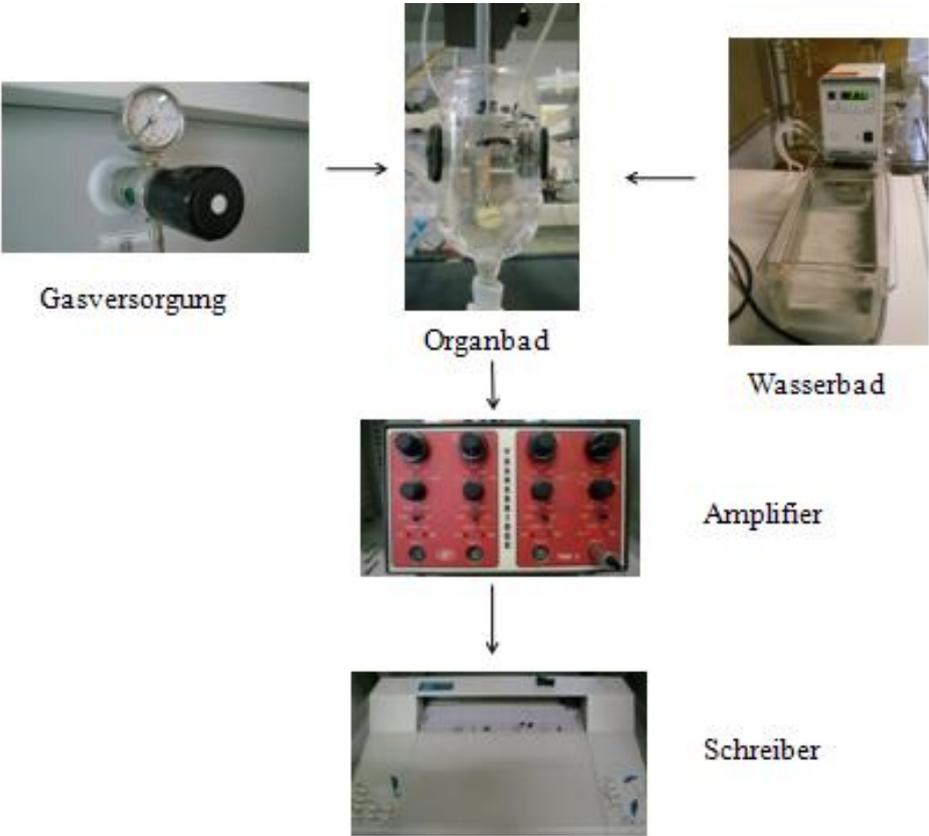
2.4. Versuchsanordnung

2.4.1. Aufbau der Versuchsapparaturen

Für die optimale Durchführung der Versuche war es sehr wichtig eine physiologische Umgebung (Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration) zu schaffen, sowie während der gesamten Versuchsdurchführung aufrechtzuerhalten. Für die Versuchsdurchführung wurden zwei Apparaturen verwendet, die nach gleichem Prinzip funktionieren und sich nur etwas in Ihrem Aufbau und der Art der Fixierung unterschieden. Für die Arteria pulmonalis, die Aorta, das Atrium cordis dextrum und das terminale Ileum wurde die Apparatur A verwendet. Für den Musculus papillaris wurde die Apparatur B verwendet. Einem physiologischen Wert entsprechende Temperatur von 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) wurde im Organbad mit Hilfe eines Wasserbadsystems über welches beide Apparaturensysteme verfügten aufrechterhalten. Für die Präparate des Pappillarmuskels und den rechten Vorhof wurde eine niedrigere Temperatur von 35°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) aufrecht gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer wurde eine konstante Sauerstoffversorgung gewährleistet.

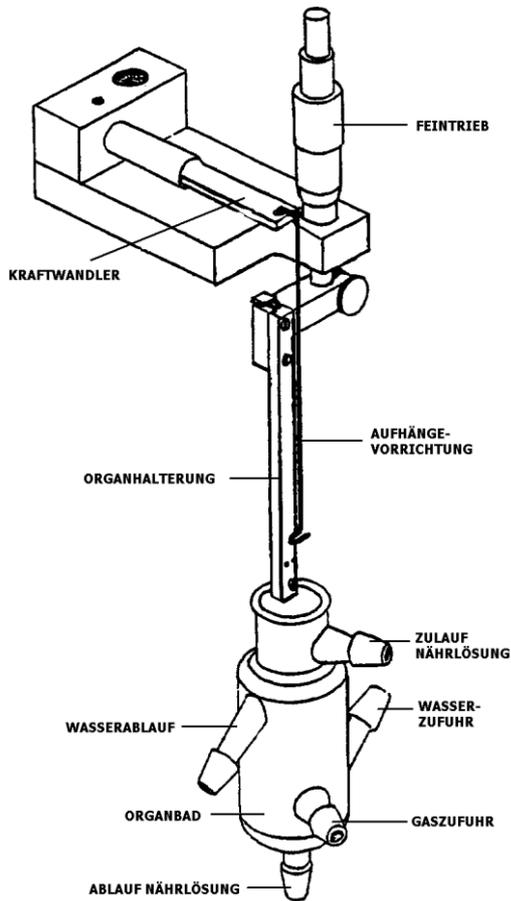
Die mechanische Kontraktion der Organe wurde bei beiden Apparaturen mit einem Kraftwandler in ein entsprechendes elektrisches Signal umgewandelt, welches mit Hilfe eines Amplifiers verstärkt wurde und mit einem Schreiber registriert werden konnte.

Abbildung 8: Versuchsanordnung



2.4.1.1. Versuchsapparatur A

Abbildung 9: Aufbau der Apparatur A

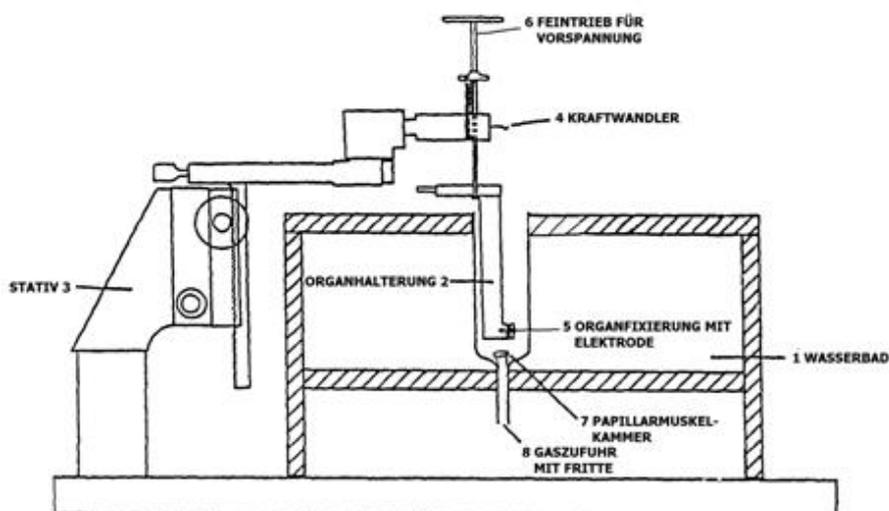


Bevor mit der Durchführung des Versuches begonnen werden konnte wurde das Organbad mit HCl und Aqua bidest. sorgfältig gereinigt und mit 25 ml Tyrode gefüllt. Als Organbad wurde ein doppelwandiges Glasgefäß, bei dem zwischen den Wänden das erwärmte Wasser mit Hilfe eines Zirkulationsmechanismus (Vorrichtung für die Wasserzufuhr und Wasserablauf) fließen konnte, verwendet. In diesem Organbad war es möglich die Tyrode auf die optimale Körpertemperatur aufzuwärmen. Zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung befand sich zusätzlich eine Öffnung, welche die kontinuierliche Gaszufuhr am Organbad ermöglichte.

Die Präparate wurden wie im Vorfeld beschrieben präpariert. Mit Hilfe der Hückchen wurde das terminale Ileum und Atrium dexter an einer Seite an die Aufhängevorrichtung aus Silberdraht und an der anderen Seite der Organhalterung an ein fixiert-montiertes Drahtstück aufgehängt. Die Präparate der Aorta und Arteria pulmonalis wurden aufgrund der ringförmigen Struktur direkt ohne Hilfsmittel an die Aufhängevorrichtung angebracht. Mit Hilfe des Feintriebmechanismus an der Apparatur war es möglich eine maximale Vorspannung und damit einheitliche Ausgangsspannung für alle Versuchspräparate zu erreichen. Im nächsten Schritt wurde das Präparat für 20 Minuten als Adaptationsphase in der Tyrode belassen. Als nächstes wurde die Tyrode über einen zuvor mit einer Klemme geschlossenen Ablauf abgelassen. Zur chemischen Reizung der Organe wurde 25 ml Kaliumchloridlösung, welche vorher aus der Tyrode zubereitet wurde nun ins Organbad dazugegeben. Bei einer mechanischen Kontraktion des Organs wurde diese über den Amplifier in ein elektrisches Signal umgesetzt. Mit Hilfe des Schreibers, welcher dieses Signal auf das Milimeterpapier registriert, konnte dieses Signal sichtbar gemacht werden.

2.4.1.2. Versuchsapparatur B

Abbildung 10: Aufbau der Apparatur B



Der Aufbau der Versuchsapparatur B ähnelt grundsätzlich der Apparatur A. Wie auch bei der ersten Apparatur wurde diese vor Beginn der Durchführung des Versuchs gründlich mit HCL und Aqua bidest. durchgespült und mit 25 ml Tyrode aufgefüllt.

Das Organbad bei der Apparatur B ist in das Wasserbad eingetaucht d.h. dass sich das Organbad somit im Unterschied zur Apparatur A direkt im erwärmten Wasser befindet. Von der Unterseite konnte die Gaszufuhr mit Hilfe eine Glasfritte gewährleistet werden.

Mit einer Plastikspritze und einem Gummischlauch musste die Tyrode abgesaugt werden, weil die zweite Apparatur im Unterschied zur ersten Apparatur über keine Abflussvorrichtung verfügte. Die für das Organ notwendige Halterung bestand aus Kunststoff und ist über ein Stativschlitten auf einem Stativ fixiert. Hierbei gab es ebenfalls eine Vorrichtung aus Silberdraht an die der Musculus papillaris aufgehängt werden konnte. Die freie Spitze des Papillarmuskels wurde zwischen einer Plexiglasscheibe und einer Platinelektrode eingeklemmt und über einen Schraubmechanismus vorsichtig festgezogen um eine Überdehnung des Organs zu vermeiden. Es war besonders wichtig die Befestigung aller Präparate rasch durchzuführen und diese in die für die Funktion und den Versuch notwendige Nährlösung einzutauchen. Für den Papillarmuskel wurde diese Apparatur verwendet, weil dieser keine Spontanaktivität besitzt und mit Hilfe eines Accupulser Stimulators (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) über eine Elektrode gereizt werden musste. Um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen wurde mit Hilfe des Feintriebs eine Vorspannung entwickelt. Im Falle einer Kontraktion des Muskels wurde mittels Silberdraht der Reiz auf den Kraftwandler übertragen, welcher den Impuls konvertierte und dieser konnte über einen Verstärker mit einem Schreiber registriert werden.

2.4.2. Die Gaszufuhr

Die Gasversorgung erfolgte von einer zentralen Gasflasche über Schläuche die von einzelnen Ventilen zu den Versuchsgeräten führten. Am Ende der Schläuche befand sich eine Glasfritte mit der eine feine Gasstromverteilung im Organbad gewährleistet werden konnte. Mit an den Schläuchen angebrachten Schraubklemmen konnte die Intensität des Gasstromes verändert werden. Als Gasgemisch wurde Oxymix verwendet (95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid). Während des gesamten Versuchs war es von enormer Wichtigkeit eine permanente Gasversorgung sicher zu stellen, um damit eine homogene Verteilung der

Testsubstanz und eine optimale Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten sowie einen physiologischen pH-Wert von 7,2-7,4 aufrechterhalten zu können.

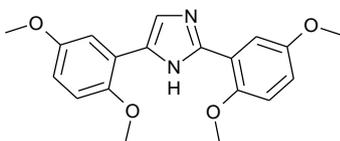
2.4.3. Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Der Kraftwandler (Transducer, Transbridge™ der Firma Precision Instruments, USA) diente der Umwandlung der mechanischen Kontraktionen des untersuchten Organs in die elektrischen Impulse. Dieses war notwendig um die Inotropie visualisieren und als mechanische Größe darstellen zu können. Mit Hilfe des Verstärkers (Amplifier, Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier der Firma WPI, USA) konnte der elektrische Impuls verstärkt und mit dem Schreiber (Flatbed Recorder, Modell BD 112 Dual Channel der Firma Kipp und Zone, NL) auf einem Milimeterpapier registriert werden.

2.5. Testsubstanzen

Am Department für Pharmazeutische/ Medizinische Chemie der Universität Wien wurden die beiden Testsubstanzen PGU 112 und PGU 179 unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und für die Versuche an den isolierten Organen von Meerschweinchen zur Verfügung gestellt.

Abbildung 11: Testsubstanz PGU 112

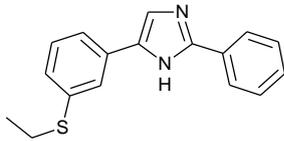


Nomenklatur: 2,5-Bis(2,5-dimethoxyphenyl)-1*H*-imidazol

MG: 376,83

Summenformel: C₁₉H₂₀N₂O₄

Abbildung 12: Testsubstanz PGU 179



Nomenklatur: 5-[3-(Ethylsulfanyl)phenyl]-2-phenyl-1*H*-imidazol

MG: 316,85

Summenformel: C₁₇H₁₆N₂S

2.6. Versuchsablauf

Die Organbäder wurden am Ende des jeden Versuchtages mit 2%iger HCl und anschließend mit Aqua bidestillata sorgfältig gereinigt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch andere Testsubstanzen zu vermeiden. Vor Beginn eines neuen Versuches wurden die Organbäder zuerst mit Tyrode durchspült, anschließend mit 25 ml Tyrode aufgefüllt und mit optimaler Gaszufuhr versorgt. Nun war es möglich die Organpräparate in der Apparatur für den Versuch einzuspannen. Nachdem das Organ 20 Minuten in der Tyrode gehalten wurde, konnte die KCl-Lösung, welche täglich frisch vorbereitet wurde hinzugefügt werden. Für die Aorta und Arteria pulmonalis wurde eine 90 mM (0,67 g KCl pro 100 ml Tyrode) und für das terminale Ileum eine 60 mM (0,45 g KCl pro 100ml Tyrode) KCl-Lösung zubereitet. Hierfür wurde das KCl in einem Messkolben mit Tyrodelösung bis zur Eichmarke aufgefüllt mit dem Ziel die Versuchsorgane vorzukontrahieren, um in weiterer Folge die eventuell dilatierende oder spasmolytische Wirkung der untersuchten Testsubstanzen erkennbar zu machen. Im Falle des Atrium dextrums wurde keine Kaliumchloridlösung verwendet, weil dieser aufgrund des Sinusknotens auch ohne chemischer Reizung fähig war spontan zu schlagen. Der Musculus papillaris wurde mittels einer Elektrode gereizt und benötigte ebenfalls keine chemische Reizung.

Vor der Untersuchung wurden die Testsubstanzen mit großer Genauigkeit auf speziellen Analysewaagen gewogen und abhängig von ihrer Löslichkeit in Aqua bidestillata oder in Dimethylsulfoxid aufgelöst. Nach Erreichen der Plateauphase erfolgte eine kumulative Zugabe der Testsubstanz dem Organbad in einem Zeitabstand von 45 Minuten.

Hierbei betragen die Konzentrationen 1, 3, 10, 30, und 100 $\mu\text{mol/l}$. Um die gewünschten Konzentrationen zu erzielen wurden nacheinander 1; 2; 7; 20 und 70 μl der aufgelösten Testsubstanz mit der Finnmikropipette hinzugefügt. Über die molare Masse wurde die benötigte Substanzmenge so berechnet um damit am Ende des Versuchs eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad zu erreichen.

Da Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel verwendet wurde und dieses eine leicht kontrahierende Wirkung besaß, musste diese bei der Auswertung der Ergebnisse abgezogen werden, um eine Verfälschung der Werte zu vermeiden. Es waren für jedes Organ mindestens vier Versuche für jede Testsubstanz vorgesehen.

2.6.1. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum

Der Vorhof wurde wie bereits im Vorfeld beschrieben freipräpariert und mit Hilfe von Häkchen in der ersten Apparatur eingespannt, sowie in das mit physiologischer Nährlösung gefüllte und begaste Organbad gelegt. Im nächsten Schritt wurde der Flachbettschreiber eingeschaltet und auf die Nulllinie positioniert. Darauffolgend wurde der Amplifier eingeschaltet, worauf der Schreiber erneut auf die Nulllinie korrigiert werden musste. Um die maximale Kontraktion erreichen zu können wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt. Es erfolgte erneut die Einstellung auf den Nullpunkt und ein Abwarten von ca. 45 Minuten um eine konstante Schlagfrequenz des Atriums zu erreichen. Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte bei einer Stromstärke von 5 mV und einer Geschwindigkeit von 5 mm/s. Aufgrund hoher Elastizität des Atriums musste die Vorspannung während der Durchführung des Versuchs regelmäßig korrigiert werden. Um zu überprüfen ob das Atrium eine konstante Anzahl der Schläge erreicht hatte wurde alle 5 Minuten eine Aufzeichnung auf 6 cm des Millimeterpapiers durchgeführt. Sobald die Schlagfrequenz über 3 bis 4 Registrierungen konstant bleibend war, konnte mit der Zugabe der zu überprüfenden Testsubstanz begonnen werden. Die Testsubstanz wurde kumulativ alle 45 Minuten hinzugefügt. Bis zum Versuchsende erfolgte alle 5 Minuten eine Kontrollaufzeichnung.

2.6.2. Versuchsablauf am Musculus papillaris

Wie im Vorfeld beschrieben wurde der Musculus papillaris präpariert und in der Apparatur B aufgehängt. Der Papillarmuskel wurde in das Organbad eingetaucht und mit einer Stromstärke von 5 mV und mittels Feintrieb auf 3,92 mN vorgespannt. Im Falle zu niedriger Kontraktionsamplitude war es möglich die Versuchsreihe auch bei einer Stromstärke von 2 mV durchzuführen. Wie beim Atrium dextrum war aufgrund der Organelastizität ein Nachjustieren des Papillarmuskels während des gesamten Versuchs notwendig, um die Abnahme der Kontraktionskraft zu vermeiden (Reiter 1967). Dadurch dass im Vorfeld die Purkinjefasern entfernt wurden besaß das Präparat des Musculus papillaris nicht die Fähigkeit der Spontanaktivität im Unterschied zum Atrium dextrum. Die Kontraktionen wurden mittels elektrischer Reizung mit einem Reizgerät (Accupulser A310 der Firma WPI, USA) induziert. Die elektrische Reizung wurde mit Rechteckimpulsen mit einer Dauer von 3 ms und einer Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Die Reizstromstärke wurde verändert bis eine Kontraktion des Muskels sichtbar wurde. Dabei sollte die Reizstärke nicht mehr als 10 % über der minimalen Schwellenstromstärke betragen, weil sonst die Katecholaminspeicher entleert werden könnten und somit der Papillarmuskel in Form eines „run down“ langsam zu schlagen aufhören würde (Furchgott et al. 1959) und somit in seiner Kontraktionskraft stetig abnehmen würde, wodurch es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen würde.

Während der Kontrollphase wurden alle 5 Minuten jeweils 6 Kontraktionsamplituden mit dem Schreiber auf Milimeterpapier registriert und anschließend gemessen. Als die Amplituden nach drei aufeinander folgenden Messungen eine konstante Länge und damit die gleiche Amplitudenhöhe zeigten, konnte die Testsubstanz hinzugefügt werden. In weiterer Folge wurden die Amplituden alle 5 Minuten während der Versuchsdauer registriert und die Konzentration der Testsubstanz alle 45 Minuten erhöht.

2.6.3. Versuch an der Arteria pulmonalis

Wie bereits im Kapitel 2.2.4 beschrieben wurde der freigelegte Ring der A. Pulmonalis in der ersten Apparatur eingespannt und in das Organbad gelegt. Als nächstes wurde der Amplifier und Schreiber wie bereits im Vorfeld im Kapitel 2.6.1. detailliert beschrieben eingeschaltet und auf Null gestellt und eine Vorspannung von 9,81 mN mit einer Stromstärke von 5 mv aufgebaut. Nach Ablauf der 20-minütigen Anpassungsphase wurde die Tyrodelösung

abgelassen und 90 mM KCl-Lösung wurde in das Organbad hinzugegeben. Als nächstes musste erstmal abgewartet werden, dass die Kontraktionskurve im Schreiber auf dem Milimeterpapier einen konstanten Wert einnahm, um dann kumulierend alle 45 Minuten die Testsubstanz hinzufügen zu können. Abhängig davon wie sich im weiteren Verlauf die Kurve verhielt, konnte unmittelbar darauffolgend leicht ersichtlich werden ob die Substanz am Versuchspräparat einen dilatierenden Effekt ausübte.

2.6.4. Versuchsablauf an der Aorta descendens

Die Durchführung dieses Versuchs ähnelt in vieler Hinsicht der Durchführung des Versuchs an der Pulmonalarterie, welche bereits im Kapitel 2.6.3. beschrieben wurde.

Die Vorbereitung des Versuchspräparats erfolgte entsprechend wie im Kapitel 2.2.5 erläutert. Die Aorta wurde in die Apparatur A eingehängt und bei einer Vorspannung von 19,6 mN und einer Stromstärke von 10 mV wurde die Adaptionssphase von 20 Minuten abgewartet. Danach wurde die Stromstärke auf 5 mV umgestellt und es wurde mit der Zugabe der 90 mM KCl begonnen. Nachdem die Kaliumchloridlösung hinzugefügt worden ist, wurde mit der Registrierung mit dem Schreiber begonnen. Hierbei war es wie auch bei der A. pulmonalis notwendig darauf zu warten, dass die Kontraktionskurve einen konstanten Wert erreicht, um mit der Zugabe der Testsubstanz beginnen zu können. Über das Verhalten der Kurve war es möglich die dilatierende Wirkung der Substanz am Versuchspräparat abzulesen.

2.6.5. Versuch am Ileum terminalis

Die Vorbereitung des Versuchspräparats erfolgte wie bereits im Kapitel 2.2.6. beschrieben. Das Ileumpräparat wurde mit dem jejunalen Ende nach oben gerichtet und dem caecalen Ende nach unten in die Apparatur A aufgehängt und in das Organbad eingesenkt. Darauffolgend wurde der Amplifier und Schreiber eingeschaltet. Es wurde über den Feintrieb eine Vorspannung von 4,9 mN bei einer Stromstärke von 5 mV eingerichtet. Es folgte die Anpassungsphase über 20 Minuten in der Tyrode. Danach wurde die Tyrodelösung abgelassen und die 60 mM Kaliumchloridlösung wurde hinzugefügt, worauf mit der Registrierung mit dem Schreiber begonnen werden konnte. Im Unterschied zu den anderen Versuchspräparaten konnte aufgrund kompletter Kontraktion beim Ileum ein starker

Kurvenausschlag aufgezeichnet werden. Der Ausschlag der Kurve ging aber in kurzer Zeit wieder zurück und wurde relativ schnell konstant, worauf die zu überprüfende Substanz hinzugegeben werden konnte. Über die Kurve konnte sichtbar gemacht werden ob die Testsubstanz am Versuchspräparat bzw. dem terminalen Ileum einen spasmolytischen Effekt zeigte.

2.7. Auswertung der Ergebnisse

2.7.1. Auswertung am Atrium dextrum

Für die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse im Versuch am rechten Vorhof wurde die vom Schreiber registrierte Schlagfrequenz genommen. Die Aufzeichnung der Schlagfrequenz erfolgte über jeweils 12 Sekunden, was einer Strecke von 6 Zentimetern auf dem Milimeterschreibpapier bei einer Papiervorschubgeschwindigkeit von 5 mm/s entsprach. Es wurden die Ausschläge des Atriums während dieser Zeit bzw. der Strecke auf dem Milimeterpapier gezählt und mit 5 multipliziert, wodurch die Schlaganzahl pro Minute berechnet werden konnte. Der konstant gebliebene Wert vor der Gabe der Testsubstanz wurde als Kontrollwert und als 100 Prozent genommen. Die während des Versuchs berechneten Chronotropiewerte wurden als prozentueller Anteil des Kontrollwertes berechnet. Auf diese Art und Weise war es möglich festzustellen ob die Testsubstanz positiven oder negativen chronotropen Effekt auf das Versuchspräparat ausübte, abhängig davon ob es zur Zunahme oder Abnahme des Prozentwertes im Vergleich zum Kontrollwert kam.

2.7.2. Auswertung am Musculus papillaris

Die Länge der Amplitude des Papillarmuskels wurde präzise am Milimeterpapier mit einem Lineal gemessen und abgelesen. Um den Wert in mN umzuwandeln wurde der gemessene Wert mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert. Bei der Durchführung des Versuches mit der Stromstärke von 5 mV wurde dieser mit 0,98 und bei der Stromstärke von 2 mV mit 0,4 multipliziert. Wie bei der Auswertung am rechten Vorhof wurde der konstante Kontrollwert als 100 % genommen und die errechneten Werte nach Gabe der Testsubstanz wurden als prozentuelle Anteile des Kontrollwertes berechnet. Auf diese Art und Weise war

es möglich den positiv oder negativ inotropen Effekt der Testsubstanz am Versuchspräparat zu überprüfen.

2.7.3. Auswertung an der Aorta, A. pulmonalis und Ileum terminalis

Für alle drei Versuchspräparate wurde auf die gleiche Art und Weise vorgegangen. Der Zeitpunkt der Gabe der Testsubstanz wurde mit einem Bleistift auf dem Milimeterpapier markiert und nach Beendigung des Versuchs wurde die Distanz der Kontraktionskurve bis zur Nulllinie mit einem Lineal gemessen. Um die Werte in mN umzuwandeln wurden diese mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert. Als Kontrollwert diente der konstante Wert vor der ersten Gabe der Testsubstanz, welcher als 100 % festgelegt wurde. So war es möglich den positiven oder negativen Effekt der zu überprüfenden Testsubstanz auf die Kontraktionskraft mittels Vergleich mit dem Kontrollwert festzustellen.

2.8. Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Besonders wichtig war es um den Effekt der Testsubstanz exakt berechnen zu können die Wirkung der als Lösungsmittel verwendeten Substanz DMSO bei der Berechnung der Ergebnisse zu berücksichtigen und diese von den erhaltenen Ergebnissen abzuziehen. Um einen aussagekräftigen und verwertbaren Wert zu erhalten wurde der arithmetische Mittelwert, sowie der Standardfehler und die Standardabweichung bei allen gemessenen Werten berechnet. Es erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form einer Konzentrations-Wirkungskurve mit dem Programm „Sigma Plot 9.0“. Hierbei wurde für die Schlagfrequenz oder die Kontraktionskraft die x-Achse und für die Testsubstanzkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ die y-Achse gewählt. Im Falle einer starken Wirkung der zu überprüfenden Substanz konnten so über die graphische Darstellung die EC_{50} -Werte berechnet werden, nämlich die Konzentration bei der die Schlagfrequenz bzw. Kontraktionskraft auf 50 % gesunken ist. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der gepaarte Student-T-Test gewählt und zur Beurteilung die Werte in mN angegeben, weil bei Prozentwerten der Kontrollwert keine Streuung aufweisen kann und möglicherweise eine viel höhere Signifikanz vortäuschen könnte. Zur adäquaten Beurteilung der Werte wurde die Signifikanz bzw. die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) berechnet. Als signifikant wurden die

Werte von $P < 0,05$ (5%) bzw. $P < 0,01$ (1%) und als hoch signifikant ein Wert von $P < 0,01$ (0,1%) bewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse der Testsubstanz PGU 112

3.1.1. Wirkung von PGU 112 am Atrium cordis dextrum

Am rechten Vorhof wurden 4 Versuche durchgeführt um den Einfluss der Testsubstanz PGU 112 auf die Schlagfrequenz (Chronotropie) zu ermitteln. Ein Mittelwert der 4 Versuche wurde als Kontrollwert herangezogen. Die Testsubstanz zeigte keine signifikante chronotrope Wirkung und ein EC_{50} -Wert konnte nicht erreicht werden.

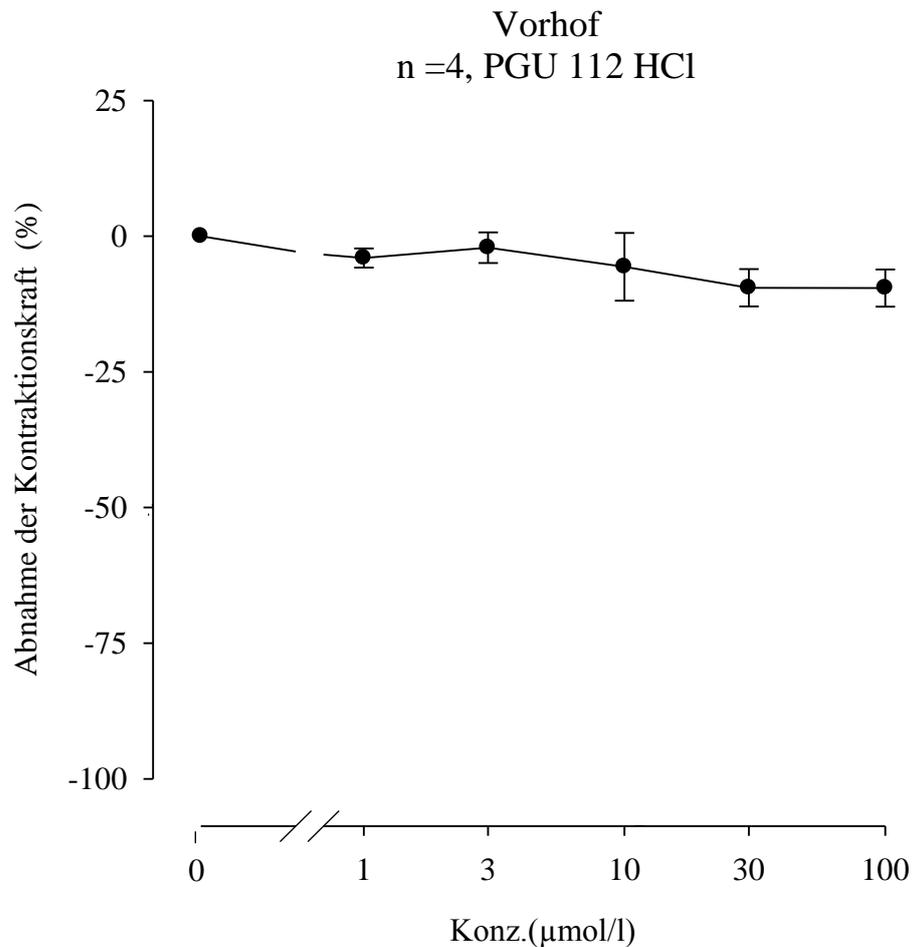
Tabelle 2: Ergebnisse von PGU 112 auf den rechten Vorhof

PGU 112E ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	233,75 \pm 16,50	0,00 \pm 0,00	4	-
1	223,75 \pm 13,29	-4,02 \pm 1,75	4	n.s.
3	227,50 \pm 10,10	-2,11 \pm 2,82	4	n.s.
10	217,50 \pm 1,44	-5,64 \pm 6,26	4	n.s.
30	210,00 \pm 8,66	-9,52 \pm 3,44	4	n.s.
100	210,00 \pm 9,35	-9,56 \pm 3,43	4	n.s.

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Schlagfrequenz in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

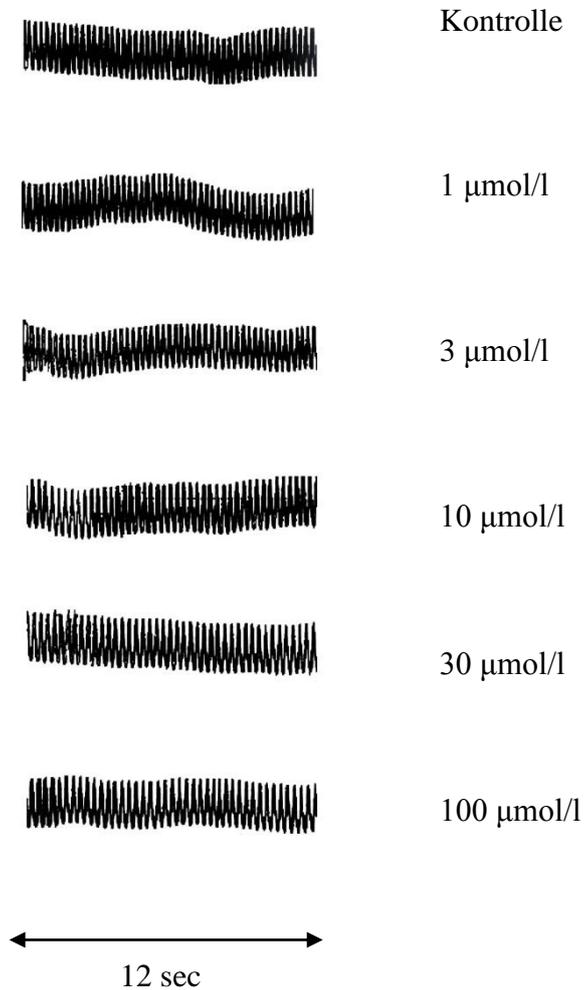
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 112 auf den rechten Vorhof



Das Diagramm zeigt die Wirkung der Testsubstanz PGU 112 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs bei den verschiedenen Konzentrationen.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 14: Originalabbildung der chronotropen Wirkung von PGU 112 auf den rechten Vorhof



Die Originalabbildung veranschaulicht die Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs, die nach kumulativer Testsubstanzgabe und einem Verlauf von 45 Minuten mittels Schreiber 12 Sekunden lang aufgenommen wurde. Durch Multiplikation der Amplituden mit dem Korrekturfaktor 5 erhält man die Schlagfrequenz pro Minute.

3.1.2. Wirkung von PGU 112 am Musculus papillaris

Um den Einfluss der Testsubstanz PGU 112 auf die Kontraktionskraft (Inotropie) des Papillarmuskels zu untersuchen wurden vier 4 Versuchsreihen durchgeführt. Aus den erhaltenen Messwerten wurde ein arithmetischer Mittelwert berechnet und ein Kontrollwert von $1,30 \pm 0,13$ mN bestimmt. Nach der kumulativen Substanzzugabe ist es zu keiner ausgeprägten inotropen Wirkung gekommen.

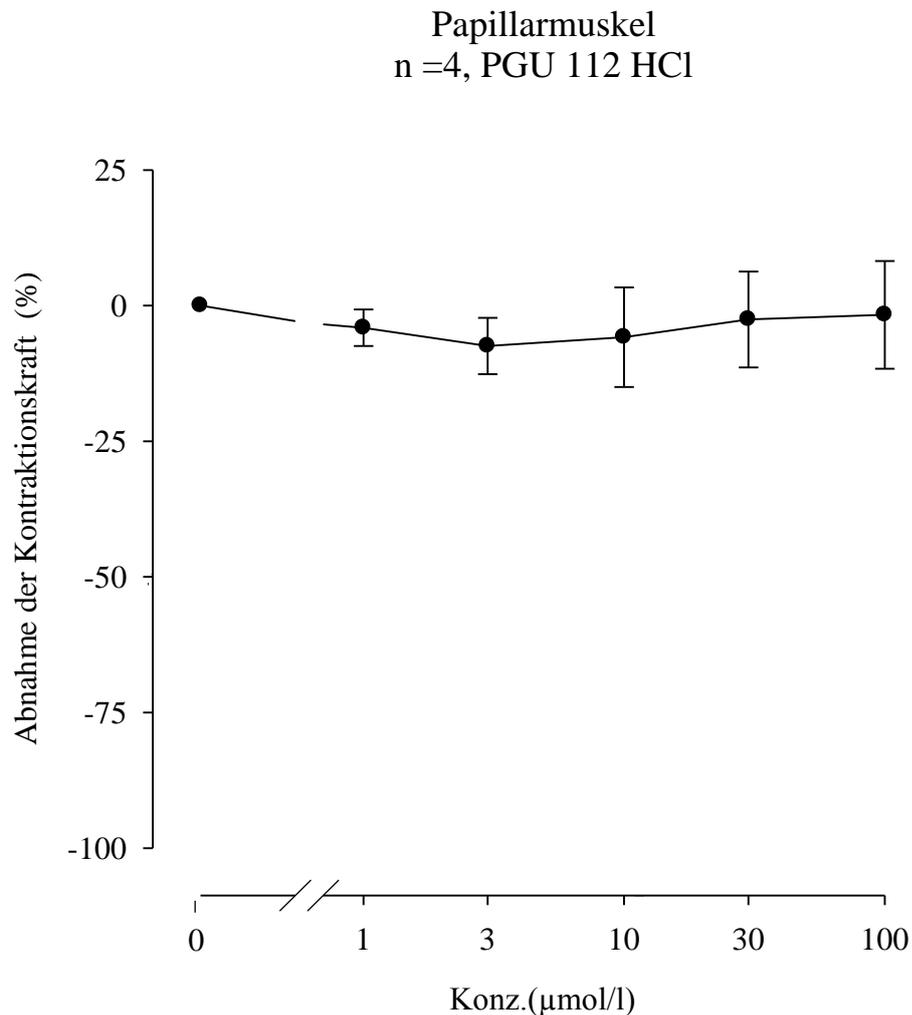
Tabelle 3: Ergebnisse von PGU 112 am Papillarmuskel

PGU 112E ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichk eit (P)
Kontrolle	$1,30 \pm 0,13$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$1,25 \pm 0,15$	$-4,08 \pm 3,37$	4	n.s.
3	$1,23 \pm 0,17$	$-7,45 \pm 5,19$	4	n.s.
10	$1,26 \pm 0,21$	$-5,83 \pm 9,17$	4	n.s.
30	$1,29 \pm 0,21$	$-2,55 \pm 8,83$	4	n.s.
100	$1,35 \pm 0,23$	$-1,70 \pm 9,94$	4	n.s.

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

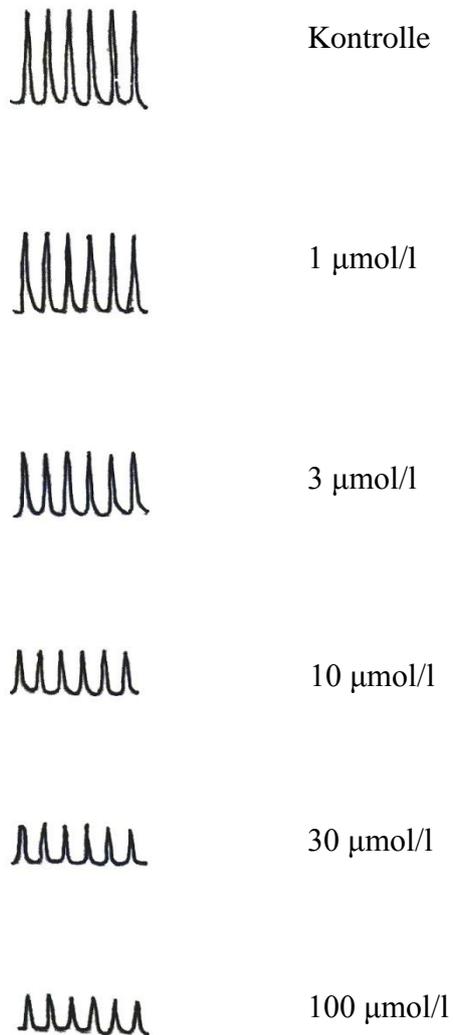
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 112 auf den Papillarmuskel



Im Diagramm wird die Wirkung der Testsubstanz PGU 112 auf die Inotropie graphisch dargestellt. Die Kurve veranschaulicht, dass die Substanzzugabe kaum einen Effekt bewirkt und infolgedessen wurde keine EC_{50} erreicht.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 16: Originalabbildung der inotropen Wirkung von PGU 112 auf den Papillarmuskel



Die in der Originalabbildung mittels Schreiber registrierten Amplituden veranschaulichen die Änderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels nach kumulativer Testsubstanzzugabe.

3.1.3. Wirkung von PGU 112 an Aorta descendens

An der glatten Muskulatur der Aorta wurde die Wirkung der Testsubstanz PGU 112 geprüft. Zu diesem Zweck wurden 4 Versuche durchgeführt und aus den erhaltenen Messergebnissen die arithmetischen Mittelwerte bestimmt. Die Substanz bewirkte eine schwache vasodilatierende Wirkung bei einem Messwert von $6,76 \pm 1,38$. Ein EC_{50} -Wert wurde nicht erreicht.

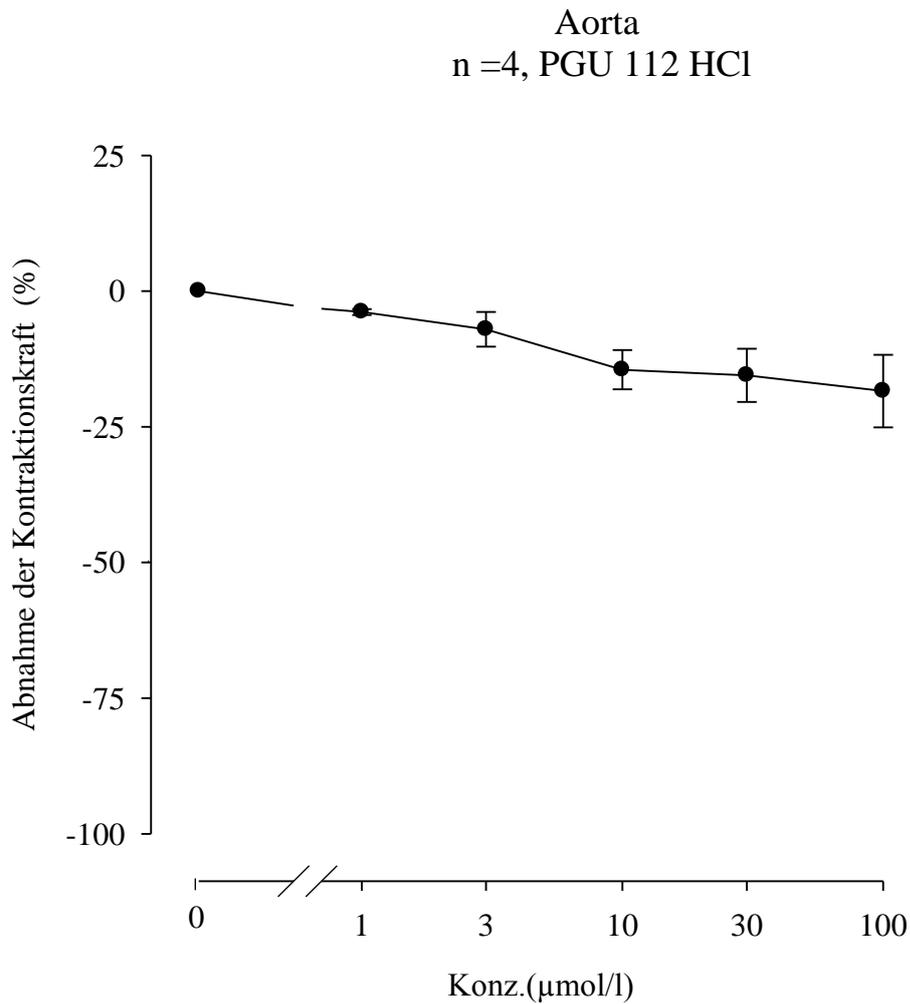
Tabelle 4: Ergebnisse von PGU 112 an der Aorta

PGU 112E ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,69 \pm 2,42$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$8,32 \pm 2,27$	$-3,85 \pm 0,55$	4	n.s.
3	$7,87 \pm 1,86$	$-7,04 \pm 3,20$	4	n.s.
10	$7,17 \pm 1,59$	$-14,48 \pm 3,63$	4	0,05
30	$7,00 \pm 1,41$	$-15,53 \pm 4,90$	4	0,05
100	$6,76 \pm 1,38$	$-18,43 \pm 6,70$	4	0,05

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

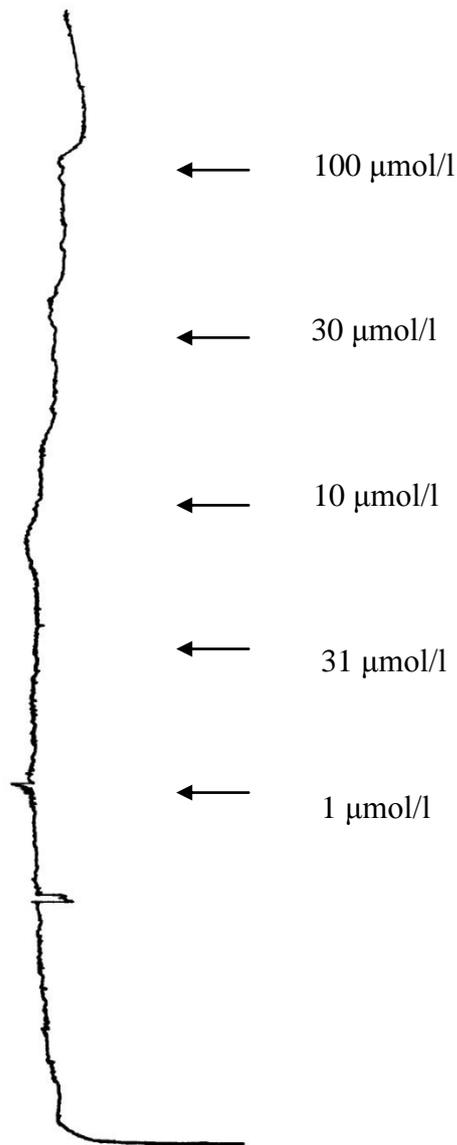
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 112 an der Aorta



Der Graph zeigt eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft nach der kumulativen Testsubstanzzugabe.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 18: Originalabbildung der Wirkung von PGU 112 auf die Aorta



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzen der Testsubstanz PGU 112 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

3.1.4. Wirkung von PGU 112 an Arteria pulmonalis

Der Einfluss der Testsubstanz PGU 112 auf die glatte Muskulatur der Pulmonalarterie wurde vier Versuchsreihen getestet. Aus der Tabelle ist abzulesen dass die Testsubstanz zu einer geringen Abnahme der Kontraktionskraft führt und ein EC₅₀-Wert bei weitem nicht erzielt werden konnte.

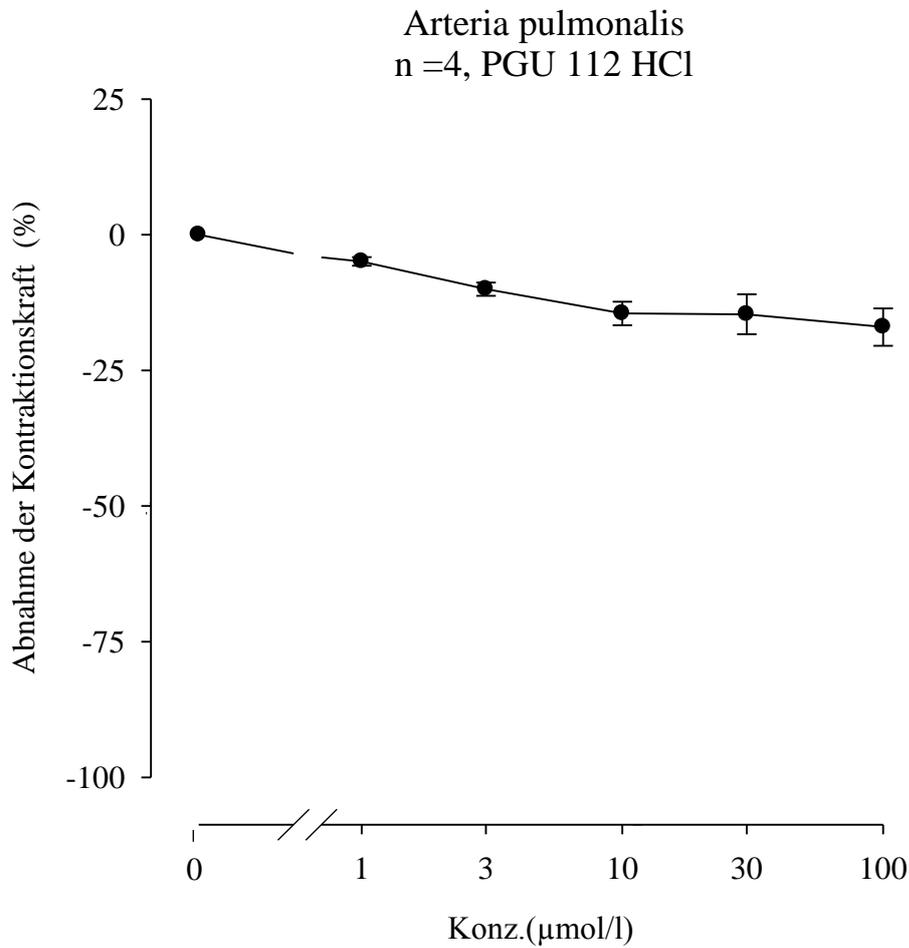
Tabelle 5: Ergebnisse von PGU 112 an der Arteria pulmonalis

PGU 112E ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9,94 \pm 1,27	0,00 \pm 0,00	4	-
1	9,42 \pm 1,14	-4,92 \pm 0,78	4	n.s.
3	8,93 \pm 1,11	-10,02 \pm 1,22	4	n.s.
10	8,50 \pm 1,09	-14,51 \pm 2,17	4	0,05
30	8,56 \pm 1,31	-14,66 \pm 3,70	4	0,05
100	7,38 \pm 2,01	-17,01 \pm 3,44	4	0,05

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

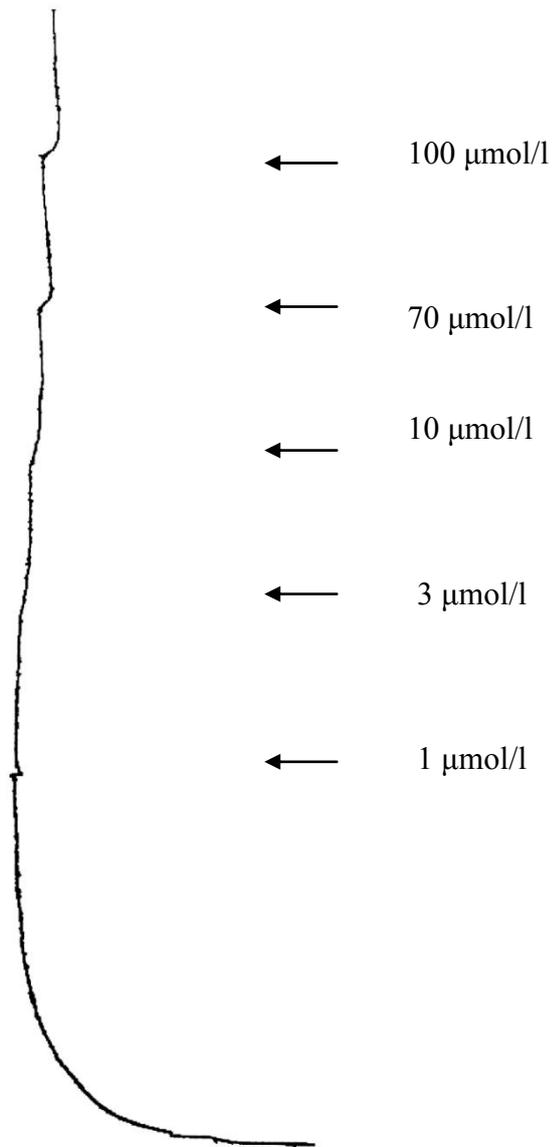
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 112 an der Arteria pulmonalis



Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine leichte vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz PGU 112 auf die Pulmonalarterie bei ansteigender Konzentration.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 20: Originalabbildung der Wirkung von PGU 112 an der Arteria pulmonalis



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzen der Testsubstanz PGU 112 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

3.1.5. Wirkung von PGU 112 am Ileum terminalis

Im Rahmen von 4 Versuchsdurchgängen wurde die vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz PGU 112 auf das terminale Ileum geprüft.

Ein Kontrollwert von $8,86 \pm 0,91$ sowie eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft ist aus der Tabelle ersichtlich, aber ein EC_{50} -Wert konnte nicht erreicht werden.

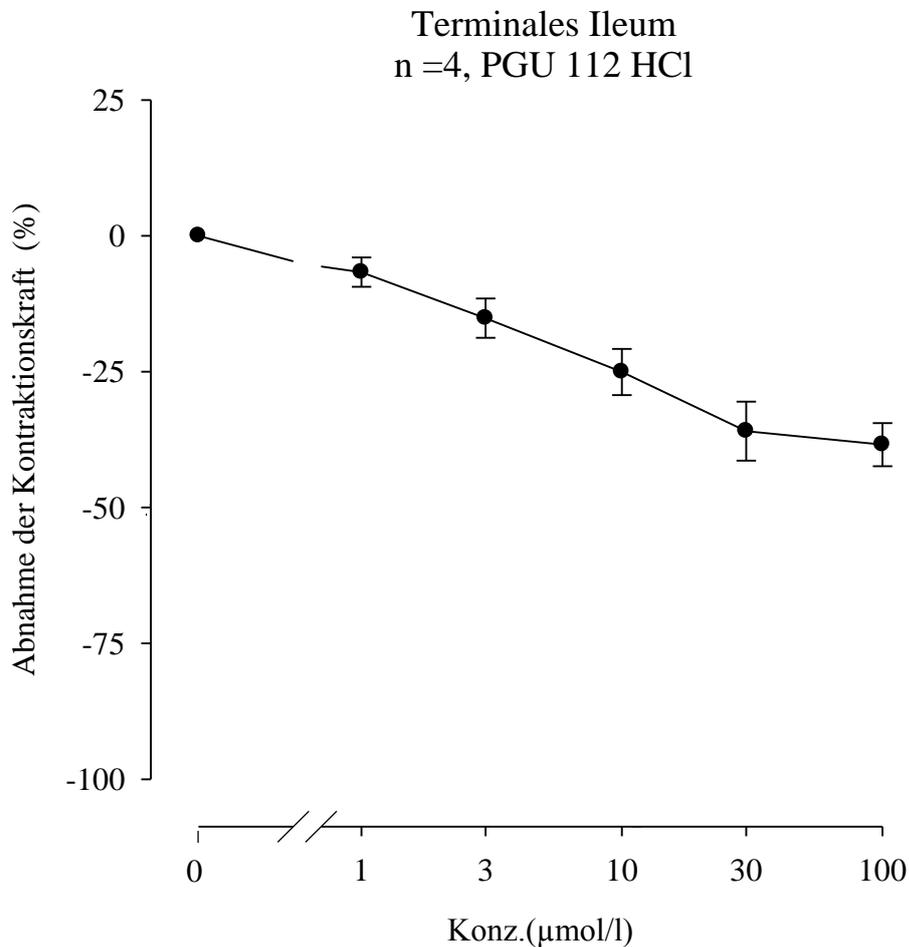
Tabelle 6: Ergebnisse von PGU 112 am terminalen Ileum

PGU 112E ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,86 \pm 0,91$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$8,19 \pm 0,57$	$-6,69 \pm 2,70$	4	n.s.
3	$7,42 \pm 0,41$	$-15,15 \pm 3,62$	4	0,05
10	$6,55 \pm 0,41$	$-25,05 \pm 4,25$	4	0,05
30	$5,61 \pm 0,54$	$-35,95 \pm 5,42$	4	0,01
100	$5,41 \pm 0,52$	$-38,43 \pm 3,96$	4	0,01

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

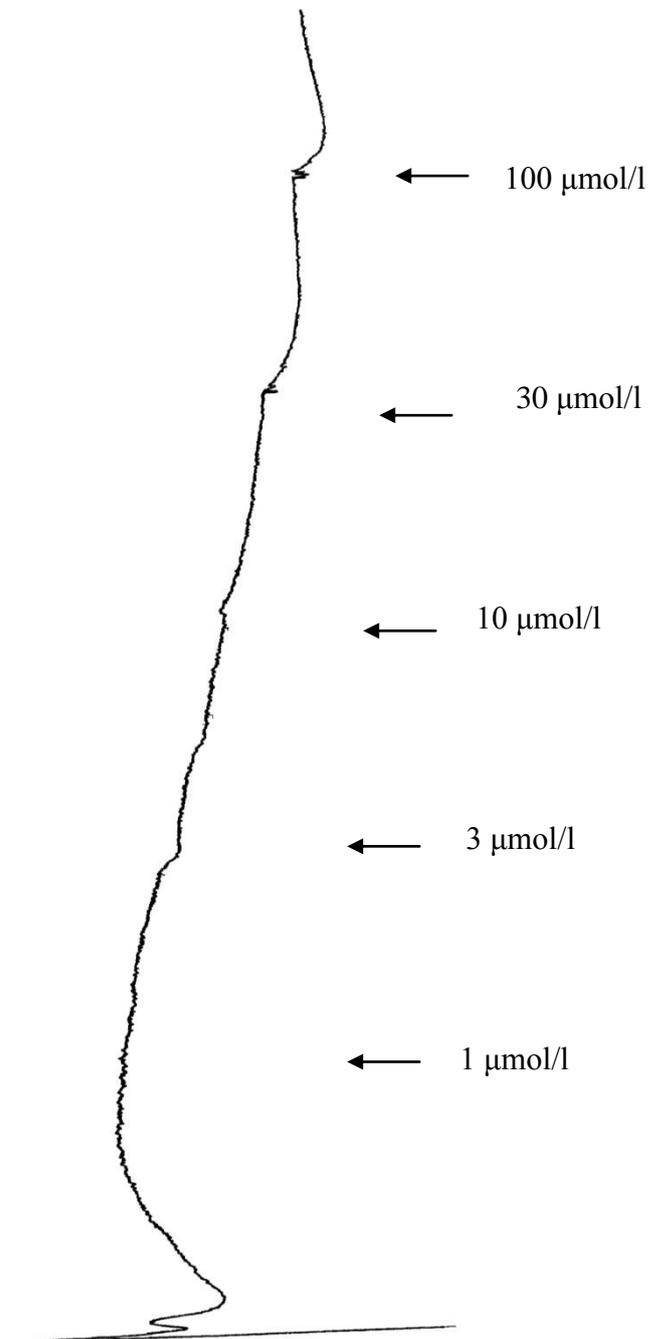
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 112 am terminalen Ileum



Der Graph zeigt den spasmolytischen Effekt der Testsubstanz PGU 112 auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 22: Originalabbildung der Wirkung von PGU 112 auf das terminale Ileum



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzen der Testsubstanz PGU 112 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

3.2. Ergebnisse der Testsubstanz PGU 179

3.2.1. Wirkung von PGU 179 am Atrium cordis dextrum

In 3 Versuchsreihen wurde eine mögliche chronotrope Wirkung der Testsubstanz PGU 179 untersucht. Ein Kontrollwert von $158,33 \pm 14,24$ Schläge/min wurde berechnet. Eine starke negativ chronotrope Wirkung war nach der ersten Substanzgabe erkennbar und schließlich wurde ein Messwert von $15,00 \pm 15,00$ Schläge/min erreicht. Der EC_{50} -Wert von $31,5 \mu\text{mol/l}$ konnte ermittelt werden.

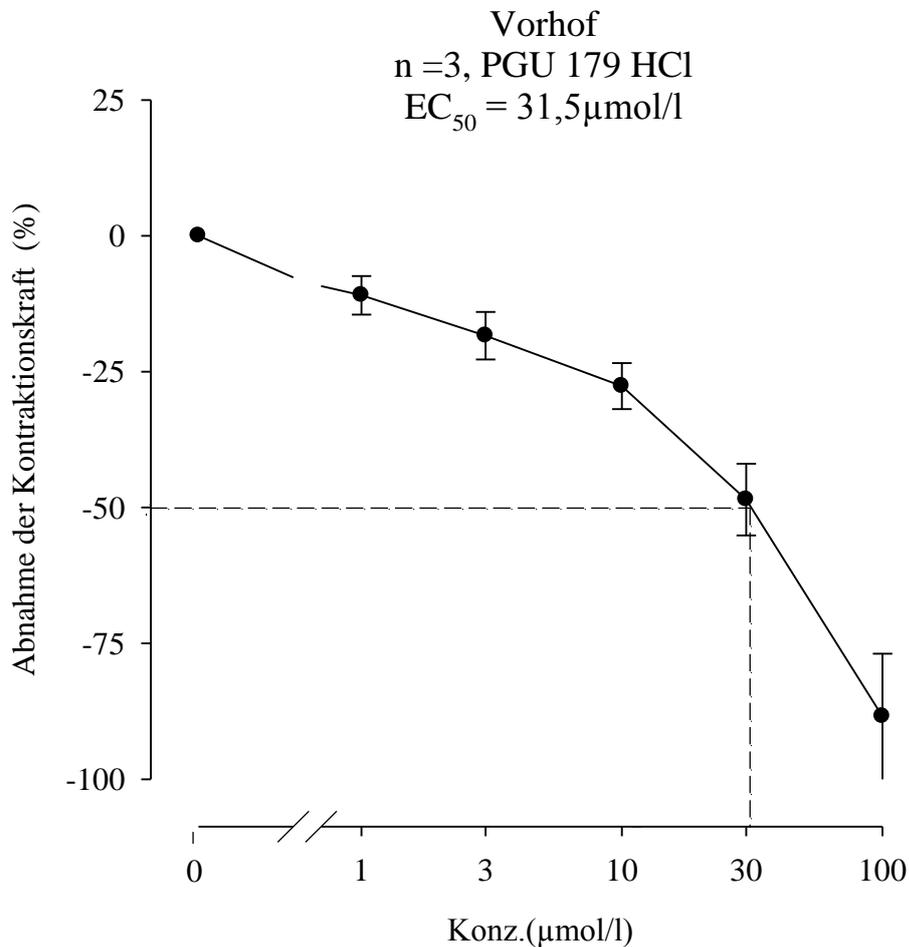
Tabelle 7: Ergebnisse von PGU 179 auf den rechten Vorhof

PGU 179 ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$158,33 \pm 14,24$	$0,00 \pm 0,00$	3	-
1	$140,00 \pm 7,64$	$-10,95 \pm 3,55$	3	n.s.
3	$128,33 \pm 8,82$	$-18,38 \pm 4,36$	3	0,05
10	$113,33 \pm 4,41$	$-27,67 \pm 4,23$	3	0,01
30	$83,33 \pm 16,92$	$-48,55 \pm 6,60$	3	0,01
100	$15,00 \pm 15,00$	$-88,46 \pm 11,54$	3	0,001

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Schlagfrequenz in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

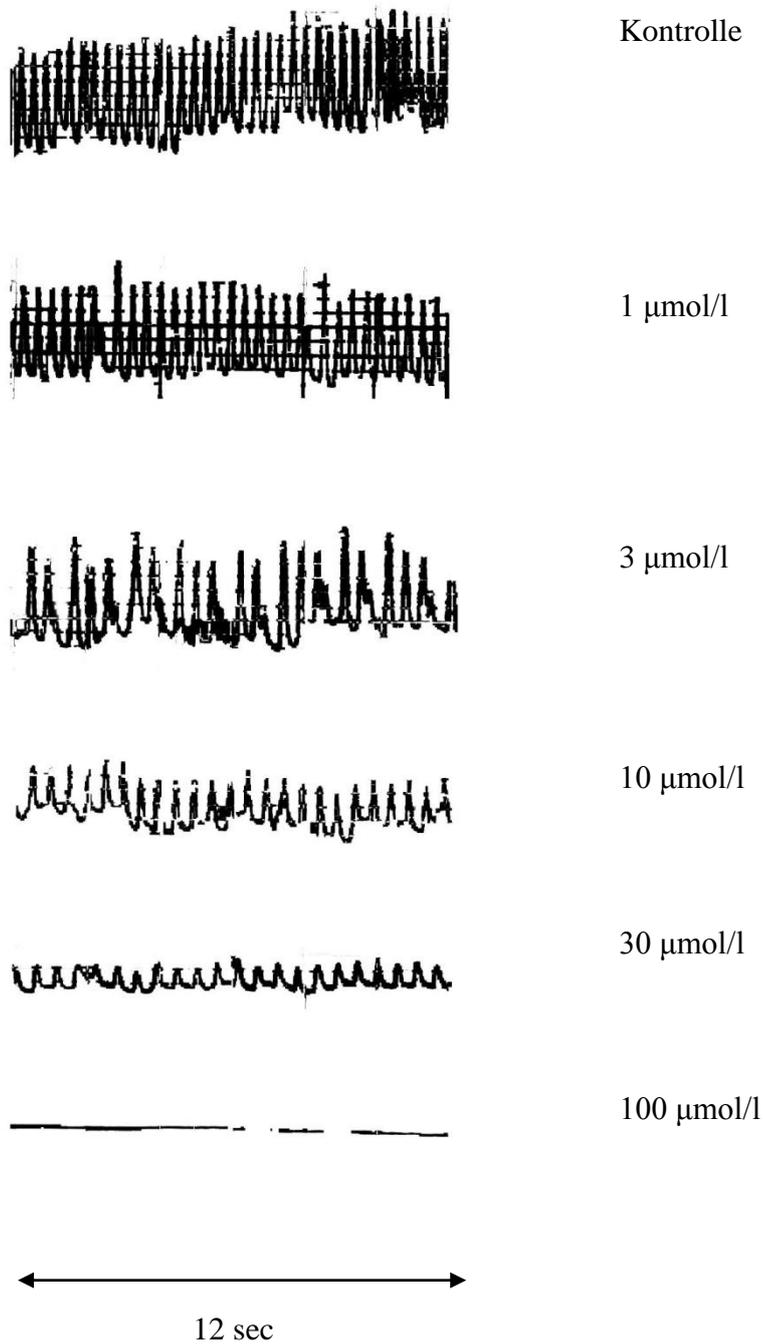
Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 179 auf den rechten Vorhof



In der Konzentrations-Wirkungskurve wird eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft graphisch wiedergeben.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in μmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 24: Originalabbildung der chronotropen Wirkung von PGU 179 auf den rechten Vorhof



Die Originalabbildung veranschaulicht die Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs, die nach kumulativer Testsubstanzgabe und einem Verlauf von 45 Minuten mittels Schreiber 12 Sekunden lang aufgenommen wurde. Durch Multiplikation der Amplituden mit dem Korrekturfaktor 5 erhält man die Schlagfrequenz pro Minute.

3.2. 2. Wirkung von PGU 179 am Musculus papillaris

An 4 Versuchspräparaten wurde die Wirkung der Substanz PGU 179 auf die Inotropie des Papillarmuskels getestet. Der arithmetische Mittelwert der 4 Kontrollwerte wurde berechnet und ein Wert von $1,32 \pm 0,15$ mN erhalten. Aus der Tabelle ist eine deutliche Verminderung der Kontraktionskraft nach kumulativer Gab der Testsubstanz bis zum Wert von $0,66 \pm 0,08$ mN ersichtlich.

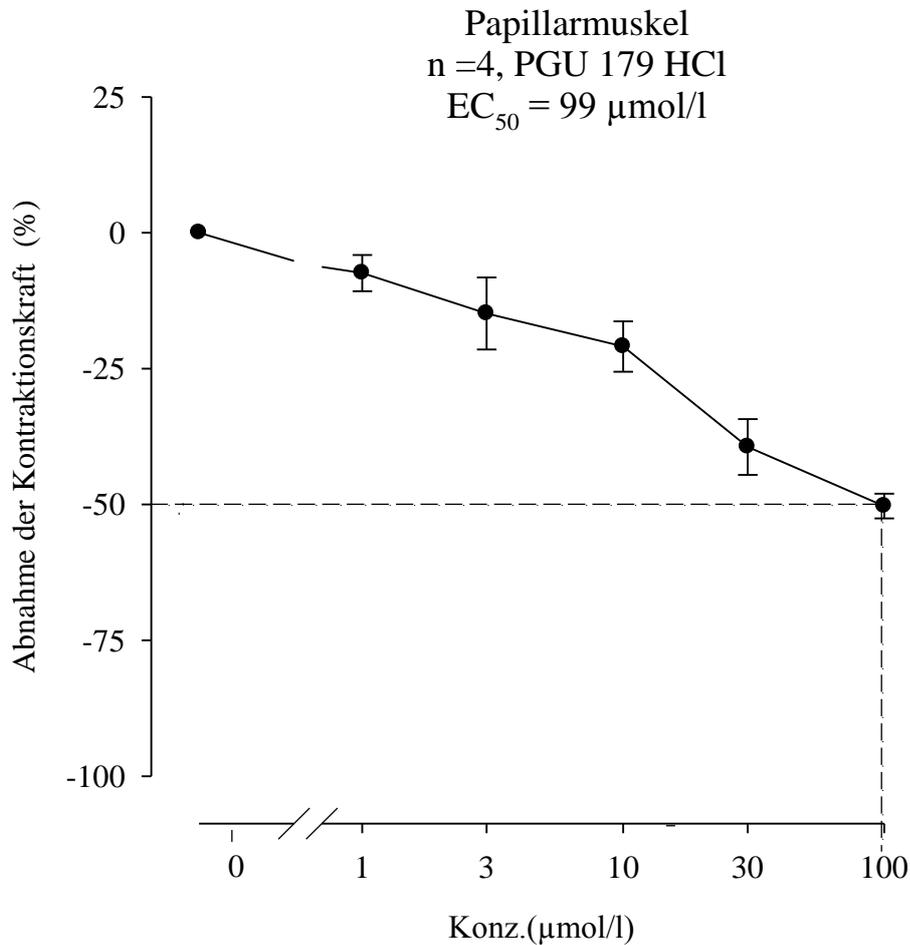
Tabelle 8: Ergebnisse der Wirkung von PGU 179 auf den Papillarmuskel

PGU 179 ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,32 \pm 0,15$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$1,21 \pm 0,10$	$-7,42 \pm 3,34$	4	n.s
3	$1,09 \pm 0,06$	$-14,84 \pm 6,64$	4	0,05
10	$1,03 \pm 0,11$	$-20,92 \pm 4,64$	4	0,05
30	$0,79 \pm 0,10$	$-39,42 \pm 5,12$	4	0,01
100	$0,66 \pm 0,08$	$-50,29 \pm 2,27$	4	0,01

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

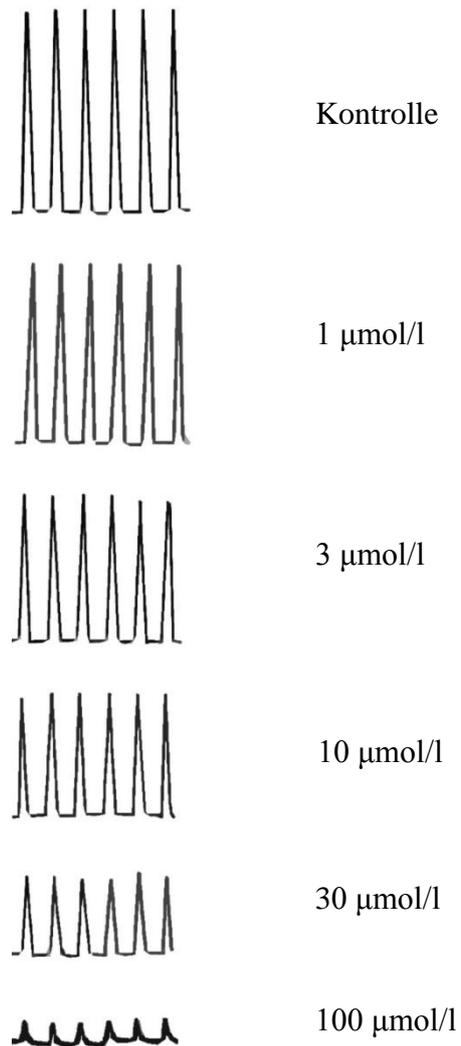
Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 179 auf den Papillarmuskel



Die Graphik widerspiegelt die starke negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz PGU 179 auf den Papillarmuskel. Der EC₅₀-Wert wurde bei 99 µmol/l erreicht.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 26: Originalabbildung der Wirkung von PGU 179 auf den Papillarmuskel



Die in der Originalabbildung mittels Schreiber registrierten Amplituden veranschaulichen die Änderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels nach kumulativer Testsubstanzzugabe.

3.2.3. Wirkung von PGU 179 an Aorta descendens

Die dilatierende Wirkung der Testsubstanz PGU 179 auf die Aorta wurde im Rahmen von vier Versuchen geprüft und ein Kontrollwert von $7,44 \pm 0,21$ mN wurde berechnet. Bereits ab der zweiten Substanzgabe wurde eine deutliche Abnahme der Kontraktilität und somit eine starke Vasodilatation beobachtet. Diese führte bei der Endkonzentration zu einer fast vollständigen Relaxation der Aorta.

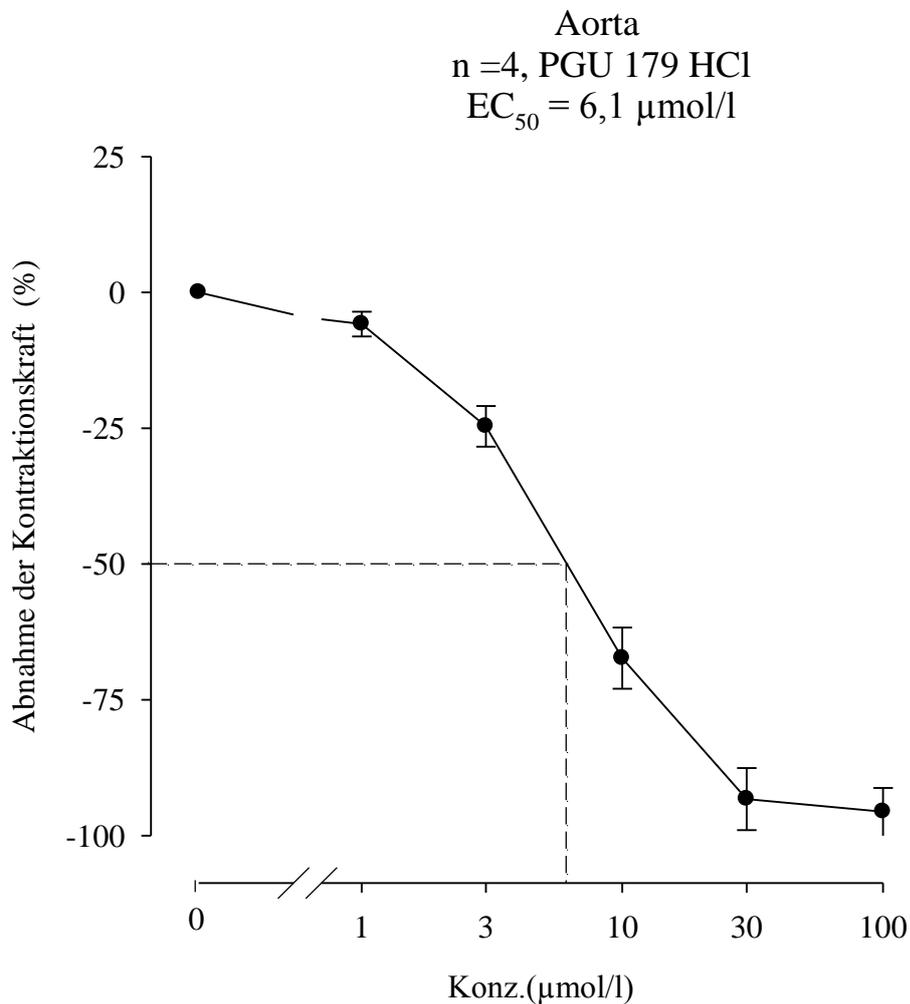
Tabelle 9: Ergebnisse von PGU 179 an der Aorta

PGU 179 ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$7,44 \pm 0,21$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$7,00 \pm 0,16$	$-5,83 \pm 2,27$	4	n.s
3	$5,59 \pm 0,23$	$-24,66 \pm 3,75$	4	0,05
10	$2,40 \pm 0,36$	$-67,34 \pm 5,62$	4	0,01
30	$0,48 \pm 0,40$	$-93,29 \pm 5,71$	4	0,001
100	$0,31 \pm 0,31$	$-95,61 \pm 4,39$	4	0,001

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

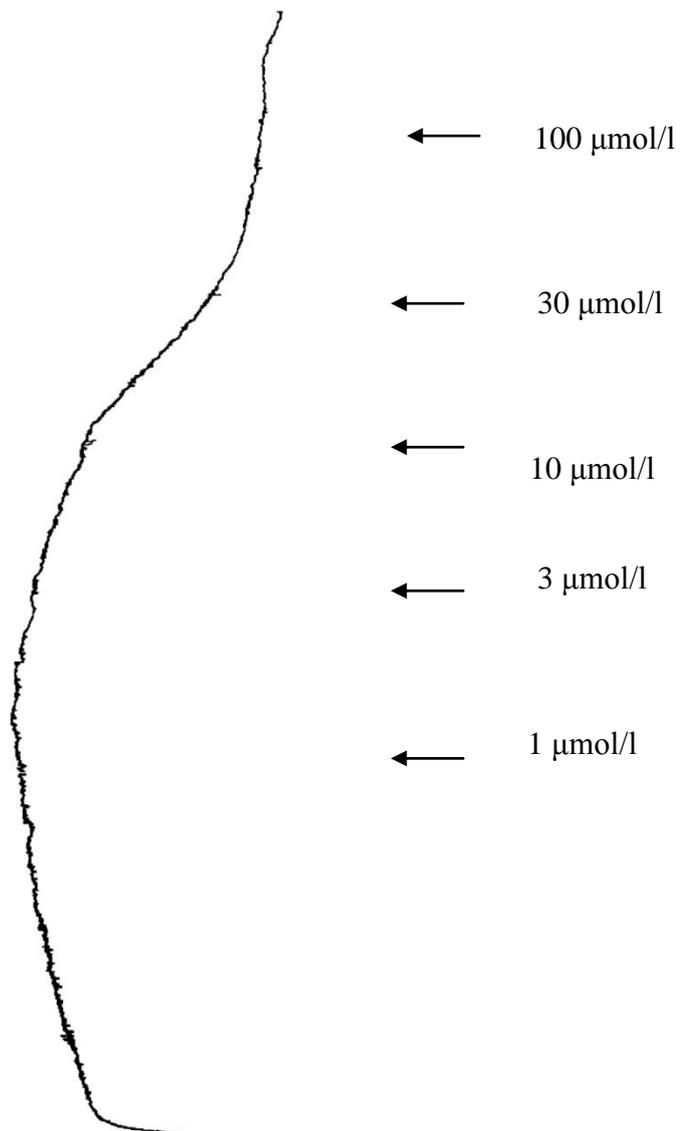
Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 179 an der Aorta



Der steile Abfall des Graphen zeigt die starke dilatierende Wirkung von PGU 179 auf die Aorta. Der EC₅₀-Wert wurde nach Einzeichnen von gestrichelten Linien bei einer Konzentration von 6,1 µmol/l ermittelt.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 28: Originalabbildung der Wirkung von PGU 179 an der Aorta



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzens der Testsubstanz PGU 179 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

3.2.4. Wirkung von PGU 179 an Arteria pulmonalis

In 4 Versuchsreihen wurde die dilatierende Wirkung der Testsubstanz PGU 179 auf die Pulmonalarterie getestet und ein Mittelwert der Kontrollwerte von $11,32 \pm 1,71$ mN errechnet. Sofort nachdem die erste Substanzkonzentration zugegeben worden war, konnte eine starke Reduktion der Kontraktionskraft beobachtet werden. Die Kontraktion ist letztendlich auf einen Wert von $0,44 \pm 0,44$ gesunken und somit konnte keine vollständige Dilatation erzielt werden. Der EC_{50} -Wert wurde bei einer Konzentration von $4,85 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

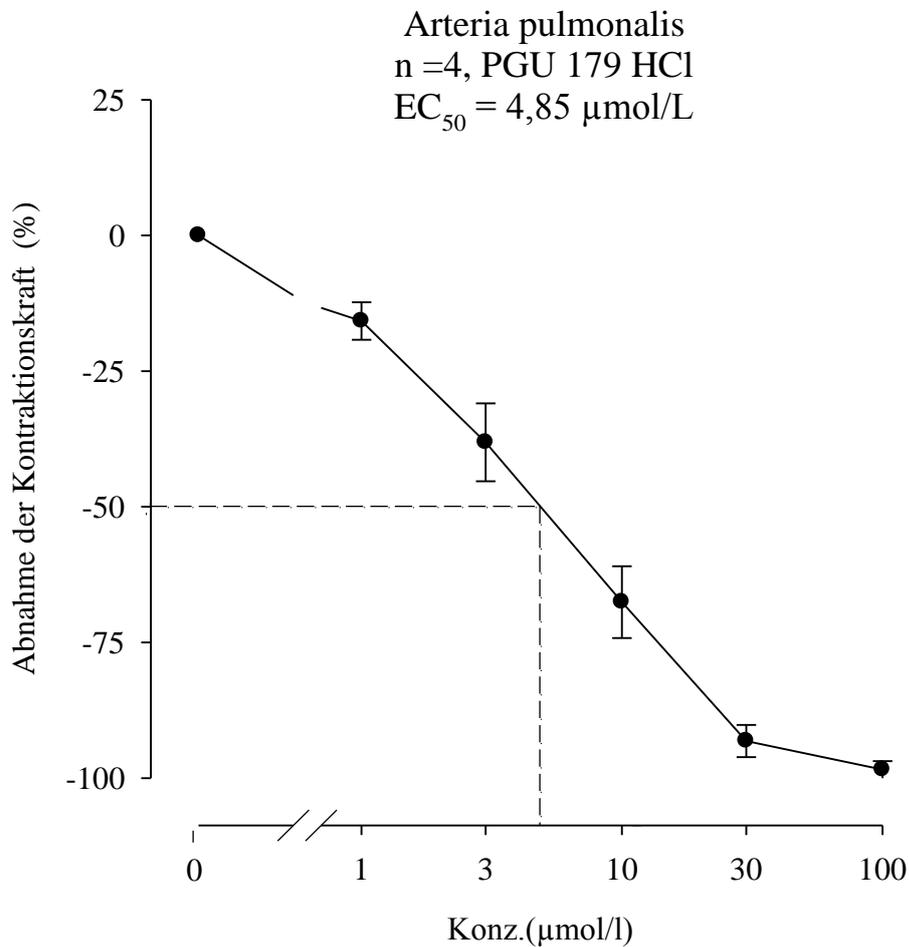
Tabelle 10: Ergebnisse von PGU 179 an der Arteria pulmonalis

PGU 179 ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,32 \pm 1,71$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$9,69 \pm 1,83$	$-15,77 \pm 3,46$	4	0,05
3	$7,31 \pm 1,82$	$-38,12 \pm 7,19$	4	0,01
10	$3,94 \pm 1,28$	$-67,57 \pm 6,61$	4	0,001
30	$0,87 \pm 0,49$	$-93,17 \pm 2,96$	4	0,001
100	$0,44 \pm 0,44$	$-98,44 \pm 1,56$	4	0,001

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

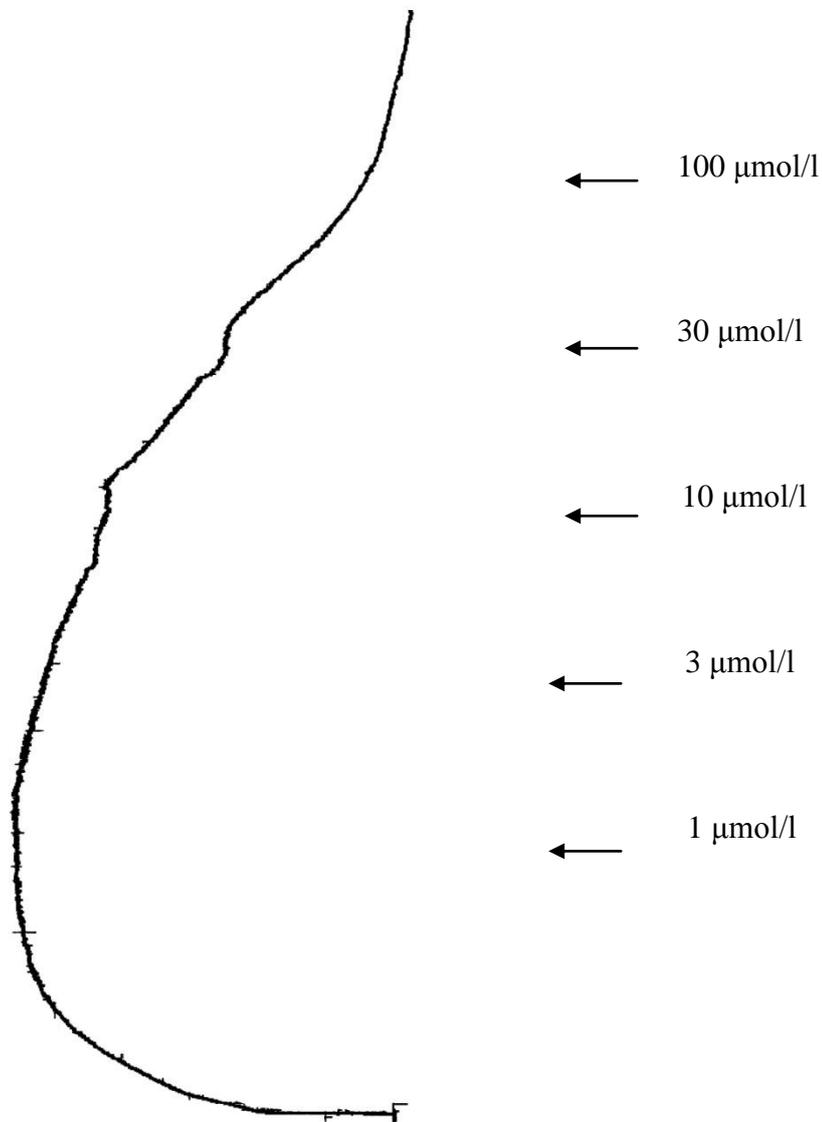
Abbildung 29: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 179 an der Arteria pulmonalis



Der Graph zeigt die signifikante dilatierende Wirkung von PGU 179 auf die glatte Muskulatur der Arteria pulmonalis.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 30: Originalabbildung der Wirkung von PGU 179 auf die Arteria pulmonalis



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzens der Testsubstanz PGU 179 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

3.2.5. Wirkung von PGU 179 am Ileum terminalis

Der eventuelle spasmolytische Effekt der Testsubstanz PGU 112 auf das terminale Ileum wurde im Rahmen von 4 Versuchen eruiert. Die Tabelle veranschaulicht die drastische Abnahme der Kontraktionskraft bereits nach der ersten Substanzkonzentration, sowie einen Kontrollwert von $10,14 \pm 0,78$, welcher nach der Endkonzentration einen Wert von $1,87 \pm 0,14$ erreichte. Aufgrund der sehr starken Wirkung wurde der EC_{50} -Wert schon bei $1,5 \mu\text{mol/l}$ erzielt.

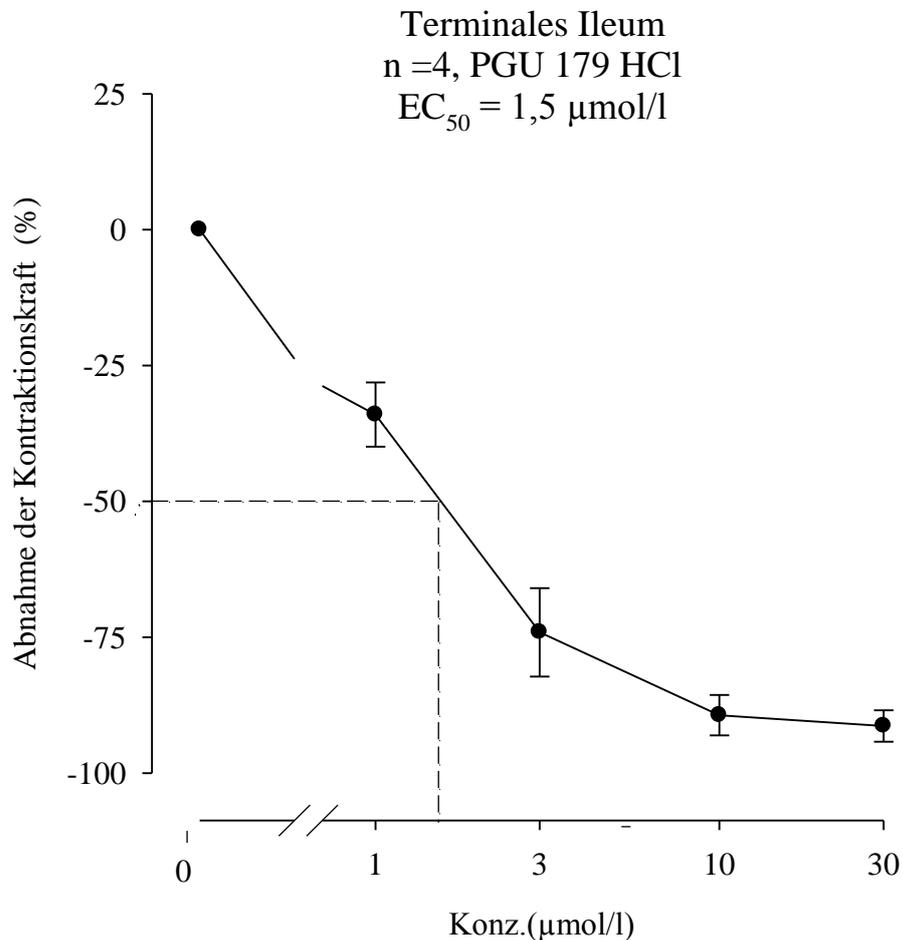
Tabelle 11: Ergebnisse von PGU 179 am terminalen Ileum

PGU 179 ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,14 \pm 0,78$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$6,60 \pm 0,53$	$-34,03 \pm 5,92$	4	0,05
3	$2,57 \pm 0,90$	$-74,01 \pm 8,13$	4	0,01
10	$1,12 \pm 0,44$	$-89,35 \pm 3,73$	4	0,001
30	$0,90 \pm 0,31$	$-91,33 \pm 2,89$	4	0,001
100	$1,87 \pm 0,14$	$-81,52 \pm 0,87$	4	0,001

Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

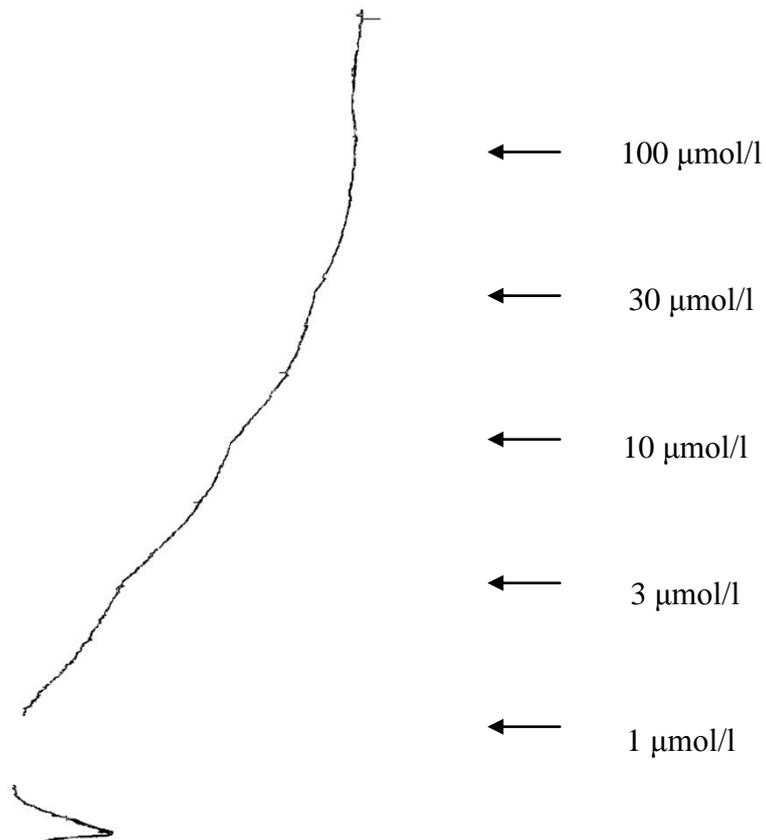
Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 179 am terminalen Ileum



Die Abbildung widerspiegelt durch den steilen Abfall der Konzentrations-Wirkungskurve die signifikante spasmolytische Wirkung von PGU 179 auf die glatte Muskulatur des Ileums. Der EC₅₀-Wert wird durch Einzeichnen von gestrichelten Linien ersichtlich.

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft dar und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

Abbildung 32: Originalabbildung der Wirkung von PGU 179 am terminalen Ileum



Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte des Einspritzens der Testsubstanz PGU 179 in einem Zeitintervall von 45 Minuten.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von zwei neusynthetisierten Diarylimidazolen PGU 112 und PGU 179 auf isolierten Meerschweinchenorganpräparaten untersucht werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen wurden im Kapitel 3 dargestellt. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse interpretiert und diskutiert werden.

Es konnte nur eine sehr geringe Wirkung von PGU 112 auf die spontan schlagenden Vorhöfe nachgewiesen werden, welche ohne statistische Signifikanz war und eine EC_{50} konnte nicht ermittelt werden. Im Gegensatz zu PGU 112 wurde bei der Testsubstanz PGU 179 bereits bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ ein negativ chronotroper Effekt verzeichnet, welcher bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ sogar hochsignifikant war. Die EC_{50} wurde bei einer Konzentration von 31,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Bei der Ausgangssubstanz kam es zur Reduktion der Schlagfrequenz um 39,14 % und erst ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine signifikante negativ-chronotrope Wirkung nachgewiesen werden. Bei den Versuchen mit Resveratrol wurde bei Konzentrationen von 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ eine anfänglich schwach positive Wirkung auf den rechten Vorhof nachgewiesen, jedoch wurde ab 30 $\mu\text{mol/l}$ ein Absinken der Schlagkraft registriert. In diesen Versuchen war es nicht möglich einen EC_{50} -Wert zu erreichen (Lötsch 2004).

Hinsichtlich der inotropen Wirkung auf die Papillarmuskeln zeigte PGU 112 keine signifikante Änderung der Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration bis 3 $\mu\text{mol/l}$ kam es zur leichten Abnahme der Kontraktionskraft. Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wiederum führte PGU 112 zu einer leichten Zunahme der Kontraktionskraft, jedoch konnte im Rahmen der Versuche keine EC_{50} ermittelt werden.

Beim Resveratrol selbst konnte zwar ein schwach-inotroper Effekt nachgewiesen werden, welcher jedoch statistisch nicht signifikant war und wie beim PGU 112 konnte keine EC_{50} erreicht werden (Lötsch 2004).

Im Unterschied zu PGU 112 wurde im Rahmen dieser Arbeit bei PGU 179 eine negativ-inotrope Wirkung nachgewiesen. Ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ konnte ein statistisch signifikanter, dilatierender Effekt der Substanz PGU 179 ermittelt werden. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration kam es zur kontinuierlichen Abnahme der Kontraktionskraft und bei einer Konzentration von 99 $\mu\text{mol/l}$ wurde die EC_{50} erreicht.

Tabelle 12: Effekt von PGU 112 HCl, PGU 179 HCl und Resveratrol auf die quergestreifte Muskulatur

Organpräparat	PGU 112 HCl EC₅₀ (µmol/l)	PGU 179 HCl EC₅₀ (µmol/l)	Resveratrol EC₅₀ (µmol/l)
Atrium dexter	>100	31,5	>100
Musculus papillaris	>100	99	>100

In der angeführten Tabelle wird klar dargestellt, dass sowohl die Testsubstanz 112, als auch Resveratrol keine große Wirkung an Papillarmuskeln gezeigt hatten. Im Gegensatz dazu zeigte PGU 179 eine klare, signifikante inotrope Wirkung und bei 99 µmol/l wurde der EC₅₀-Wert erreicht. Weder PGU 112 noch die Ausgangssubstanz Resveratrol zeigten einen deutlichen Effekt auf die spontan schlagenden rechten Vorhöfe. Einzig PGU 179 zeigte eine ausgeprägte negativ chronotrope Wirkung und bei einer Konzentration von 31,5 µmol/l konnte die EC₅₀ erzielt werden.

An der isolierten Aorta zeigte PGU 112 keine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft. Trotz kontinuierlicher, leichter Abnahme der Kontraktionskraft war es nicht möglich die EC₅₀ zu ermitteln. Im Unterschied dazu kam es bei PGU 179 bereits bei einer Konzentration von 3 µmol/l zur signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft, welche bei einer Konzentration von 30 µmol/l bereits statistisch als hochsignifikant zu werten war. Im Bezug zum Kontrollwert wurde eine beinahe komplette Relaxation von 95,61% erreicht. Die EC₅₀ konnte bei einer Konzentration von 6,1 µmol/l ermittelt werden.

In den Untersuchungen mit Resveratrol konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Relaxation der glatten Muskulatur nachgewiesen werden, aber erst ab einer Konzentration von 300 µmol/l, was für eine deutlich geringere Wirkung im Vergleich zu PGU 175 bedeutet. Die EC₅₀ wurde bei einer Konzentration von 145 µmol/l erreicht (Lötsch 2004).

Die Testsubstanz PGU 112 zeigte wie auch bei der Aorta keine statistisch signifikante Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis. Es konnte keine Dilatation der Pulmonalarterie und somit keine EC₅₀ ermittelt werden. Nicht überraschend war die Wirkung

von PGU 179 auf die Arteria pulmonalis noch stärker als auf die Aorta. Zu einer statistisch signifikanten Kontraktionsänderung kam es bereits ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ und ab 10 $\mu\text{mol/l}$ zur statistisch hochsignifikanter relaxierender Wirkung. Im Vergleich zum Kontrollwert konnte eine Gesamtabnahme von 98,44% erreicht werden und die EC_{50} war im Vergleich zur Aorta mit 4,85 $\mu\text{mol/l}$ noch niedriger.

Im Rahmen der Versuche mit Resveratrol konnte zunächst eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft, welche ab einer Konzentration mit 300 $\mu\text{mol/l}$ wieder zu sinken begann. Bei einer Konzentration von 126 $\mu\text{mol/l}$ wurde der EC_{50} -Wert erreicht. Somit führte Resveratrol in den Konzentrationen zwischen 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ zu einer signifikant ausgeprägten Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur. Bei einer Konzentration von 126 $\mu\text{mol/l}$ kam es zum Absinken des Tonus auf 58 % des Ausgangswertes (Lötsch 2004).

Eine ganz andere Wirkung zeigte PGU 112 auf den Dünndarm. Ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ kam es zur signifikanten spasmolytischen Wirkung und im weiteren Verlauf zu einer kontinuierlichen Abnahme der Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ kam es zum Absinken um 38,43 % im Vergleich zum Kontrollwert, dennoch konnte der EC_{50} -Wert nicht erreicht werden. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit PGU 175 können nicht mit der Gesamtabnahme verglichen werden, weil es möglicherweise zur Zunahme der Kontraktion bei 100 $\mu\text{mol/l}$ aufgrund des möglichen Ausfallens der Testsubstanz im Organbad gekommen ist. Infolgedessen ist die Gesamtabnahme der Kontraktion unbekannt und es war nur möglich den Wert bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ zu verwenden, welcher 91,33 % betrug. Beeindruckend ist dass der EC_{50} -Wert bereits bei 1,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde, was der niedrigste Wert aller mit Diarylimidazolen durchgeführten Versuche ist. Die Wirkung von Resveratrol war im Vergleich zur Testsubstanz PGU 179 wesentlich geringer. Der EC_{50} -Wert wurde erst bei einer Konzentration von 46,4 $\mu\text{mol/l}$ erzielt und die Gesamtabnahme der Kontraktionskraft betrug lediglich 69,77 % des Kontrollwertes (Lötsch 2004).

Die Wirkung des Naturstoffs wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ am terminalen Ileum untersucht. Eine stark relaxierende Wirkung am Darm konnte aufgezeigt werden, welche jedoch mit signifikanten Werten erst ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Bei 46,4 $\mu\text{mol/l}$ wurde der EC_{50} -Wert ermittelt (Lötsch 2004).

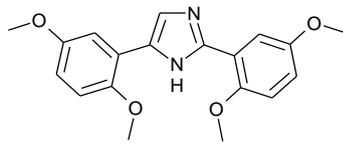
Tabelle 13: Effekt von PGU 112 HCl, PGU 179 HCl und Resveratrol auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	PGU 112 HCl EC₅₀ (µmol/l)	PGU 179 HCl EC₅₀ (µmol/l)	Resveratrol EC₅₀ (µmol/l)
Aorta	>100	6,1	145
Arteria pulmonalis	>100	4,85	126
Terminales Ileum	>100	1,5	46,4

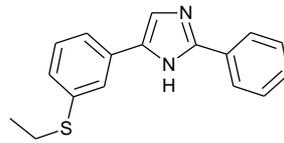
Da die Versuche nur bis zu Konzentrationen von 100 µmol/l durchgeführt wurden, war es nicht möglich den exakten EC₅₀-Wert der Testsubstanz PGU 112 an der Aorta, Pulmonalarterie und dem terminalen Ileum herauszufinden.

Aus der oben angeführten Tabelle wird mühelos ersichtlich, dass die Wirkung der Testsubstanz PGU 179 auf alle Organpräparate viel stärker ist, als der von der Ausgangssubstanz Resveratrol. Bei den Versuchen mit der Aorta und der Pulmonalarterie konnte eine über 20-fache Wirkung im Vergleich zu Resveratrol erreicht werden. Der EC₅₀-Wert von PGU 179 war am terminalen Ileum ebenfalls um das 30-fache niedriger als beim Resveratrol. Ähnlich war die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz PGU 112 auf die Aorta, Pulmonalarterie und den Dünndarm wesentlich niedriger als die von der Leitsubstanz. Aufgrund unterschiedlicher Wirkung der Testsubstanzen auf die Organpräparate sollten die Unterschiede in den Strukturformeln der Substanzen näher betrachtet werden. Zum besseren Vergleich sind in der Abbildung 33 die chemischen Strukturen der beiden Testsubstanzen PGU 112, PGU 179 und des Naturstoffs Resveratrol nebeneinander dargestellt.

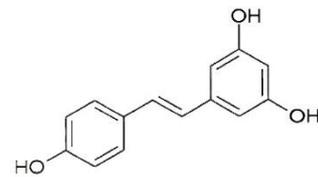
Abbildung 33: Strukturformeln von PGU 112 HCl, PGU 179 HCl und Resveratrol



PGU 112 HCl



PGU 179 HCl



trans-Resveratrol

Resveratrol ist chemisch gesehen ein Trihydroxystilben. Wenn man Resveratrol mit den beiden Testsubstanzen vergleicht, so haben diese anstatt der Ethylen-Gruppierung einen Imidazolring. Durch diesen Austausch kommt es zum Verlust der beim Resveratrol vorhandenen E- und Z-Isomerie. Am Imidazolring ist bei beiden Testsubstanzen in den Positionen 2 und 5 jeweils ein Benzolring mit verschiedenen Substituenten angehängt. Beim Resveratrol befindet sich im Unterschied zu den Testsubstanzen an beiden Benzolringen in den Positionen 3, 5 und 4` jeweils eine freie Hydroxylgruppe.

Bei PGU 112 wurden die Hydroxylgruppen in den Positionen 3 und 4` durch drei neue in den Positionen 2`, 5` und 2 ersetzt. Außerdem sind alle vier OH-Gruppen methyliert, wodurch es zur Erhöhung des lipophilen Charakters und damit zur Verminderung der hydrophilen Eigenschaften kommt. PGU 175 hat in der Position 3 nur einen Ethylsulfanyl-Rest, wodurch es zu einer zusätzlichen Zunahme der Lipophilie kommt.

Die strukturellen Modifikationen von PGU 112 im Vergleich zum Resveratrol führten vermutlich zu keiner Verbesserung der Wirkung an der Aorta, Arteria Pulmonalis oder dem terminalen Ileum. Es ist eher wahrscheinlich dass es durch die strukturelle Änderung zur Verschlechterung der Wirkung gekommen ist. Um die beiden Substanzen genau vergleichen zu können sind wahrscheinlich weitere Versuche mit Konzentrationen bis 300 µmol/l notwendig. Nur so ist es möglich den EC₅₀-Wert von PGU 112 zu ermitteln.

Die mehr als 20-fach stärkere Wirkung von PGU 179 an der Aorta und Arteria pulmonalis im Unterschied zu Resveratrol könnte mit dem Fehlen der Substituenten in den Positionen 3 und 5 und der Einführung des Thioethyl-Restes in der Position 4` erklärt werden. Mit dem Austausch der Ethylen-Gruppierung durch einen Imidazolring konnte die Zunahme der Wirkung nicht erklärt werden, da es bei der Testsubstanz PGU 112 zu keiner signifikanten Änderung der Wirkung gekommen ist. Die über 30-fach höhere Wirkung der Testsubstanz

PGU 179 am terminalen Ileum im Vergleich zum Naturstoff Resveratrol könnte durch die Begünstigung der starken spasmolytischen Wirkung durch die strukturellen Unterschiede des Resveratrols erklärt werden. Möglicherweise ist dies auf das Vorhandensein des Imidazolringes und des Thioethyl-Restes an der Position 3 zurückzuführen. Der verstärkte Effekt auf die Chronotropie rechter Vorhöfe und auf die Inotropie der Papillarmuskeln im Vergleich zum Naturstoff könnte mit dem Fehlen der Reste in den Positionen 3 und 5 erklärt werden. Mit dem Anfügen zusätzlicher Reste bei der Testsubstanz PGU 112 kam es zur Verminderung der negativ chronotropen Wirkung im Vergleich zur Grundsubstanz Resveratrol.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von zwei am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien neusynthetisierten Diarylimidazolen PGU 112 und PGU 179 an isolierten Meerschweinchenorganpräparaten untersucht. Bei den Testsubstanzen handelt es sich um Modifikationen des Naturstoffs Resveratrol, dem lebensverlängernde u.a. kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. Im Rahmen von in-vitro Untersuchungen wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf die glatte Muskulatur der Aorta, Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums, sowie an der quergestreiften Muskulatur des rechten Vorhofs und Papillarmuskels untersucht. Dabei wurden die Substanzen PGU 112 und PGU 179 in ansteigenden Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ in kumulativer Form in ein Organbad eingespritzt und die Reaktion der Organpräparate wurde mit Hilfe eines Schreibers registriert. Mit Hilfe von isometrischen Kontraktionsmessungen war es möglich die spasmolytische Wirkung, sowie den Einfluss auf die Inotropie und Chronotropie der Organpräparate zu untersuchen.

Nach Auswertung der Ergebnisse lässt sich mit großer Sicherheit sagen, dass die neusynthetisierte Verbindung PGU 112 keine statistisch signifikante Wirkung auf die Organpräparate gezeigt hat. PGU 112 zeigte eine niedrigere Wirkung auf die Organpräparate als der Ausgangsstoff Resveratrol. Im Unterschied dazu zeigte PGU 179 eine eindeutige Wirkung sowohl auf die quergestreifte, als auch auf die glatte Muskulatur, wo es fast zur kompletter Spasmolyse und Relaxation der Organe gekommen ist.

Am rechten Vorhof wurde die positive oder negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanzen überprüft. Am Papillarmuskel wurde der Einfluss auf die Inotropie getestet. An der glatten Muskulatur der anderen Organe wurde die Wirkung der Testsubstanzen PGU 112 und PGU 179 auf die Kontraktionskraft überprüft.

Die Testsubstanzen wurden untereinander und mit der Ausgangssubstanz Resveratrol hinsichtlich ihrer chemischer Struktur und Effekte auf die Organpräparate verglichen. Es zeigte sich, dass es durch das Fehlen der Substituenten in den Positionen 3 und 5 und das Einführen des Thioethyl-Restes in Position 4 zu einer Verstärkung der relaxierenden Wirkung auf die Aorta und A. pulmonalis, sowie zur Steigerung der spasmolytischen Wirkung am Darm kommt. Am rechten Vorhof konnte ein negativ chronotroper Effekt verzeichnet werden, welcher auf der Reduktion der Substituenten basiert. Ebenfalls konnte ein inotroper Effekt nachgewiesen werden. Der Austausch der Ethylen-Gruppierung durch einen Imidazolring könnte die spasmolytische Wirkung verstärken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Testsubstanz PGU 179 zu einer eindeutig verstärkten dilatierenden Wirkung bei allen Präparaten der glatten Muskulatur führt. Desweiteren zeigte PGU 179 ebenfalls eine negativ chronotrope Wirkung am rechten Vorhof. Es gilt in der Zukunft neue Substanzen zu suchen, welche auf dem Naturstoff basieren, um so ein möglichen klinischen Nutzen zu erkennen und sinnvoll einsetzen zu können. Dafür sind die ersten Schritte getan.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24(5A): 2783-2840

Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423:181-185

Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, Schröder J, Noel JP (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem Biol* 11: 1179-1194

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342

Becker JV, Armstrong GO, van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, Pretorius IS (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* 4: 79-85

Belguendouz L, Frémont L, Gozzelino MT (1998) Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 55: 811-816

Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS (1996) Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J Chromatogr A* 730 :47-52

Criqui MH, Ringel BL (1994) Does Diet or Alcohol Explain the French Paradox? *Lancet* 344: 1719-1723

Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ (2001) Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Cancer Res* 61: 4731-4739

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103-1104

Frémont L, Belguendouz L, Delpal S (1999) Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 64: 2511-2521

Fulda S, Debatin KM (2004) Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 64: 337-346

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

Gronbaek M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G (1995) Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ* 310: 1165-1169

Hipskind JD, Paiva NL (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 551-562

Ignatowicz E, Baer-Dubowska W (2001) Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol.* 53 (6) 557-569

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220

Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1985) Effects of stilbene derivatives on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 837: 209-212

Kleine-Gunk B (2007) Resveratrol- Schlüssel für ein langes Leben?. *Pharm Zeit* 29/2007

Kollár P, Kotolová H, Necas J, Karpíšek M, Bartosíková L, Karesová P (2001) Experimental study of resveratrol and flavonoids in red wine with regard to their possible hypolipemic effects. *Vnitr Lek* 46: 856-860

Kundu JK, Surh YJ (2004) Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutat Res* 555: 65-80

Kundu JK, Surh YJ (2008) Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 269: 243-261

Laden BP, Porter TD (2001) Resveratrol inhibits human squalene monooxygenase. *Nutrit Res* 21: 747-753

Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21: 2383-2396

Lekli I, Szabo G, Juhasz B, Das S, Das M, Varga E, Szendrei L, Gesztelyi R, Varadi J, Bak I, Das DK, Tosaki A (2008) Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: the role of GLUT-4 and endothelin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H859-866

Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 1017-1026

Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR 2 for lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-2128

Lötsch V (2004) Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivates (STPAR29A) auf verschiedene isolierte Präparate von Meerschweinchen. Diplomarbeit Universität Wien

Mahyar-Roemer M, Kohler H, Roemer K (2002) Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* 2: 27-36

Marier JF, Chen K, Prince P, Scott G, del Castillo JR, Vachon P (2005) Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res* 69: 151-154

Martinez J, Moreno JJ (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 59: 865-870

Marx J (2004) Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 306: 966-968

McCay CM, Cromwell MF, Maynard LA (1935) The Effect of retarded growth upon the length of life span upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79

McGeer EG, McGeer PL (2003) Inflammatory processes in Alzheimer`s disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 741-749

Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2003) Hypolipidemic action of dietary resveratrol a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci* 73: 1393-1400

Olas B, Zbikowska HM, Wachowicz B, Krajewski T, Buczynski A, Magnuszewska A (1999) Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets. *Acta Biochim Pol* 46: 961-966

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 235: 207-219

Philip M, Rowley DA, Schreiber H (2004) Inflammation as a tumor promoter in cancer induction *Semin Cancer Biol* 14: 433-439

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

Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, Alcohol, Platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* 339: 1523-1526

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F (2003) Red Wine Ingredient Resveratrol Protects from β -Amyloid Neurotoxicity. *Gerontology* 49: 380-383

Schmandke H (2002) Resveratrol und Piceid in Weintrauben und Erdnüssen sowie daraus hergestellte Produkte. *Ernährungs-Umschau* 9: 349-353

Schröder G, Brown JWS, Schröder J (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase – cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Europ J Biochem* 172: 161-169

Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK (2007) Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytother Res* 21: 278-283

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol – a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30: 91-113

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Wine as a biological fluid – history production and role in disease prevention. *J Clin Lab Analysis* 11: 287-313

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC Witztum JL (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924

Su HC, Hung LM, Chen JK (2006) Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1339-1346

Subbaramaiah K, Michaluart P, Chung WJ, Tanabe T, Telang N, Dannenberg AJ (1999) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Ann NY Acad Sci* 889: 214-22

Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Brit J Pharmacol* 126: 673-680

Virgili M, Contestabile A (2000) Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci Lett* 281: 123-126

Willerson JT, Ridker PM (2004) Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109: II2-II10

Yu CW, Shin YG, Chow A, Li YM, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelmann WH, Pezzuto JM, Mehta RG, Van Breemen RB (2002) Human rat and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 19: 1907-1914

Yu HB, Zhang HF, Zhang X, Li DY, Xue HZ, Pan CE, Zhao SH (2010) Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepatogastroenterology* 57: 1241-1247

7. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Maida Begovic

Geburtsdatum: 30. Jänner 1984 in Jajce (Bosnien und Herzegowina)

Staatsbürgerschaft: Bosnisch-herzegowinisch

Familienstand: ledig

Ausbildung:

2003-2012 Studium der Pharmazie in Wien (Österreich)

2002-2003: Studium der Pharmazie in Sarajevo (Bosnien und Herzegowina)

1998-2002: Gymnasium in Sarajevo (Bosnien und Herzegowina)

1997-1998: Volksschule in Sarajevo (Bosnien und Herzegowina)

1996-1997: Werner-Heisenberg-Gymnasium in Leverkusen (Deutschland)

1994-1996: Gesamtschule Schlebusch in Leverkusen (Deutschland)

1992-1994: GGS Herderstrasse in Leverkusen (Deutschland)

1990-1992: Grundschule in Jajce (Bosnien und Herzegowina)