



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening eines neu
synthetisierten Diarylimidazols (PGU 193) an
isolierten Organen von Meerschweinchen

Verfasserin

Lejla Imamovic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im Jänner 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

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

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei meiner Familie. Ohne deren Liebe, Verständnis und Fürsorge hätte ich es nie alleine geschafft. Spezieller Dank gilt dabei meiner Schwester Larisa, die mich bei Prüfungsstress und schlechter Laune immer wieder mit verschiedensten Methoden aufheitern konnte.

Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik danke ich auch sehr. Er war der bestmögliche Diplomarbeitbetreuer, den man sich überhaupt aussuchen konnte.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich für die schönen und lustigen Momente. Sie haben mir immer positive Energie und ein Gefühl der Geborgenheit während der vielen Jahren gegeben.

Für die Bereitstellung von der Testsubstanz PGU 193, möchte ich mich zuletzt bei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung der Arbeit	1
1.2. Naturstoff Resveratrol	2
1.2.1. Vorkommen	2
1.2.2. Französische Paradoxon	3
1.2.3. Biologische Funktion	3
1.2.4. Wirkungen	4
1.2.5. Pharmakokinetik	6
2. Material und Methodik	8
2.1. Testsubstanz PGU 193 HCl	8
2.2. Nitro-L-Arginin	8
2.3. Versuchsanordnung	9
2.4. Versuchstiere	10
2.5. Herstellung der Tyrode	11
2.6. Isolierung und Präparation der Tierorgane	13
2.6.1. Atrium cordis dexter (Rechter Vorhof)	15
2.6.2. Musculus papillaris (Papillarmuskel)	15
2.6.3. Arteria pulmonalis (Lungenarterie)	16
2.6.4. Aorta descendens (Absteigender Teil der Aorta)	16
2.6.5. Terminales Ileum (Darm)	17
2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen	18
2.7.1. Apparatur 1	20
2.7.2. Apparatur 2	22
2.7.3. Kraftwandler	24

2.7.4. Gaszufuhr	24
2.8. Versuchsdurchführung	25
2.8.1. Versuchsablauf – Atrium cordis dexter	25
2.8.2. Versuchsablauf – Terminales Ileum	26
2.8.3. Versuchsablauf – Aorta descendens	27
2.8.4. Versuchsablauf – Arteria pulmonalis	27
2.8.5. Versuchsablauf – Musculus papillaris	28
2.9. Auswertung der Ergebnisse	28
2.9.1. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	28
2.9.2. Atrium cordis dexter	29
2.9.3. Musculus papillaris	30
2.9.4. Statistik	30
3. Ergebnisse	32
3.1. Testsubstanz PGU 193 HCl	32
3.1.1. Aorta descendens	32
3.1.2. Arteria pulmonalis	35
3.1.3. Terminales Ileum	38
3.1.4. Atrium cordis dexter	41
3.1.5. Musculus papillaris	44
3.2. Untersuchung mit Nitro-L-Arginin	47
3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µl Nitro-L-Arginin	48
3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µl Nitro-L-Arginin	51
4. Diskussion	54
4.1. Versuchsreihen an der glatten Muskulatur	54
4.2. Versuchsreihen an der quergestreiften Muskulatur	56
4.3. Versuche mit PGU 193 und Nitro-L-Arginin	57
4.3.1. Versuch mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin	57

4.3.2. Versuch mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	58
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	61
7. Curriculum vitae	63

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Am Department für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien wurde die Testsubstanz PGU 193 synthetisiert. Die Substanz leitet sich vom Naturstoff Reservatrol ab, dessen Struktur stark modifiziert wurde.

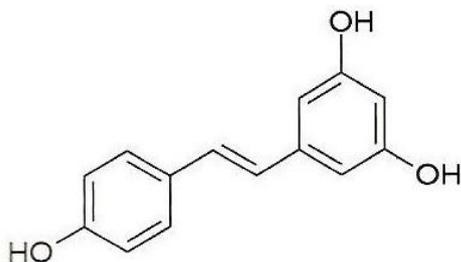
Ziel der Diplomarbeit war es die Wirkung der Testsubstanz an 5 isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen. An der glatten Muskulatur der Aorta, der Pulmonalarterie und des Ileums wurde die vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung untersucht. An der quergestreiften Muskulatur des Papillarmuskels konnte die Änderung der Inotropie beobachtet werden und am rechtem Vorhof die Chronotropie.

An jenem Organ, an dem mit der Testsubstanz die stärkste Wirkung erzielt wurde, sollte auch ein möglicher Wirkmechanismus untersucht werden.

1.2. Naturstoff Resveratrol

Chemisch gesehen ist Resveratrol ein trans-3, 5, 4` Trihydroxystilben.

Abbildung 1: Resveratrol



1.2.1. Vorkommen

Resveratrol gilt als Wirkstoff des Rotweines. Hauptsächlich kommt es in der Traubenschale vor. Geringe Konzentrationen findet man aber auch in den Traubenkernen, Stielen, Reben und Wurzeln des Weinstocks. Nachgewiesen wurde es ebenfalls in Erdnüssen und Maulbeeren.

Das erste Mal wurde Resveratrol 1940 aus den Blättern der weißen Lilie isoliert. Den höchsten Gehalt des Resveratrols hat jedoch der japanische Knöterich (*Polygonum cuspidatum*), der in der traditionellen japanischen Medizin als Heilpflanze unter dem Namen Ko-jo-kon und in der Ayuweda-Medizin als Darakchasava verwendet wird (Paul et al. 1999).

Die Konzentration des Resveratrols hängt beim Wein von der Dauer der Extraktion ab. Bei Weißwein und Traubensaft ist der Fermentationsprozess kürzer als beim Rotwein und deswegen weist es auch eine geringere Konzentration von Resveratrol auf. Durch Röstung der Erdnüsse vermindert sich der Gehalt ebenfalls.

1.2.2. Französische Paradoxon

Resveratrol wurde international bekannt durch das Französische Paradoxon (Renaud et al. 1992).

Epidemiologen berichten Anfang 1990. über eine interessante Beobachtung, nämlich dass in Frankreich eine um 30-40% niedrigere Herzinfarktrate lag, als in den vergleichbaren europäischen Ländern und den Vereinigten Staaten und dass obwohl die Franzosen zu cholesterinreicher Kost und einem Zigarettenkonsum neigen. Dieses Phänomen wurde rasch zum Französischen Paradoxon (Criqui et al. 1994).

Die mögliche Erklärung war der hohe Rotweinkonsum der Franzosen, der kardioprotektiv wirkte und eine hohe Konzentration von Resveratrol aufweist, welches für die Wirkung verantwortlich sein konnte (Hung et al. 2000).

Nachstehende Untersuchungen zeigten allerdings, dass dem Alkohol die gefäßprotektive Wirkung zugeteilt wird. Die Klatsky Studie zeigte eine Abnahme der kardiovaskulären Erkrankungen bei einem moderaten Alkoholkonsum und zwar unabhängig davon welche Art von Alkohol verzehrt wurde (Klatsky et al. 1997).

1.2.3. Biologische Funktion

Biologisch dient das Resveratrol den Pflanzen als Phytoalexin. Das sind Substanzen die Pflanzen vor Pilz-, Bakterien- und Virusinfektionen, sowie von UV-Strahlung, Toxinen und anderen äußerlichen Einflüssen schützen (Ignatowicz et al. 2001).

1.2.4. Wirkungen

Reservatrol ist bekannt für seine vielfachen Wirkungen. Es wurde durch zahlreiche Studien untersucht in denen die verschiedenen Wirkungen und therapeutische Eigenschaften veröffentlicht wurden.

Antioxidative Wirkung

Polyphenole besitzen hohe antioxidative Potenz. Die polyphenolischen Hydroxylgruppen stellen ideale Radikalfänger dar. Eine antioxidative Wirksamkeit wurde ebenfalls für das Reservatrol nachgewiesen. Es dichtet ähnlich wie das Coenzym Q10 sogenannte Protonenleaks der Mitochondrien ab und macht Sauerstoffradikale dadurch unschädlich (Leonard et al. 2003).

Eine besondere Bedeutung haben die Antioxidantien für die Blutgefäße. Sie verhindern die LDL-Cholesterol Oxidation und somit deren Einlagerung in die Gefäßwand. Die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques wird unterbunden und dadurch die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen wie: Hypertonie, Arteriosklerose, Myokardinfarkt und Thrombosen gesenkt.

Eine antioxidative Wirkung ist auch für das Gehirn von großer Bedeutung. In mehreren in vivo Studien konnte nachgewiesen werden, dass Reservatrol die Blut-Hirn-Schranke bei Ratten überwindet und eine neuroprotektive Wirkung aufweist (Virgili et al. 2000).

Der Einsatz von Reservatrol bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer scheint sinnvoll zu sein.

Antiinflammatorische Wirkung

Reservatrol ist ein Pflanzeninhaltsstoff der eine antientzündliche Wirkung besitzt. Es hemmt zwei Schlüsselenzyme der Entzündungsreaktion, nämlich die Cyclooxygenase 2 (COX-2) und die intrinsische Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) (Subbaramaiah et al. 1999, Tsai et al. 1999).

Der nukleare Faktor kappa-b (NF- κ b) spielt im intrazellulären Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Il-1, Il-6, TNF- α). NF- κ b befindet sich normalerweise im inaktiven Zustand als Dimer im Zytoplasma. Durch viele Stimuli, wie zum Beispiel: UV-Strahlung, Bakterientoxine, usw., kann es aktiviert werden, wodurch es in den Zellkern wandert, wo es zu Genexpression und zu Synthese von Entzündungsenzymen führt.

Resveratrol konnte in vitro Tests zeigen das es die Translokation des NF- κ b in den Nucleus unterbindet und somit die Entstehung proinflammatorischer Mediatoren (Kundu et al. 2004).

Inhibition der Karzinogenese

Wissenschaftler in Science veröffentlichten bereits 1997 eine Arbeit die nachweist, dass Resveratrol in Krebszellmodellen eine inhibitorische Wirkung auf die drei Stadien der Karzinogenese zeigt, nämlich die Initiation, Promotion und die Progression (Jnang et al. 1997).

Resveratrol zeigt sich in einer Reihe von experimenteller Arbeiten als potenter Apoptose-Induktor. Bereits vorhandene Krebszellen zwingt es in den programmierten Zelltod (Dorrie et al. 2001, Mahyar-Roemer et al. 2002).

Da der Resveratrol-Gehalt von unterschiedlichen Rotweinsorten verschieden ist und weitere wirksame Polyphenole im Rotwein vorkommen, ist es sehr problematisch oder sogar unmöglich eine Korrelation zwischen Rotweinkonsum und Krebshäufigkeit aufzustellen. Alkohol übt teils inhibitorische, teils promovierende Wirkungen auf verschiedene Krebsarten aus (Kleine-Gunk 2007).

Wirksamkeit wie Kalorienrestriktion

Zu den Therapieansätzen der Anti-Aging-Medizin gehört die Kalorienrestriktion, die am längsten bekannt und am besten untersucht wurde.

In den 1930er Jahren wurde über Laborratten berichtet, die bei einer 30% Reduktion der Nahrungsaufnahme eine bis zu 50% längere Lebenserwartung aufwiesen (McCay et al. 1935).

CR-Mimetika sind Substanzen die wie eine Kalorienreduktion die gleichen biochemischen Prozesse aktivieren, ohne dass der Mensch dabei hungern muss. In Reservatrol haben die Forscher eine solche Substanz gefunden. Dass das Reservatrol eine lebensverlängernde Wirkung bei niederen Organismen, wie hypokalorische Kost aufweist, konnte die Arbeitsgruppe von Sinclair nachweisen (Howitz et al. 2003).

Methabolisches Syndrom

Im November 2006 berichtet wieder die Arbeitsgruppe von David A. Sinclair in Nature von einer weiteren Wirkung von Reservatrol.

Sie untersuchten den Gesundheitszustand und die Lebenserwartung von schlanken, adipösen und adipösen Mäusen die Reservatrol einnahmen. Die dicken Mäuse verstarben und wurden erwartungsgemäß viel schneller krank als die schlanken. Die Mäuse die Reservatrol bekamen lebten gleich so lang wie die schlanken, ohne die Anzeichen des metabolischen Syndroms. Dies ist auf eine deutliche Verbesserung der Insulinsensitivität zurückzuführen, wofür durch die Autoren das Reservatrol verantwortlich war (Baur et al. 2006).

1.2.5. Pharmakokinetik

In der klinischen Anwendung von Reservatrol stellt die Pharmakokinetik das Kernproblem dar. In vitro wurden die Effekte mit unterschiedlichen Dosierungen erreicht. Fraglich ist ob Reservatrol im lebenden Organismus resorbiert wird und ob es an den Wirkort mit ausreichender Konzentration ankommt.

Dass das Reservatrol nach peroraler Einnahme gut aufgenommen wird, konnte Walle und seine Mitarbeiter zeigen. Allerdings wurde es bereits in 30 Minuten durch Glukuronidierung und Konjugation in der Leber metabolisiert. Nur Spuren von freiem Reservatrol konnten nachgewiesen werden (Walle et al. 2004).

Diskutiert wird darüber ob vielleicht die Metaboliten biologisch wirksam sind. Es gibt nämlich interessante Hinweise darüber, dass die Sulfatierung von Resveratrol durch andere Polyphenole, wie zum Beispiel das Quercetin, inhibiert wird (Mertens-Talcott et al. 2005).

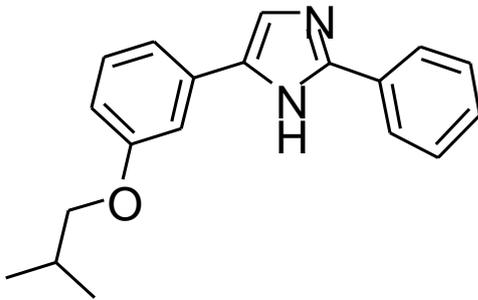
Die Erklärung könnte darin liegen wieso ein bis zwei Gläser Rotwein, die niedrigen Konzentrationen von Resveratrol enthalten, doch einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben.

2. Material und Methodik

2.1. Testsubstanz PGU 193 HCl

An dem Department für Pharmazeutische/Medizinische Chemie wurde PGU 193 von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Erker synthetisiert und für die Untersuchung an das Department für Pharmakologie und Toxikologie weitergeleitet.

Abbildung 2: chemische Struktur von PGU 193 HCl



MG: 292, 41 g/mol

Nomenklatur: 5-(3-Isobutoxyphenyl)-2-phenyl-1*H*-imidazol

2.2. Nitro-L-Arginin

Mit Nitro-L-Arginin wurde in zweitem Teil der Diplomarbeit der Wirkmechanismus getestet.

NO das durch das Enzym eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) aus dem Endothel freigesetzt wird, aktiviert die Bildung von cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat) und zwar über die cGC (cytosolische Guanylatcyclase). Als Folge dessen sinkt die intrazelluläre Ca-Konzentration und es kommt zur Gefäßrelaxation.

2.3. Versuchsanordnung

Am Beginn des praktischen Teils der Arbeit wurde zuerst geprüft in welchem Lösungsmittel sich das PGU 193 löste. Es wurde festgestellt, dass es sich um eine lipophile Substanz handelt die in Dimethylsulfoxid (DMSO) gut löslich ist. DMSO war als ein dipolares Lösungsmittel, dass sich zugleich auch mit Wasser vermischen konnte für die Versuche besonders geeignet. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde dies aber in Betracht gezogen, weil das DMSO eine geringe Einwirkung auf die Organe hatte.

Die Einwaage der Substanz musste anschließend ausgerechnet werden. Da die Organbäder unterschiedliche Volumen hatten, 8 ml und 25 ml wurde dies in die Rechnung mitebezogen. Die Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ musste pro Gefäß nach vollständigem Pipettieren der 100 μl erreicht werden.

Tabelle 1: Verwendete Einwaagen

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz (100 $\mu\text{mol/l}$)
PGU 193	292, 41 g/mol	8 ml	0,23 mg
		25 ml	0,73 mg

Die Substanz wurde eingewogen und in 100 μl DMSO gelöst, als sich die Kontraktionskurve des zu Untersuchenden Organ auf einem konstantem Niveau eingestellt hatte. In genau 45 minütigen Abständen wurden die Stammlösungen in das Organbad vorsichtig mit Finnmikropipetten eingespritzt. Zuerst 1 μl , dann 2, 7, 20 und zum Schluss 70 μl . Am Millimeterpapier des Schreibers wurde der genaue Zeitpunkt der Zugaben notiert.

2.4. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Meerschweinchen verwendet, da deren Ionekanäle ähnlich aufgebaut sind wie bei Menschen. Es handelte sich dabei um Meerschweinchen des „TRIK“-Stammes. Ihr Körpergewicht betrug 300 bis 600 g.

An jedem Versuchstag wurde immer ein Tier benötigt. Nach der Tötung öffnete man den Thorax und Abdomen vorsichtig. Zuerst wurde mit der Schere und Pinzette noch das schlagende Herz und die Lunge entnommen, dann ein Stück des Dünndarms, das an einem Ende mit einem Faden abgebunden wurde. Als letztes wurde die Aorta vorsichtig herausgeschnitten.

Damit die Organe weiter ex vivo leben konnten war es wichtig sie gleich in die Nährlösung (Tyrode) zu geben und zu begasen.

Abbildung 3: Meerschweinchen



2.5. Herstellung der Tyrode

Bei der Tyrode handelt es sich um eine physiologische Nährstofflösung, die alle erforderlichen Elektrolyte enthält um die isolierten Organe weiter am Leben zu erhalten.

An jedem Versuchstag wurde in einem 2l Messkolben die Tyrode frisch zubereitet. Die genaue Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode

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

Zuerst wurde immer die Glukose eigewogen, da sie als einzige als Reinsubstanz zur Verfügung stand. Nachdem wurden die NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und die KH₂PO₄ Stammlösungen hinzugefügt. Mit Aqua bidestillata wurde der Messkolben bis auf $\frac{3}{4}$ des Volumens aufgefüllt und mehrmals geschüttelt, bis die Zusammensetzung homogen wurde.

Die Begasung mit dem Oxymix/Carbogen, dass aus 95% O₂ und 5% CO₂ besteht, erfolgte anschließend 20 Minuten lang. Nach 10 Minuten wurde das CaCl₂ langsam und tropfenweise mit der elektrischen Pipette dazugegeben. Das wichtigste dabei war es darauf zu achten, dass die sonst klare Tyrode nicht trüb wurde. Dass wäre nämlich ein eindeutiges Zeichen dafür, dass schwerlösliche Calciumsalze ausgefallen sind und die Tyrode somit nicht mehr die exakte Zusammensetzung hätte.

Nachdem das CaCl₂ hinzugefügt wurde und die 20 Minuten vorüber waren, wurde der Messkolben bis zur Eichgerade mit Aqua bidestillata aufgefüllt und einpaar mal geschwenkt.

2.6. Isolierung und Präparation der Tierorgane

Nachdem die Organe isoliert und in der physiologischen Lösung begast wurden, konnten sie für die Versuchsdurchführung präpariert werden. Sie wurden zuerst einzeln mit einer Pinzette in Petrischalen, die zuvor mit Tyrode befüllt wurden überführt. In der Petrischale befand sich eine Korkscheibe, die fixiert wurde mit einem Gummischlauch. An den Korkboden konnten die Organe gut mit Präpariernadeln befestigt werden.

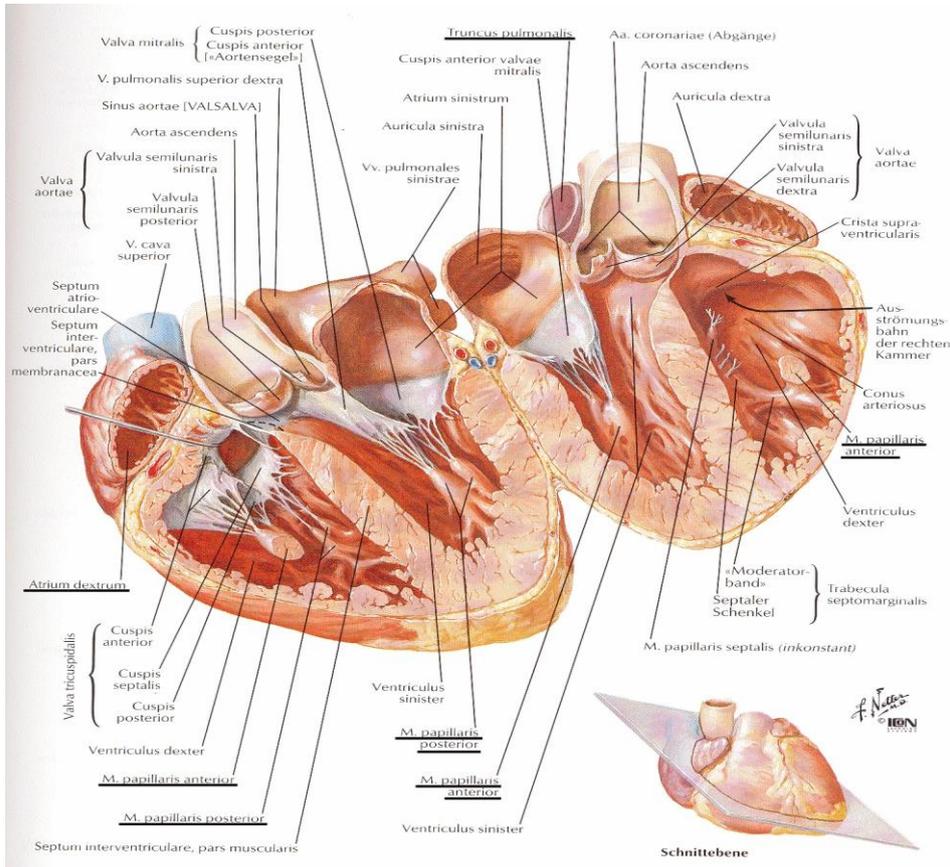
Um bessere Lichtverhältnisse zu schaffen fand die Präparation immer unter einem Stereomikroskop statt.

Abbildung 4: Lichtmikroskop und das Präparierwerkzeug



Da die ersten Organe aus dem Herzen isoliert wurden, wird hier zuerst die Anatomie des Herzens bildlich dargestellt.

Abbildung 5: Anatomie des Herzens



2.6.1. Atrium cordis dexter (Rechter Vorhof)

Mit zwei Präpariernadeln wurde das Herz am Korkboden befestigt. Unter dem Lichtmikroskop wurde das überflüssige Fett- und Lungengewebe abgeschnitten. Es musste sehr vorsichtig gearbeitet werden, da der Sinusknoten (primärer Impulsgeber) schwer zu lokalisieren war und ein falscher Schnitt hätte zu Verletzung des Organs geführt. Für das Gelingen der Versuche war die autonome Schlagfähigkeit des Herzens von essentieller Bedeutung.

Der isolierte Vorhof wurde mit Hilfe von zwei Präpariernadeln und zwei Fäden an den Spitzen angebunden. Durch einen weiteren Knoten wurde je ein Silberhäkchen angebracht. Ein zweiter Knoten machte die Bindung stabiler, damit das Präparat später von der Apparatur nicht abreißen konnte.

2.6.2. Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Die Papillarmuskeln befinden sich in der rechten und linken Herzkammer (siehe Abbildung 5). Nachdem der rechte Vorhof entfernt wurde, folgte ein feiner Schnitt entlang des Septums der rechten Kammer bis zur Herzspitze. Somit konnten die Papillarmuskeln erst sichtbar gemacht werden. Der nächste bedeutende Schritt war es die Purkinjefasern zu entfernen. Sie stellen den letzten Abschnitt der Erregungsleitungsystems des Herzens dar, die ebenfalls spontan depolarisieren und somit zur Erregungsbildung führen würden. Mit ihrer Spontanaktivität hätte dies zu falschen Ergebnissen der Versuche geführt. An den Papillarmuskel wurde ein Faden mit Silberhäkchen angebunden und schließlich von der Sehne abgetrennt. Die winzigen Präparate wurden dann bis zum Versuchsbeginn in einem mit Tyrode befüllten Becherglas begast.

2.6.3. Arteria pulmonalis (Lungearterie)

Für die Versuche wurde der Truncus pulmonalis, der aus der rechten Herzkammer hervorgeht, gebraucht (siehe Abbildung 5). Es wurde so nahe es geht am Herzen geschnitten, weil sich der Truncus pulmonalis ein paar Millimeter weiter in die rechte und linke Lungenarterie abzweigt.

Pro Tag wurden ein bis zwei Präparate hergestellt. Das waren kleine, in etwa 3 mm dicke Ringe, die ohne Silberhäkchen an die Apparatur eingespannt werden konnten.

2.6.4. Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)

Mit einer Pinzette wurde die Aorta am oberen Ende erfaßt und entlang der Wirbelsäule ein 30 mm langes Stück herausgeschnitten.

Die Aorta wurde dann in einer Petrischale mit Steckadeln fixiert und präpariert. Da sie reich vom Fettgewebe umgeben war, wurde es mit einer Federschere präzise herausgeschnitten. Lipophile Testsubstanzen hätten sich sonst an das Fett angelagert und zu falschen Ergebnissen geführt. Am Ende wurden wieder, wie bei der Pulmonalarterie, 3 mm lange Segmente geschnitten, die an die Apparatur ohne Häkchen angespannt werden konnten.

Abbildung 6: Fertig präparierte Aortaringe



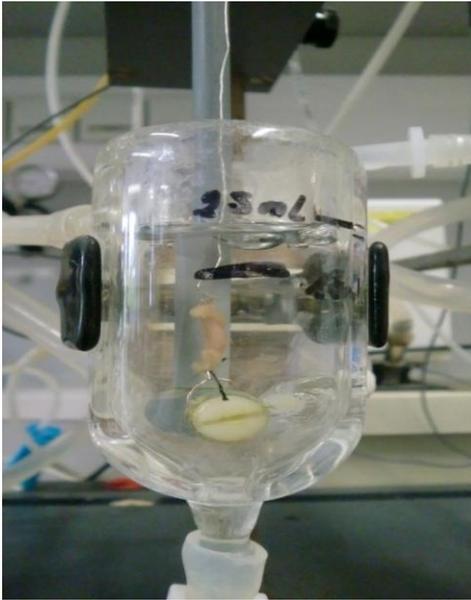
2.6.5. Terminales Ileum (Darm)

Anatomisch gliedert sich der Darm in 3 Teile, nämlich: den Zwölffingerdarm (lat. Duodenum), Leerdarm (lat. Jejunum) und Krummdarm (lat. Ileum). Über das terminale Ileum geht das Dünndarm in den Dickdarm über.

Da für die Versuche das terminale Ileum vorgesehen war, musste dieser Übergang gesucht werden. Ein ca. 20 cm langes Stück wurde herausgezogen und mit einem Faden angebunden. Dann wurde der Darm abgeschnitten und in die Nährstofflösung, die sofort begast wurde gelegt.

Zur Präparation wurde ein ca. 5 mm langer Abschnitt schräg abgeschnitten. Die Spitzen wurden an die Petrischale mit Stecknadeln befestigt. Es wurde darauf geachtet, dass die Öffnungen offen blieben, damit der Wirkstoff im Organbad durch sie strömen konnte. Mit dem Faden wurden wieder, wie bei dem Vorhof die Häkchen angebracht.

Abbildung 7: Darmpräparat im Organbad



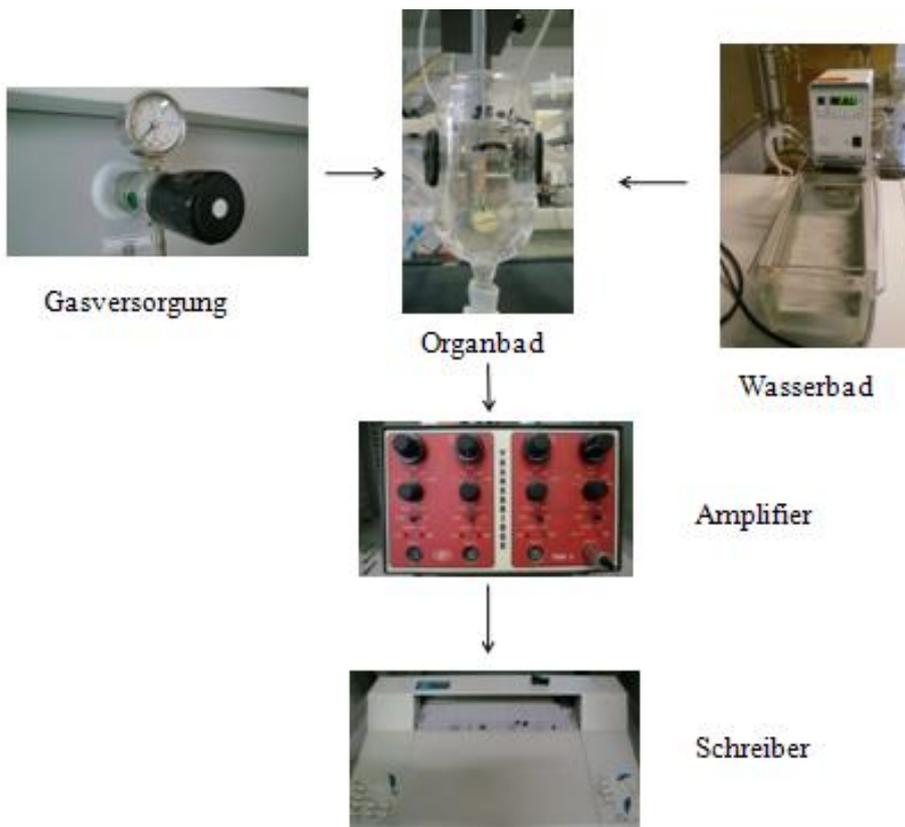
2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen

Die vorgefertigten Präparate wurden auf zwei verschiedenen Apparaturen getestet. Für den Papillarmuskel wurde ausschließlich die Apparatur 1 und für die restlichen vier Präparate die Apparatur 2 verwendet.

Mit den Apparaturen konnten die physiologischen Bedingungen der Organe nachgeahmt werden. Die Sauerstoffversorgung, Temperatur und pH-Wert wurden immer genau beachtet.

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Silberdrahtes an die Apparaturen eingespannt. Am oberen Ende war der Draht mit einem Kraftwandler verbunden. Jede Veränderung am Organ wurde mit dem Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt. Nachdem das Signal am Amplifier verstärkt wurde, konnte es am Schreiber schließlich registriert werden.

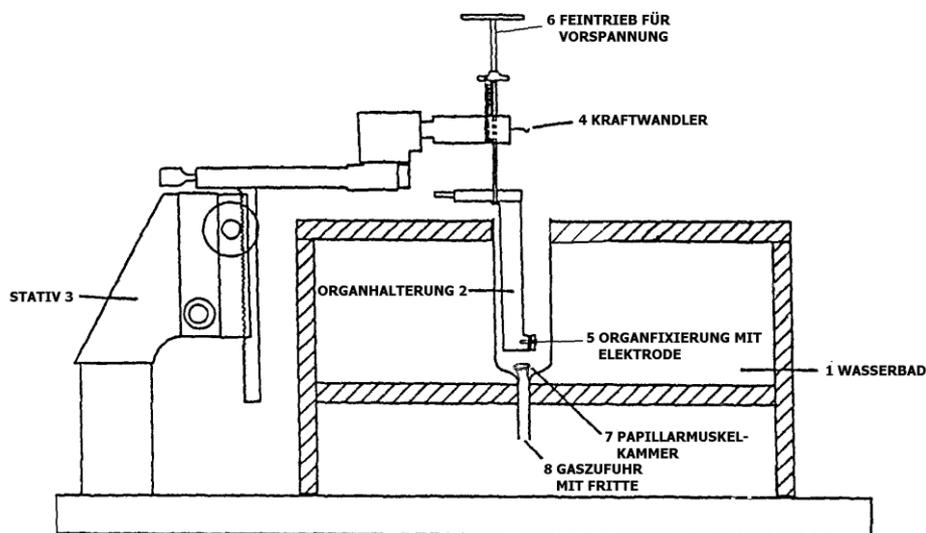
Abbildung 8: Versuchsanordnung



2.7.1. Apparatur 1

Die Kontraktionskraft des Papillarmuskels wurde an folgender Apparatur getestet.

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Apparatur 1



Jeden Morgen, etwa 30 Minuten vor dem Beginn der Versuche wurde das Wasserbad eingeschaltet. Die große Wanne wurde immer bis zur Markierung mit Wasser gefüllt. An der Apparatur 1 sorgte das Thermostat für eine konstante Temperatur von 35 Grad Celsius darin. Der Deckel des Organbades stellte die Papillarmuskelkammer dar. Die Organhalterung war mit einem Stativ befestigt. Der winzige Papillarmuskel wurde zwischen einem Plastikplättchen und einer Elektrode mit einem Schraubenzieher fixiert und zwar so, dass das Häkchen nach oben raus schaute. Mit einem Silberdraht wurde schließlich der Muskel über das Häkchen mit dem Kraftwandler verbunden.

Das Organbad wurde vor dem Beginn der Versuche immer mit 25 ml Tyrode gefüllt. Die Gaszufuhr, die durch ein Schraubensystem reguliert wurde, kam durch eine Glasfritte von unten.

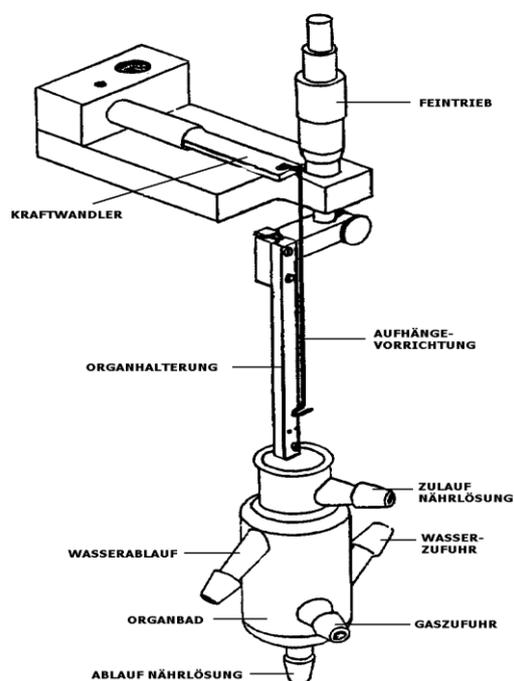
Mit dem Feintrieb wurde die Vorspannung angelegt und somit konnte der Muskel maximal vorkontrahiert werden.

Der Muskel musste zusätzlich elektrisch mit einem Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) gereizt werden. Die Schläge wurden schließlich am Schreiber registriert.

2.7.2. Apparatur 2

An der Apparatur 2 konnten die Aorta, Pulmonalarterie, Vorhof und der Darm getestet werden.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Apparatur 2

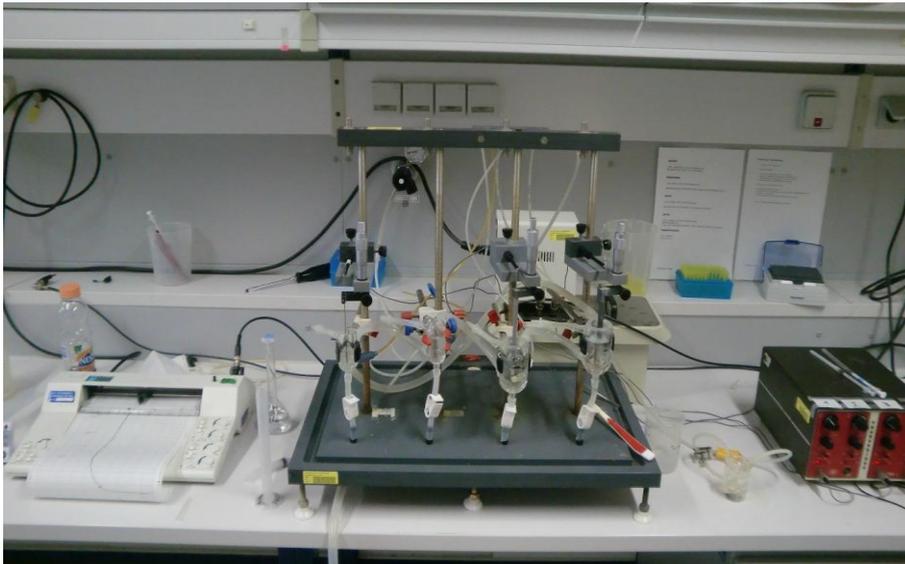


Vom Aufbau her unterscheidet sich die Apparatur 2 von der Apparatur 1 nur gering. Das Wasserbad stellt hier eine doppelwandige Kammer dar, in deren Innerem das Wasser konstant zirkulieren konnte. Die Temperatur wurde auf 37°C eingestellt. Über eine Quetschklemme, die am unteren Schlauch angebracht war, konnte der Abfluss des Organbades reguliert werden. Bei der Apparatur 1 dagegen musste mit einer Spritze das Wasser oder das Organbad am Ende der Versuche herausgesaugt werden.

Beide Apparaturen waren mit Schläuchen mit der Gaszufuhr verbunden. Mit einem Verschlussystem wurde die Zufuhr zwischen den Versuchen auf und zugedreht.

Die vorgeschriebene Vorspannung wurde wie bei der Apparatur 1 über den Feintrieb eingestellt. Die Präparate hatten immer eine einheitliche maximale Ausgangsspannung, wodurch die Ergebnisse der Versuche vergleichbar wurden. Auf den Kraftwandler wurde die mechanische Kraft wieder übertragen und dann über den Verstärker am Schreiber aufgezeichnet.

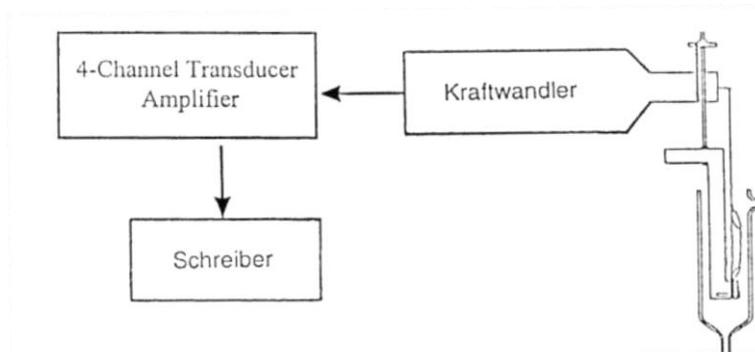
Abbildung 11: Originale Abbildung der Apparatur 2



2.7.3. Kraftwandler

Dank dem Kraftwandler, den beide Apparaturen besaßen, wurden die Versuche überhaupt messbar. Er wandelte die mechanische Kraft der Organe in elektrische Impulse um. Durch Spasmolyse oder Kontraktion der Organe änderte sich der elektrische Widerstand am Dehnungsstreifen. Diese Änderung des Stromflusses wurde am Verstärker zusätzlich intensiviert (4-Channel Transducer Amplifier, WPI) und letztendlich auf dem Schreiber (Flatbed Recorder, Modell BD 112 Dual Channel, Firma Kipp & Zonen) notiert. Die Aufzeichnungen auf dem Millimeterpapier wurden zum Schluss ausgewertet.

Abbildung 12: Schema der Signalgewinnung



2.7.4. Gaszufuhr

Die Gaszufuhr war von Vorbereitung der Tyrode bis zur Ende der Versuchsdurchführungen zu gewährleisten. Die Tyrode musste 20 Minuten mit Oxymix (95% O₂ und 5% CO₂) begast werden damit die Organe gleich nach der Isolierung mit ausreichend Sauerstoff versorgt wurden. Ein konstanter physiologischer pH konnte ebenfalls gehalten werden.

Das Gas ging von einer zentralen Gasflasche über Schläuche in die Gefäße/Apparaturen. Mit Schraubklemmen wurde die Intensität eingestellt, so das nicht zu viel, oder nicht zu wenig Gas geleitet wurde.

2.8. Versuchsdurchführung

Damit mit der Versuchsdurchführung begonnen werden konnte, musste zuerst sichergestellt werden dass die Apparaturen sauber waren. Am Tag zuvor wurden sie immer mit einer 2%iger Salzsäure gründlich geputzt und mit Aqua bidestillata 2-3-mal durchgespült. Vor den Versuchen wurden sie noch einmal mit Aqua bidestillata und mit Tyrode durchgespült.

Nun konnte mit den einzelnen Versuchen gestartet werden.

2.8.1. Versuchsablauf-Atrium cordis dexter

Das Präparat, dessen Vorbereitung in Kapitel 2.6.1. beschrieben wurde, spannte man schnell an die Apparatur 2 ein. Es durfte nicht zu fest oder auch nicht zu locker sein. In dem Orgabad dürfte der Silberdraht die Wände des Gefäßes nicht berühren. Der Vorhof reagierte sehr empfindlich auf eine verminderte Sauerstoffzufuhr.

Als nächstes wurde der Schreiber angeschaltet und eine Spannung von 5 mV angelegt. Speed wurde auf 5 mm/sec gestellt und dann wurde mit dem Zero-Drehrad der Schreiber auf die Nulllinie gedreht. Mit dem Feintrieb wurde der Vorhof auf 10,4 mN vorgespannt. Die Herzschläge vom Vorhof konnten im Organbad schon beobachtet werden, doch am Schreiber wurden sie dann noch deutlicher. Der Vorhof brauchte in etwa 45 Minuten bis sich die Schlagfrequenz auf eine konstante Zahl der Schläge pro Zeiteinheit gelegt hat. Alle 5 Minuten wurden sie am Millimeterpapier registriert indem gleichzeitig der „record on“ und der „pen down“ Knopf gedrückt wurde. Dabei

wurden immer 6 Kästchen geschrieben. Als die Schlagfrequenz nach 2-3 Messungen konstant wurde, konnte die Substanz schon eingespritzt werden. Nach dem Pipettierschema wurde alle 45 Minuten die entsprechende Konzentration eingespritzt. Kontrollmessungen wurden alle 5 Minuten am Schreiber notiert. Der Versuch ging solange der Vorhof schlug oder die Endkonzentration von 100 µl/mol erreicht wurde.

2.8.2. Versuchsablauf-Terminales Ileum

Das Darmpräparat wurde an die Apparatur 2 eingespannt. Nachdem es in der Tyrode begast und der Schreiber eingeschaltet wurde, musste die Spitze des Schreibers auf den Nullpunkt gerückt werden. Mit dem Feintrieb wurde bei 5 mV 5 cm vorgespannt. Die Spitze des Schreibers wurde wieder auf den Nullpunkt gerückt und ab diesem Moment wurden mit der Stoppuhr 20 Minuten gemessen.

In der Zwischenzeit wurde die KCl Lösung vorbereitet, mit der der Darm maximal kontrahiert wurde. Die dafür nötige Konzentration wurde experimentell ermittelt und betrug beim Darm genau 60 mmol. Hergestellt wurde die KCl Lösung jeden Tag frisch, indem 0,45 g des KCl in 100 ml Tyrode gelöst wurde.

Nachdem die 20 Minuten vorüber waren, wurde der Schreiber auf die Zeroposition wieder gerückt und mit den Tasten „pen down“ und „record on“ auf das Papier gelegt. Nun wurde die Tyrode über den Gummischlauch abgelassen und schnell 25 ml der KCl Lösung hinzugefügt. Ein gutes Zeichen für den Verlauf des Versuchs war es, wenn der Schreiber stark nach links ausschlug und das Niveau sich nach einer Zeit konstant einstellte.

Beim Darm stellte sich die Plateauphase im Durchschnitt nach etwa 1-1.5 h ein. Die im DMSO gelöste Testsubstanz konnte nun injiziert werden. Nach dem Verlauf der Kurve sah man eindeutig ob die Substanz eine spasmodische Aktivität aufwies.

2.8.3. Versuchsablauf-Aorta descendens

Die ringförmigen Aortastücke wurden auch an die Apparatur 2 eingespannt. Dabei dürfte die Aorta nicht überdehnt oder verknäuelst werden. Nachdem das Präparat in das Organbad gesenkt wurde, aktivierte man den Schreiber und legte eine Spannung von 10 mV an. Den Schreiber wurde wieder auf den Nullpunkt positioniert und mit dem Feintrieb auf 19,4 mN vorgespannt.

Die Aorta und die Pulmoarterie brauchten um maximal kontrahiert zu werden eine Konzentration von 90 mmol des KCl. Die Lösung wurde jedem Tag frisch mit 0,67 g KCl und 100 ml Tyrode hergestellt.

Nachdem die 20 Minuten Anpassungszeit vorüber waren, wurde bei der Aorta die Spannung auf 5 mV umgestellt. Der Schreiber wurde auf den Nullpunkt gestellt und die Tasten „pen down“ und „record on“ gleichzeitig gedrückt. Dann wurde, wie beim Darm die Tyrode abgelassen und je nachdem, ob mit dem „kleinen“ oder „großen“ Organbad gearbeitet wurde, 8 oder 25 ml der KCl-Lösung hinzugefügt. Das Organ schlug im Normalfall nach links über 5 cm aus und wurde konstant nach etwa 45 Minuten.

Nachdem sich das Plateau eingestellt hat konnte die Substanz eingespritzt werden. Das Ziel dabei war die gefäßerweiternde Wirkung der Testsubstanz festzustellen.

2.8.4. Versuchsablauf-Arteria pulmonalis

Der Versuchsablauf der Pulmoarterie wurde analog wie bei der Aorta (Kapitel 2.8.3.) ausgeführt, nur dass die Vorspannung hier die ganze Zeit auf 5 mV (=9,81 mN) eingestellt war und nicht 10 mV wie bei der Aorta (19,6 mN).

2.8.5. Versuchsablauf-Musculus papillaris

Das Präparat wurde an die, wie im Kapitel 2.7.1. beschriebene Apparatur 1 eingespannt. Am Schreiber wurde die Stromstärke auf 5 mV (2 oder 1 mV bei Bedarf) eingestellt und die Geschwindigkeit, die an der Apparatur als Speed bezeichnet wurde, auf 5 mm/sec eingestellt. Mit dem Feintrieb wurde auf 3,92 mN vorgespannt. Nachdem alles genau vorbereitet wurde, musste der Muskel mit dem Accupulser gereizt werden. Alle 15 Sekunden wurde dem Muskel ein Stromschlag gegeben. Über eine Isolation Unit wurde die Reizstärke erhöht bis der Muskel anfang zu schlagen. Danach wurde die Reizstärke noch um 10% erhöht, damit der Muskel weiter kontinuierlich schlagen konnte.

Zur Kontrolle wurden alle 5 Minuten die Zacken am Schreiber aufgezeichnet. Mit einem Lineal wurden nach einer Anpassungsphase von etwa 45 Minuten die Zackenlängen gemessen. Nachdem die Zacken dreimal dieselbe Länge hatten, wurde die Geschwindigkeit am Schreiber auf 20 mm/s gestellt. Somit wurden die Amplituden genauer messbar.

Die Substanz konnte nun eingespritzt werden. Nach 45 Minuten Einwirkzeit der eingespritzten Konzentration, wurde die Geschwindigkeit auf 20 mm/s eingestellt und die Zackenlänge gemessen.

2.9. Auswertung der Ergebnisse

2.9.1. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Bei der Aorta und der Pulmonalarterie wurde die vasodilatierende und beim Darm die spasmolytische Wirkung erforscht. Die Versuche liefen vom Prinzip her gleich. Die Organe wurden chemisch mit KCl maximal kontrahiert. Nachdem die

Kontraktionskurve die Plateauphase erreicht hatte, wurde die Substanz dazugegeben. Appliziert wurden alle 45 Minuten folgende Volumen ins Organbad: 1, 2, 7, 20 und 70 μ l. Am Millimeterpapier wurde jeder einzelner Schritt beschriftet. Nach den Versuchen wurde das Millimeterpapier aus dem Schreiber rausgezogen und mit einem Lineal die Abstände zwischen dem Nullpunkt und dem notierten Stellen, wo die Substanz, in der jeweiligen Konzentration 45 Minuten reagiert hatte gemessen.

Da die einzelnen Versuche bei unterschiedlichen Stromstärken durchgeführt wurden, mussten die gemessenen Werte in Zentimeter mit einem Eichungsfaktor multipliziert werden. Bei 5 mV mit 0,98, bei 2 mV 0,2 und bei 10 mV mit 0,2.

Der Wert, der sich in der Plateauphase vor der Substanzapplikation eingestellt hatte diente als Referenzwert. Er betrug nämlich immer 100%. Im Bezug zu diesem Kontrollwert wurde die Zunahme/Abnahme der Kontraktionskraft prozentuell berechnet.

Aus den ermittelten Werten wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, aus der der EC_{50} Wert dann herausgelesen werden konnte.

2.9.2. Atrium cordis dexter

Nachdem der Vorhof an der Apparatur eingespannt wurde, musste in etwa 45 Minuten gewartet werden bis die Zahl der Schläge pro Minute konstant wurde. Am Millimeterpapier wurden alle 5 Minuten 6 Kästchen registriert. Die 6 Kästchen entsprachen 6 Zentimeter oder 12 Sekunden. Wenn die Zahl der Herzschläge nach drei Messungen konstant wurde (Kontrollwert=100%), konnte die erste Konzentration pipettiert werden. Nach 45 Minuten wurden die Schläge wieder in 6 Kästchen gezählt. Das gleiche wurde ebenfalls nach der Applikation der restlichen Konzentrationen gemacht.

Die Werte wurden dann mit 5 multipliziert und der prozentuelle Ansatz mittels Kontrollwert ausgerechnet. Mit der Konzentrationskurve konnte die Abnahme oder die Zunahme der Chronotropie festgestellt werden.

2.9.3. Musculus papillaris

Die Inotropie des Papillarmuskels konnte ermittelt werden, indem zur Kontrolle alle 5 Minuten die Zacken (Amplituden) am Schreiber aufgezeichnet wurden. Mit einem Lineal wurden, nach einer Anpassungsphase von etwa 45 Minuten, die Zackenlängen gemessen. Nachdem die Zacken dreimal gleich lang waren, wurde die Geschwindigkeit am Schreiber auf 20 mm/s. gestellt. Somit wurden die Amplituden genauer messbar (=Kontrollwert).

Die Substanz wurde gespritzt und nach den 45 Minuten wurden die breiten Zacken geschrieben. Für alle Konzentrationen wurden die Amplituden, die in Abhängigkeit von der Stromstärke, wie bei der Aorta, Pulmonalarterie oder dem Darm, mit einem Eichfaktor multipliziert. Die Prozente wurden wieder in Abhängigkeit vom Kontrollwert berechnet.

2.9.4. Statistik

Da PGU 193 in DMSO löslich war, musste seine Eigenwirkung auf die Organe vom erhaltenen Wert abgezogen werden.

Zur Berechnung des Standardfehlers der Mittelwerte und des arithmetischen Mittel wurde „Sigma Plot 9.0“ verwendet.

Mit der Konzentrations-Wirkungskurve wurden die Werte graphisch dargestellt, wobei bei stark Wirksamen Substanzen ein EC_{50} Wert ermittelt werden konnte.

Für gepaarte Beobachtungen wurde zuletzt ein Signifikanztest („Student-T-Test“) durchgeführt. Die Messergebnisse wurden als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($P < 0,05$) oder sogar kleiner als 1% ($P < 0,01$) war. Jene Ergebnisse, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% ($P < 0,001$) hatten, wurden als hochsignifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Testsubstanz PGU 193 HCl

3.1.1. Aorta descendens

Der vasodilatierende Effekt von PGU 193 auf die Aorta wurde wie im Kapitel 2.8.3. beschrieben getestet. Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt und mit den erhaltenen Ergebnissen wurden die arithmetische Mittelwerte, sowie deren Standardfehler für die einzelnen Konzentrationen in mN und in Prozent ausgerechnet. Der Kontrollwert betrug bei der Aorta $7,85 \pm 1,52$ mN vor der kumulativen Zugabe der Testsubstanz. Er nahm stetig ab und erreichte den tiefsten Punkt von $1,24 \pm 0,88$ mN oder $-84,66 \pm 8,89\%$ nachdem die 100 μl injiziert wurden.

Tabelle 3: Ergebnisse der Versuche von PGU 193 HCl an der Aorta

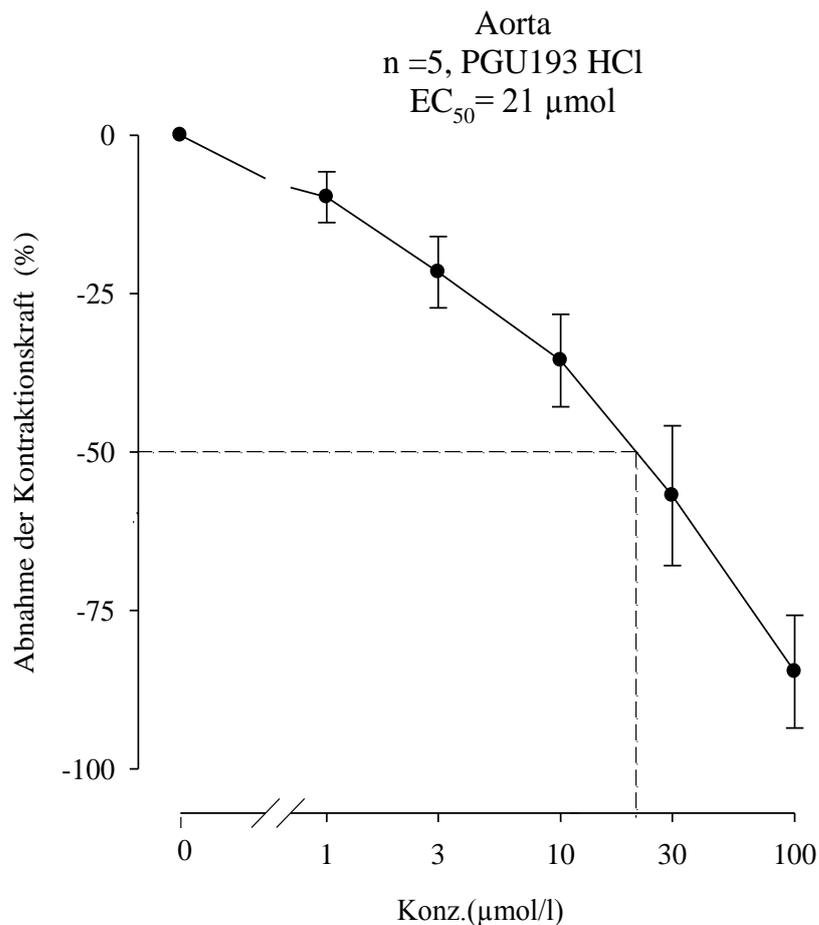
PGU 193 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$7,85 \pm 1,52$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
1	$7,30 \pm 0,83$	$-9,78 \pm 4,02$	5	n.s.
3	$5,85 \pm 0,73$	$-21,62 \pm 5,63$	5	0,05
10	$4,74 \pm 0,62$	$-35,56 \pm 7,3$	5	0,01
30	$3,11 \pm 0,93$	$-56,89 \pm 11,03$	5	0,001
100	$1,24 \pm 0,88$	$-84,66 \pm 8,89$	5	0,001

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

f_c = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

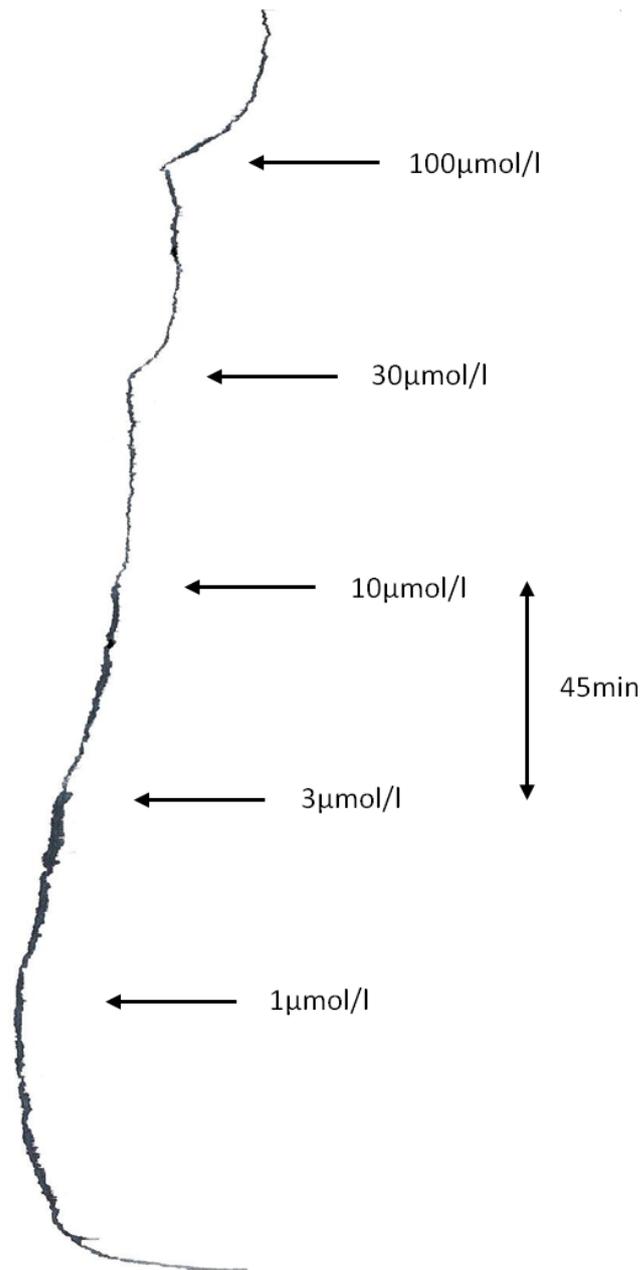
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 193 an der Aorta descendes



Die x-Achse stellt die verwendeten Konzentrationen in µmol/l dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken stellen den Standardfehler dar.

An der Abbildung 13 sieht man eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft (y-Achse) während der Substanzzugabe (x-Achse). Ab 21 µmol/l erreicht die Substanz einen EC₅₀ Wert. Das heißt das PGU 193 eine starke vasodilatierende Wirkung auf die Aorta ausübt.

Abbildung 14: Originalaufzeichnung von PGU 193 an der Aorta descendes



Die Originalabbildung zeigt den am Schreiber aufgezeichneten Versuchsverlauf an der Aorta. Durch Pfeile werden die Zeitpunkte der Injektionen von PGU 193 wiedergegeben. Durch die Zunahme der Substanzkonzentration nimmt die Kontraktionskraft kontinuierlich ab. Am stärksten dilatierte sich das Gefäß nach der Zugabe der Endkonzentration von 100 μmol/l.

3.1.2. Arteria pulmonalis

Die eventuell dilatierende Wirkung von PGU 193 auf die Pulmonalarterie wurde in 4 Versuchsdurchläufen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden ebenfalls arithmetisch gemittelt und ein Kontrollwert von $10,24 \pm 2,46$ mN festgestellt.

Gleich nachdem $1 \mu\text{l}$ appliziert wurde, nahm die Kontraktionskraft um $-10,06 \pm 2,61\%$ ab und erreichte sogar $-78,03 \pm 9,63\%$ nach der Endkonzentration.

Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche von PGU 193 HCl an der Arteria pulmonalis

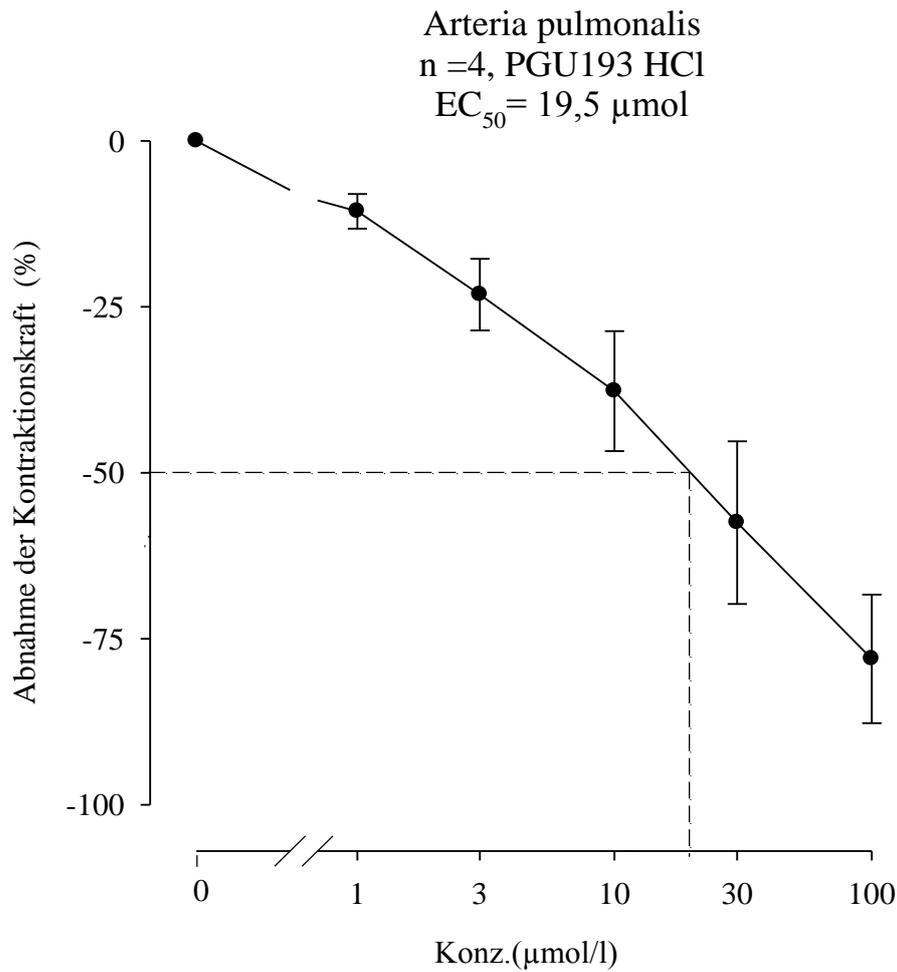
PGU 193 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,24 \pm 2,46$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$9,27 \pm 2,40$	$-10,06 \pm 2,61$	4	n.s.
3	$8,05 \pm 2,29$	$-23,16 \pm 5,38$	4	0,05
10	$6,76 \pm 2,26$	$-37,70 \pm 9,03$	4	0,01
30	$5,02 \pm 2,12$	$-57,5 \pm 12,24$	4	0,001
100	$2,10 \pm 1,20$	$-78,03 \pm 9,63$	4	0,001

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

f_c = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertest

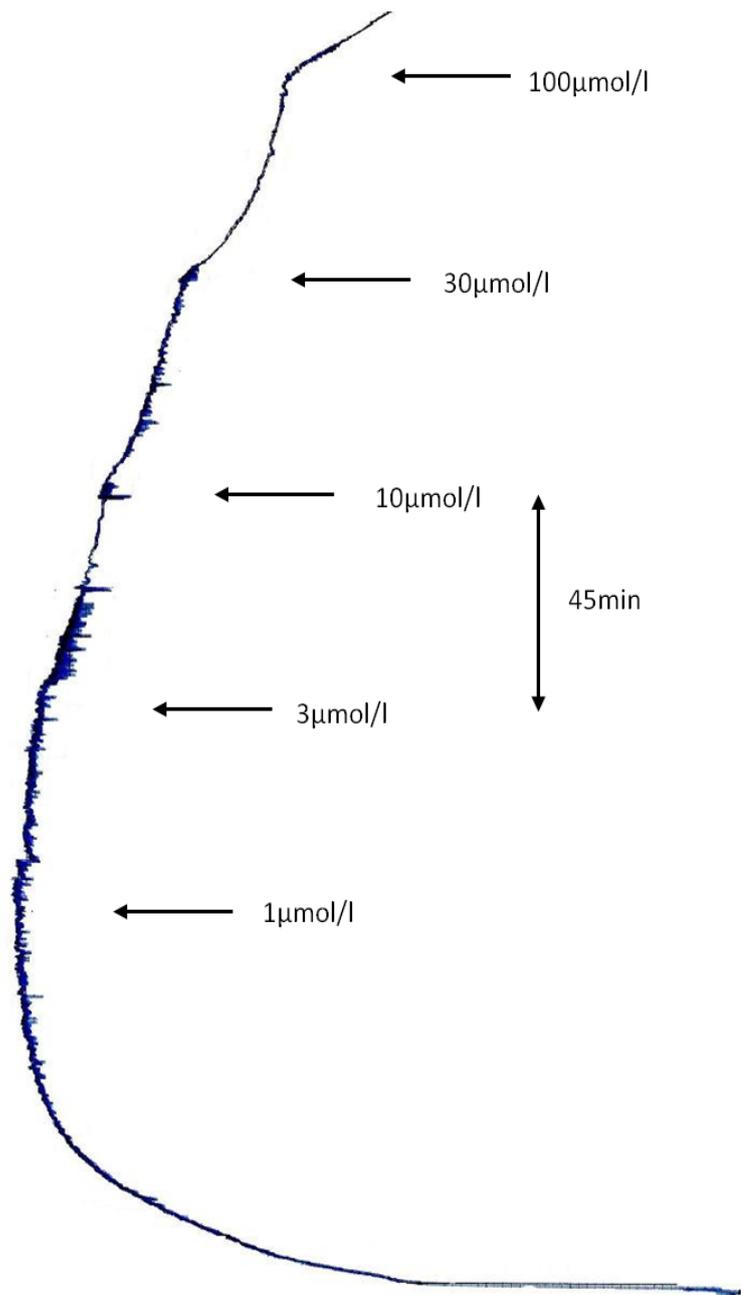
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 193 an der Arteria pulmonalis



Die x-Achse stellt wieder die verwendeten Konzentrationen in µmol/l dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken stellen den Standardfehler dar.

In der Abbildung 15 wird die vasodilatierende Wirkung von PGU 193 graphisch dargestellt. Ab 1mmol/l ist ein Effekt sichtbar und nimmt mit zunehmender Konzentration stetig zu. Ab 19,5 µmol/l wird der EC₅₀ Wert erreicht.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung von PGU 193 an der Arteria pulmonalis



Die Originalabbildung zeigt den am Schreiber aufgezeichneten Versuchsverlauf an der Lungenarterie. Durch Pfeile werden die Zeitpunkte der Injektionen von PGU 193 wiedergegeben.

3.1.3. Terminales Ileum

Die Messwerte von vier Versuchen wurden wieder arithmetisch gemittelt und die Kontraktionskraft von den unterschiedlichen Konzentrationen in mN und Prozent ausgerechnet. Der Kontrollwert vor der Substanzzugabe betrug $7,84 \pm 2,07$ mN, erreichte aber seinen Tiefpunkt von $3,51 \pm 1,05$ mN oder $-56,48 \pm 3,12\%$ nachdem die letzte Konzentration hinzugefügt wurde. PGU 193 zeigt somit einen definitiven spasmolytischen Effekt auf das terminale Ileum.

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche von PGU 193 HCl am Dünndarm

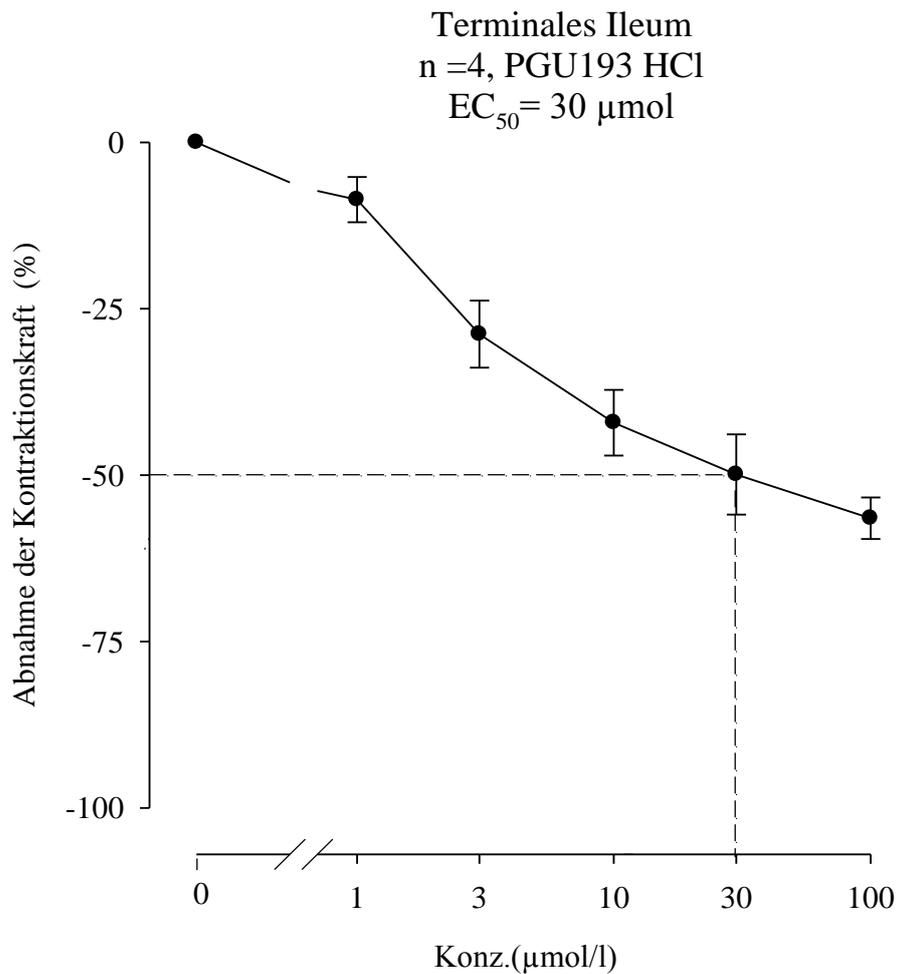
PGU 193 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$7,84 \pm 2,07$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$7,30 \pm 2,11$	$-8,62 \pm 3,40$	4	n.s.
3	$5,83 \pm 1,89$	$-28,82 \pm 5,03$	4	0,05
10	$4,72 \pm 1,53$	$-42,13 \pm 4,93$	4	0,01
30	$4,03 \pm 1,21$	$-49,91 \pm 6,01$	4	0,01
100	$3,51 \pm 1,05$	$-56,48 \pm 3,12$	4	0,01

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

f_c = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

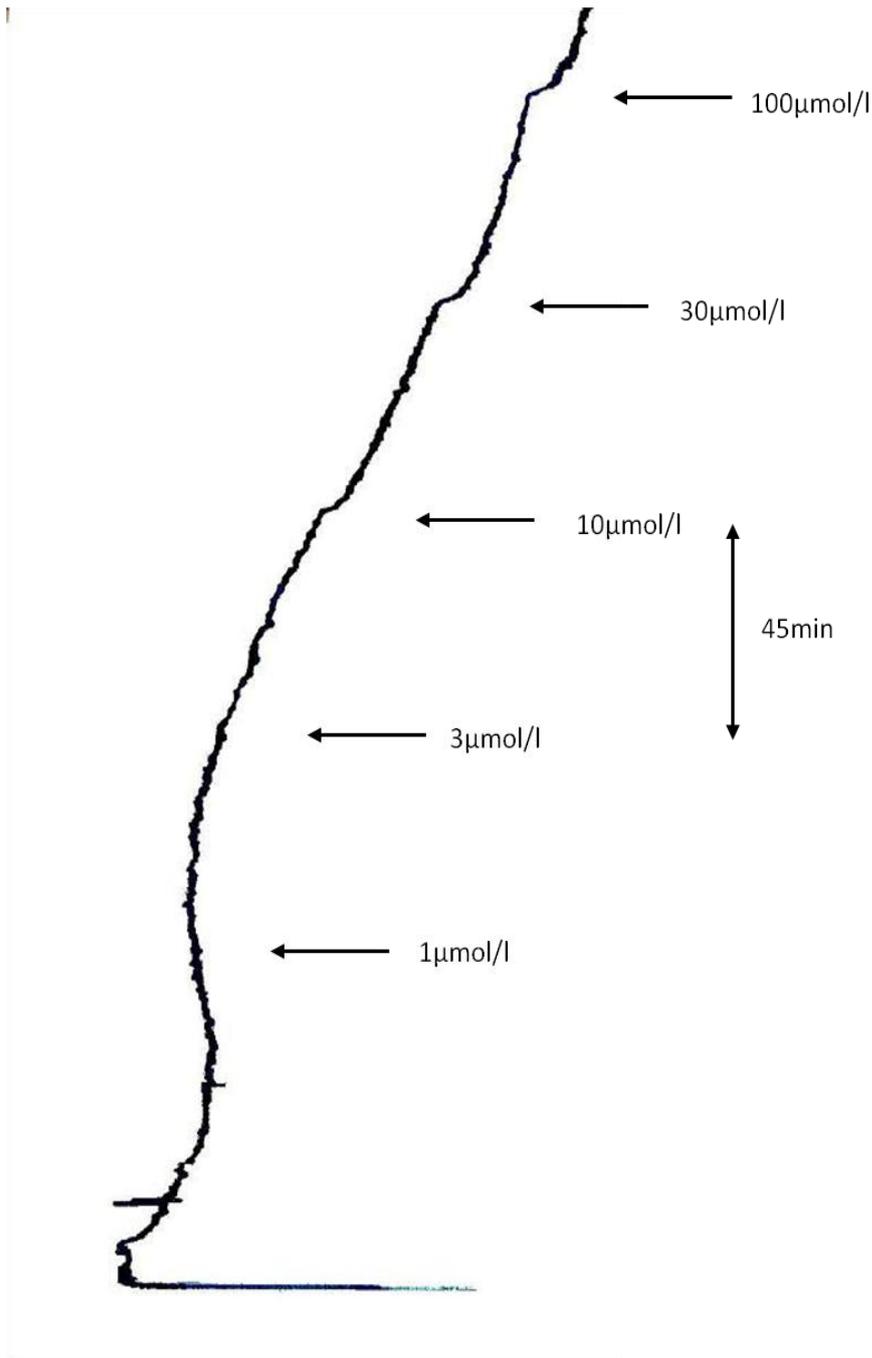
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 193 am terminalen Ileum



Die x-Achse stellt die verwendeten Konzentrationen in µmol/l dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken stellen den Standardfehler dar.

Die Abbildung 17 veranschaulicht den spasmolytischen Effekt von PGU 193 am terminalen Ileum in Abhängigkeit mit der Konzentration des PGU 193. Wieder konnte nach dem einzeichnen den strichlierten Linien ein EC₅₀ Wert von 30 µmol/l ermittelt werden.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung von PGU 193 an dem terminalen Ileum



Die Originalabbildung zeigt den am Schreiber aufgezeichneten Versuchsverlauf am Dünndarm. Durch Pfeile werden die Zeitpunkte der Injektionen von PGU 193 wiedergegeben.

3.1.4. Atrium cordis dexter

Für die Testung der chronotropen Wirkung von PGU 193 wurden fünf Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert betrug $191,00 \pm 5,79$ Schläge/Minute, nahm während der Substanzzugabe konstant ab und zwar bis zu $79,00 \pm 32,30$ Schläge/Minute, nachdem die Endkonzentration hinzugefügt wurde.

Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche von PGU 193 HCl auf den rechten Vorhof

PGU 193 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (x/min)	f \pm SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$191,00 \pm 5,79$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
1	$175,00 \pm 6,71$	$-8,32 \pm 2,72$	5	n.s.
3	$166,00 \pm 5,34$	$-12,91 \pm 2,89$	5	0,05
10	$150,00 \pm 4,18$	$-21,20 \pm 3,10$	5	0,05
30	$133,00 \pm 6,44$	$-30,09 \pm 4,13$	5	0,01
100	$79,00 \pm 32,30$	$-58,13 \pm 17,3$	5	0,01

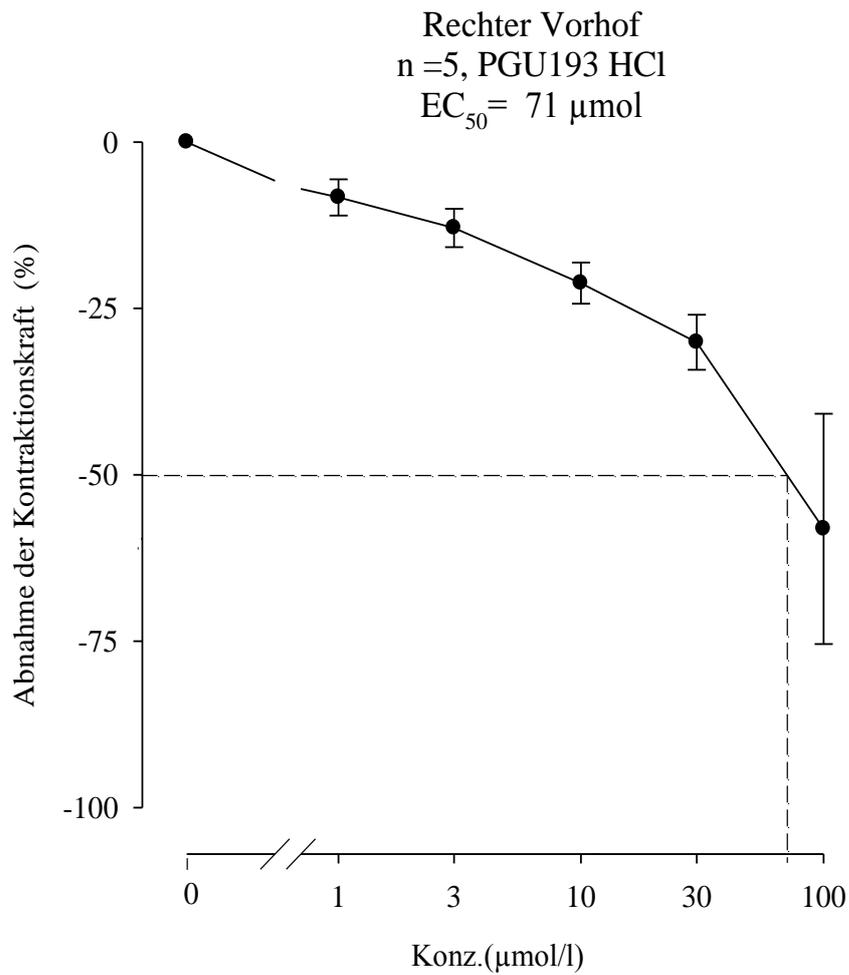
Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

f = Schlagfrequenz

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

x = Anzahl der Schläge

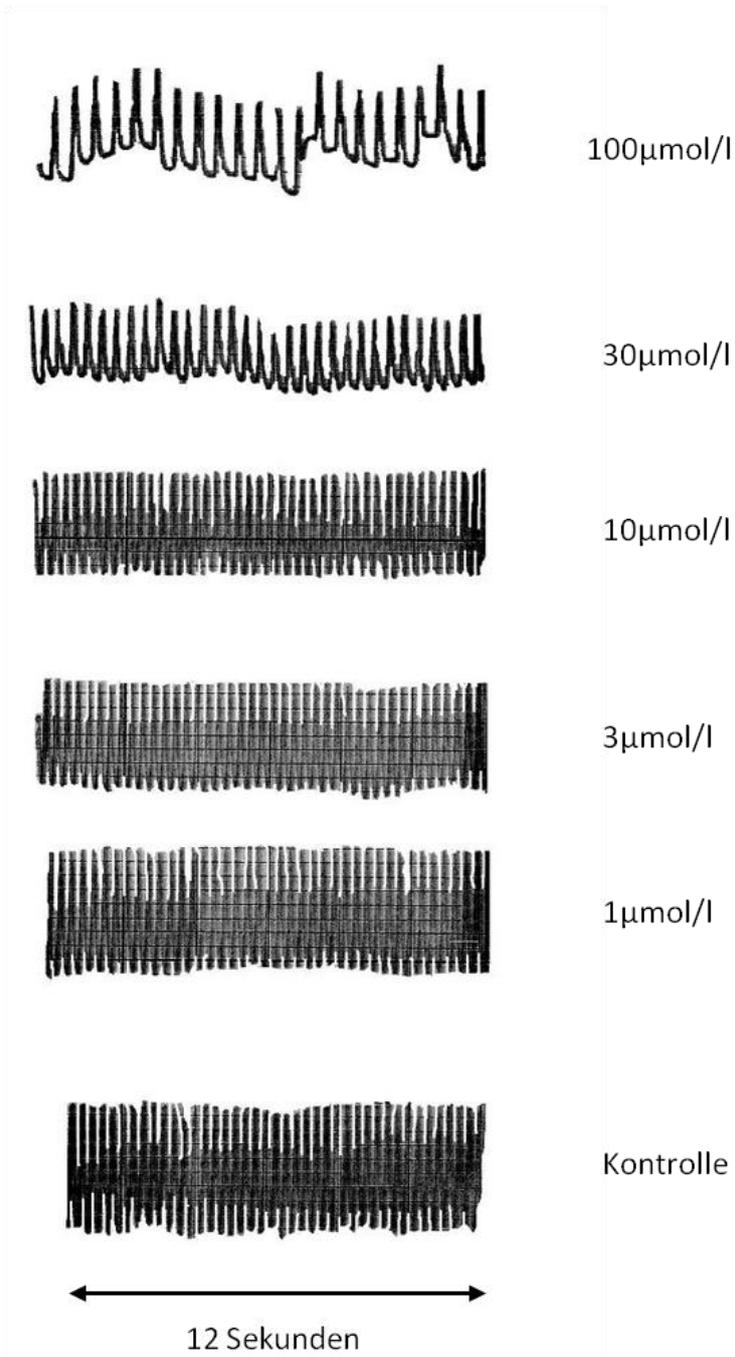
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 193 am Atrium cordis dexter



Die x-Achse stellt die verwendeten Konzentrationen in µmol/l dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken stellen den Standardfehler dar.

Die Abbildung 19 zeigt die Abnahme der Schlagfrequenz, durch das einwirken von PGU 193 graphisch dar. Erst ab 30 µmol/l ist ein stärkerer negativ chronotroper Effekt sichtbar und bei 71 µmol/l wird ein EC₅₀ Wert erreicht.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung von PGU 193 am Atrium cordis dexter



Die Originalaufzeichnung zeigt eine eindeutige negativ chronotrope Wirkung von PGU 193 auf den Sinusknoten. Am Schreiber wurden die Amplituden von 12 Sekunden registriert und dann mit dem Korrekturfaktor 5 multipliziert.

3.1.5. Musculus papillaris

An 4 isolierten Papillarmuskeln wurde die Wirkung von PGU 193 getestet. Ein Kontrollwert von $0,97 \pm 0,21$ mN wurde ermittelt. Nach den Substanzzugaben wurde eine Abnahme der Inotropie festgestellt und zwar bis zu $0,53 \pm 0,11$ mN, oder $-44,96 \pm 1,92\%$.

Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche von PGU 193 HCl am Papillarmuskel

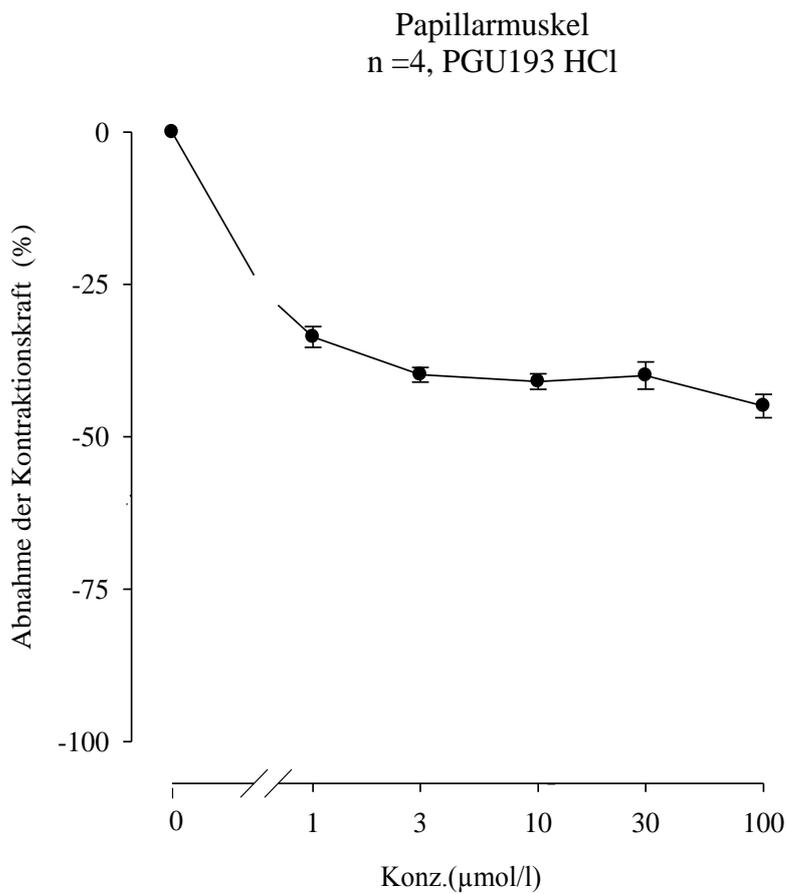
PGU 105 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$0,97 \pm 0,21$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$0,65 \pm 0,15$	$-33,62 \pm 1,71$	4	0,05
3	$0,58 \pm 0,13$	$-39,82 \pm 1,20$	4	0,01
10	$0,57 \pm 0,12$	$-40,94 \pm 1,26$	4	0,01
30	$0,58 \pm 0,13$	$-39,95 \pm 2,24$	4	0,01
100	$0,53 \pm 0,11$	$-44,96 \pm 1,92$	4	0,01

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

f_c = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwerts

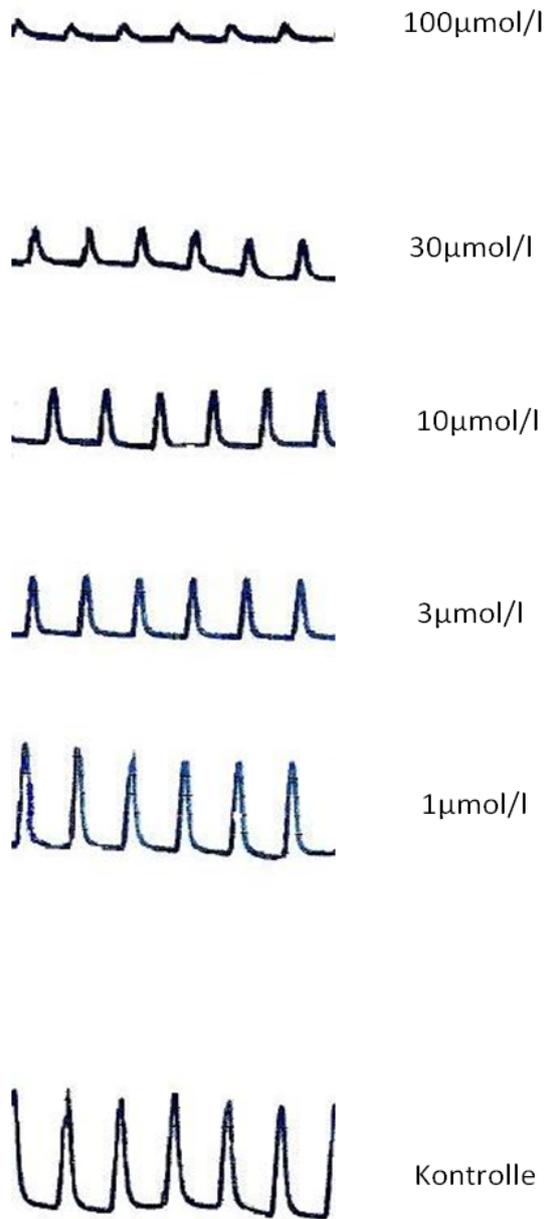
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 193 am Musculus papillaris



Die x-Achse stellt die verwendeten Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken stellen den Standardfehler dar.

Die Abbildung 21 zeigt, dass gleich nach der ersten Zugabe von PGU 193 es zu einer drastischen Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Die darauf folgenden Applikationen zeigten aber keine signifikante Wirkung mehr. Ein EC_{50} Wert wird knapp nicht erreicht.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung von PGU 193 am Musculus papillaris



Die Originalaufnahmen der am Schreiber registrierten Amplituden zeigen eine Abnahme der Kontraktionskraft mit den zugefügten Konzentrationen von PGU 193.

3.2. Untersuchung mit Nitro-L-Arginin

Die Untersuchung des Wirkmechanismus wurde an der Aorta durchgeführt. Die Präparation der Aorta, das Einspannen an der Apparatur 2, die maximale Kontraktion mit KCl, lief genau so wie im Kapiteln 2.6.3. und 2.8.3. beschrieben. Als das Organ eine Plateauphase erreichte, wurde die eNOS mit zwei verschiedenen Nitro-L-Arginin Konzentrationen blockiert. Nach 45 Minuten wurde das PGU 193 gespritzt und die Wirkung beobachtet.

3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin

Wie bereits im Kapitel 3.2. beschrieben erfolgte die Versuchsdurchführung. Die Kontraktionskraft betrug in der Kontrollphase $7,84 \pm 2,45$ mN. Nach dem Zusetzen von 30 µmol/l Nitro-L-Arginin veränderte sich die Kontraktionskraft kaum. Erst nach der Applikation von 30 µmol/l Substanz nahm die Kontraktionskraft ab und erreichte das tiefste Niveau bei $4,19 \pm 1,30$ mN.

Tabelle 8: PGU 193-Wirkung mit Nitro-L-Arginin vorbehandelter Aorta descendes

Nitro-L-Arginin (30µmol/l)	Fc ± SEM (mN)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	$7,84 \pm 2,45$	3	-
30	$7,78 \pm 2,68$	3	-
30 µmol/l PGU 193	$4,19 \pm 1,30$	3	n.s.

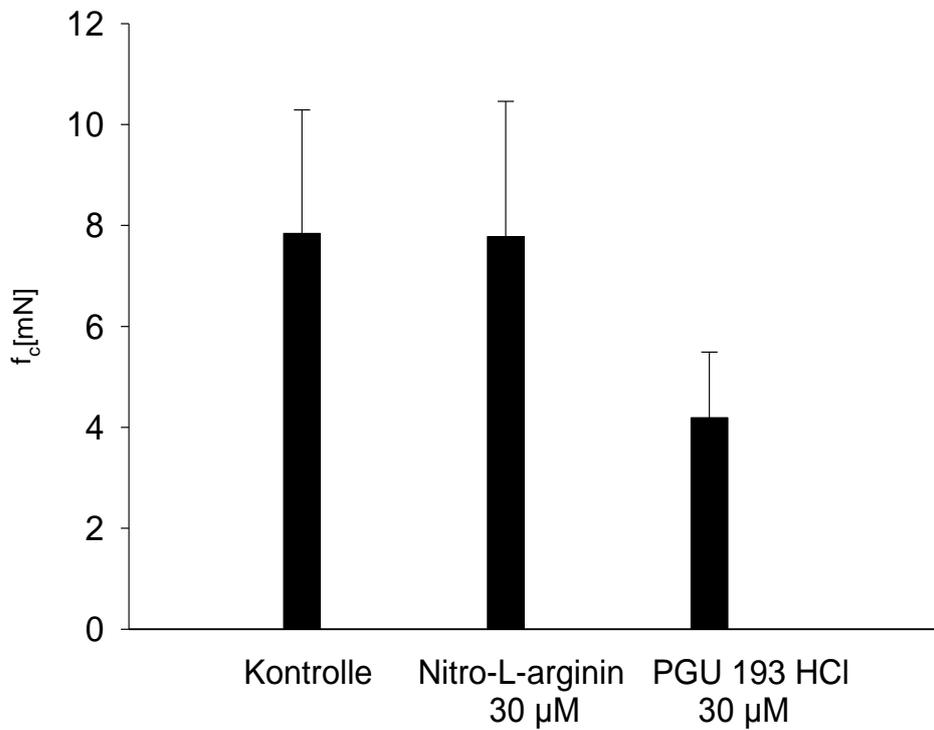
Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

Fc – Kontraktionskraft in mN

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 23: Balkendiagramm von PGU 193 an der Aorta descendes mit 30 μ l Nitro-L-Arginin

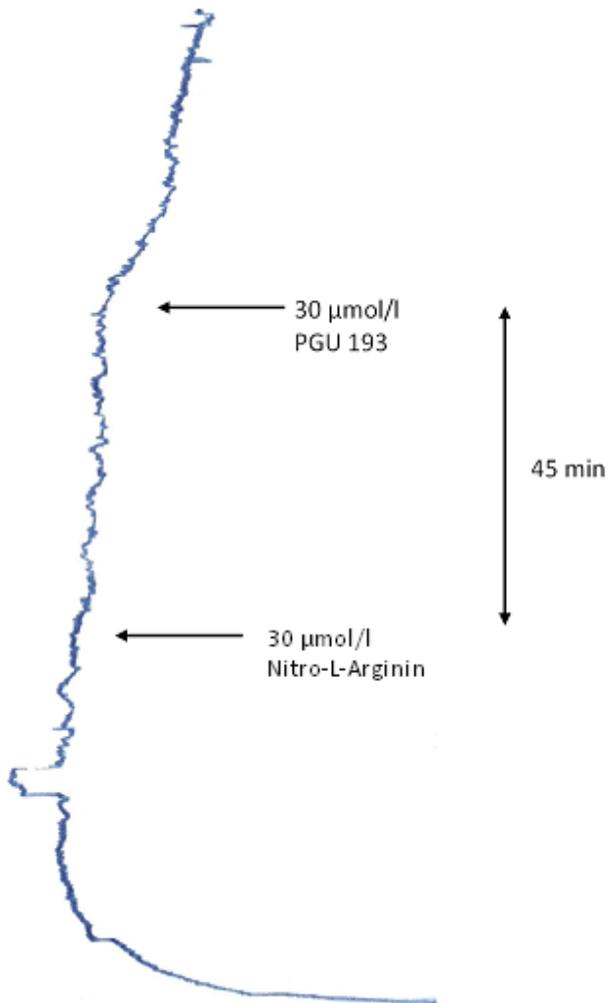
Aorta, Nitro-L-arginin
PGU 193 HCl, 30 μ mol/l
n=3



Die x-Achse im Balkendiagramm stellt die Konzentrationen in μ mol/l dar und die y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Die Mittelwerte aus den 3 Versuchen wurden mit den senkrechten Balken wiedergegeben, wobei die strichförmigen Verlängerungen die Standardfehler symbolisieren.

Das Diagramm zeigt dass nach dem Zusetzen von 30 μ mol/l Nitro-L-Arginin zu keiner Veränderung der Kontraktionskraft kommt.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung von PGU 193- Wirkung an der Aorta descendes unter Einwirkung von 30 μ l Nitro-L-Arginin



Die Originalabbildung zeigt den am Schreiber aufgezeichneten Versuchsverlauf an der Aorta unter der Einwirkung von 30 μ mol/l Nitro-L-Arginin und 30 μ mol/l Substanz. Durch Pfeile werden die Zeitpunkte der Injektionen von PGU 193 wiedergegeben.

3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin

In 3 Versuchsreihen wurde der Wirkmechanismus mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin getestet. Die Kontraktionskraft betrug in der Kontrollphase $7,87 \pm 1,94$ mN. Nach dem Zusetzen von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin veränderte sich die Kontraktionskraft wieder kaum. Erst nach der Applikation von 30 µmol/l Substanz nahm die Kontraktionskraft ab und erreichte das tiefste Niveau bei $5,20 \pm 1,39$ mN.

Tabelle 9: PGU 193-Wirkung mit Nitro-L-Arginin vorbehandelter Aorta descendes

Nitro-L-Arginin (30 µmol/l)	Fc ± SEM (mN)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	$7,87 \pm 1,94$	3	-
100	$7,77 \pm 1,90$	3	-
30 µmol/l PGU 193	$5,20 \pm 1,39$	3	n.s.

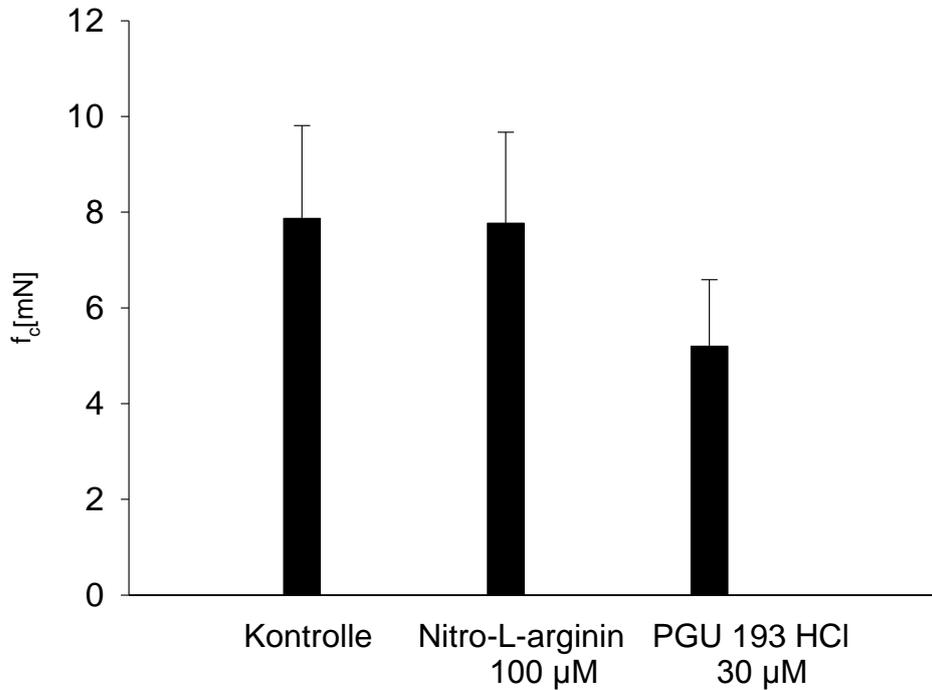
Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

Fc = Kontraktionskraft in mN

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 25: Balkendiagramm von PGU 193 an der Aorta descendes mit 100 μ l Nitro-L-Arginin

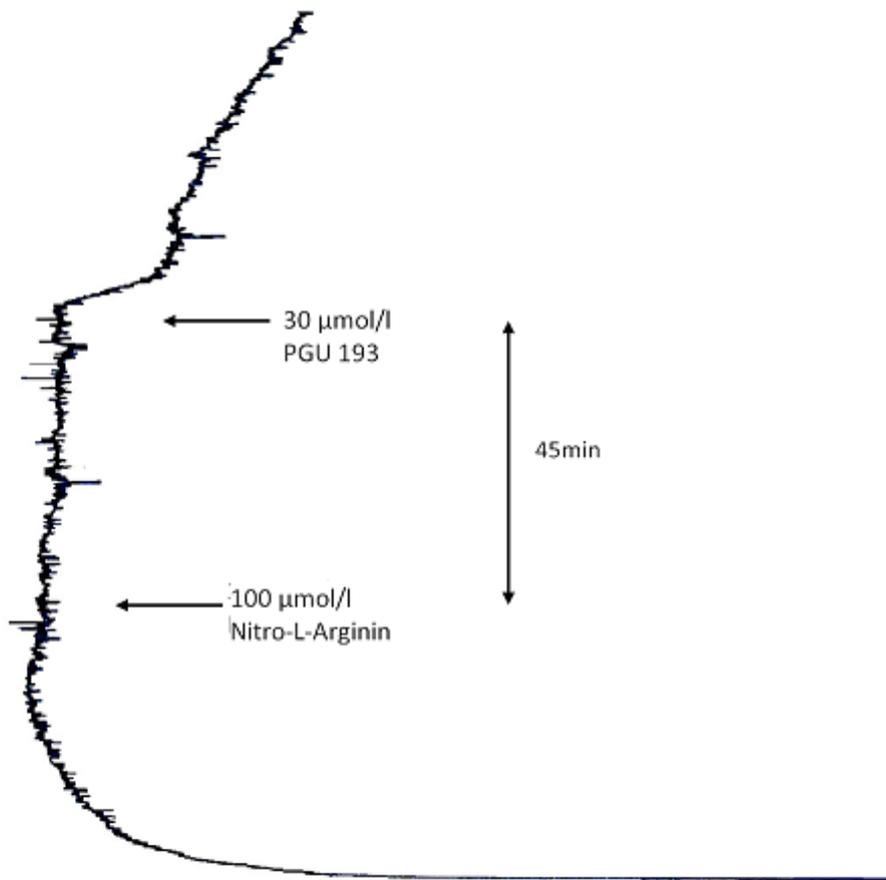
Aorta, Nitro-L-arginin
PGU 193 HCl, 30 μ mol/l
n=3



Die x-Achse im Balkendiagramm stellt wieder die jeweiligen Konzentrationen in μ mol/l dar und die y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Die Mittelwerte aus den 3 Versuchen sind mit den senkrechten Balken wiedergegeben, wobei die strichförmigen Verlängerungen die Standardfehler symbolisieren.

Das Diagramm sieht man das es auch nach dem Zusetzen von 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin zu keiner Veränderung der Kontraktionskraft kommt.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung von PGU 193- Wirkung ad der Aorta descendes unter Einwirkung von 100 μ l Nitro-L-Arginin



Die Originalabbildung zeigt den am Schreiber aufgezeichneten Versuchsverlauf an der Aorta unter der Einwirkung von 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin und 30 μ mol/l Substanz. Durch Pfeile werden die Zeitpunkte der Injektionen von PGU 193 wiedergegeben.

4. Diskussion

Im praktischen Teil der Diplomarbeit wurde die neusynthetisierte Substanz, die als PGU 193 bezeichnet wurde an 5 verschiedenen Organen von Meerschweinchen getestet.

Daraufhin folgte die Untersuchung des Wirkmechanismus mit dem Nitro-L-Arginin.

Die genaue Vorgangsweise der Präparation, als auch der Versuchsablauf wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln detailliert beschrieben.

Die Ergebnisse wurden ebenfalls im Kapitel 3 präsentiert und ausgewertet.

In diesem Kapitel werden die Wirkungen noch ausführlich diskutiert.

4.1. Versuchsreihen an der glatten Muskulatur

Die Aorta, Pulmonalarterie und das terminale Ileum mussten chemisch mit einer KCl-Lösung maximal vorkontrahiert werden. Die dafür benötigten Konzentrationen wurden experimentell ermittelt und betragen 60 mmol/l für den Darm und für die Aorta und die Arteria pulmonalis 90 mmol/l.

Nachdem es zu einem konstanten Kontraktionstonus kam, wurde die Substanz auf eine eventuell dilatierende oder spasmolytische Wirkung untersucht.

Organpräparat	PGU 193 HCl Fc ± SEM (%) bei 100µmol/l Endkonzentration	EC₅₀ (µmol/l)
Aorta	-84,66 ± 8,89	21
Arteria pulmonalis	-78,03 ± 9,63	19,5
Terminales Ileum	-56,48 ± 3,12	30

PGU 193 übte auf die Organe der glatten Muskulatur eine starke Wirkung aus. Ein EC₅₀ Wert wurde bei allen drei Organen erreicht, wobei den tiefsten Wert von 19,5 µmol/l die Pulmonalarterie aufwies.

Ein starker Effekt wurde bei der Aorta festgestellt. Der Kontrollwert vor der Zugabe der Substanz betrug 7,85 ± 1,52 mN (=100%). Bei jeder weiteren Applikation nahm die Kontraktionskraft stetig ab. Nachdem die Endkonzentration von 100 µmol/l erreicht wurde nahm die Kontraktionskraft der Aorta bis 1,24 ± 0,88 mN bzw. -84,66 ± 8,89% ab.

Eine ähnliche Wirkung hatte das PGU 193 auf die Pulmonalarterie. Die Kontraktionskraft nahm um 2,10 ± 1,20 mN bzw. um -78,03 ± 9,63% ab. Im Vergleich mit dem Kontrollwert, der 10,24 ± 2,46 mN (=100%) betrug, war die Wirkung deutlich erkennbar.

Eine etwas schwächere Wirkung, im Vergleich zur Aorta und zur Pulmonalarterie zeigte die Testsubstanz auf das terminale Ileum. Ein EC₅₀ Wert von 30 µmol/l wurde aber trotzdem erreicht. Es kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um -56,48 ± 3,12% bei einer Konzentration von 100 µmol/l.

4.2. Versuchsreihen an der quergestreiften Muskulatur

Die eventuell vorhandenen positiv oder negativ inotrope/chronotrope Wirkungen wurden an der quergestreiften Muskulatur vom Papillarmuskel und dem Vorhof getestet.

Organpräparat	PGU 193 HCl Fc ±SEM(%) bei 100µmol/l Endkonzentration	EC₅₀ (µmol/l)
Atrium dexter	-58,13±17,3	71
Muskulus papillaris	-44,96± 1,92	-

Der Vorhof musste als einziges Organ nicht extern gereizt werden aufgrund der autonomen Spontanaktivität des Sinusknotens. Als er anfang konstant zu schlagen wurde PGU 193 alle 45 Minuten hinzugefügt. Der Kontrollwert betrug $191,00 \pm 5,79$ Schläge pro Minute, wobei bei jeder weiteren Zugabe der Substanz die Zahl der Schläge konstant abnahm. Bei der Applikation von $30 \mu\text{l}$ PGU 193 sank die Zahl von $133,00 \pm 6,44$ auf $79,00 \pm 32,30$ Schläge pro Minute

Insgesamt nahm die Kontraktionskraft um $-58,13 \pm 17,3\%$ ab, womit man darauf schließen kann, dass es sich bei PGU 193 um eine negativ chronotrope Substanz handelt.

Der EC₅₀ Wert konnte auch ermittelt werden, war jedoch mit 71 µmol/l etwas höher als bei den glattmuskulären Organen.

Der Papillarmuskel wurde mit einer Elektrode gereizt und die Inotropie wurde dabei beobachtet.

Bereits bei der Zugabe von 1 µl PGU 193 nahm die Kontraktionskraft um $-33,615 \pm 1,71\%$ ab. Bei der Applikation von 2, 7, 30 µl änderte sich die Kontraktionskraft gering, blieb sogar gleich. Bei der Endkonzentration von 100 µmol/l nahm sie insgesamt um $-44,96 \pm 1,92\%$ ab. Die Substanz wirkt somit negativ chronotrop, doch ein EC₅₀ Wert wurde knapp nicht erreicht.

4.3. Versuche mit PGU 193 und Nitro-L-Arginin

In insgesamt 6 Versuchsreihen an der Aorta wurde der Wirkmechanismus mit zwei verschiedenen Nitro-L-Arginin Konzentrationen getestet.

Ziel der Versuche war es die eNOS mit dem Nitro-L-Arginin zu blockieren, die endothelial zu NO Freisetzung führt und somit zu Vasodilatation. Als PGU 193 hinzugefügt wurde konnte festgestellt werden, ob es zu einer weiteren signifikanten Vasodilatation kommt.

4.3.1. Versuch mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin

Nach der erreichten Plateauphase wurden 30 µmol/l Nitro-L-Arginin ins Organbad gespritzt. Nach 45 Minuten wurde dann 30 µmol/l Substanz hinzugefügt und die Wirkung beobachtet.

Der Kontrollwert betrug dabei $7,84 \pm 2,45$ m N. Nach dem spritzen von Nitro-L-Arginin änderte sich der Wert nur gering, doch nachdem das PGU 193 hinzugefügt wurde nahm die Kontraktionskraft bis $4,19 \pm 1,30$ mN ab.

4.3.2. Versuch mit 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin

In diesem Versuch wurde mit 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin die eNOS blockiert.

Die Ergebnisse unterscheiden sich nur gering als bei dem Versuch mit 30 μ mol/l Nitro-L-Arginin.

Die Kontrollwert betrug hierbei $7,87 \pm 1,94$ mN, änderte sich kaum nach der Applikation von 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin und nahm bis $5,20 \pm 1,39$ mN ab, nach dem die Substanz 45 Minuten eingewirkt hatte. Somit könnte eine Freisetzung von NO zumindest teilweise zum Wirkmechanismus von PGU 193 beitragen.

5. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurden die Wirkungen von PGU 193 an 5 isolierten Merschweinchenorganen erforscht. Dabei verwendete man: die Aorta, Pulmonalarterie, Papillarmuskel, Vorhof und den terminalen Ileum.

Nach den Versuchsbedingungen wurde das PGU 193 in 5 verschiedenen Konzentrationen getestet, nämlich in 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$.

An der Aorta, Pulmonalarterie und dem terminalem Ileum wurde untersucht wie die Substanz sich auf die Kontraktionskraft der Organe auswirkt. Über eine eventuelle positive oder negative inotrope Wirkung von PGU 193 wurde am Papillarmuskel geforscht. Beim Vorhof wiederum konnte man die Chronotropie beobachten.

Pro Organ wurden immer mindestens 4 Versuche gemacht.

Die Substanz zeigte auf die glattmuskulären Organe (Aorta, Pulmonalarterie, terminales Ileum) eine starke vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung. Bei allen drei Organen wurde der EC_{50} Wert erreicht (Aorta=21 $\mu\text{mol/l}$, Pulmonalarterie=19,5 $\mu\text{mol/l}$ und terminale Ileum 30 $\mu\text{mol/l}$).

Am Papillarmuskel wirkte die Substanz eindeutig negativ inotrop, doch der EC_{50} Wert wurde an diesem Organ knapp nicht erreicht.

Beim Vorhof wurden die Schläge pro Minute gezählt. Unter der Substanzzugabe nahm die Zahl konstant ab. Bei 71 $\mu\text{mol/l}$ wurde ein EC_{50} Wert erreicht.

Den Wirkmechanismus wurde in zweitem Teil der Diplomarbeit erforscht. Die Aorta wurde zuerst mit 2 verschiedenen Nitro-L-Arginin Konzentrationen (30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) vorbehandelt. Damit blockierte man das Enzym, das endothelial zur NO Freisetzung führt und infolgedessen zur Vasodilatation.

Die Wirkung von PGU 193 könnte somit teilweise durch eine Freisetzung zustande kommen.

6. Literaturverzeichnis

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

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

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

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196

Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ (2000) Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 47: 549-555

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

Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD (1997) Red wine, white wine, liquor, beer and risk for coronary artery disease hospitalization. *Am J Cardiol* 80: 416-420

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

Kundu JK, Surh YJ (1997) Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. *Mutat Res* 555: 65-80

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

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

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

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

Mertens-Talcott SU, Percival SS (2005) Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 218: 141-152

Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C (1999) Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old Darakchasava, an Ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol* 68: 71-76

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

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

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32: 1377-1382

7. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor- und Nachname: Lejla Imamovic
Geburtsdatum: 24. April 1984 in Tuzla (Bosnien und Herzegowina)
Staatsbürgerschaft: Bosnisch-herzegowinisch
Familienstand: ledig

Ausbildung

2006-2012 Studium der Pharmazie in Wien (Österreich)
2003-2006 Studium der Pharmazie in Sarajevo (Bosnien und Herzegowina)
1999-2003 Gymnasium in Zivinice (Bosnien und Herzegowina)
1996-1999 Volksschule in Zivinice (Bosnien und Herzegowina)
1992-1996 Volksschule in Luzern (Schweiz)
1991-1992 Volksschule in Zivinice (Bosnien und Herzegowina)