



DIPLOMARBEIT

„Pharmakologisches Profil eines disubstituierten
Imidazolderivats (PGU186 HCl) an isolierten
Meerschweinchenorganen“

Verfasserin
Kora Koch

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

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

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine ausgesprochen freundliche Betreuung, das hervorragende Arbeitsklima und die Hilfe bei der Realisierung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie bedanken.

Ebenso möchte ich dem Department für Medizinische / Pharmazeutische Chemie der Universität Wien, für die Bereitstellung der neu synthetisierten Testsubstanz meinen Dank aussprechen.

Weiters will ich meinen lieben Freunden danken, mit denen ich während dieses Lebensabschnittes viele wertvolle Erinnerungen teilen durfte – ich wünsche euch allen weiterhin viel Freude und Erfolg auf eurem Weg!

Ein großes Dankeschön gilt auch meinem Freund, der mich auf dieser Reise begleitet und motiviert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir ermöglicht hat, diesen Weg im Leben gehen zu dürfen, stets großes Interesse für mein Studium gezeigt hat und mich in vielerlei Hinsicht unterstützt hat.

Und mein tiefster Dank gilt meinem lieben Vater, der mir immer besonderen Halt gegeben hat und von dem ich in dieser Zeit, auch neben meinem Studium, viel Wertvolles lernen durfte.

1. ZIEL DER DIPLOMARBEIT	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. <i>DIE LEITSUBSTANZ RESVERATROL</i>	2
2.1.1. NATURSTOFF RESVERATROL UND SEINE BIOLOGISCHE FUNKTION	2
2.1.2. STRUKTUR.....	3
2.1.3. BIOSYNTHESE.....	3
2.1.4. VORKOMMEN	5
2.1.5. WIRKUNGEN.....	6
2.1.6. PHARMAKOKINETIK.....	8
2.2. <i>MUSKELGEWEBE</i>	9
3. MATERIAL UND METHODIK	11
3.1. <i>DIE TESTSUBSTANZ PGU186 HCl</i>	11
3.2. <i>VERSUCHSTIERE</i>	12
3.3. <i>ISOLIERUNG UND PRÄPARATION DER ORGANE</i>	13
3.3.1. ARTERIA PULMONALIS.....	14
3.3.2. ATRIUM CORDIS DEXTRUM	15
3.3.3. MUSCULUS PAPILLARIS.....	15
3.3.4. AORTA DESCENDENS	16
3.3.5. ILEUM TERMINALIS.....	16
3.4. <i>PHYSIOLOGISCHE NÄHRLÖSUNGEN</i>	17
3.4.1. NÄHRLÖSUNG FÜR ATRIUM CORDIS DEXTRUM, MUSCULUS PAPILLARIS, ILEUM TERMINALIS UND ARTERIA PULMONALIS	18
3.4.2. NÄHRLÖSUNG FÜR AORTA DESCENDENS.....	19
3.5. <i>VERSUCHSANORDNUNGEN</i>	20
3.5.1. VERSUCHSAPPARATUR A	21
3.5.2. VERSUCHSAPPARATUR B	23
3.5.3. GASVERSORGUNG.....	24
3.5.4. KRAFTWANDLER.....	25
3.5.5. REIZUNG DES MUSCULUS PAPILLARIS	26
3.6. <i>VERSUCHSABLAUF ZUR UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG</i>	27
3.6.1. BEREITUNG DER STAMMLÖSUNGEN.....	29
3.6.1.1. STAMMLÖSUNGEN DER TESTSUBSTANZ.....	29
3.6.1.2. STAMMLÖSUNGEN VON NITRO-L-ARGININ.....	29
3.6.2. KALIUMCHLORID-LÖSUNG ZUR VORKONTRAKTION.....	30
3.6.3. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON ARTERIA PULMONALIS	31
3.6.4. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON AORTA DESCENDENS	32
3.6.5. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON ILEUM TERMINALIS	33
3.6.6. VERSUCHSABLAUF AN ORGANPRÄPARATEN VON ATRIUM CORDIS DEXTRUM ..	34
3.6.7. VERSUCHSABLAUF AN ORGANPRÄPARATEN VON MUSCULUS PAPILLARIS	35
3.7. <i>VERSUCHSABLAUF ZUR UNTERSUCHUNG DES MÖGLICHEN WIRKMECHANISMUS</i>	37
3.7.1. NITRO-L-ARGININ.....	37
3.7.2. VERSUCHSABLAUF AN AORTA DESCENDENS, ARTERIA PULMONALIS UND ILEUM TERMINALIS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ.....	39
3.8. <i>AUSWERTUNGEN DER VERSUCHSREIHEN</i>	39
3.8.1. ATRIUM CORDIS DEXTRUM	40
3.8.2. MUSCULUS PAPILLARIS.....	41
3.8.3. AORTA DESCENDENS, ARTERIA PULMONALIS UND ILEUM TERMINALIS	41

4. ERGEBNISSE	43
4.1. <i>ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG DER TESTSUBSTANZ PGU186 HCl.....</i>	<i>43</i>
4.1.1. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DER ARTERIA PULMONALIS	43
4.1.2. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DER AORTA DESCENDENS	47
4.1.3. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DES ILEUM TERMINALIS.....	50
4.1.4. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE SCHLAGFREQUENZ DES ATRIUM CORDIS DEXTRUM	53
4.1.5. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DES MUSCULUS PAPILLARIS.....	56
4.2. <i>ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG DES WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl</i>	<i>59</i>
4.2.1. WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl AN ISOLIERTEN ORGANPRÄPARATEN DER AORTA DESCENDENS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ	62
4.2.2. WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl AN ISOLIERTEN ORGANPRÄPARATEN DES ILEUM TERMINALIS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ	65
5. DISKUSSION.....	68
5.1. <i>WIRKUNG AUF GLATTMUSKULÄRE ORGANE.....</i>	<i>68</i>
5.1.1. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DER ARTERIA PULMONALIS	69
5.1.2. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DER AORTA DESCENDENS.....	69
5.1.3. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DES ILEUM TERMINALIS.....	70
5.2. <i>WIRKUNG AUF DIE HERZMUSKULATUR.....</i>	<i>70</i>
5.3. <i>WIRKUNG VON PGU186 HCl UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ</i>	<i>71</i>
6. ZUSAMMENFASSUNG	74
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	76
8. CURRICULUM VITAE	79

1. ZIEL DER DIPLOMARBEIT

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit ist es, die Substanz PGU186 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen auf ihre biologische Aktivität hin zu testen. Die getestete Substanz wurde 2010/2011 am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien neu synthetisiert. Als Leitsubstanz diente der Naturstoff Resveratrol.

Die unterschiedlichen Wirkungen der Substanz PGU186 HCl wurden in mehreren Versuchsreihen anhand von spezifischen isolierten Organen untersucht:

An den Herzmuskelpräparaten, welche quergestreifte Muskulatur aufweisen, wurden einerseits die Chronotropie am rechten Vorhof und andererseits die Inotropie am Papillarmuskel überprüft.

Weitere Versuche galten glattmuskulären Organpräparaten. Man untersuchte die vasodilatierende Wirkung an Aorta und Pulmonalarterie und die spasmolytische Wirkung an Präparaten des terminalen Ileum. Die protokollierten und ausgewerteten Testergebnisse werden in dieser Diplomarbeit dargelegt.

2. EINLEITUNG

Um den Inhalt dieser Diplomarbeit besser vermitteln zu können, werden in diesem Kapitel die natürliche Muttersubstanz der neu synthetisierten Substanz PGU186 HCl und die getestete Substanz selbst vorgestellt. Weiters findet sich ein kurzer Überblick über die drei unterschiedlichen Muskelgewebe der Vertebraten, welche eine wichtige Rolle bei den Versuchsreihen eingenommen haben.

2.1. DIE LEITSUBSTANZ RESVERATROL

2.1.1. NATURSTOFF RESVERATROL UND SEINE BIOLOGISCHE FUNKTION

Resveratrol ist ein Naturstoff und zählt zu den sekundären Pflanzenstoffen, und zwar zur Gruppe der Flavonoide. Sekundärstoffe sind nicht unmittelbar am Energie- und Baustoffwechsel beteiligt, sie sind also für die Pflanzen nicht lebensnotwendig. Jedoch können sie ihrem Produzenten in seiner Umwelt oft beträchtliche Überlebensvorteile verschaffen.

Strukturell gesehen gehört Resveratrol zu den Polyphenolen und wirkt biologisch, als Bestandteil des pflanzeigenen Immunsystems, als Phytoalexin. Somit weist es antibiotische und auch fungizide Wirkung auf.

Jenen Pflanzen, die dazu befähigt sind, Resveratrol zu synthetisieren, dient es also als Abwehrstoff. Resveratrol kann somit als sogenannter Stressmetabolit bezeichnet werden und wird vor allem dann von Pflanzen gebildet, wenn diese extremen Umwelteinflüssen, wie z.B. längere Trockenperioden, Pilzinfektionen oder erhöhte UV-Strahlung, ausgesetzt sind (Teuscher et al. 2004, Celotti et al. 1996).

2.1.2. STRUKTUR

Resveratrol ist das bekannteste Mitglied einer Gruppe von Naturstoffen, die als Stilbene zusammengefasst werden.

Chemisch gesehen ist Resveratrol ein trans-3, 5, 4'-Trihydroxystilben. Seine Molekularstruktur besteht also aus einem Stilben-Grundkörper, bei welchem die zwei Phenylreste trans-ständig zueinander stehen. An einem dieser zwei Phenylreste sind zwei, am anderen nur eine Hydroxylgruppe substituiert. Somit zählt Resveratrol zu den Polyphenolen.

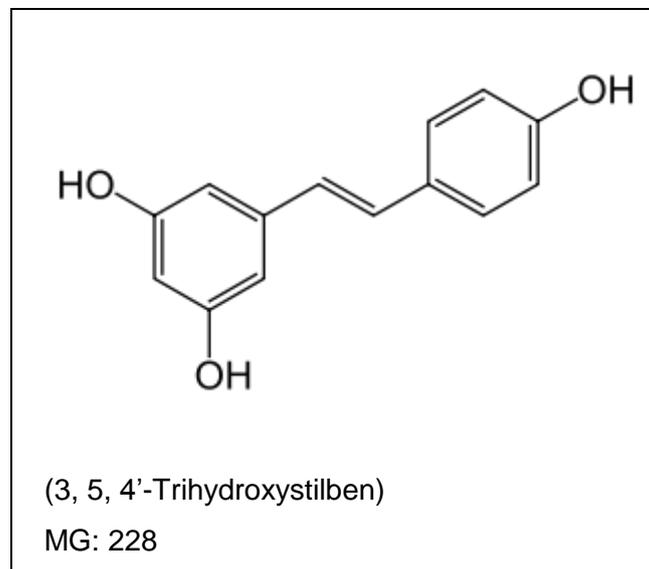


Abbildung 1: Strukturformel, Nomenklatur und Molekulargewicht von Resveratrol

2.1.3. BIOSYNTHESE

Um Resveratrol synthetisieren zu können, benötigt eine Pflanze die Resveratrolsynthase. Dieses Schlüsselenzym ist eine Stilbensynthase und kommt nicht in allen Pflanzen vor, weshalb Resveratrol nicht von allen Pflanzen gebildet werden kann.

Die Biosynthese erfolgt dann über den Shikimisäure-Weg. Es handelt sich also um den Biogeneseweg von Phenylpropankörpern, ausgehend von einer Reaktion von D-Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat. Nach mehreren Reaktionsschritten entsteht folglich die proteinogene Aminosäure Phenylalanin, welche von jeder Pflanze natürlich synthetisiert werden kann. Um daraus Resveratrol zu bilden, desaminiert die Pflanze Phenylalanin mit dem Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase und führt es somit in die trans-Zimtsäure über. Diese wird dann enzymatisch hydroxyliert, wodurch die p-Cumarsäure entsteht. Es folgen drei Kondensationsreaktionen mit Hilfe der zwei Enzyme 4-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA. Diese sind in allen Pflanzen vorhanden. Das dabei entstandene Tetraketid wird nun durch die Resveratrolsynthase umgesetzt, indem die terminale Carboxylgruppe als CO₂ abgepalten wird und so ein zweiter aromatischer Ring in der Verbindung gebildet wird. Dadurch entsteht Resveratrol als Endprodukt (Teuscher et al 2004; Schröder et al. 1988).

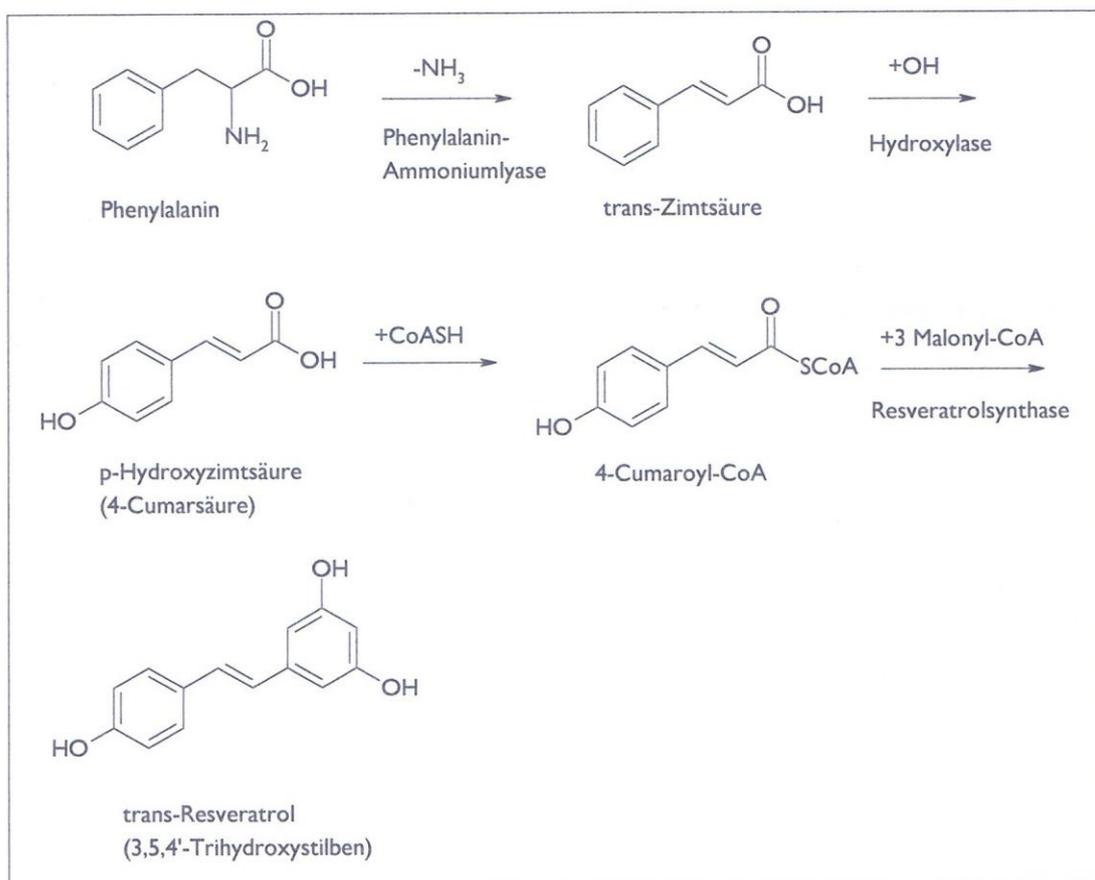


Abbildung 2: Biosynthese von Resveratrol

2.1.4. VORKOMMEN

Resveratrol wurde in mehr als 70 Pflanzenarten nachgewiesen, u.a in der Himbeere (*Rubus idaeae*), in der Pflaume (*Prunus*-Arten), in Eukalyptus (*Eukalyptus*-Arten) und in der Fichte (*Picea*-Arten).

Die wichtigste Pflanze, die in diesem Rahmen jedoch zu nennen ist, ist die Weinrebe, *Vitis vinifera*, aus der Familie der *Vitaceae*, welche der Weinproduktion dient. Resveratrol konnte hier sowohl in der Wurzel als auch in der Rebe, den Stielen und in den Samen, also den Traubenkernen, dieser Pflanze nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration an Resveratrol wurde jedoch in der Schale der Frucht, der roten Weinrebe, gefunden (Celotti et al.1996). Frische Weintraubenschalen weisen einen Resveratrolgehalt von 50 bis 100 µg/g auf. Der Gehalt dieses interessanten Polyphenols in Rotwein liegt bei 1,5 bis 3 mg/l (Jang et al. 1997).

Als es in den neunziger Jahren als Bestandteil der Polyphenol-Fraktion des Rotweins entdeckt wurde, erweckte Resveratrol große Aufmerksamkeit (Soleas et al. 1997). Man ist dadurch der Aufklärung des „Französischen Paradoxon“ einen Schritt näher gekommen. Dieses ist Gegenstand von geographischen Korrelationsstudien und befasst sich mit der Beobachtung, dass bei der französischen Bevölkerung trotz eines hohen Verzehrs von fett- und cholesterinreicher Nahrung und trotz hohen Tabakgenusses die Herzinfarktrate signifikant niedriger ist als in vergleichbaren Ländern (Hänsel und Sticher 2010).

Die Frage nach den Schutzfaktoren ist bis heute nicht eindeutig gelöst. Eine Hypothese galt jedoch dem regelmäßigen Rotweinkonsum. Es stellte sich heraus, dass nicht der Alkoholgehalt die alleinige Erklärung für diese Tatsache war, sondern vielmehr die im Rotwein enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffe, insbesondere den oligomeren Proanthocyanidinen, den Flavonolen (Quercetin) und dem Resveratrol (Hänsel und Sticher 2010).

Die Höhe des Resveratrolgehalts im Produkt ist vor allem auch vom Herstellungsprozess abhängig, und zwar hauptsächlich von der Dauer der Hülsenextraktion. Deshalb finden sich im Weißwein und im Traubensaft deutlich geringere Resveratrolkonzentrationen, weil hier der Fermentationsprozess der Schalen von weitaus kürzerer Dauer ist (Schmandke 2002).

2.1.5. WIRKUNGEN

Resveratrol stärkt also die Abwehr und zeigt diese Wirkung sowohl in der Pflanze als auch im menschlichen Körper. Zahlreiche Naturwissenschaftler haben sich mit diesem Thema auseinandergesetzt und Studien über die unterschiedlichen Eigenschaften von Resveratrol veröffentlicht. Die zwei wohl bedeutendsten Wirkungen von Resveratrol sind dessen antioxidativen und vasodilatierenden Eigenschaften.

In diesem Unterkapitel wird nun auf die - meiner Meinung nach wichtigsten und interessantesten - Forschungsergebnisse eingegangen.

Zum Ersten zeigten in vitro-Studien die antioxidative Wirkung und den Einfluss von Resveratrol auf den Fettstoffwechsel. Es wurde gezeigt, dass die im Rotwein enthaltenen phenolischen Substanzen die kupferkatalysierte Oxidation von LDL (low density lipoprotein) weitaus stärker hemmt als α -Tocopherol (Vitamin E) (Frankel et al. 1993). Resveratrol kann mit Kupfer Chelatkomplexe bilden, wodurch die LDL-Peroxidation vermindert wird. Dies führt zu einem verminderten Risiko der Plaquebildung in arteriellen Blutgefäßen und folglich wird auch das Risiko, an Arteriosklerose zu erkranken, herabgesetzt, wodurch natürlich auch die Wahrscheinlichkeit beispielsweise eines Myokardinfarkts oder eines Schlaganfalles deutlich verringert wird.

Weiters fungiert Resveratrol auch als Radikalfänger. Durch diese Erkenntnisse bestand die Annahme zweier unterschiedlicher Interaktionswege von Resveratrol mit den Plasmaproteinen: einerseits reichert sich Resveratrol in den Plasmalipoproteinen an, und zwar am meisten in jenen mit dem höchsten Fettgehalt, den VLDL (very low density lipoproteins), weil Resveratrol selbst einen lipophilen Charakter hat, andererseits wird dem hydrophilen Teil des Resveratrols die Radikalfängeraktivität zugesprochen, wodurch es imstande ist, Radikale abzufangen, noch bevor diese PUFA (mehrfach ungesättigte Fettsäuren) und die Membranen attackieren können (Belguendouz et al 1998).

Den Einfluss von Resveratrol auf den Fettstoffwechsel zeigten auch weitere Studien anhand von Versuchen an Ratten. Die durch Resveratrol bedingte Senkung der Serumtriglyceride, des VLDL- und des LDL-Spiegels wurde darauf zurückgeführt, dass Resveratrol die Squalenmonooxidase hemmt, ein wichtiges Enzym in der Cholesterinbiosynthese (Laden und Porter 2001).

Darüber hinaus wurde anhand von Versuchen an Zellkulturen gezeigt, dass Resveratrol die antioxidative Wirkung des intrazellulären Radikalfängers Glutathion steigert. Folglich konnte Resveratrol eine neuroprotektive Wirkung bei beta-Amyloid-Peptid-induzierter Neurotoxizität zugeschrieben werden. Demzufolge kann angenommen werden, dass bei moderatem Rotweinkonsum das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, signifikant verringert wird (Savaskan et al. 2003).

Resveratrol besitzt die weitere positive Eigenschaft der Stärkung von Herz- und Kreislauffunktionen. Dies ist neben der antioxidativen Wirkung auch auf vasodilatierende Effekte und der Beeinflussung der Blutgerinnung zurückzuführen. Der Naturstoff beeinflusst nämlich den Arachidonsäurestoffwechsel, indem es die Prostaglandinsynthese stimuliert. Ferner hemmt Resveratrol einerseits die Thrombozytensynthese und andererseits sowohl die durch Thrombin als auch die durch Adenosindiphosphat (ADP) induzierte Thrombozytenaggregation (Hänsel und Sticher 2010).

Da Resveratrol aufgrund seines Stilbengrundkörpers räumlich in den Östrogenrezeptor passt, wirkt es auch als Phytoöstrogen. Somit kann es beispielsweise an einer Senkung des Cholesterinspiegels mitbeteiligt sein und zeigt auch Vorteile bei der Behandlung von Osteoporose. Es wurde jedoch festgestellt, dass es nicht nur agonistische, sondern auch antagonistische Eigenschaften am α - und β -Estrogen-Rezeptor besitzt (Gehm et al. 1997, Bowers et al. 2000).

Darüber hinaus ist außerdem die blutdrucksenkende Wirkung über eine durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Gefäßerweiterung zu erwähnen (Hänsel und Sticher 2010). Es wurden Studien an isolierten Aortapräparaten durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass Resveratrol sowohl die Expression der NO-Synthase steigerte als auch diese zusätzlich zur vermehrten NO-Synthase bewegte, was zu einer Vasodilatation führt (Wallerath et al. 2002).

Resveratrol steht weiterhin aufgrund seiner antimutagenen und anticancerogenen Aktivitäten im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. Die erste diesbezügliche Studie wurde 1997 veröffentlicht. Tierversuche an Mäusen bewiesen, dass das Phytoalexin in allen drei Phasen des Krebsverlaufes - also der Initiationsphase, der Promotionsphase und der Progressionsphase - eingreift. Vor allem weckte das Polyphenol mit seinen antioxidativen Eigenschaften Interesse, weil durch die

Fähigkeit, freie Radikale abzufangen, die Initiationsphase von Tumoren inhibiert werden kann (Jang et al. 1997).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Resveratrol ein bemerkenswerter Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase und der DNA-Synthese in Säugetierzellen ist, wodurch eine weitere Anwendung als antiproliferierendes Mittel gegen Krebs beim Menschen möglich wäre (Fontcave et al. 1998).

Spätere Forschungen ergaben, dass die durch Resveratrol induzierte Apoptose über einen allgemeinen Mechanismus in allen Zellen mit Mitochondrien/Caspase-9-spezifischen Signalweg abläuft (Dörrie et al. 2001).

Das Polyphenol weist weiters auch antiinflammatorische Wirkung auf, was auf seine Aktivität als Inhibitor der Cyclooxygenase-1 (COX-1) zurückzuführen ist (Szewczuk et al. 2004).

Da Resveratrol zur Gruppe der Phytoalexinen gehört, wirkt es auch fungizid. Dies ist vor allem für die Agrarkultur von Interesse, da über Resveratrol eine erhöhte Pilzresistenz von Pflanzen erreicht werden könnte, was z.B. den Anbau von Weinreben oder Tabak ertragreicher machen sollte (Soleas et al. 1997, Hipskind, und Paiva 2000, Becker et al. 2003).

2.1.6. PHARMAKOKINETIK

In einigen Studien wurden der Metabolismus von Resveratrol *in vitro* und *in vivo* untersucht. Man erkannte, dass Resveratrol eine orale Bioverfügbarkeit von 70% und eine Plasmahalbwertszeit von ca. 9 Stunden aufweist. Resveratrol wird im Körper zum Großteil rasch metabolisiert. Da es sich, wie zuvor schon erwähnt, um eine sehr lipophile Substanz handelt, wird es vor allem durch Konjugation mit Glucuronsäure bzw. Schwefelsäure *in vivo* zu einer hydrophileren Substanz umgewandelt, die folglich vor allem renal ausgeschieden werden kann. Die zwei Hauptmetaboliten, trans-Resveratrol-3-O-glucuronid und trans-Resveratrol-3-O-sulfat, können demnach im Urin und auch im Blutserum nachgewiesen werden. Nicht metabolisiertes Resveratrol zeigt vor allem Interaktion mit dem Plasmaprotein Albumin (Yu et al. 2002, Walle et al. 2004, Jannin et al. 2004).

Im Jahr 2000 wurde gezeigt, dass Resveratrol das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 inaktiviert, was bei klinischer Anwendung von Bedeutung ist, weil es somit zu starken Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen kommen kann (Chan et al. 2000).

2.2. MUSKELGEWEBE

Muskelgewebe zählt neben dem Epithelgewebe, dem Binde- und Stützgewebe und dem Nervengewebe zu den vier Grundgeweben der Vertebraten. Man unterscheidet hier drei unterschiedliche Muskeltypen, nämlich die Skelettmuskulatur, die Herzmuskulatur und die glatte Muskulatur.

Muskelgewebe ist aus langen, erregbaren Zellen aufgebaut, die zu einer beträchtlichen Kontraktion befähigt sind. Im Cytoplasma der Muskelzellen befinden sich zahlreiche Myofibrillen. Diese sind aus dicken Proteinfasern aufgebaut, den sogenannten Sarkomeren, welche sich wiederum aus zahlreichen, parallel angeordneten, kontraktilen Actin- und Myosinfilamenten zusammensetzen.

Wenn ein Nervenimpuls über den Neurotransmitter Acetylcholin (Ach) eine Muskelkontraktion bewirkt, wird zunächst ein Aktionspotenzial entlang der Plasmamembran der Muskelzelle ausgelöst. Folglich werden Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum (SR) abgegeben. Diese lösen daraufhin durch Bindung an spezifische Bindungsstellen innerhalb der Muskelfasern eine Verschiebung der Actin- und Myosinfilamente ineinander aus, wodurch es zu einer Verkürzung des jeweiligen Sarkomeres kommt - und somit zu einer Muskelkontraktion. Adenosintriphosphat (ATP) liefert zu diesem aktiven Vorgang der Kontraktion die benötigte Energie. Die darauffolgende Relaxation des Muskels erfolgt passiv, sobald der Nervenimpuls unterbrochen wird.

Die Skelettmuskulatur wird auch als quergestreifte Muskulatur bezeichnet, da die parallele Anordnung der Myofibrillen den Zellen bei mikroskopischer Ansicht ein quer gestreiftes Muster verleiht. Der Skelettmuskel besteht aus Bündeln langer Zellen, den Muskelfasern. Jede dieser Fasern enthält eine Vielzahl an parallel angeordneten, strangförmigen Myofibrillen. Diese unterteilen sich in eine lineare Abfolge der kontraktilen Grundeinheiten des Muskels, den sogenannten Sarkomeren. Die Skelettmuskulatur ist über Sehnen mit den Knochen verbunden und vor allem für die

aktive Fortbewegung eines Lebewesens und die willkürlichen Bewegungen des Körpers von Bedeutung.

Die glatte Muskulatur zeigt unter dem Mikroskop keine Querstreifung. Diese unwillkürlich gesteuerte Muskulatur dient der Funktion vieler innerer Organe, wie beispielsweise des Verdauungstraktes, der Harnblase oder der Arterien. Aufgrund ihres spindelförmigen Aufbaus ziehen sich diese Muskelfasern langsamer als Skelettmuskeln zusammen, bleiben aber länger kontrahiert. Skelettmuskeln und glatte Muskeln werden von unterschiedlichen Bereichen des Nervensystems gesteuert.

Die Herzmuskulatur ist ebenso wie die Skelettmuskulatur quergestreift und ähnelt dem Skelettmuskel in seinen kontraktile Eigenschaften. Jedoch sind hier die Muskelfasern verzweigt und über Glanzstreifen untereinander verbunden, was der Synchronisierung des Herzschlags dient. Durch diese elektrische Koppelung kann sich ein Aktionspotenzial über alle Herzmuskelzellen ausbreiten, dies führt folglich zur Kontraktion des gesamten Herzens.

Eine weitere Besonderheit zeigt sich darin, dass die Herzmuskelzellen als Einzige dazu befähigt sind, selbst Aktionspotenziale generieren zu können, weshalb sie auch nach Isolierung aus einem Organismus unter geeigneten Bedingungen weiterschlagen können – im Gegensatz dazu kann die Kontraktion von Skelettmuskelzellen nur in Abhängigkeit eines von einem Neuron ausgelösten Aktionspotenzials bewirkt werden. Diese Fähigkeit der spontanen rhythmischen Depolarisation der Herzmuskelmembran ermöglichte die Durchführung zur Untersuchung der chronotropen Eigenschaften an isolierten Präparaten des rechten Vorhofs im Laufe des praktischen Teils dieser Diplomarbeit (Campbell 2006).

3. MATERIAL UND METHODIK

Im folgenden Kapitel wird die Durchführung der praktischen Arbeit, die im Rahmen dieser Diplomarbeit erfolgte, dokumentiert.

3.1. DIE TESTSUBSTANZ PGU186 HCl

Im Mittelpunkt dieser Diplomarbeit steht das synthetisierte Derivat PGU186 HCl des Naturstoffes Resveratrol, welches am Institut für Pharmazeutische Chemie synthetisiert wurde und weiters am Institut für Pharmakologie der Universität Wien auf seine pharmakologischen Wirkungen untersucht wurde. PGU zeigt im Vergleich zu Resveratrol stärkere Wirkung bezüglich der vasodilatierenden Effekte.

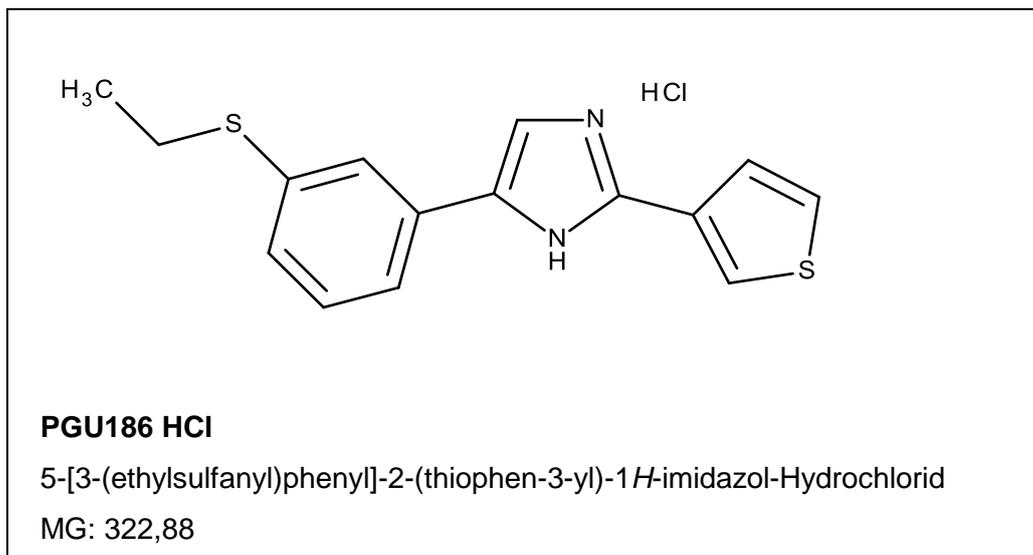


Abbildung 3: Strukturformel, Kurzbezeichnung, Nomenklatur und Molekulargewicht der Testsubstanz

3.2. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden ausschließlich weibliche Meerschweinchen aus Auszuchtstämmen der Gattung TRIK verwendet, was bedeutet, dass die Zuchtpartner nach möglichst kleinem Verwandtschaftsgrad ausgewählt wurden. Das Alter der Tiere betrug 6 bis 8 Wochen, ihr Durchschnittsgewicht ca. 400g. Die Meerschweinchen eignen sich insofern gut als Versuchstiere, als ihre Ionenkanäle denen des Menschen sehr ähnlich sind.



Die Testung der Substanzen erfolgte an isolierten Organen der Versuchstiere. Hierfür wurde pro Arbeitstag ein Meerschweinchen mittels Genickschlag getötet. Bei dieser Methode tritt der Tod sofort ein und das Tier hat nicht unnötig zu leiden.

Unmittelbar nach der Tötung wurden die gewünschten Organe, Aorta, terminales Ileum, Vorhof und Papillarmuskel, vorsichtig entnommen, in die physiologische Nährlösung übergeführt und für die Versuche entsprechend präpariert.

Abbildung 4: Präparierbesteck zur Isolierung der Organe

3.3. ISOLIERUNG UND PRÄPARATION DER ORGANE

Nach Entnahme der Organe wurden diese präpariert, um geeignete Bedingungen für die Durchführung der anschließenden Versuche zu schaffen.



Abbildung 5: Mikroskop und Präparierbesteck

Die Präparation erfolgte in Petrischalen, die mit einem Korkboden ausgelegt und ebenfalls mit physiologischer Nährlösung gefüllt waren. Mithilfe eines Gummiringes wurde das Aufschwimmen des Korkbodens verhindert. Der Korkboden ermöglichte die Befestigung der Organe mittels Stecknadeln, um geeignete Präparierbedingungen zu schaffen.

Diese physiologische Nährlösung wurde mit Oxymix, einer Gasmischung mit der Zusammensetzung von 95% O₂ und 5% CO₂ versetzt, welche die Organfunktionen für einige Stunden künstlich aufrecht erhielten und so die Durchführung der Versuche an funktionstüchtigen, lebenden Organen ermöglichten – eine Alternative zum klassischen Tierversuch.

In der folgenden Beschreibung spiegelt sich die Reihenfolge der Organentnahme wider:

Nach Tötung wurde unmittelbar der Brustkorb des Versuchstieres mittels Präparierschere geöffnet – so konnte das noch schlagende Herz entnommen und rasch in ein Becherglas mit physiologischer Nährlösung gelegt werden. Danach wurde der Schnitt der Bauchdecke entlang vergrößert, um ein ca. 20 cm langes Stück des Dünndarms zu entnehmen und es in ein weiteres Becherglas mit physiologischer Nährlösung überzuführen. Die Entnahme der Aorta entlang der Wirbelsäule erfolgte anschließend mit Hilfe einer Pinzette und einer Präparierschere. Nach Beseitigung der Lungenteile und dem Einschneiden des Zwerchfells wurde die Wirbelsäule mit den Fingern nach vorne gedrückt und ein ca. 3 cm langes Stück der thorakalen Aorta entlang des Rückgrats herausgeschnitten. Bei diesem Arbeitsschritt musste man darauf achten, die Aorta nicht mit der Präparierschere zu verletzen. Das entnommene Organ konnte somit ebenfalls in ein eigenes Becherglas mit physiologischer Nährlösung eingelegt werden.

Aus dem noch schlagenden Herzen wurden folgende drei Organe unter dem Binocular-Mikroskop herauspräpariert:

3.3.1. ARTERIA PULMONALIS

Die Lungenarterie dient im Organismus dazu, die Lunge mit Blut zu versorgen. Das sauerstoffarme Blut fließt in den Lungenarterien vom Herzen in die Lunge, wo es in den Kapillaren der Alveolen mit Sauerstoff angereichert wird

Mittels einer Federschere konnten hier Perikard und anhaftende Lungenteile entfernt und die Arteria pulmonalis möglichst nahe dem Herzen abgetrennt werden. Anschließend wurde eventuell vorhandenes Fettgewebe ebenfalls mittels Federschere weggeschnitten, um ein bis zwei ringförmige Stücke der Arteria Pulmonalis von ca. 2 mm Breite zu erhalten.

Ein Becherglas mit physiologischer Nährstofflösung diente der Aufbewahrung der fertig präparierten Organe bei dauerhafter Begasung mit Oxymix.

3.3.2. ATRIUM CORDIS DEXTRUM

Die rhythmischen Aktionen des Herzens werden von Erregungen ausgelöst, die normalerweise im Sinusknoten entstehen. Die Fähigkeit dieser Zellen, in bestimmten Zeitabständen spontan Erregungen zu bilden, stellt die Grundlage für die Selbststeuerung der Herzschlagfolge (Autorhythmie) dar (Mutschler et al.1999).

Die Entfernung von anhaftendem Fettgewebe erfolgte auch hier mittels Federschere. Anschließend wurden die Vorhöfe von den beiden Herzkammern getrennt, um den rechten Vorhof zu isolieren.

Hierbei war darauf zu achten, dass das Organ beim Befestigen mittels Stecknadeln nicht zu sehr gedehnt wurde, um den sich darin befindlichen Sinusknoten nicht zu verletzen. Seine Funktion war ausschlaggebend für den nachfolgenden Versuch.

Um den rechten Vorhof auf die dafür vorgesehene Versuchsanordnung vorzubereiten, wurden jeweils an beiden Enden des rechten Vorhofes, dem Herzrohr und der Spitze des Sinusknoten, mithilfe einer Pinzette und eines Fadens ein kleines Häkchen aus Draht geknotet. Mittels dieser Häkchen konnte man das Präparat später in die Versuchsanordnung einspannen.

Bis zu Versuchsbeginn wurde der rechte Vorhof in einem Becherglas mit physiologischer Nährlösung bei dauerhafter Begasung mit Oxymix aufbewahrt.

3.3.3. MUSCULUS PAPILLARIS

Die Papillarmuskeln sind kelgelförmige Muskelvorsprünge des Herzmuskels und ragen ins Innere des Herzens vor (Mutschler et al.1999).

Nachdem der rechte Vorhof abgetrennt worden war, wurden die Herzkammern entlang des Septums bis zur Spitze aufgeschnitten. Nach dem Aufklappen der Kammer und der Befestigung mit Stecknadeln waren die Papillarmuskeln sichtbar. In weiterer Folge wurden die Purkinje-Fasern entfernt, die Papillarmuskeln von der Herzwand abgetrennt und mittels eines Fadens mit einem Drahhäkchen versehen. Auch hier diente die physiologische Nährlösung unter Begasung mit Oxymix zur Aufbewahrung der Organe.

Anschließend erfolgte das Präparieren von Aorta und Dünndarm:

3.3.4.AORTA DESCENDENS

Die Aorta ist das größte Blutgefäß im Körper und entspringt der linken Herzkammer. Sie nimmt das vom linken Ventrikel ausgeworfene sauerstoffreiche Blut auf und leitet es in die Äste des Körperkreislaufs und somit zu den unteren Körperbereichen weiter. Sie steigt zuerst nach rechts gerichtet auf (Aorta ascendens), verläuft dann im Bogen nach links hinten (Arcus aortae) und zieht dann abwärts (Aorta descendens) (Mutschler et al.1999).

Das ca. 3 cm lange Aortenstück, das dem Versuchstier entlang des Rückgrats entnommen worden war, wurde ebenfalls in einer Petrischale mit Korkboden und Gummiring in physiologischer Nährlösung präpariert. Die Aorta war an beiden Enden mit Stecknadeln am Korkboden zu fixieren, wobei darauf geachtet werden musste, das Organ nicht zu stark zu dehnen. Mithilfe einer Pinzette und einer Federschere ließ sich die Aorta nun vorsichtig von anhaftendem Fett- und Muskelgewebe befreien, ohne die Aorta selbst zu verletzen. Schließlich wurde der Aortenstrang mittels Präparierschere in für die Versuchsanordnung entsprechend große Stücke geteilt, sodass man ringförmige Aortenstückchen von 2 – 3 mm Länge erhielt. Bis Versuchsbeginn erfolgte die Aufbewahrung dieser Aortenringe ebenfalls in einem mit physiologischer Nährlösung gefülltem und mit Oxyxymix begastem Becherglas.

3.3.5.ILEUM TERMINALIS

Der Dünndarm wird in 3 Abschnitte eingeteilt – den Zwölffingerdarm (Duodenum), den Leerdarm (Jejunum) und den Krummdarm (Ileum). Jejunum und Ileum dienen hauptsächlich der Nährstoffresorption. Das Ileum terminale mündet schließlich in den Dickdarm, dessen größter Abschnitt als Colon bezeichnet wird (Campbell 2006).

Nach Entnahme des ca. 20 cm langen Darmstücks aus dem Versuchstier – und dessen Aufbewahrung in mit Oxyxymix begasteter physiologischer Krebs-Henseleit-Nährlösung in einem Becherglas – mussten daraus nun Präparate hergestellt werden, welche für die Versuchsanordnungen entsprechend geeignet waren.

Hierzu wurde in Petrischalen gearbeitet, die mit einem Korkboden und einem Gummiring ausgestattet und mit physiologischer Nährlösung gefüllt waren. Von dem langen Darmstück wurde mit Hilfe einer Präparierschere ein ca. 0,8cm langes Stück entnommen und anschließend die Enden dieses Stücks schräg abgeschnitten. Stecknadeln fixierten das kurze Darmstück am Korkboden der Petrischale, wiederum war darauf zu achten, das Organ nicht zu überdehnen.

Falls der Darm noch mit Darminhalt gefüllt war, unterstützte eine Pasteurpipette eine Spülung.

Anschließend ermöglichte die Befestigung je eines Drahtäkchens mittels eines Fadens sowohl am jejunalen als auch am caecalen Ende des Darmstücks das Einspannen des Darmpräparats in die entsprechende Versuchsanordnung. Durch die schräg geschnittenen Enden ließen sich die Drahtäkchen leichter daran befestigen.

Bis zum Einspannen des fertig präparierten Darmstücks in die Versuchsanordnung erfolgte wiederum die Oxymix-Begasung des Präparates in einem Becherglas mit physiologischer Nährlösung.

3.4. *PHYSIOLOGISCHE NÄHRLÖSUNGEN*

Um die Substanztestung an isolierten, jedoch lebenden Organen zu ermöglichen, mussten für die Organe geeignete Bedingungen geschaffen werden, um sie nach Entnahme aus dem Versuchstier am Leben zu erhalten. Dies gelang, indem die Organe unmittelbar nach der Organentnahme in physiologische Nährlösung übergeführt wurden.

Die tägliche frische Zubereitung dieser physiologischen Nährlösung war ein sehr wichtiger Arbeitsschritt, um das Gelingen und die Reproduzierbarkeit der nachfolgenden Versuche zu gewährleisten. Das genaue Mischungsverhältnis war hier also entscheidend, um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Die physiologische Nährlösung gewährleistete einerseits die O₂-Versorgung des Gewebes der isolierten Organe und andererseits diente sie der Aufrechterhaltung eines physiologischen Blut-pH-Werts von 7,2 – 7,4.

Neben der stets richtigen Zubereitung der physiologischen Nährlösung war es auch wichtig, alle Versuche bei gleicher Temperatur durchzuführen, um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Hierfür wurde die Nährlösung stets auf eine Körpertemperatur, je nach Organ 35- 37°C, mit einem Spielraum von +/- 1°C erwärmt.

3.4.1. NÄHRLÖSUNG FÜR ATRIUM CORDIS DEXTRUM, MUSCULUS PAPILLARIS, ILEUM TERMINALIS UND ARTERIA PULMONALIS

Gearbeitet wurde mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (Na, K, Mg, Ca, Glc), welche auch als Tyrode-Lösung, benannt nach Hr. Tyrode, bezeichnet wird. Die Zubereitung erfolgte nach Vorschrift von Reiter (1967).

	mmol/l
NaCl	114,90
KCl	4,73
NaHCO ₃	24,90
CaCl ₂	3,20
MgSO ₄	1,18
KH ₂ PO ₄	1,18
Glucose	10,00

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung für Atrium cordis dextrum, Musculus papillaris, Ileum terminalis und Arteria pulmonalis

Die Substanzen in der oben angeführten Tabelle wurden, mit Ausnahme des CaCl₂, in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und mit einer geeigneten Menge Aqua bidestillata aufgefüllt. Danach konnte die Zubereitung mit Oxymix begast werden. Nach ca. 10 Minuten wurde bei fortlaufender Begasung das noch fehlende CaCl₂ tropfenweise zugefügt, um ein Ausfallen des schwerlöslichen Calciumsalzes zu verhindern.

Nach insgesamt 20 minütiger Begasung erfolgte die Auffüllung des Messkolbens mit Aqua bidestillata bis zur Markierung und die Durchmischung der Tyrode-Lösung durch Schwenkbewegungen.

3.4.2.NÄHRLÖSUNG FÜR AORTA DESCENDENS

Die Zubereitung der Nährlösung für die Aortenpräparate erfolgte wie zuvor in Kapitel 2.4.1 beschrieben, jedoch unterschied sich diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung in ihrer Zusammensetzung von der bereits erwähnten Tyrode-Lösung.

	mmol/l
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO ₃	11,90
CaCl ₂	3,20
MgSO ₄	5,80
KH ₂ PO ₄	1,40
Glucose	10,00

Tabelle 2: Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung für Aorta descendens

3.5. VERSUCHSANORDNUNGEN

Zur Durchführung der Versuche standen 2 unterschiedliche Apparaturen (A, B) zur Verfügung. In Versuchsapparatur A wurden die Versuche an rechtem Vorhof, Pulmonalarterie, Aorta und terminalem Ileum durchgeführt. Die Versuche mit den Papillarmuskeln hingegen erfolgten ausschließlich in Apparatur B.

Prinzipiell funktionieren beide Versuchsapparaturen gleich, der wesentliche Unterschied beider Apparaturen liegt alleinig in deren Aufbau sowie im Befestigungsmechanismus der Organpräparate an der Organhalterung. Sowohl bei Apparatur A als auch bei Apparatur B ist das Organpräparat über einen Silberdraht mit einem Kraftwandler verbunden.

Weiters wurde das Organbad bei beiden Apparaturen von einem Wasserbad umgeben. Dadurch war es möglich, die physiologische Nährlösung richtig zu temperieren, um so möglichst körperähnliche Bedingungen für die isolierten Organe zu schaffen.

Die erforderliche Temperatur betrug bei den Versuchen mit dem Papillarmuskel und dem rechtem Vorhof $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und bei den Versuchen mit Präparaten von Aorta, Pulmonalarterie und Darm $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Zusätzlich verfügten beide Apparaturen über eine Gaszufuhr.

3.5.1. VERSUCHSAPPARATUR A

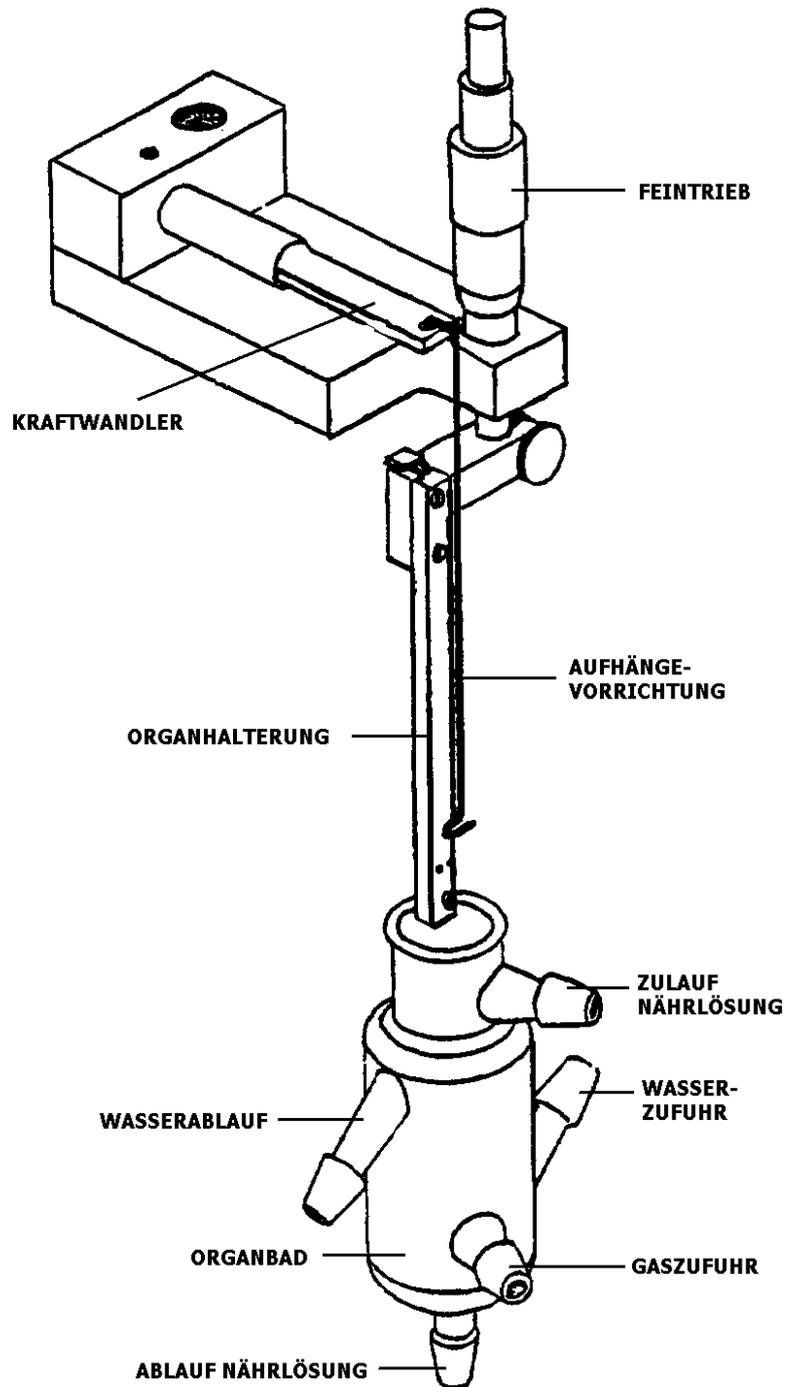


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung A

Mit der Versuchsanordnung A konnten also Versuche an allen isolierten und präparierten Organen vorgenommen werden, mit Ausnahme des Papillarmuskels. Zwei Silberdrähte dienten der Organbefestigung. Einer davon war am Steg verankert, der andere konnte an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt werden.

Das Organbad bestand hier aus einem doppelwandigen Glasgefäß. Zwischen den beiden Glaswänden zirkulierte temperiertes Wasser, welches über Kunststoffschläuche zu- und abfloss.

Der Boden des Organbades war mit einem Abflussschlauch ausgestattet, welcher durch eine Quetschklemme verschlossen war. Durch Öffnen dieser Klemme war es somit einfach, die Nährlösung zu wechseln und das Organbad zu reinigen und durchzuspülen.

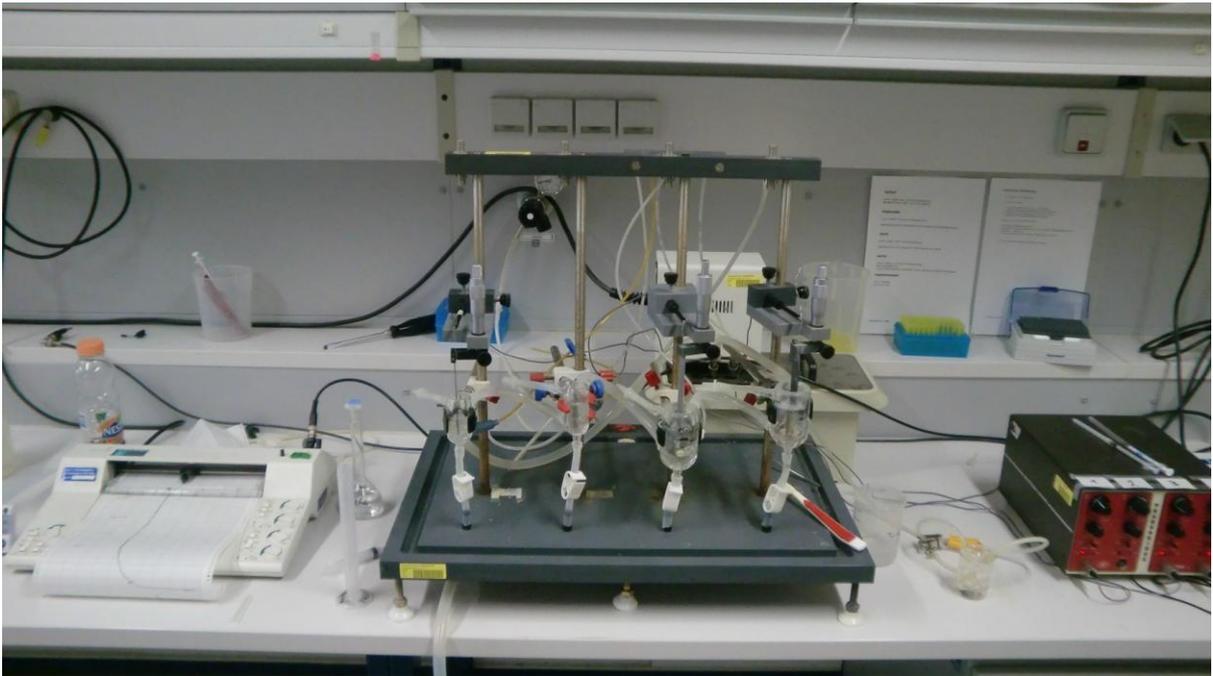


Abbildung 7: Originalabbildung eines Arbeitsplatzes der Versuchsanordnung A

3.5.2.VERSUCHSAPPARATUR B

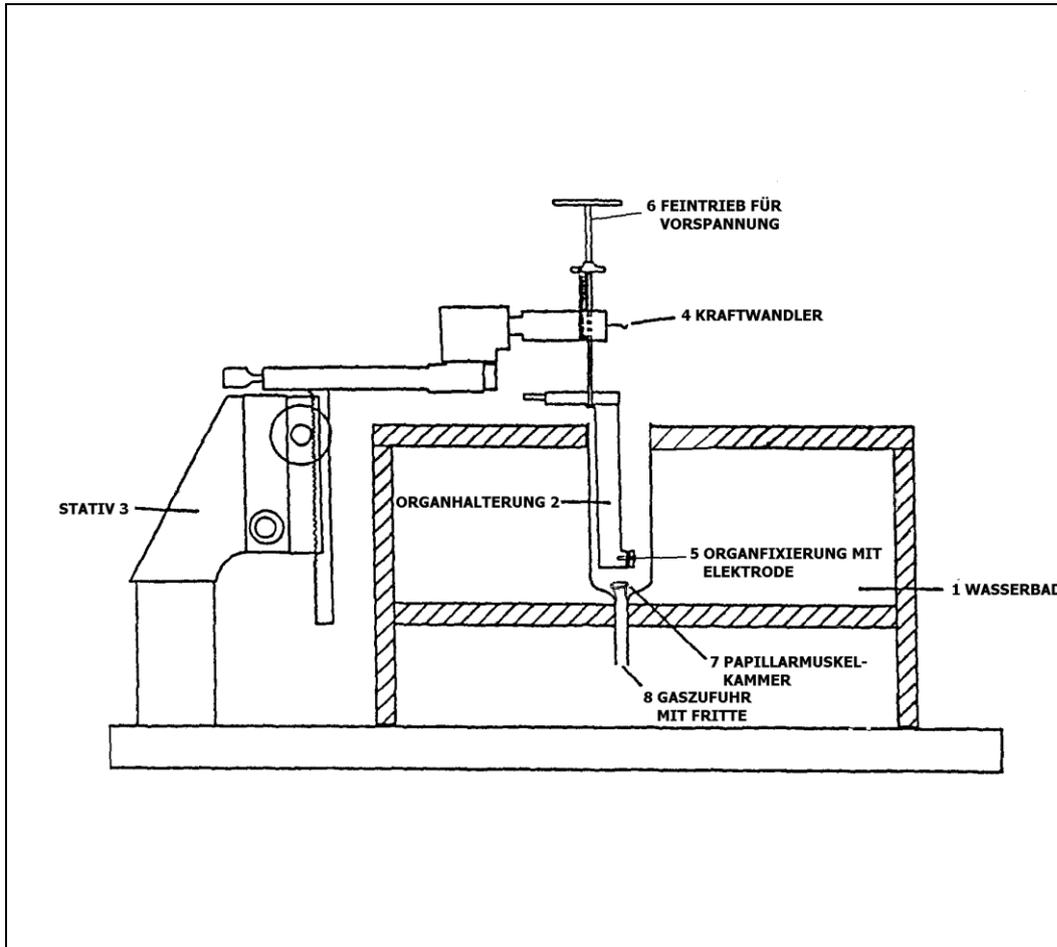


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung B

Aufgebaut war die Versuchsanordnung B einerseits aus einem Wasserbad, welches dazu diente, die Versuche bei stets gleicher Temperatur durchführen zu können. Die Erwärmung dieses Wasserbades erfolgte durch eine Heizspirale und wurde mittels Thermostat kontrolliert und möglichst konstant gehalten. Wie bereits erwähnt, betrug die erforderliche Temperatur des Wasserbades bei Versuchen mit Papillarmuskelpräparaten $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Das Organbad wies ein Volumen von 28 ml auf und war Bestandteil des Deckels dieses Wasserbades, wodurch es in das temperierte Wasser eintauchte. Somit konnte auch die sich im Organbad befindliche Krebs-Henseleit-Nährlösung temperiert werden. Für ein gutes Gelingen der Versuche wurden so möglichst optimale Bedingungen für die isolierten Organpräparate geschaffen. Um Verunreinigungen zu

vermeiden, war es wichtig, das Organbad vor und nach jedem Versuch mit einer Kunststoffspritze durchzuspülen und zu reinigen.

Über ein Stativ konnte man die daran befestigte Muskelhalterung in die gewünschte Position bringen.



Abbildung 9: Originalabbildung eines Arbeitsplatzes der Versuchsanlage B

3.5.3. GASVERSORGUNG



Abbildung 10: Originalabbildung der Gaszufuhr

Die Versuchsanlagen wurden mittels einer zentralen Gasflasche mit ausreichend Gas versorgt. Jede einzelne Versuchsanlage war mit einem weichen Kunststoffschlauch versehen, über welchen das Gas zugeführt wurde. Um den Gasstrom im Organbad fein zu verteilen, war am Ende eines jeden Kunststoffschlauches eine Fritte angebracht. Weiters war an jedem dieser Schläuche eine Metallklemme befestigt, über welche man mittels eines Schraubmechanismus die Gaszufuhr sehr fein regulieren konnte. Gearbeitet wurde mit dem Gasgemisch „Oxymix“, welches sich aus 95% Sauerstoff (O_2) und 5% Kohlendioxid (CO_2) zusammensetzt.

Während der gesamten Laufzeit der Versuche mussten die isolierten Organe ununterbrochen mit dem Gasgemisch versorgt werden, um im Organbad den physiologischen pH-Wert von 7,35 - 7,45 konstant zu halten. Weiters wurde durch die laufende Gaszufuhr die Nährlösung in gleichbleibender Bewegung gehalten, was wiederum die homogene Verteilung der Testsubstanzen gewährleistete.

Es war wichtig, die Gaszufuhr behutsam zu adjustieren. Bei zu schwacher Einstellung wäre verminderte Sauerstoffzufuhr die Folge, wodurch das Organpräparat während eines Versuches abgestorben wäre und der Versuch somit abgebrochen hätte werden müssen.

Bei zu stark eingestelltem Einströmen des Gases ins Organbad hätte durch die sprudelnde Bewegung einerseits das Organpräparat aus seiner Halterung gehoben und lose im Organbad herumgewirbelt werden können, andererseits hätte auch der Silberdraht zur Signalweiterleitung unkontrollierten Reizen ausgesetzt sein können, was zu verfälschten Aufzeichnungen am Millimeterpapier geführt hätte.

3.5.4. KRAFTWANDLER

Der Kraftwandler misst die Kraft, mit der sich das eingespannte Organ kontrahiert und transformiert diese mechanische Kraft in ein elektrisches Signal. Um dieses elektrische Signal entsprechend dokumentieren zu können, wurde es zuerst mittels eines Verstärkers („4-Channel Transducer Amplifier“ von World Precisions Instruments, FL, USA) angepasst und anschließend über einen Schreiber mit einem Filzschreibstift auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Der Schreiber (Single Channel Model BD 112 Flatbed Recorder, Kipp&Zonen, Delft, Niederlande) verfügte über einen automatischen Papiervorschub.

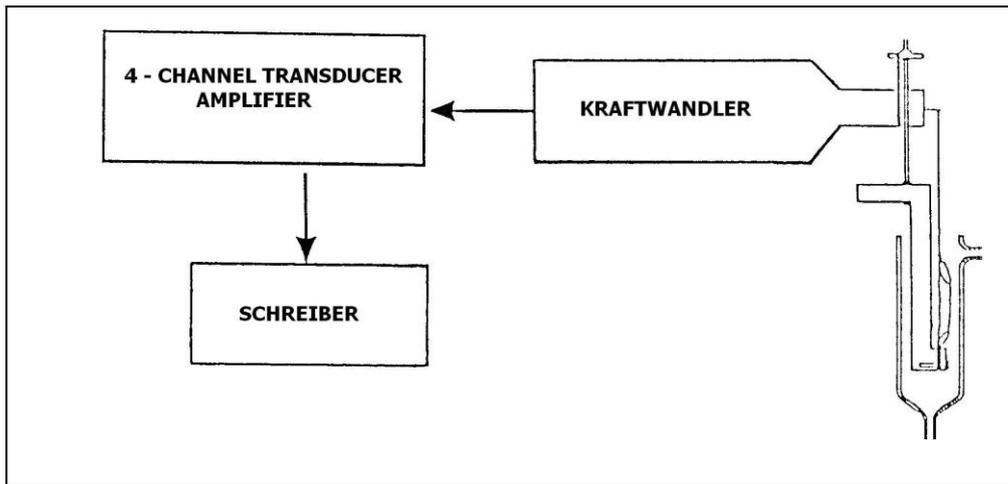


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Signalgewinnung

3.5.5. REIZUNG DES MUSCULUS PAPILLARIS

Die Papillarmuskelpräparate dienen dazu, die Kontraktionskraft zu messen. Da sie jedoch – im Gegensatz zum rechten Vorhof – keine Spontanaktivität aufweisen, müssen sie durch externe Reize zur Kontraktion animiert werden. Über ein spezielles Reizgerät, dem Accupulser A310 (World Precision Instruments, Hamden, FL, USA) erfolgte also eine elektrische Reizung. Der Papillarmuskel wurde so über Silberelektroden, welche Teile der Organhalterung waren, stimuliert und folglich kontrahiert.

Um reproduzierbare Werte zu bekommen, erfolgte die Reizung auf die Organpräparate mit Hilfe von 3 ms langen Rechteckimpulsen bei einer Frequenz von 1 Hertz, also eine Kontraktion pro Sekunde. Die erforderliche Frequenzstärke wurde für jedes isolierte Organ neu ermittelt, indem die Frequenzstärke so lange erhöht wurde, bis das Papillarmuskelpräparat mit Kontraktionen reagierte. Zur angewendeten Stromstärke wurden 10% addiert, weil sie ca. 10% über der minimalen Reizschwelle liegen sollte.

Wäre die gewählte Stromstärke zu hoch, hätte das eine Entleerung der Katecholaminspeicher zur Folge, wodurch die Messwerte entweder verfälscht werden oder das Papillarmuskelpräparat absterben würde. Bei einer zu schwach gewählten Stromstärke hingegen wäre es nicht möglich, die Kontraktionen zu messen.

3.6. VERSUCHSABLAUF ZUR UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG

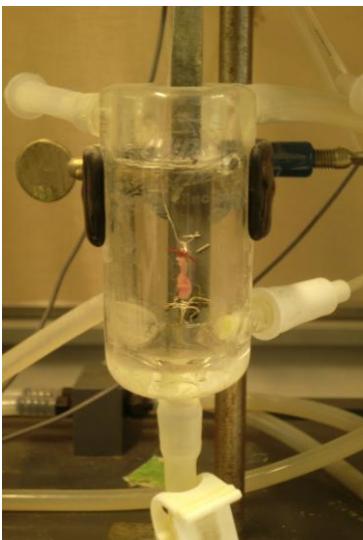
Die gründliche Reinigung der Organbäder war der erste und letzte Arbeitsschritt eines jeden Arbeitstages sowie auch vor bzw. nach jedem einzelnen Versuch. Dies war wichtig, um korrekte und reproduzierbare Versuchsergebnisse erzielen zu können. Man spülte hierfür die Organbäder mit einer 2-prozentigen Salzsäure (HCl) gründlich durch, um sie von Organrückständen oder auskristallisierten Salzen der Nährlösung vollständig zu befreien.

Nach der Reinigung wurde das Organbad einige Male ordentlich mit Aqua bidestillata gewaschen, um sicherzugehen, dass die darauffolgend eingefüllte Nährlösung nicht mit Salzsäureresten verunreinigt wurde.

Mit Hilfe einer Mensur wurden stets genau 28 ml Nährlösung in ein Organbad eingefüllt, um für jedes isolierte Organ die exakt gleichen Versuchsbedingungen zu schaffen.

Nach dem Einfüllen der Nährlösung konnte das zu testende Organ in die Organhalterung eingespannt und ins Organbad abgesenkt werden. Das Einspannen der Organe musste möglichst rasch und mit Vorsicht erfolgen, weil man das Organ einerseits so rasch wie möglich wieder in die physiologische Nährlösung überführen musste, um sein Absterben zu verhindern, und andererseits war es aus demselben Grund erforderlich, beim Einspannen darauf zu achten das Organ nicht zu verletzen.

Anschließend, nachdem man die Organhalterung samt Präparat ins Organbad getaucht hatte, erfolgte die Regelung der Gaszufuhr. Man musste hierbei darauf



achten, die Begasung so schwach wie möglich und so stark wie nötig einzustellen, um einerseits sicherzustellen, dass die Nährlösung nicht aus dem Organbad schwappte und das Organpräparat nicht aus seiner Verankerung gehoben wurde. Andererseits aber war es für das Gelingen eines Versuchs wichtig, das isolierte Organ mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen.

Abbildung 12: Originalabbildung eines laufenden Versuches an einem Organpräparat des Ileum terminalis im Organbad der Versuchsanordnung A

Damit sich das Organpräparat der neuen Umgebung anpassen konnte, wurde eine gewisse Dauer abgewartet. Sobald sich die Muskulatur des jeweiligen Organpräparates stabilisiert hatte, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden.

Die Testsubstanz wurde während eines Versuchsablaufes kumulativ in einem Abstand von je 45 Minuten in fünf Konzentrationsstufen dem Organbad zugegeben. Die Zugabe erfolgte beginnend mit der niedrigsten Konzentrationsstufe, um eine gleichmäßige Veränderung der Kontraktionskraft beobachten zu können. Nachdem die kumulative Zugabe abgeschlossen war, erreichte diese eine Endkonzentration der Testsubstanz im Organbad von 100 $\mu\text{mol/l}$.

Zugegebene Menge an Testsubstanz 100 μl	Endkonzentration 100 $\mu\text{mol/l}$
1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
2 μl	3 $\mu\text{mol/l}$
7 μl	10 $\mu\text{mol/l}$
20 μl	30 $\mu\text{mol/l}$
7 μl 0	100 $\mu\text{mol/l}$

Tabelle 3: Darstellung des Pipettierschemas

Für die Substanzzugabe wurden Finnpipetten (Fa. Labsystem, Finnland) herangezogen. Bei diesem Arbeitsschritt musste darauf geachtet werden, die Organhalterung nicht mit der Pipette zu berühren, damit kein störendes Signal bei der laufenden Messung ausgelöst wurde.

Mit Hilfe des Schreibers wurden die daraus resultierenden Veränderungen der Kontraktionskraft auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet, jedoch mussten die Zeitpunkte und die jeweiligen Konzentrationen, an denen die Substanzzugabe erfolgte, manuell neben dem erhaltenen Graphen vermerkt werden.

3.6.1. BEREITUNG DER STAMMLÖSUNGEN

Die zu testende Substanz wurde von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt und in festem Zustand in einer kleinen Phiolen überliefert. Um eine homogene Verteilung der Substanz im Organbad zu erzielen, musste die Substanz vor der Zugabe zuerst in Lösung gebracht werden. Als Lösungsmittel für PGU186 HCl wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgewählt. Da DMSO selbst eine Eigenwirkung auf die isolierten Organe zeigte, musste dies bei den anschließenden Auswertungen und Berechnungen berücksichtigt werden.

3.6.1.1. STAMMLÖSUNGEN DER TESTSUBSTANZ

Die Stammlösungen der Testsubstanz wurden täglich frisch vorbereitet. Das Molekulargewicht der zu testenden Substanz und das Fassungsvermögen des jeweiligen Organbades wurden in die Berechnung der Einwaagen miteinbezogen.

Stammlösung	Molare Masse (g/mol)	Volumen des Organbades (ml)	Einwaage (mg) für eine Endkonzentration von 100 µmol/l / Organbad
PGU186 HCl	322,88	8	0,26
PGU186 HCl	322,88	25	0,81

Tabelle 4: Stammlösungen der Testsubstanz**3.6.1.2. STAMMLÖSUNGEN VON NITRO-L-ARGININ**

Da für die Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl die Aminosäure Nitro-L-Arginin herangezogen wurde, mussten auch hierfür genaue Einwaagen berechnet werden.

Stammlösung	Molare Masse (g/mol)	Volumen des Organbades (ml)	Einwaage (mg) für eine Endkonzentration von 100 µmol/l / Organbad
Nitro-L-Arginin	210,66	8	0,17
Nitro-L-Arginin	210,66	25	0,53

Tabelle 5: Stammlösungen von Nitro-L-Arginin

Im Kapitel 3.6. finden sich detaillierte Erläuterungen zu Nitro-L-Arginin im Bezug auf diese Diplomarbeit.

3.6.2. KALIUMCHLORID-LÖSUNG ZUR VORKONTRAKTION

Alle glattmuskulären Organe, also Aorta, Pulmonalarteria und Darm, mussten für die Durchführung der Versuche zur maximalen Kontraktion gebracht werden. Dies erfolgte durch eine chemische Reizung mittels Kaliumchlorid-Lösung. Da an den genannten Organen auf eine vasodilatierende bzw. relaxierende Wirkung hin geprüft wurde, konnte durch diese Vorkontraktion der Einfluss der Testsubstanz auf die Muskulatur des jeweiligen Organs genau beobachtet werden.

Man arbeitete mit zwei verschiedenen Kaliumchlorid-Lösungen, welche sich in ihrer Konzentration unterschieden und welche wie die Tyrode-Lösung ebenfalls täglich frisch zubereitet wurden. Die zwei Konzentrationswerte der KCl-Lösungen wurden experimentell ermittelt.

Einerseits mischte man eine 90 mmolare KCl-Lösung, die für die Versuche mit Aorta und Pulmonalarterie herangezogen wurde. Hierfür wurden 0,67 g Kaliumchlorid in einen 100ml Messkolben eingewogen. Danach wurde mit frisch zubereiteter Tyrode-Lösung bis zur Markierung des Messkolbens aufgefüllt und ordnungsgemäß gut durchgeschüttelt, um eine homogene Mischung zu erzielen. Andererseits wurde eine 60 mmolare KCl-Lösung für die Versuche an den Darmpräparaten hergestellt. Hierfür wurden 0,45 g Kaliumchlorid in den 100 ml Messkolben eingewogen und ebenfalls in frischer Tyrode-Lösung gelöst und gut durchmischt.

3.6.3. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON ARTERIA PULMONALIS

Es musste auch hier beim Einspannen darauf geachtet werden, das Organ nicht zu sehr zu dehnen und Verletzungen des Organpräparates durch die Drahtenden zu vermeiden. Der Gefäßring wurde quer über die zwei L-förmig gebogenen Silberdrähte eingespannt. Nachdem das Organ an die Organhalterung angebracht worden war, senkte man es in das Organbad ab, sodass das Präparat von allen Seiten mit physiologischer Nährlösung umgeben war. Anschließend wurde die Gaszufuhr mit Oxymix eingestellt, sodass das Organ nun von den von ihm benötigten Nährstoffen umspült wurde.

Nachdem das zu testende Präparat nun ordnungsgemäß im Organbad eingebracht worden war, erfolgte nun der Vorgang des Vorspannens. Dieser Arbeitsschritt war notwendig, damit das Muskelpräparat seine maximale Kontraktionskraft entfalten konnte. Hierfür wurden ein mit dem Organbad verbundener Schreiber und ein Verstärker aktiviert und eine Nulllinie auf dem Millimeterpapier definiert. Danach legte man eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5mV an, welche während des gesamten Versuches konstant belassen wurde. Anschließend stellte man den Schreiber wieder auf die Nulllinie zurück.

Nun wartete man ab, damit sich das Organ anpassen konnte. Währenddessen mussten kleine Abweichungen des Schreibers von der Nulllinie mittels Mikrometer nachkorrigiert werden.

Um nun eine Abweichung der Kontraktionskraft messen zu können, wurde das Präparat, wie in Kapitel 2.6.1. beschrieben, mit einer 90 mmolare KCl-Lösung vorkontrahiert. Man ließ also die Krebs-Henseleit-Nährlösung mittels Quetschklemme über einen Ablaufschlauch aus dem Organbad aus, spülte einmal mit KCl-Lösung durch und füllte anschließend das Organbad mit genau 28 ml KCl-Lösung wieder auf. Hierbei war es sinnvoll, die verwendete KCl-Lösung auf ca. 37°C vorzuwärmen, um dem Organ ein möglichst optimales Medium zu bereiten.

Der Schreiber zeichnete die darauffolgende Kontraktion der Pulmonalarterie auf. Nach mind. 45 Minuten wurde in den meisten Fällen eine Plateauphase erreicht, die sogenannte „steady state“, was bedeutet, dass die Kontraktionskraft des Muskelpräparats nun über einen gewissen Zeitraum konstant bleibt. Auf dem

Millimeterpapier deutete man die Höhe dieser Plateauphase als die maximale, also 100 prozentige Kontraktion der glatten Muskulatur.

Zu diesem Zeitpunkt konnte nun mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz nach dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Pipettierschema begonnen werden.

3.6.4. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON AORTA DESCENDENS

Auch hier erfolgten, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, nach Einbringung des Gefäßringes in die dafür vorgesehene Organhalterung, die Zuschaltung des Schreibers und des Amplifiers und folglich die Durchführung der Nullpunkteinstellung. Im Unterschied zur Pulmonalarterie wurde hier jedoch mit einer speziell für die Aorta modifizierten Krebs-Henseleit-Nährlösung gearbeitet.

Ein weiterer Unterschied erfolgte beim Anlegen der Vorpannung. Bei Aortapräparaten wurde nämlich mittels Feintrieb bei 10 mV auf 10 cm vorgespannt. Diese Vorspannung betrug umgerechnet 19,6 mN. Außerdem war hier eine Anpassungsphase von ca. 60 Minuten erforderlich.

Nach einer Entspannungsphase von 20 Minuten wurde auf 5 mV umgestellt, was umgerechnet 9,81 mN ergab. Die dadurch resultierende Verschiebung des Schreibers vom Nullpunkt musste auch hier wieder mittels Mikrometer korrigiert werden. Anschließend wurde der Schreibstift abgesenkt.

Die Krebs-Henseleit-Nährlösung wurde nun wieder aus dem Organbad über einen Ablaufschlauch abgelassen und durch genau 25 ml einer 90 mmolaren KCl-Lösung ersetzt.

Durch das veränderte Nährmedium erfolgte eine sofortige schnelle Kontraktion der Aorta. Nun galt es abzuwarten bis zur Einstellung der Plateauphase, um mit der Substanzzugabe nach dem zuvor beschriebenen Pipettierschema beginnen zu können.

3.6.5. VERSUCHSABLAUF BEI ORGANPRÄPARATEN VON ILEUM TERMINALIS

Der präparierte Darm, siehe Kapitel 2.3.5, wurde hier so in die Organhalterung der Versuchsapparatur eingespannt, dass der caecale Teil des Darmstücks nach unten und das jejunale Ende nach oben gerichtet waren. Wie bei allen anderen Präparaten musste auch hier sehr behutsam gearbeitet werden, um Beschädigungen des Organpräparates zu verhindern.

Nach Einbringung des Präparats wurde die Organhalterung wieder in die physiologische Nährlösung abgesenkt und die Begasung mit Oxymix adjustiert. Anschließend wurden Schreiber und Verstärker aktiviert und eine Vorspannung von 4,9 mN mittels Feintrieb angelegt.

Nun folgte eine 20 minütige Anpassungsphase, in der sich die Darmmuskulatur an die Bedingungen gewöhnen konnte. Während dieser Zeit kam es am Präparat zu Veränderungen der Darmperistaltik, wodurch es notwendig war, immer wieder mittels Feintrieb nachzuspannen und den Schreiber zurück auf die Nulllinie zu setzen.

Auch hier war es erforderlich vorzukontrahieren, um eine Abnahme der Kontraktionskraft messen zu können. Dies erfolgte mit der 60 mmolaren KCl-Lösung. Der Arbeitsvorgang erfolgte analog zu den oben genannten Arbeitsschritten. Zuerst wurde die Tyrode-Lösung abgelassen und durch die KCl-Lösung ausgetauscht, wodurch es schnell zur vollständigen Kontraktion des Darmpräparates kam.

Da dies vom Schreiber dokumentiert wurde, war diese schnelle und starke Kontraktion am Millimeterpapier gut zu beobachten. Anschließend kam es zu einer ebenso raschen Abnahme und schließlich wartete man darauf, dass sich die Darmkontraktion einpendelte und über einen ca. 45 Minuten langen Zeitraum konstant war. War dies der Fall, konnte man in 45-minütigen Abständen mit der Zugabe der Testsubstanz nach aufsteigenden Konzentrationsstufen beginnen.

Bei einigen Versuchen kam es jedoch vor, dass die Kontraktion des Darmstücks proportional zur Wartezeit abnahm, wodurch keine Plateauphase erreicht wurde. In diesen Fällen musste das Organpräparat verworfen werden. Folglich wurde mit der Präparation eines neuen Darmstücks begonnen, um einen erneuten Versuch zu starten.

3.6.6. VERSUCHSABLAUF AN ORGANPRÄPARATEN VON ATRIUM CORDIS DEXTRUM

Nach Präparation des isolierten Organs, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, wurde das Vorhofpräparat in die dafür vorgesehene Apparatur eingehängt und sofort in das mit 25 ml Krebs-Henseleit-Nährlösung befüllte Organbad abgesenkt, welches mit Oxymix durchperlt wurde.

Da das empfindliche Organpräparat während des Vorgangs des Einspannens in die Organhalterung nicht in physiologische Nährlösung getaucht werden konnte, musste man hier wieder besonders rasch und behutsam arbeiten, um einerseits das Organ nicht zu verletzen und andererseits war es eben wichtig, das Präparat so schnell wie möglich wieder in die mit Oxymix begaste Tyrode-Lösung zu tauchen, damit es mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt war. Gelingt dies nicht, starb das Vorhofpräparat in Folge eines Sauerstoffmangels ab und man konnte erst an einem weiteren Arbeitstag einen erneuten Versuch starten.

Nach Einbringen des rechten Vorhofs in das Organbad wurde der Schreiber aktiviert und der Schreibstift mit Hilfe eines Drehrades an die Nulllinie des Millimeterpapiers justiert. Am Flachbrettschreiber wurden eine Stromstärke von 5 mV und der Speed, das heißt die Geschwindigkeit des Papiervorschubs, auf 5mm/sek eingestellt. Durch die anschließende Aktivierung des Amplifiers bewegte sich der Schreibstift meist wieder deutlich von der Nulllinie weg, was man durch manuelle Einstellung wieder korrigieren musste.

Nun legte man eine Vorspannung von 10,4 mN mittels Feintrieb an. Es war wichtig, die angelegte Vorspannung während des gesamten Versuchablaufes mittels Feintrieb behutsam nachzukorrigieren, weil das Gewebe durch seine natürliche Plastizität im Laufe der Zeit immer wieder etwas nachgab.

Nach einer Anpassungsphase von mindestens 30 Minuten wurde nun die Schlagfrequenz beobachtet, was durch die Spontanaktivität des sich im rechten Vorhofes befindlichen Sinusknoten ohne externe Reizung möglich war. Für die Kontrollmessungen wurde der Schreiber alle 5 Minuten abgesenkt, um die Ausschläge über eine Länge von 6 cm, was bei eingestelltem Speed innerhalb von 12 Sekunden erfolgte, aufzuzeichnen.

Die Kontrollmessungen wurden so lange durchgeführt, bis mind. vier aufeinander folgende Messungen eine konstante Schlagfrequenz aufwiesen. Danach konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz in 45-minütigen Abständen nach dem üblichen Pipettierschema begonnen werden.

Ab Beginn der Kontrollmessungen bis hin zum Ende eines Versuches wurde alle 5 Minuten eine Messung aufgezeichnet.

3.6.7. VERSUCHSABLAUF AN ORGANPRÄPARATEN VON MUSCULUS PAPILLARIS

Der Papillarmuskel wurde wie in Kapitel 2.3.3 präpariert, für einen Versuch in die Apparatur 2 eingeklemmt und in das 35°C warme, mit Tyrode-Lösung befüllte und mit Oxymix durchperlte Organbad abgesenkt. Daraufhin wurde der Schreiber aktiviert und der Schreibstift auf der Nulllinie justiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung des Verstärkers.

Nach einer kurzen Anpassungsphase wurde eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt. Auch hier war es aufgrund der Plastizität des Gewebes notwendig, die Vorspannung mittels Feintrieb während des gesamten Versuchsablaufes regelmäßig nachzujustieren. Somit konnte eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung verhindert werden (Reiter 1967).

Da der Papillarmuskel, wie in Kapitel 2.5.5 genau erläutert, im Gegensatz zum rechten Vorhof keine Spontanaktivität aufweist, musste hier mit Hilfe elektrischer Reize nachgeholfen werden.

Nach einer halben Stunde Anpassungszeit wurde auch hier mit den Kontrollmessungen begonnen. Hierfür wurde der Stift des Schreibers alle 5 Minuten abgesenkt, um sechs aufeinanderfolgende Amplituden der Kontraktionen aufzuzeichnen. Die Kontrollmessungen erfolgten so lange, bis mindestens drei Messungen in Folge konstant waren. Die Längen der aufgezeichneten Amplituden wurden mit einem Lineal vermessen. Genau wie bei den Versuchen am rechten Vorhof wurde auch hier über die gesamte Dauer des Versuches alle 5 Minuten eine Messung mittels Schreiber aufgezeichnet.

Nach Beendigung der Kontrollmessungen erfolgte die Substanzzugabe nach dem üblichen Pipettierschema. Alle 45 Minuten wurde die Testsubstanz in der nächst höheren Konzentrationsstufe dem Organbad vorsichtig zupipettiert. Am Ende eines jeden Konzentrationsintervalls erfolgte dann eine Aufzeichnung bei 20 mm/sek, was zur erleichterten Vermessung der Amplituden diente.

3.7. VERSUCHSABLAUF ZUR UNTERSUCHUNG DES MÖGLICHEN WIRKMECHANISMUS

Um den Wirkmechanismus von PGU186 HCl zu untersuchen, wurde Nitro-L-Arginin, ein Derivat der proteinogenen Aminosäure L-Arginin, herangezogen.

3.7.1. NITRO-L-ARGININ

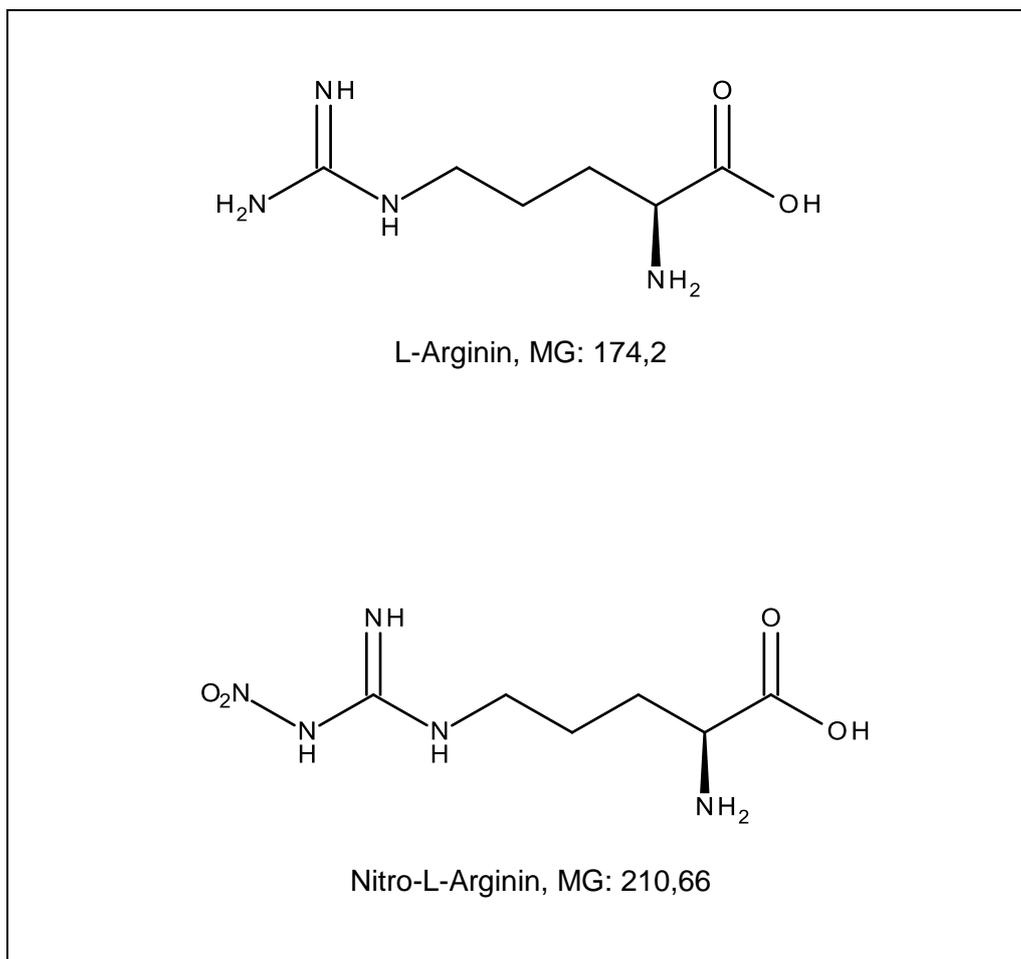


Abbildung 13: Strukturformel und Molekulargewicht von L-Arginin und seinem Derivat Nitro-L-Arginin

L-Arginin, auch als Hexonbase bezeichnet, ist aufgrund der Guanidino-Gruppe die am stärksten basische Aminosäure und Bestandteil von jedem Protein. Sie ist besonders reichlich in Protaminen und Histonen enthalten und kommt in freier Form in vielen Pflanzen vor, wie beispielsweise in Rotalgen, Kürbisgewächsen und Koniferen. In diesen Pflanzen spielt es eine wichtige Rolle als Stickstoff-Transportform.

Arginin ist eine glucoplastische und halbessentielle Aminosäure, was bedeutet, dass sie für den Erwachsenen nicht essentiell ist. Bei stark untergewichtigen Neugeborenen kann jedoch die Bildung von L-Arginin eingeschränkt sein, in dem Fall wäre, unter anderem, die Zufuhr dieser Aminosäure essentiell. Arginin ist ein wichtiges Glied im Harnstoffzyklus und wird dort aus Carbamylphosphat, L-Ornithin und der α -Aminogruppe von L-Asparaginsäure synthetisiert (Hunnius 1998).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit war die Aminosäure L-Arginin deshalb von Interesse, weil aus ihr durch drei Isoformen der NO-Synthase – der neuronalen, der induzierbaren und der endothelialen NO-Synthase – Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert wird. NO ist das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül. Endothelzellen, aber auch Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS), des vegetativen peripheren Nervensystems und des Darmnervensystems sind imstande, NO zu bilden.

Das Gefäßendothel produziert NO kontinuierlich. Man nimmt an, dass es der wichtigste endogene Vermittler einer Vasodilatation ist. Nachdem NO aus dem Endothel in die Gefäßwand abgegeben wird, bindet es an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylylcyclase (GC-S), eines intrazellulären „Enzymrezeptors“, in der glatten Gefäßmuskulatur. GC-S bildet daraufhin aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) den second messenger cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). Unter Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) kommt es folglich zur Gefäßrelaxation (Aktories 2005).

Ein Analogon von L-Arginin ist Nitro-L-Arginin. Dieses greift in den NO-Stoffwechsel ein, indem es die NO-Synthase inhibiert. In Folge dessen wird der Biosyntheseweg von NO gehemmt und die von NO ausgelöste Vasodilatation unterdrückt (Krejcy et al. 1993).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden drei Versuchsreihen an den glattmuskulären Organpräparaten, Aorta, Pulmonalarterie und Darm, durchgeführt, um den Wirkmechanismus der Testsubstanz zu untersuchen. Dabei testete man, ob PGU186 HCl in der Lage ist, die von Nitro-L-Arginin ausgelöste Vasokonstriktion wieder aufzuheben und eine Gefäßrelaxation auszulösen.

Der Versuchsablauf verlief hier bis zum Erreichen eines „steady state“ analog zu den vorangegangenen Versuchen. Nach einer Anpassungsphase ließ man die Krebs-

Henseleit-Lösung ab und füllte das Organbad mit KCl-Tyrode-Lösung, um die Vorkontraktion einzuleiten. Sobald die maximale Muskelkontraktion des jeweiligen Organpräparates konstant war und eine Plateauphase erreicht wurde, konnte mit der Untersuchung des Wirkmechanismus begonnen werden.

In Kapitel 3.5.1.2 sind die verwendeten Substanzmengen für die Versuche mit Nitro-L-Arginin in Form einer Tabelle wiedergegeben. Nach Einwiegen der erforderlichen Substanzmenge hat man diese anschließend in 100 µl KCl-Tyrode gelöst.

3.7.2. VERSUCHSABLAUF AN AORTA DESCENDENS, ARTERIA PULMONALIS UND ILEUM TERMINALIS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ

Nachdem sich ein Organ soweit stabilisiert hatte, sodass es zum Erreichen einer Plateauphase kam, wurden 100 µmol/l der Nitro-L-Arginin-Stammlösung ins Organbad pipettiert. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten führte man dann die Testsubstanz hinzu. Die zugegebene Konzentration an PGU186 HCl betrug bei Organpräparaten von Aorta und Darm jeweils 20 µmol/l, bei Präparaten der Pulmonalarterie 10 µmol/l. Nach weiteren 45 Minuten wurden die Versuche beendet.

3.8. AUSWERTUNGEN DER VERSUCHSREIHEN

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO selbst einen Effekt auf die Organpräparate aufwies, musste diese Wirkung von den gemessenen Werten abgezogen werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen.

In den folgenden drei Unterkapiteln wird beschrieben, wie man die Messwerte der einzelnen Versuchsreihen erhielt. Um diese Messwerte dann in Konzentrations-Wirkungskurven darzustellen, mussten die arithmetischen Mittelwerte inklusive deren Standardfehler (SEM) berechnet werden. Aus den erhaltenen Werten wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Bei diesen waren auf der x-Achse die Konzentrationen der Testsubstanz logarithmisch dargestellt und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % eingetragen.

Im Anschluss ermittelte man aus den erhaltenen Kurven anhand der Grafik die entsprechenden EC_{50} -Werte. Hierfür erstellte das Computerprogramm Sigma Plot eine graphische Darstellung. Aus dieser konnte folglich jener Wert abgelesen werden, der die mittlere effektive Konzentration der Testsubstanz in mmol/l, bei der es zu einer Veränderung der Kontraktionskraft oder, bei Präparaten des rechten Vorhofs, der Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes kam, darstellt.

Weiters wurde der gepaarte Student-t-Test angewendet, um die Messwerte hinsichtlich ihrer Signifikanz zu beurteilen. Hierfür war die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit P notwendig. Bei $P < 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $P < 1\%$ ($P < 0,01$) konnten die Werte als signifikant bezeichnet werden, bei $P < 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant.

3.8.1. ATRIUM CORDIS DEXTRUM

Die Messungen am rechten Vorhof wurden vorgenommen, um den Einfluss von PGU186 HCl auf die Schlagfrequenz des Sinusknoten zu untersuchen. In Kapitel 3.5.6 wurde bereits beschrieben, dass die Aufzeichnungsdauer des Schreibers, bei einem Papiervorschub von 5 mm/sek und einer Dauer von 12 Sekunden, einer Aufzeichnungstrecke von 6 cm entsprach. Die Ausschläge auf dieser Strecke wurden manuell abgezählt. Anschließend wurde der ermittelte Wert mit dem Faktor 5 multipliziert, um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten. Die letzte Kontrollmessung vor der ersten Substanzzugabe stellte den Referenzwert für die darauf folgenden Messungen eines Versuches dar und wurde somit als 100% betrachtet. Die letzte Messung vor Zugabe der nächsthöheren Konzentrationsstufe verglich man mit dem Referenzwert.

In Folge dessen konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Testsubstanz einen positiv chronotropen Einfluss, bei einem erhaltenen Wert von über 100%, einen negativ chronotropen Einfluss, bei einem erhaltenen Wert von unter 100%, oder einen neutral chronotropen Einfluss auf die Schlagfrequenz hatte.

3.8.2. MUSCULUS PAPILLARIS

Zur Auswertung der Versuchsreihe an Präparaten des Papillarmuskels zog man die Aufzeichnungen der Amplituden, welche auch hier alle 5 Minuten vorgenommen wurden, heran. Pro Messung wurden je sechs Amplituden aufgezeichnet und mit Hilfe eines Lineals vermessen. Um die erhaltenen Werte von cm in mN umzurechnen, mussten diese mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers, welcher 0,98 betrug, multipliziert werden. Die Messungen wurden bei einer Stromstärke von entweder 1 oder 2 mV begonnen. Wenn die Voltzahl für die gewünschte Muskelkontraktion zu schwach war, wurde auf 5 mV erhöht. Die jeweilige Stromstärke (1mV, 2mV oder 5mV) einer Messung war bei den weiteren Berechnungen zu berücksichtigen. Bei Verwendung der Stromstärken von 1mV bzw. 2mV musste zusätzlich mit dem Faktor 0,4 multipliziert werden, um die Werte u standardisieren.

Auch hier wurde der letzte konstante Wert vor Beginn der Substanzzugabe als Referenzwert für den jeweiligen Versuch herangezogen und entsprach somit 100%. In Folge dessen wurde auch hier die jeweils letzte Messung einer Konzentrationsstufe, also nach Ablauf von genau 45 Minuten, zum Vergleich mit dem Kontrollwert herangezogen, um eine Aussage über die Kontraktionskraft tätigen zu können. Lag der erhaltene Messwert über 100%, so bedeutete dies eine positiv inotrope Wirkung, bei einem erhaltenen Wert von unter 100% wurde eine negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel festgestellt.

3.8.3. AORTA DESCENDENS, ARTERIA PULMONALIS UND ILEUM TERMINALIS

Bei den Messungen dieser drei Organpräparate zeichnete der Schreiber eine Kontraktionskurve auf. Man untersuchte hier die dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der zu testenden Substanz.

Nach maximaler Kontraktion des Organs durch Zugabe einer KCl-Tyrode-Lösung wurden die unterschiedlichen Konzentrationsstufen kumulativ in einem Zeitabstand von je 45 Minuten ins Organbad pipettiert. Bei jeder Substanzzugabe wurden der exakte Zeitpunkt und die jeweilige Konzentrationsstufe händisch am Millimeterpapier neben der aufgezeichneten Kurve vermerkt. Von jedem dieser gekennzeichneten Punkte, also wieder jeweils jener Messwert vor Zugabe der nächst höheren

Konzentrationsstufe, wurde der Abstand bis zur Nulllinie vermessen und mit dem Referenzwert verglichen. Als Referenzwert, also 100%, diente hier jener Abstand, der vom Nullpunkt bis zur jeweiligen Plateauphase reichte. Somit konnte auch hier pro Versuch durch Vergleich der unterschiedlichen Messwerte mit dem Referenzwert eine Aussage über die Stärke einer Dilatation bzw. einer Spasmolyse getroffen werden. Um die erhaltenen Messwerte von cm in mN umzurechnen, musste auch hier mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert werden, da 1 cm am Millimeterpapier 0,98 mN entspricht.

4. ERGEBNISSE

In diesem Kapitel wird auf die Ergebnisse eingegangen, die beim praktischen Teil dieser Diplomarbeit, anhand der unterschiedlichen Organpräparate des Meerschweinchens, erzielt wurden.

4.1. ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG DER TESTSUBSTANZ PGU186 HCl

4.1.1. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DER ARTERIA PULMONALIS

Der Versuchsablauf an isolierten Präparaten der Pulmonalarterie erfolgte wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben. Anhand von vier Versuchen untersuchte man die Wirkung von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.

In Tabelle 6 sind die errechneten Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) in mN sowie in % im Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationsstufen zusammengefasst. Weiters geben die Variablen n Auskunft über die Anzahl der Versuche und P Auskunft über die entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeit.

PGU186HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	9,87 \pm 0,97	100 \pm 0	4	---
1	8,96 \pm 0,87	-9,06 \pm 1,39	4	n.s.
3	7,37 \pm 0,76	-25,40 \pm 1,44	4	0,05
10	3,80 \pm 0,75	-62,52 \pm 6,04	4	0,01
30	1,59 \pm 0,18	-83,195 \pm 2,84	4	0,001
100	1,07 \pm 0,33	-92,27 \pm 2,60	4	0,001

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von PGU186 HCl an Präparaten von Arteria pulmonalis

Der Kontrollwert wurde festgelegt, indem man den arithmetischen Mittelwert der Versuchsgesamtheit errechnete. Er betrug im Rahmen der Versuchsreihe an Präparaten der Pulmonalarterie 9,87 \pm 0,97 mN. Nach Durchlaufen der ersten Konzentrationsstufe war bereits eine schwache Wirkung von PGU186 HCl auf den Darm ersichtlich. Diese steigerte sich im Verlauf der folgenden Konzentrationsstufen deutlich. Bei einer Organbadkonzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ war bereits eine signifikante dilatierende Wirkung festzustellen. Somit konnte im Laufe dieser Versuchsreihe ein EC_{50} -Wert bei einer Konzentration von 6,6 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden, was bedeutet, dass bei dem genannten Wert eine halbmaximale Dilatation des Organpräparats eingetreten ist. In Folge einer Ermittlung eines EC_{50} -Werts bei solch einer geringen Konzentration kann PGU186 HCl, in Bezug auf seine dilatierende Wirkung auf die Pulmonalarterie, als potentiell stark wirksame Substanz eingestuft werden.

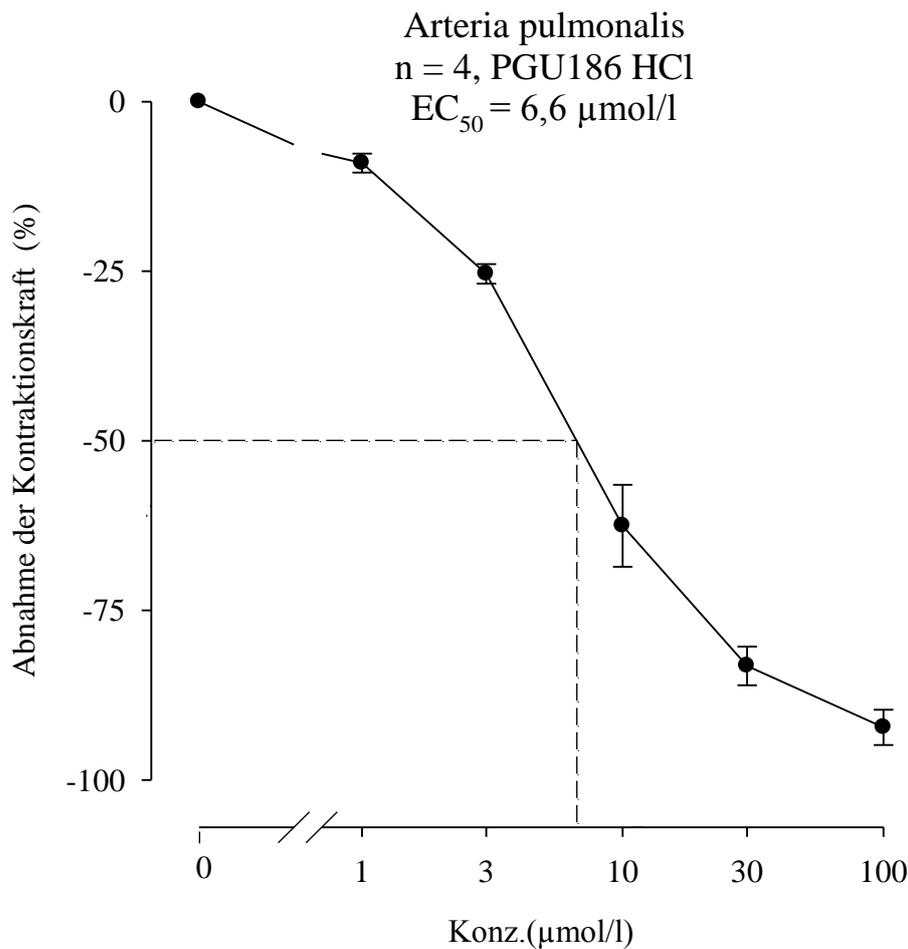


Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PGU186 HCl an Arteria pulmonalis

In Diagramm 1 wird die effektive Wirkung der Testsubstanz graphisch dargestellt. Auf der x-Achse ist die kumulative Zugabe der einzelnen Konzentrationsstufen in µmol/l logarithmisch veranschaulicht, die y-Achse stellt die Abnahme der Kontraktionskraft in % dar. Die Punkte im Verlauf der Kurve markieren die Mittelwerte der unterschiedlichen Konzentrationen von PGU186 HCl im Organbad. Die durch diese Punkte senkrecht verlaufenden Balken symbolisieren die jeweiligen Standardfehler.

Man kann anhand von Diagramm 1 deutlich erkennen, dass, bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz im Organbad, die Kontraktionskraft der Pulmonalarterienpräparate sank. Die Kontraktionskraft bei einer Konzentrationsstufe von 100 µmol/l ist deutlich schwächer als jene zu Beginn der Versuche.

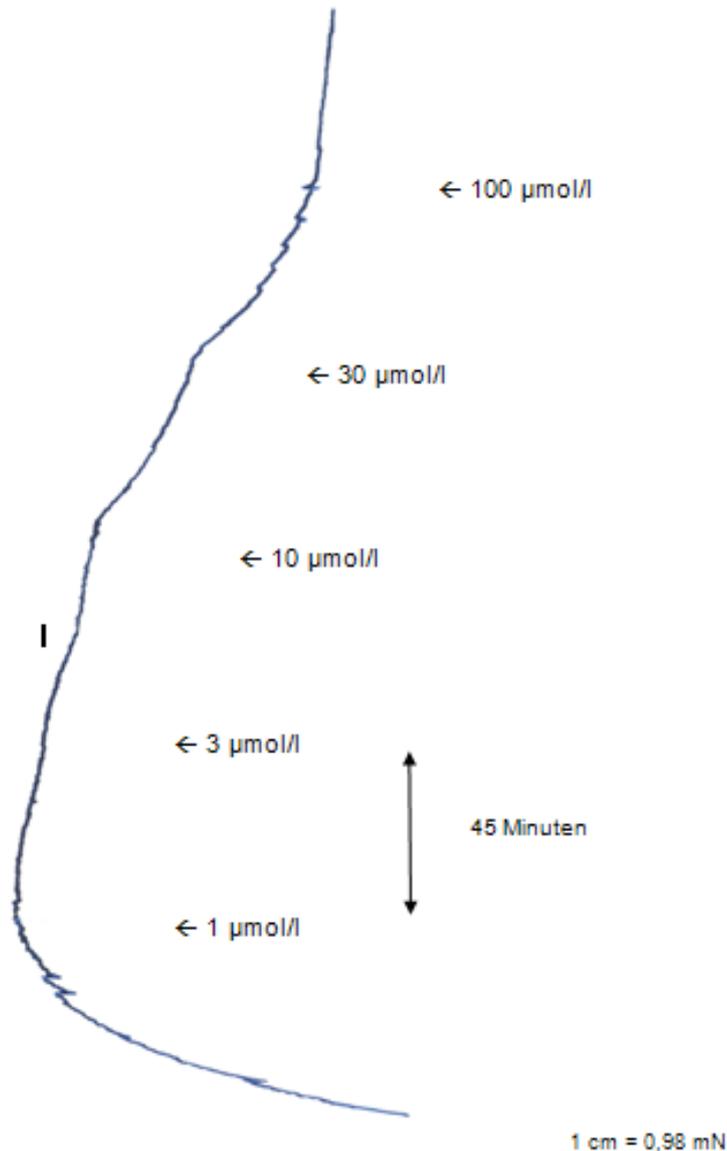


Abbildung 14: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

In Abbildung 14 sieht man die vom Schreiber dokumentierte Aufzeichnung eines Versuches dieser Versuchsreihe. Auch hier ist die Abnahme der Kontraktionskraft der Pulmonalarterie durch Einwirken von PGU186 HCl deutlich zu erkennen. Der stetige Abfall der aufgezeichneten Kurve zeigt die Abnahme der Gefäßkontraktion. Die Pfeile neben der abgebildeten Kurve markieren die Zeitpunkte, zu denen die Substanzzugabe erfolgte. Somit ist die kumulative Substanzzugabe der einzelnen Konzentrationsstufen in einem zeitlichen Abstand von je 45 Minuten anhand der Kurve klar nachzuvollziehen.

4.1.2. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DER AORTA DESCENDENS

Der Versuchsablauf wurde, wie in Kapitel 3.5.4. beschrieben, durchgeführt. Zur Untersuchung der Kontraktionskraft der Aorta descendens wurden folglich 4 Versuche herangezogen. Der Kontrollwert konnte durch Errechnung des arithmetischen Mittelwertes der Versuchsgesamtheit erhoben werden und betrug $9,24 \pm 1,26$ mN. Man konnte auch hier im Verlauf der Versuche unter Einfluss der kumulativ zugegebenen Testsubstanz eine eindeutige, jedoch etwas schwächere Abnahme der Kontraktionskraft beobachten.

Die hier abgebildete Tabelle veranschaulicht die Anzahl der durchgeführten Versuche n sowie die berechneten Mittelwerte samt deren Standardabweichungen in mN und in Prozent und die gemessene Irrtumswahrscheinlichkeit P, in Bezug auf die einzelnen Konzentrationsstufen.

PGU186HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums wahrscheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	$9,24 \pm 1,26$	100 ± 0	4	---
1	$8,56 \pm 1,23$	$-6,26 \pm 0,67$	4	n.s.
3	$7,60 \pm 1,17$	$-18,12 \pm 1,80$	4	0,05
10	$5,48 \pm 1,27$	$-42,41 \pm 5,53$	4	0,01
30	$3,33 \pm 0,48$	$-63,52 \pm 3,26$	4	0,001
100	$2,40 \pm 0,71$	$-75,33 \pm 4,10$	4	0,001

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von PGU186 HCl an Präparaten von Aorta descendens

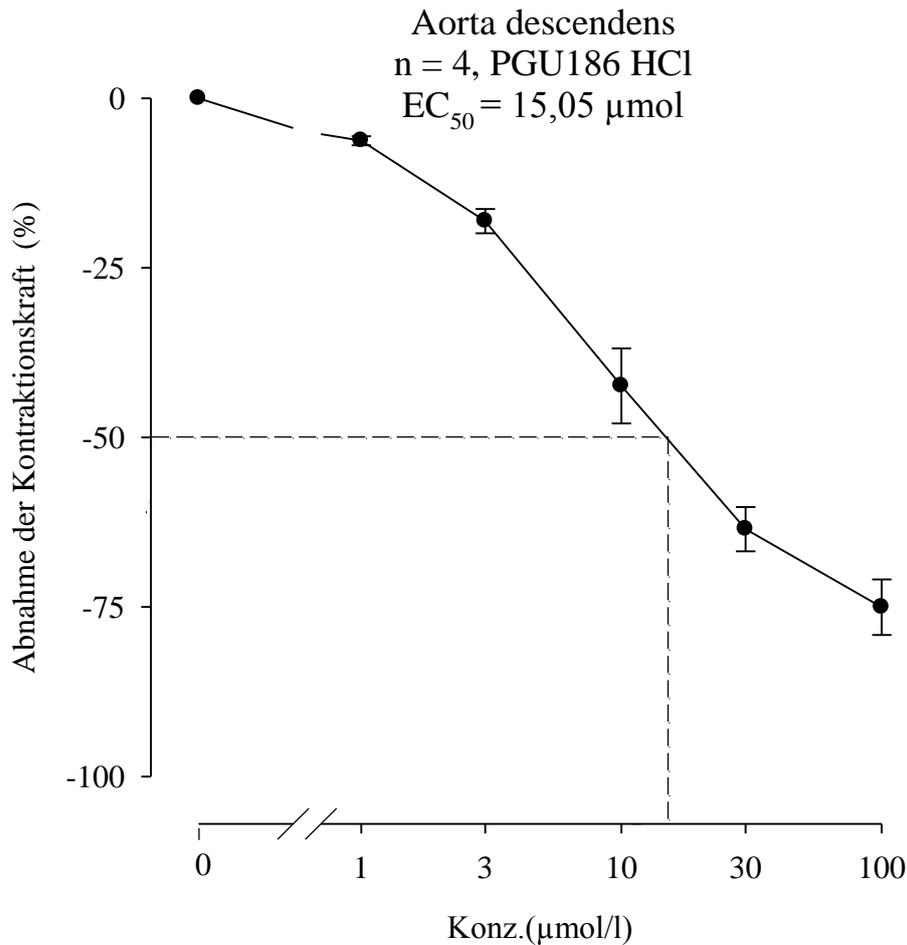


Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PGU186 HCl an Aorta descendens

Diagramm 2 stellt anhand der ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurve den Einfluss von PGU186 HCl auf Aortenpräparate graphisch dar. Die Abszisse zeigt die Konzentration der Testsubstanz im Organbad in µmol/l, die Ordinate spiegelt die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft wider.

Es ist klar ersichtlich, dass auch hier die Einwirkung der Testsubstanz einen starken Einfluss auf die Kontraktionskraft auf die Organpräparate hatte. PGU186 HCl bewirkte bei den ersten zwei Konzentrationsstufen, 1 µmol/l und 3 µmol/l, eine schwache Dilatation der vorkontrahierten Aortenpräparate. Bei der folgenden verstärkten Konzentration der Testsubstanz stieg diese Wirkung stärker an. Folglich konnte in dieser ebenfalls ein EC₅₀-Wert ermittelt werden, welcher bei einer Konzentration von 15,05 µmol/l lag.

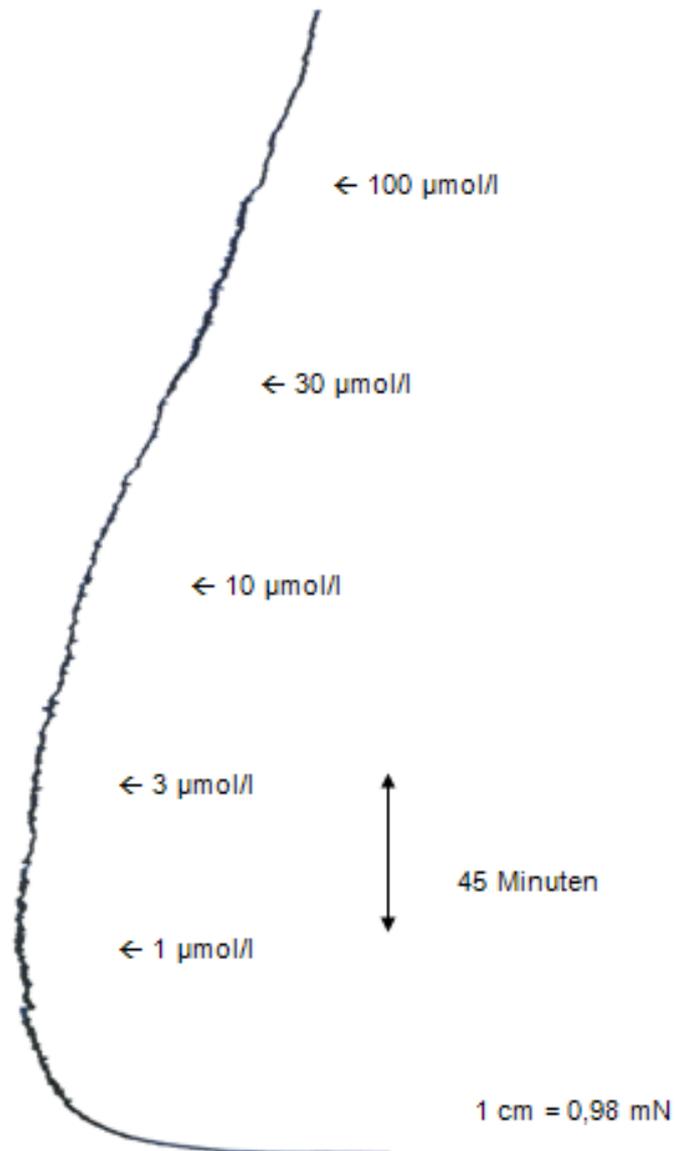


Abbildung 15: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta descendens

In Abbildung 15 ist die Wirkung der Testsubstanz und somit die Abnahme der Kontraktionskraft noch einmal zu beobachten. Die Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Flachbrettschreibers von einem Versuch, welcher im Laufe der Versuchsreihe an isolierten Aortenpräparaten, dokumentiert wurde. Durch die seitlich angeführten Pfeile sind die Zeitpunkte der kumulativen Substanzzugabe mit einem zeitlichen Abstand von je 45 Minuten deutlich veranschaulicht.

4.1.3. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DES ILEUM TERMINALIS

Der Versuchsablauf an Präparaten des isolierten Ileum terminalis erfolgte wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben. Anhand von vier Versuchen konnte ermittelt werden, welchen Einfluss PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft von isolierten Darmpräparaten hatte.

In Tabelle 8 sind die errechneten Mittelwerte inklusive deren Standardfehler, sowohl in mN als auch in Prozent, zusammengefasst. Weiters gibt n die Anzahl der Versuche an und P die entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeit.

PGU186H Cl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	7,73 \pm 0,59	100 \pm 0	4	---
1	4,40 \pm 0,28	-42,76 \pm 2,50	4	0,05
3	1,52 \pm 0,39	-79,56 \pm 5,92	4	0,001
10	0,20 \pm 0,54	-97,65 \pm 7,11	4	0,001

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von PGU186 HCl an Präparaten des Ileum terminalis

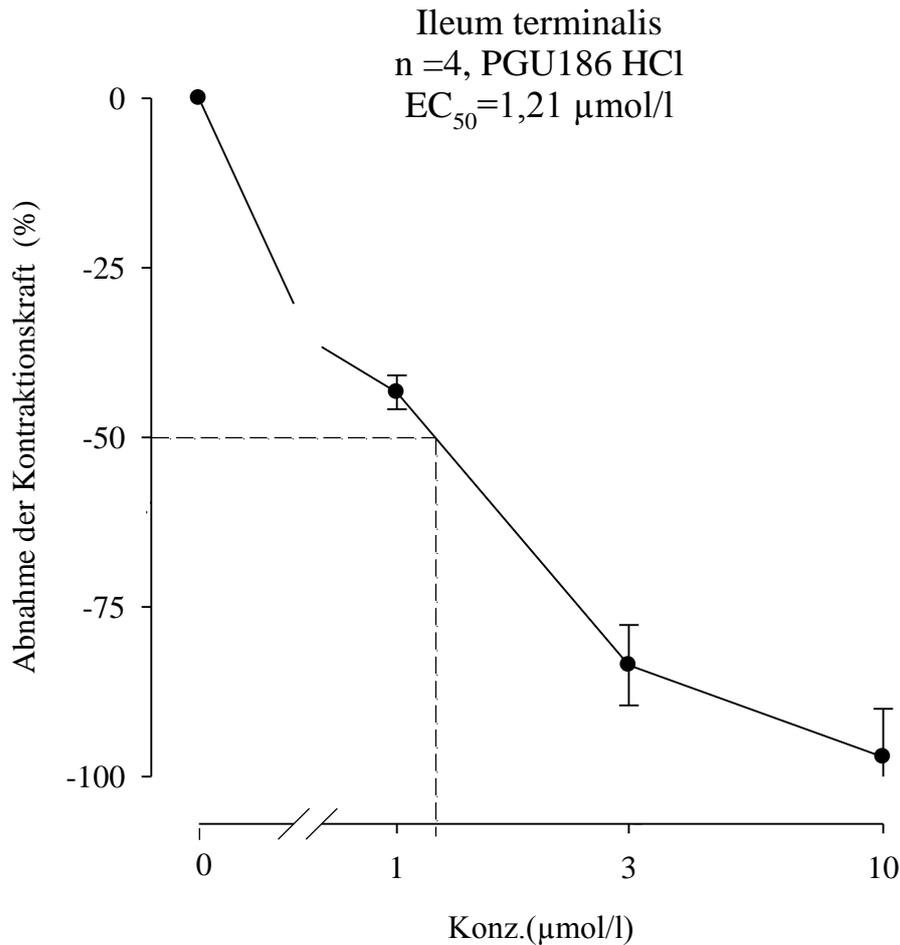


Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PGU186 HCl an Ileum terminalis

Dieses Diagramm stellt den Einfluss von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft von isolierten Darmpräparaten anhand einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve graphisch dar. Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen, die y-Achse gibt die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft an.

Hier ist bereits eine signifikante spasmolytische Wirkung von PGU186 HCl nach Zugabe von 1 µmol/l zu beobachten. Bereits bei einer Konzentration von 10 µmol/l Testsubstanz im Organbad wurde die maximal mögliche Spasmolyse erreicht. In Folge dessen sank die Substanzkonzentration im glösten Zustand, was wiederum zu einer Abnahme der spasmolytischen Wirkung an den Darmpräparaten führte. Aufgrund der starken Wirkung der Testsubstanz konnte ein EC₅₀-Wert bei einer Organbadkonzentration von 1,21 µmol/l festgestellt werden.

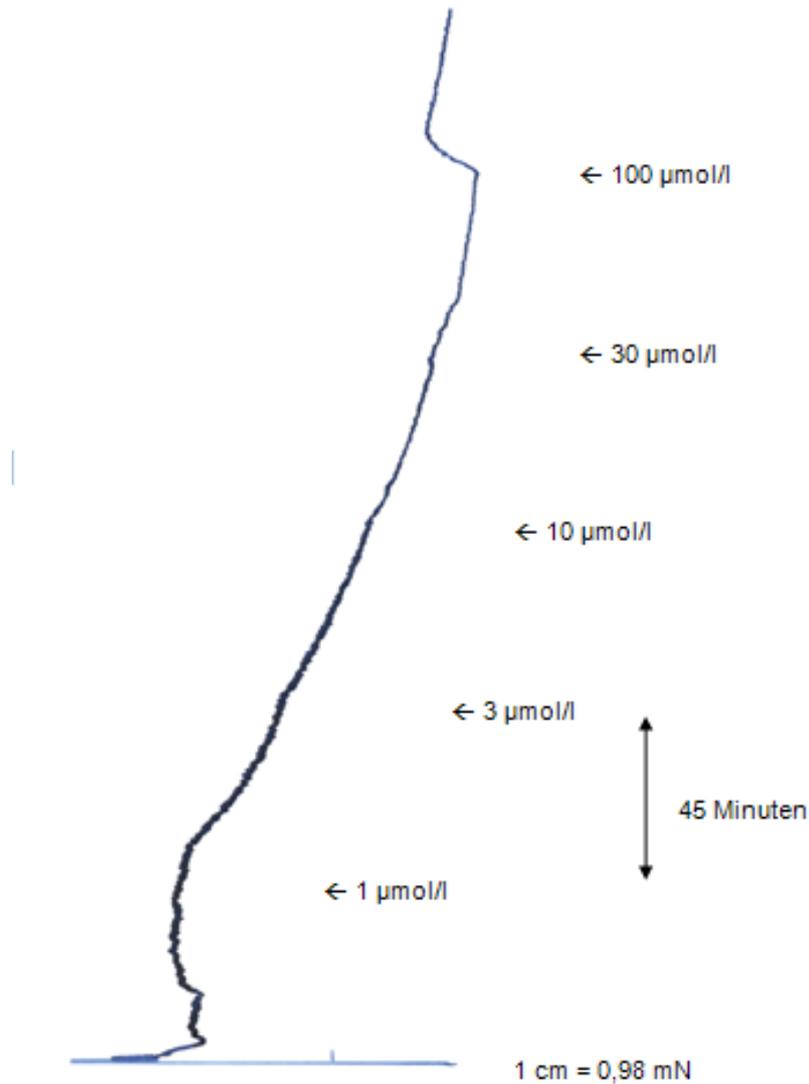


Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft des Ileum terminalis

Anhand dieser Originalaufzeichnung eines Schreibers wird die spasmolytische Wirkung von PGU186 HCl auf das Ileum noch einmal bestätigt. Man erkennt die steil abfallende Kurve und es ist aufgrund der seitlich angeführten Pfeile, welche die Zeitpunkte der Substanzzugabe in einem Abstand von je 45 Minuten kennzeichnen, deutlich ersichtlich, dass die maximal mögliche Spasmolyse, also die Erreichung der Nulllinie, bereits nach der dritten Konzentrationsstufe erreicht wurde.

PGU186 HCl kann also auch in Bezug auf seine spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur des Ileum terminalis als hoch wirksam eingestuft werden.

4.1.4. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE SCHLAGFREQUENZ DES ATRIUM CORDIS DEXTRUM

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Wirkung von PGU186 HCl auf die Chronotropie des rechten Vorhofes zu ermitteln, wurden auch hier vier Versuche zur Auswertung herangezogen. Der Kontrollwert wurde auch im Zuge dieser Versuchsreihe durch Berechnung des Mittelwertes erhoben. Er betrug, wie in Tabelle 9 ersichtlich, $148,75 \pm 16,38$ Schläge pro Minute. Weiteres sind in der Tabelle die Versuchsanzahl n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P und die Mittelwerte (f) samt deren Standardabweichungen (SEM), hinsichtlich der kumulativen Substanzzugabe, angegeben. Die Größen f und SEM wurden sowohl in Anzahl der Schläge pro Minute als auch prozentuell angeführt.

PGU186HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (x/min)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	$148,75 \pm 16,38$	0 ± 0	4	---
1	$118,75 \pm 13,13$	$-20,11 \pm 1,77$	4	0,05
3	$100,0 \pm 10,41$	$-32,11 \pm 3,80$	4	0,01
10	$62,5 \pm 9,24$	$-58,68 \pm 2,14$	4	0,01
30	$11,25 \pm 11,25$	$-88,75 \pm 11,25$	4	0,001

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von PGU186 HCl an Präparaten des Atrium cordis dextrum

PGU186 HCl zeigte im Laufe der Versuchsreihe am isolierten Vorhofpräparaten eine signifikante Abnahme der Schlagfrequenz, also eine negativ chronotrope Wirkung.

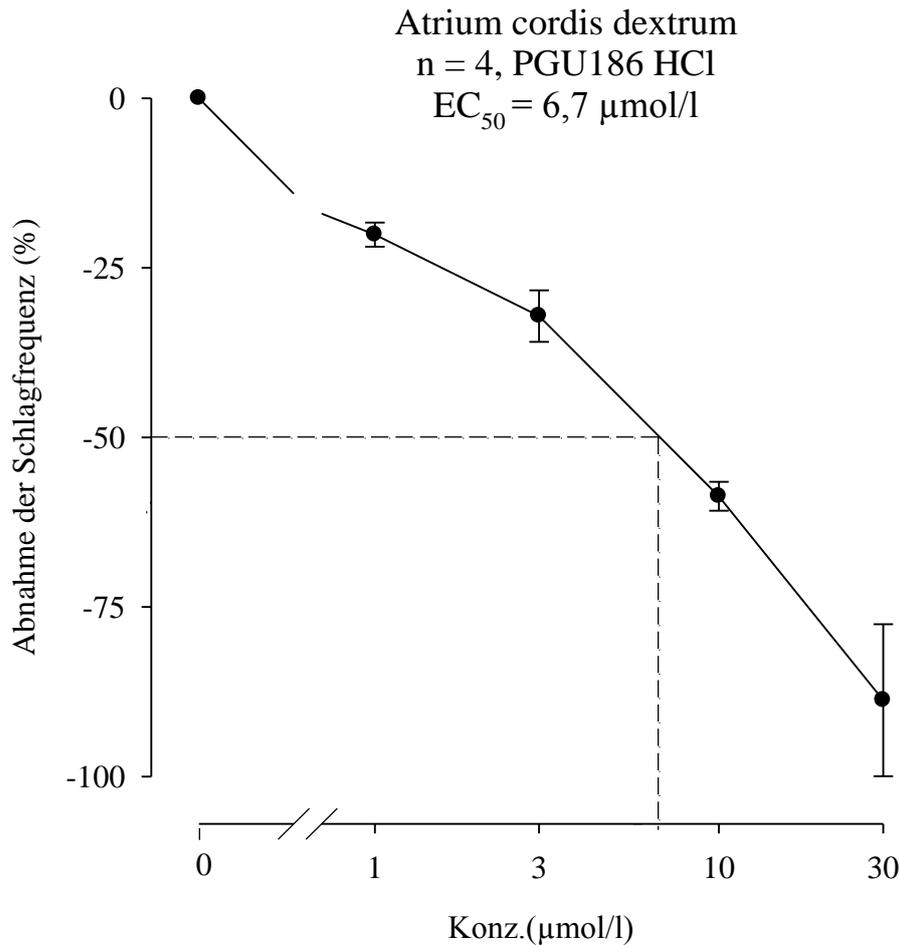


Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PGU186 HCl an Atrium cordis dextrum

Anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Diagramm 4 ist die Veränderung der Chronotropie im Laufe dieser Versuchsreihe graphisch dargestellt. Die Abszisse dieser Graphik gibt die Substanzkonzentration von PGU186 HCL im Organbad in µmol/l an. Die Ordinate zeigt die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz.

Das steile Abfallen der Kurve ist als eine starke Abnahme der Schlagfrequenz zu deuten. Eine signifikant negativ chronotrope Wirkung konnte bereits nach Zugabe von 1 µmol/l PGU186 HCl ins Organbad festgestellt werden. Auch hier war die Wirkung der Testsubstanz so stark, dass ein EC₅₀-Wert ermittelt werden konnte. Er lag bei einer Konzentration von 6,7 µmol/l der Testsubstanz. Nach Zugabe der dritten Konzentrationsstufe war der Einfluss des Resveratrolderivats auf die isolierten Vorhofpräparate so stark, dass eine Schlagfrequenz nun nicht mehr gemessen werden konnte.

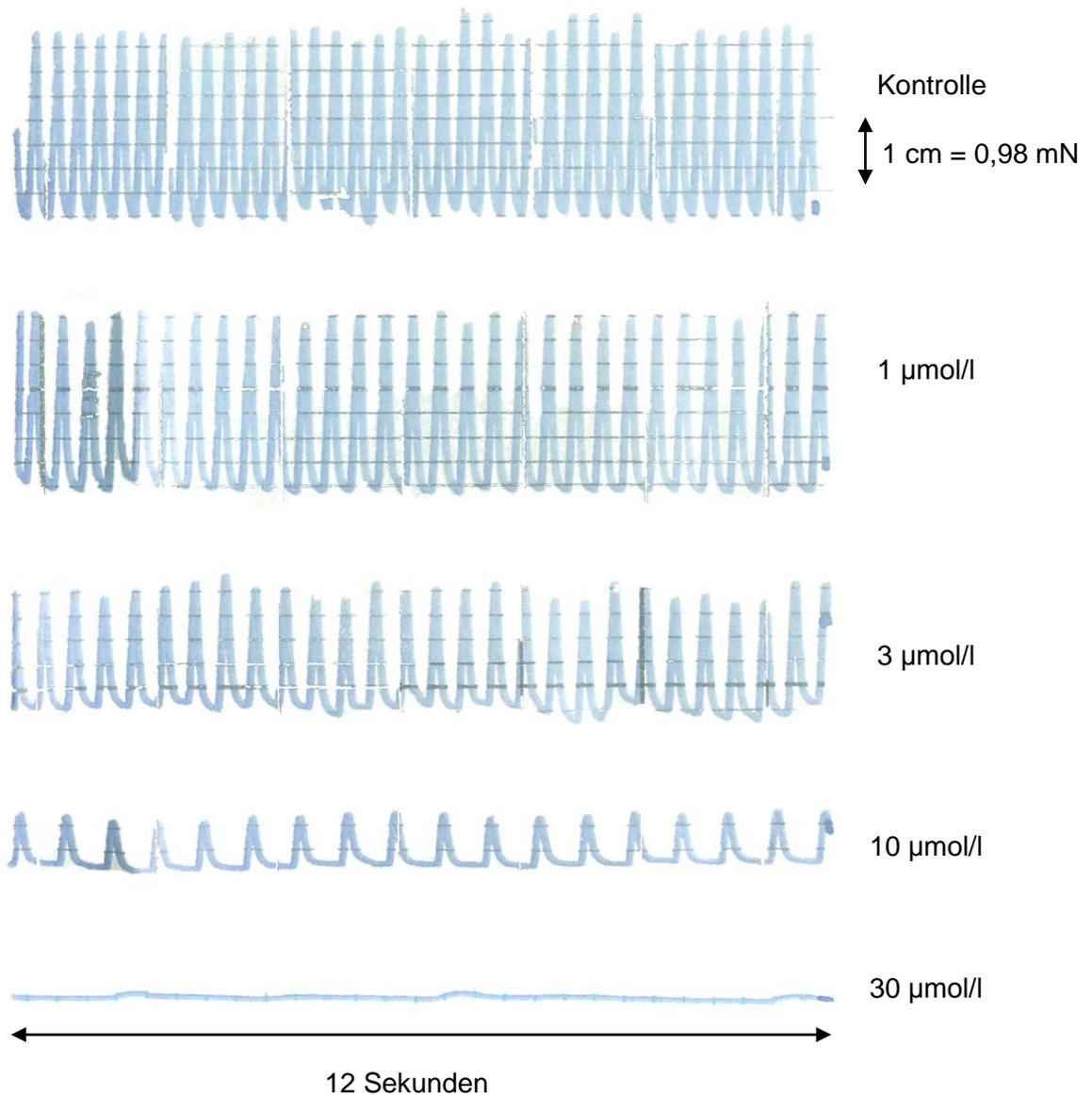


Abbildung 17: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU186 HCl auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum

In der hier angeführten Originalaufzeichnung ist die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz noch einmal ersichtlich. Man erkennt, am hier abgebildeten Beispiel einer der vier Versuche, welche zur Untersuchung der chronotropen Wirkung der Testsubstanz, herangezogen worden sind, dass die Anzahl der Amplituden proportional zur steigenden Substanzkonzentration abnimmt.

4.1.5. WIRKUNG VON PGU186 HCl AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT DES MUSCULUS PAPILLARIS

Diese Versuchsreihe diente der Untersuchung der inotropen Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagkraft des Papillarmuskels. Man wertete die Ergebnisse anhand von 4 Versuchen aus. Bei dieser Versuchsreihe wurde ein Kontrollwert von $1,39 \pm 0,54$ mN ermittelt. Nach Stabilisierung der isolierten Organpräparate hat man auch hier mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. PGU186 HCl zeigte schon bei Zugabe der ersten Konzentrationsstufe einen negativ inotropen Einfluss auf die Kontraktionskraft. Diese Wirkung wurde durch jede Erhöhung der Substanzkonzentration im Organbad, alle 45 Minuten, deutlich verstärkt. Schließlich mussten die Versuche, spätestens kurz nach Zugabe der letzten Konzentrationsstufe, frühzeitig abgebrochen werden, weil nun die Kontraktionskraft so schwach war, dass der Schreiber keine erkennbaren Schläge mehr aufzeichnen konnte.

In der nachfolgenden Tabelle werden die erhaltenen Ergebnisse dieser Versuchsreihe gezeigt. Neben der Versuchsanzahl n und der Irrtumswahrscheinlichkeit P werden wieder Mittelwert (f_c) samt Standardfehler (SEM) in mN und in Prozent angegeben.

PGU186HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	$1,39 \pm 0,54$	0 ± 0	4	---
1	$1,28 \pm 0,47$	$-4,02 \pm 7,99$	4	n.s.
3	$1,18 \pm 0,44$	$-11,97 \pm 8,24$	4	n.s.
10	$1,15 \pm 0,45$	$-18,05 \pm 5,01$	4	0,05
30	$0,68 \pm 0,28$	$-51,85 \pm 3,67$	4	0,01
100	$0,68 \pm 0,29$	$-52,48 \pm 1,57$	4	0,01

Tabelle 10: Versuchsergebnisse von PGU186 HCl an Präparaten des Musculus papillaris

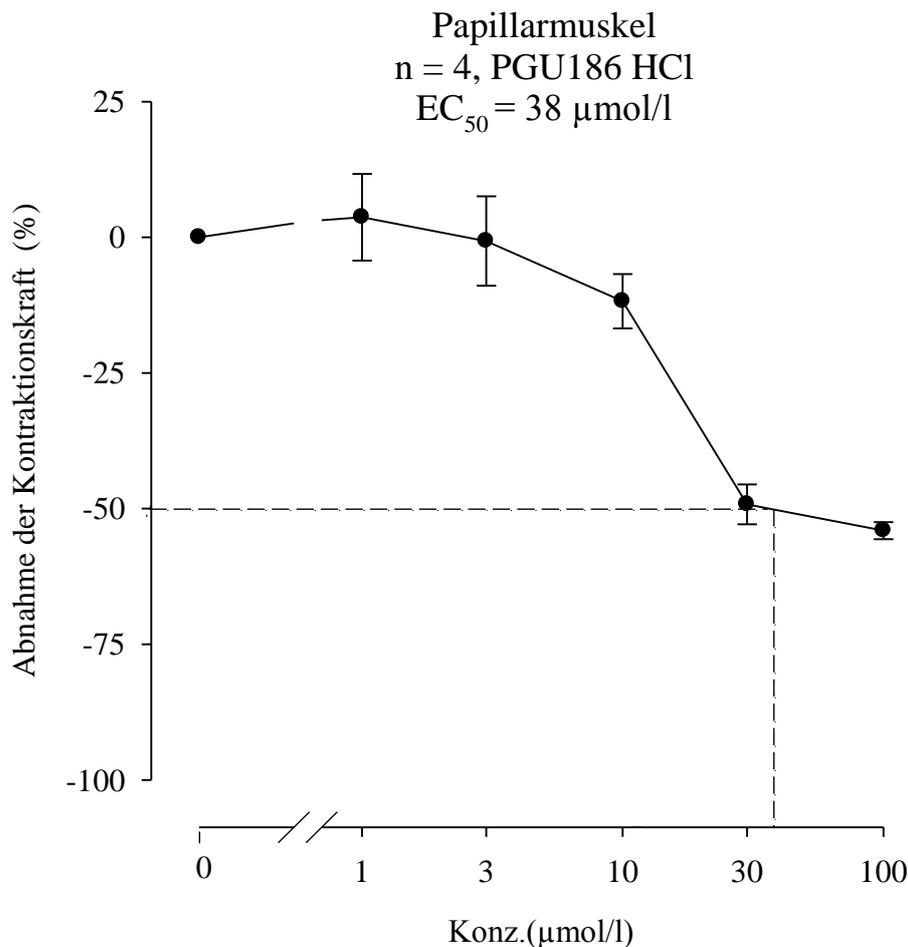


Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PGU186 HCl an Musculus papillaris

In Diagramm 5 ist die Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagkraft der isolierten Papillarmuskelorgane graphisch dargestellt. Die Abszisse zeigt logarithmisch die Konzentration von PGU186 HCl im Organbad in µmol/l. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in Prozent abzulesen. Die Punkte auf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve symbolisieren die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen, die vertikalen Striche, die durch diese Punkte gezogen wurden, stehen für die Streuung der Standardfehler.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in dem hier abgebildeten Diagramm 5 zeigt einen leichten Anstieg nach Zugabe der ersten Konzentrationsstufe, es erfolgte hier also eine leichte Steigerung der Schlagkraft. Im weiteren Versuchsverlauf wurde eine Abnahme der Schlagkraft beobachtet. PGU186 HCl erreichte einen EC₅₀-Wert von 38 µmol/l und somit kann seine Wirkung als negativ inotrop eingestuft werden.

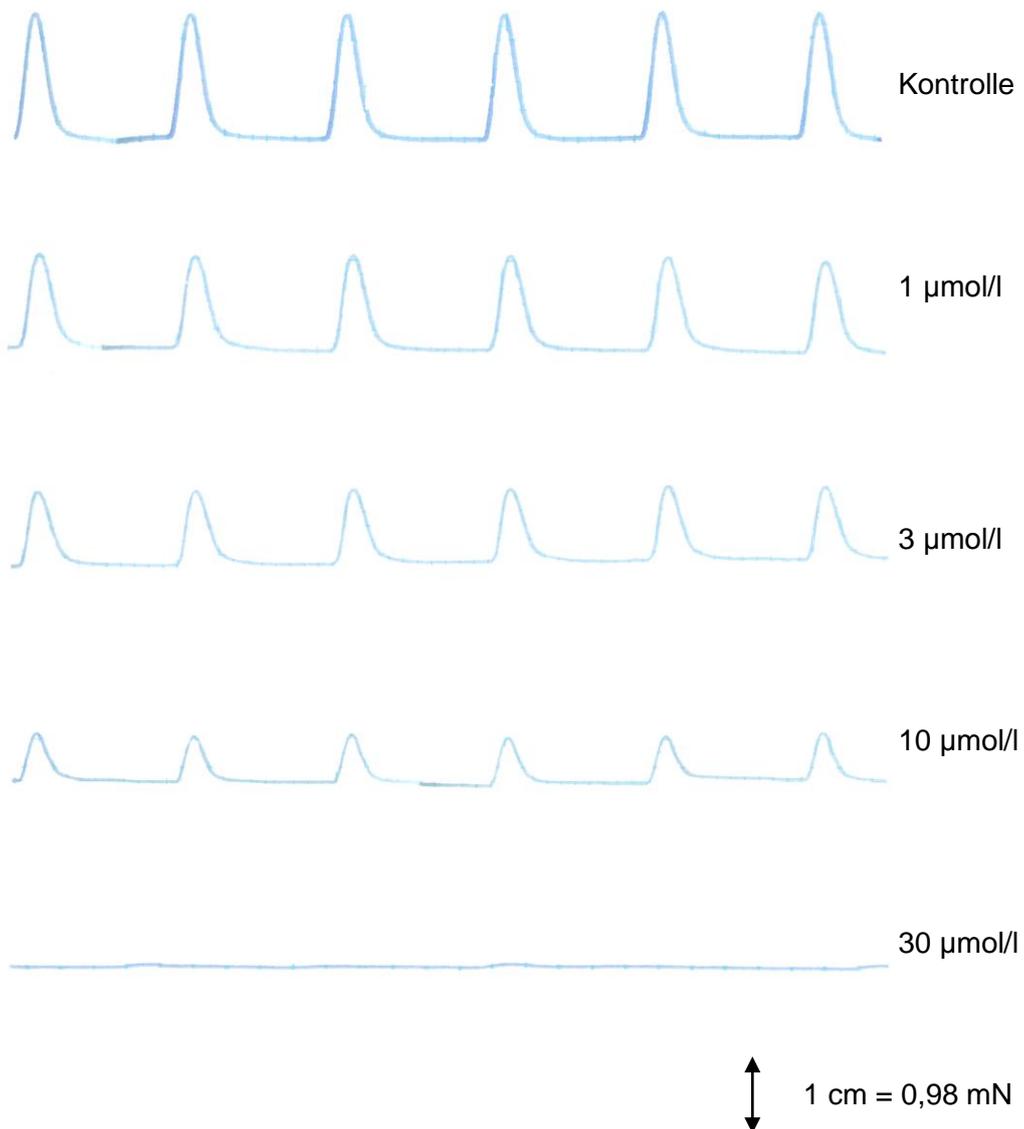


Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU186 HCl auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

Anhand der in Abbildung 18 angeführten Originalaufzeichnung erkennt man an der kontinuierlichen Abnahme der Amplitudenlänge deutlich die signifikant negativ inotrope Wirkung von PGU186 HCl. Bereits bei einer Substanzkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ waren die Amplituden kaum noch bis gar nicht mehr erkennbar.

4.2. ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG DES WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl

Bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen auf die Wirkung von PGU186 HCl an den Organpräparaten von Aorta descendens, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis konnte eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet werden. Folglich führte man nun drei neue Versuchsreihen an den genannten glattmuskulären, isolierten Organpräparaten durch, um den Wirkmechanismus unter Zugabe von Nitro-L-Arginin analysieren zu können. Der Ablauf der Versuche wurde in Kapitel 3.6 näher erläutert.

4.2.1. WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl AN ISOLIERTEN ORGANPRÄPARATEN DER ARTERIA PULMONALIS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ

Nach einer chemischen Vorkontraktion des Organpräparates mit Hilfe einer KCl-Tyrode-Lösung ermittelte man in dieser Versuchsreihe einen Kontrollwert von $11,61 \pm 0,36$ mN. Danach folgte die Substanzzugabe. Zuerst führte man $100 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin dem Organbad zu. Nach 45 Minuten Anpassungszeit erfolgte die Zugabe der Testsubstanz in einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$.

Es werden nun die arithmetischen Mittelwerte inklusive deren Standardfehler in mN, die Versuchsanzahl n und die entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeiten P anhand einer Tabelle veranschaulicht.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$11,61 \pm 0,36$	3	---
$100 \mu\text{mol}$ Nitro-L-Arginin	$12,99 \pm 0,61$	3	---
+ $10 \mu\text{mol}$ PGU186 HCl	$11,17 \pm 0,62$	3	n.s.

Tabelle 11: Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Arteria pulmonalis

**Arteria pulmonalis, Nitro-L-Arginin
PGU 186 HCl, 10 μ mol/l
n = 3**

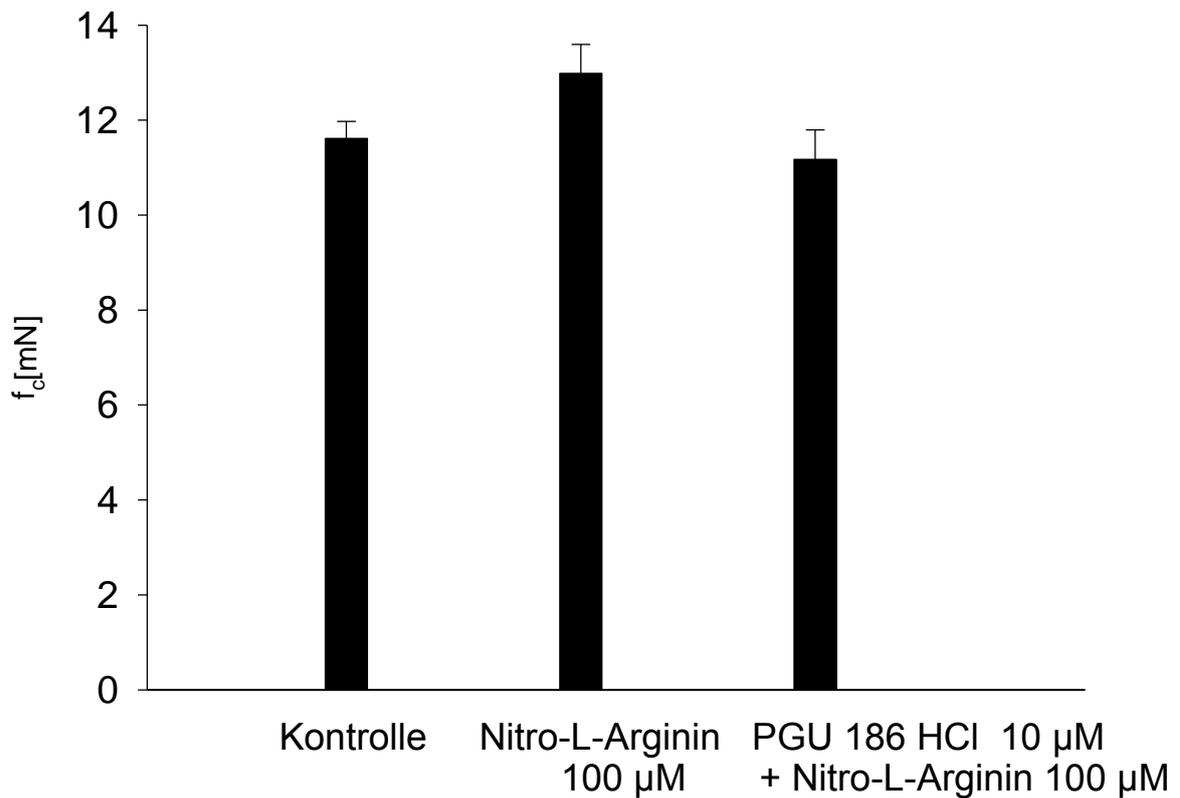


Diagramm 6: Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Arteria pulmonalis

Das hier angeführte Diagramm 6 zeigt ein Balkendiagramm, in welchem die Ergebnisse graphisch dargestellt werden. Die Abszisse zeigt wiederum die Substanzkonzentrationen in μ mol/l und die Ordinate die Kontraktionskraft in mN. Auch hier stehen die Balken für die erhaltenen Mittelwerte dieser Versuchsreihe und die strichförmigen Verlängerungen an deren oberen Enden symbolisieren die Standardfehler.

Anhand dieses Diagramms ist klar ersichtlich, dass es nach Zugabe der 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin zu einer Verstärkung der Kontraktionskraft der bereits vorkontrahierten Organpräparate kam. Die anschließende Zugabe von PGU186 HCl führte, im Vergleich zum Kontrollwert, nur zu einer leichten Relaxation des Gefäßringes.

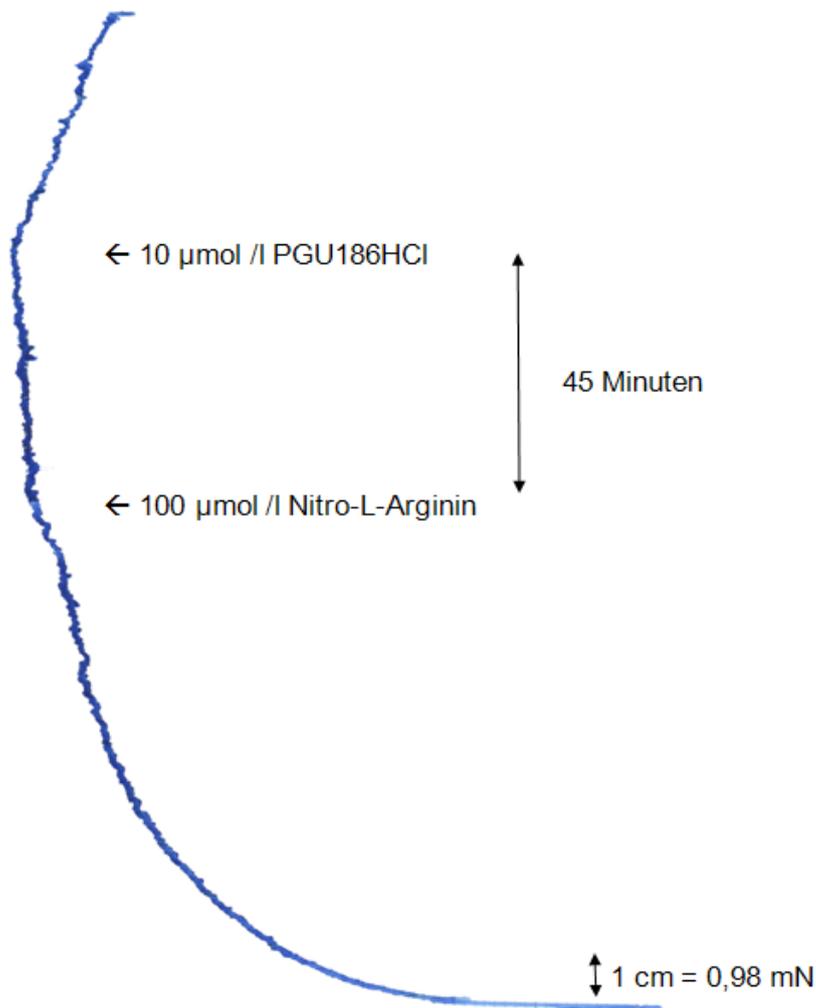


Abbildung 19: Originalaufzeichnung eines Versuches zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Arteria pulmonalis

In Abbildung 19 sieht man, anhand einer Originalaufzeichnung des Flachbrettschreibers, wie die aufgezeichnete Kurve zuerst, durch Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin, ein wenig ansteigt und später, durch Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz, deutlich abfällt.

4.2.1. WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl AN ISOLIERTEN ORGANPRÄPARATEN DER AORTA DESCENDENS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ

Nachdem das isolierte Organpräparat im Organbad mittels einer KCl-Tyrode-Lösung maximal vorkontrahiert wurde, konnte man in dieser Versuchsreihe einen Kontrollwert von $3,72 \pm 0,74$ mN ermitteln. Danach erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin und folglich eine Anpassungsphase von 45 Minuten. Anschließend wurden die $20 \mu\text{mol/l}$ PGU186 HCl ins Organbad pipettiert und weitere 45 Minuten abgewartet.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$3,72 \pm 0,74$	4	---
$100 \mu\text{mol}$ Nitro-L-Arginin	$3,17 \pm 1,09$	4	---
+ $20 \mu\text{mol}$ PGU186 HCl	$1,08 \pm 0,29$	4	0,05

Tabelle 12: Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Aorta descendens

In Tabelle 12 sind die arithmetischen Mittelwerte (f_c) samt Standardfehler (SEM) in mN, die Anzahl der Versuche n und die entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeiten P angegeben.

**Aorta, Nitro-L-Arginin
PGU 186 HCl, 20 $\mu\text{mol/l}$
n = 4**

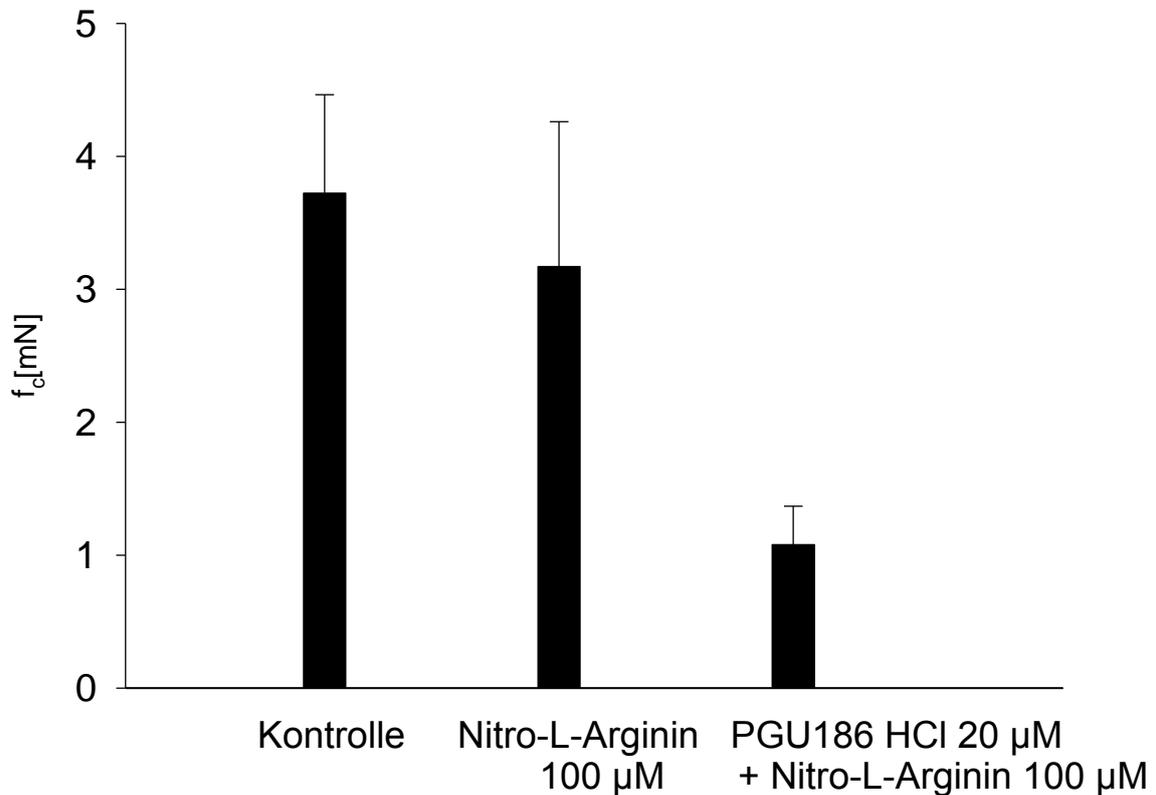


Diagramm 7: Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Aorta descendens

Diagramm 7 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Versuchsreihe anhand eines Balkendiagramms. An der x-Achse sind die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in $\mu\text{mol/l}$ angegeben, während die y-Achse die Kontraktionskraft in mN widerspiegelt. Die abgebildeten Balken ergeben sich aus den errechneten Mittelwerten. Die strichförmigen Verlängerungen an den Balken geben die entsprechenden Standardfehler an. Der erste Balken von links steht für den Kontrollwert. Der mittlere Balken zeigt eine Abnahme der Kontraktionskraft durch Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin. Der dritte Balken stellt eine gesteigerte Abnahme durch die zusätzliche Zugabe von PGU186 HCl, in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$, dar.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine vom Flachbrettschreiber dokumentierte Originalabbildung eines Versuches aus dieser Versuchsreihe. Durch den Abfall der Kurve wird die Abnahme der Kontraktionskraft veranschaulicht.

Nach Zugabe der 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin kam es zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft des isolierten Aortenpräparates. Nach Zugabe der Testsubstanz in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten ist eine wiederholte Relaxation zu erkennen.

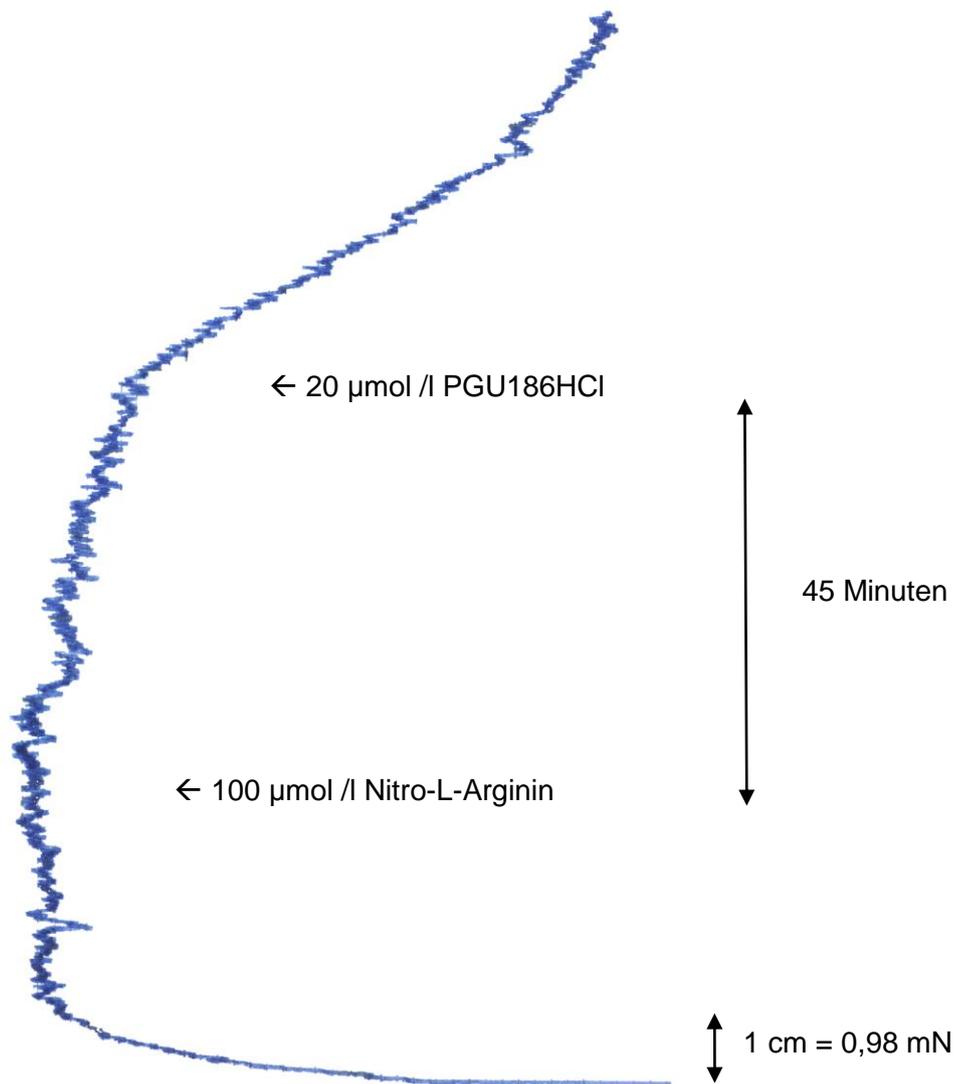


Abbildung 20: Originalaufzeichnung eines Versuches zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin an Aorta descendens

4.2.2. WIRKMECHANISMUS VON PGU186 HCl AN ISOLIERTEN ORGAN-PRÄPARATEN DES ILEUM TERMINALIS UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ

Anhand von drei Versuchen wurde ermittelt, welchen Einfluss Nitro-L-Arginin auf die Wirkung von PGU186 HCl hat. Nachdem die isolierten Darmpräparate in einer KCl-Tyrode-Lösung vorkontrahiert worden waren, führte man dem Organbad zuerst 100 µmol/l Nitro-L-Arginin und anschließend zusätzlich 20 µmol/l PGU186 HCl hinzu.

In folgender Tabelle sind wieder die Ergebnisse dieser Versuchsreihe in den gewohnten Parametern aufgelistet.

Konzentration (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	6,86 ± 0,78	3	---
100 µmol Nitro-L-Arginin	5,60 ± 0,64	3	---
+ 20 µmol PGU186 HCl	0 ± 0	3	0,001

Tabelle 13: Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin am Ileum terminalis

**Terminales Ileum, Nitro-L-Arginin
PGU 186 HCl, 20 $\mu\text{mol/l}$
n = 3**

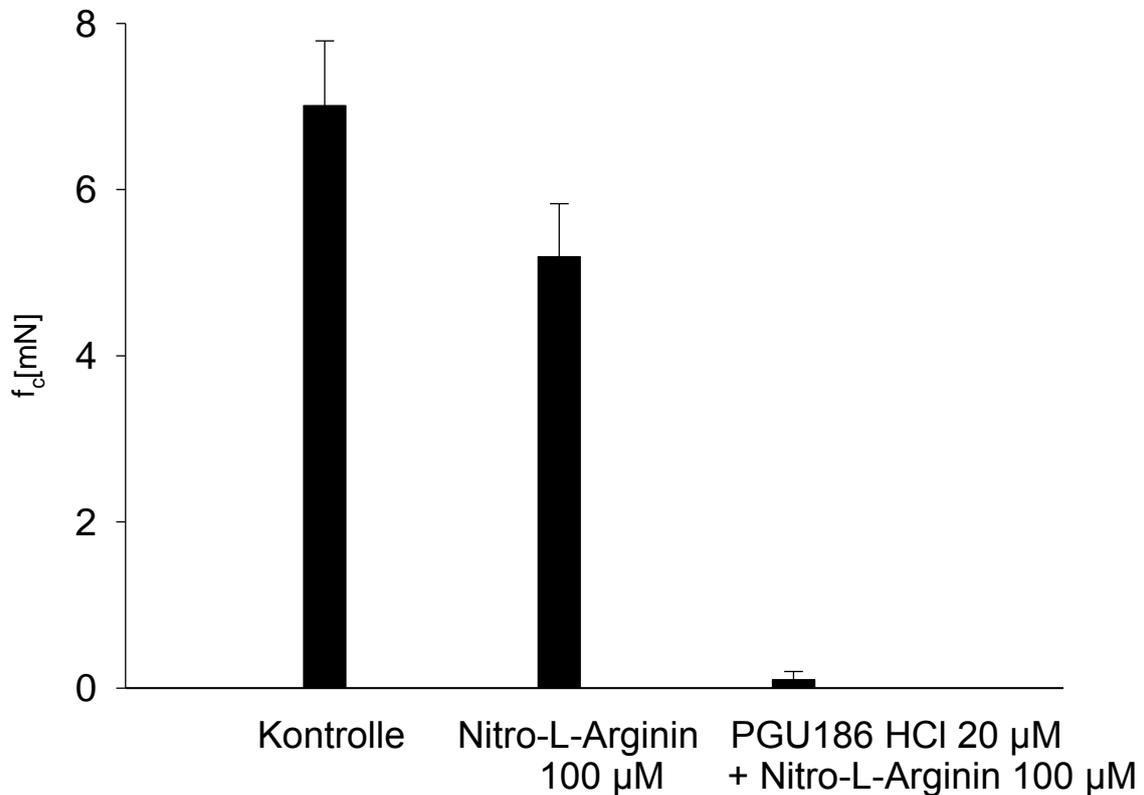


Diagramm 8: Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin am Ileum terminalis

Mit Hilfe dieses Balkendiagramms sollen die Versuchsergebnisse besser nachvollziehbar werden. Auf der x-Achse sind, wie gewohnt, die Konzentrationen der Substanzen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. Die Kontraktionskraft in mN wird auf der y-Achse wiedergegeben. Anhand der Balken, welche die arithmetischen Mittelwerte darstellen, und der verlängernden Striche, welche die Standardfehler markieren, werden die Messergebnisse hier graphisch vermittelt.

Man erkennt, dass durch Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin eine signifikante Verringerung der Kontraktionskraft eintrat. Durch die zusätzliche Zugabe der Testsubstanz erfolgte wiederum eine enorme spasmolytische Wirkung auf die Präparate des terminalen Ileum.

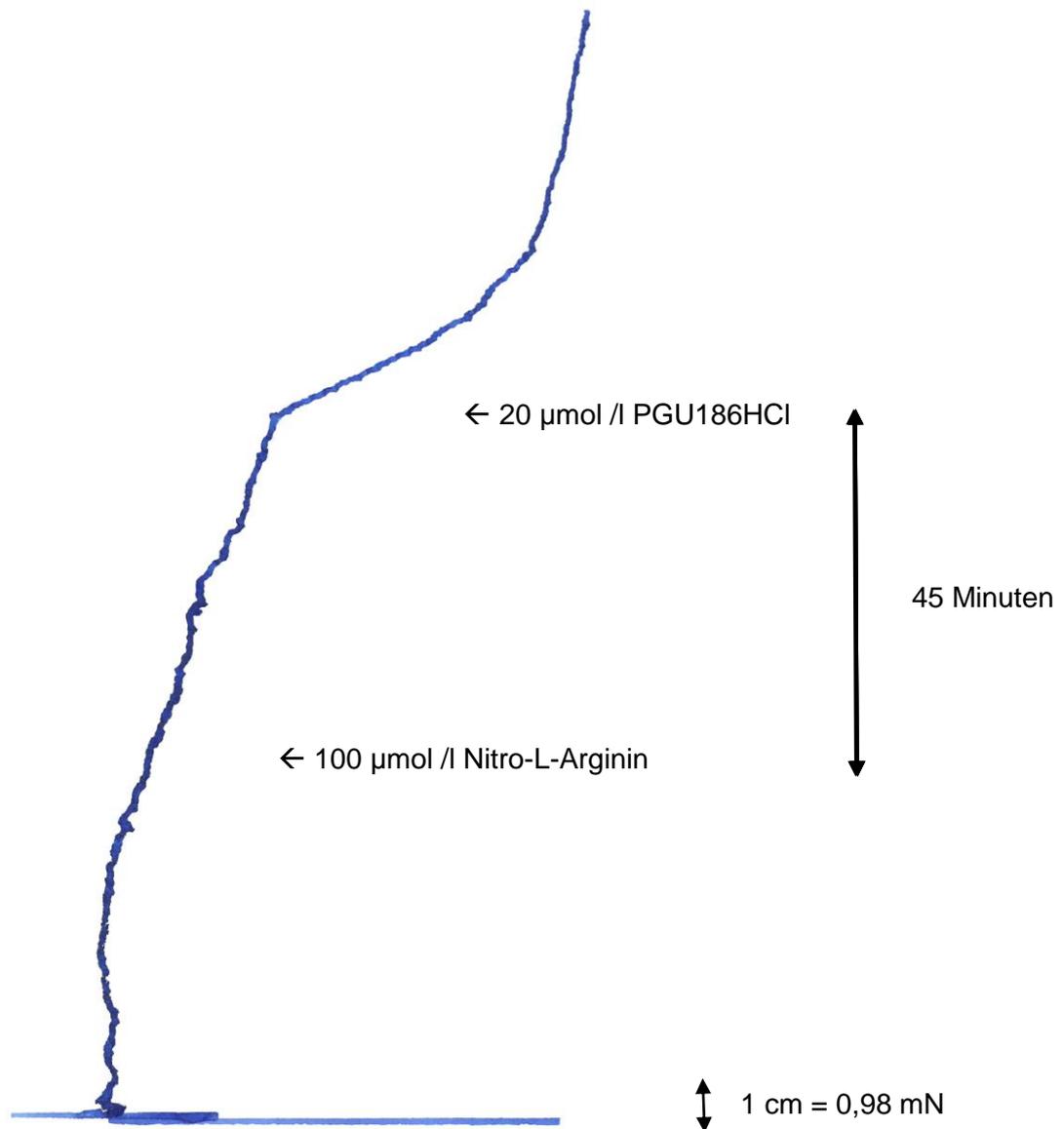


Abbildung 21: Originalaufzeichnung eines Versuches zur Untersuchung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl unter Einfluss von Nitro-L-Arginin am Ileum terminalis

Abbildung 21 zeigt noch einmal eine Originalaufzeichnung eines Versuches. Auch hier ist der steile Abfall der Kurve, also die Relaxation des Darmpräparates, nach Zugabe der Testsubstanz eindeutig erkennbar.

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die neu synthetisierte Substanz PGU186 HCl an isolierten Organen des Meerschweinchens auf seine Wirkung hin getestet. Man untersuchte auf der einen Seite, welchen Einfluss die Testsubstanz auf die Muskulatur an glattmuskulären Organpräparaten von Aorta descendens, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis ausübte. Auf der anderen Seite wurden Versuche an Herzmuskelpräparaten durchgeführt, um die Wirkung auf die Inotropie, an Präparaten des Musculus papillaris, und die Chronotropie, an Präparaten des Atrium cordis dextrum, zu testen.

Kapitel 3 beschreibt die genaue Durchführung der Versuchsreihen, die Ergebnisse der ausgewerteten Versuche werden in Kapitel 4 übersichtlich aufgelistet und erklärt. Das folgende Kapitel 5 präsentiert die erhaltenen Ergebnisse und deren Bewertung.

5.1. WIRKUNG AUF GLATTMUSKULÄRE ORGANE

Eine genaue Übersicht zu den Ergebnissen der Versuche an glattmuskulären Organpräparaten ist in den Kapiteln 4.1.1 – 4.1.3 zu finden. PGU186 HCl zeichnete sich in allen drei Versuchsreihen als stark wirksame Substanz aus, weil sie in jedem Versuch eine signifikante Dilatation bzw. Spasmolyse der chemisch vorkontrahierten Organpräparate auslöste.

Infolge dessen beschloss man weitere Versuchsreihen an den drei glattmuskulären Organen durchzuführen, um den Wirkmechanismus der Testsubstanz genauer untersuchen zu können. Genaue Informationen dazu sind im Kapitel 4.2 nachzulesen und werden in Kapitel 5.3 diskutiert.

Die nachstehende Tabelle stellt die Versuchsergebnisse der drei Versuchsreihen, die an Organpräparaten mit glatter Muskulatur durchgeführt wurden, um die Wirkung von PGU186 HCl zu testen, einander gegenüber. Es wird ersichtlich, dass sich die erhaltenen Werte in einer ähnlichen Größenordnung befinden.

Organpräparat	PGU186 HCl fc(%) ± SEM 100 µmol/l	EC ₅₀
Pulmonalarterie	-92,27 ± 2,60	6,6 µmol/l
Aorta	-75,33 ± 4,10	15,05 µmol/l
Terminales Ileum	-81,63 ± 2,81	1,21 µmol/l

Tabelle 14: Auflistung der Wirkung von PGU186 HCl auf glattmuskuläre Organpräparate

5.1.1. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DER ARTERIA PULMONALIS

Die Vasodilatation der vorkontrahierten Gefäßringe in dieser Versuchsreihe war bereits nach Zugabe der ersten Konzentrationsstufe an PGU186 HCl signifikant und sank im Verlauf der Versuche stetig weiter ab. Der Kontrollwert vor Beginn der Substanzzugabe betrug $9,87 \pm 0,97$ mN, der Endwert hingegen $1,07 \pm 0,33$ mN. Die Kontraktionskraft war folglich bei einer Substanzkonzentration von 100 µmol/l um gute 90 Prozent geringer als vor Beginn der Substanzzugabe. Somit konnte ein EC₅₀-Wert von 6,6 µmol/l ermittelt werden. Somit kann PGU186 HCl als Substanz mit einem stark dilatierenden Effekt eingestuft werden.

5.1.2. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DER AORTA DESCENDENS

An isolierten Aortenpräparaten war der Effekt der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur, im Vergleich zu den beiden anderen glattmuskulären Organpräparaten, am geringsten, jedoch nahm auch hier die Kontraktionskraft konstant ab. Hier ermittelte man einen Kontrollwert von $9,24 \pm 1,26$ mN und einen Endwert von $2,40 \pm 0,71$ mN. Die Abnahme der Kontraktionskraft von 0 µmol/l auf 100 µmol/l PGU186 HCl im Organbad betrug in diesem Fall also 75 Prozent und der erhobene EC₅₀-Wert lag bei einer Substanzkonzentration von 15,05 µmol/l. Aufgrund der Versuchsergebnisse kann man auch hier zum Schluss kommen, dass PGU186 HCl eine stark dilatierend wirksame Substanz ist.

5.1.3. WIRKUNG AUF ISOLIERTE PRÄPARATE DES ILEUM TERMINALIS

In dieser Versuchsreihe konnte der stärkste Effekt auf die glatte Muskulatur beobachtet werden. Hier nahm die Kontraktionskraft um gut 80 Prozent ab, bei einem Kontrollwert von $7,73 \pm 0,59$ mN und einem Endwert von $1,44 \pm 0,25$ mN. Der EC_{50} -Wert, der anhand Diagramm 3 ermittelt wurde, lag bei einer Substanzkonzentration von $1,21 \mu\text{mol/l}$.

5.2. WIRKUNG AUF DIE HERZMUSKULATUR

Bei den isolierten Präparaten mit Herzmuskulatur handelte es sich um den rechten Vorhof und den Papillarmuskeln. Man untersuchte, ob die Testsubstanz am rechten Vorhof zu einer Veränderung der Schlagfrequenz führte bzw. ob die Versuche am Papillarmuskel eine Aussage über die Effekte von PGU186 HCl auf die Inotropie lieferten. Um dies untersuchen zu können, mussten die Papillarmuskelpräparate über eine Elektrode gereizt werden, der rechte Vorhof hingegen nicht, weil dieser, aufgrund des autonom schlagenden Sinusknoten, spontan aktiv ist. Auch hier traten bei beiden Versuchsreihen effektive Wirkungen auf, sodass man in beiden Fällen einen EC_{50} -Wert ermitteln konnte.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse in ausgewählten Parametern.

Organpräparat	PGU186 HCl fc(%) \pm SEM 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50}
Rechter Vorhof	$0,0 \pm 0,0$	6,7 $\mu\text{mol/l}$
Papillarmuskel	$-52,48 \pm 1,57$	38 $\mu\text{mol/l}$

Tabelle 15: Auflistung der Wirkung von PGU186 HCl auf Organpräparate mit quergestreifter Muskulatur

Vergleicht man die beiden EC_{50} -Werte, so wird ersichtlich, dass die Wirkung der Testsubstanz bei den Versuchen am rechten Vorhof deutlich signifikanter ausfiel als bei jenen am Papillarmuskel.

Bei den Versuchen am rechten Vorhof war die Wirkung von PGU186 HCl auf das Organpräparat so stark, dass die Versuche noch vor Zugabe der letzten Konzentrationsstufe frühzeitig abgebrochen werden mussten, da die Funktion der isolierten Organe bei einer Substanzkonzentration von 30 µmol/l versagte und eine Schlagfrequenz folglich nicht mehr gemessen werden konnte.

Bei der Versuchsreihe am Papillarmuskel kam es ebenfalls zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft, was auf eine signifikante negativ-inotrope Wirkung der Testsubstanz zurückzuführen ist.

5.3. WIRKUNG VON PGU186 HCl UNTER DEM EINFLUSS VON NITRO-L-ARGININ

In den drei vorangegangenen Versuchsreihen an glattmuskulären Organpräparaten konnte eine signifikante dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung von PGU186 HCl festgestellt werden. Nun galt es herauszufinden, ob die Testsubstanz auch in der Lage war, unter dem Einfluss des NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin eine Relaxation des jeweiligen isolierten Organpräparates zu bewirken. Wenn ja, kann man als Schluss ziehen, dass PGU186 HCl imstande ist, die endotheliale Ausschüttung von NO auszulösen.

Es wurden drei der durchgeführten Versuche herangezogen, um eine Aussage über den Wirkmechanismus von PGU186 HCl treffen zu können. Nachdem sich das jeweilige Pulmonalarterienpräparat im Organbad stabilisiert hatte, wurde zunächst Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100 µmol/l zupipettiert. Nach genau 45 Minuten führte man schließlich 10 µl der Testsubstanz-Stammlösung dem Organbad zu und beobachtete die Reaktion in einem zeitlichen Rahmen von weiteren 45 Minuten. Danach wurde der Versuch beendet.

In Kapitel 4.2.1 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe detailliert angegeben. Abbildung 19 zeigt eine Originalaufzeichnung eines solchen Versuches. Weiters sind anhand von Tabelle 11 und Diagramm 6 zu erkennen, dass es durch die Zugabe von 100 µl des NO-Antagonisten zu einer verstärkten Kontraktion des bereits mit KCl-Tyrode-Lösung vorkontrahierten Organpräparates kam. Anschließend führte die Zugabe der Testsubstanz zu einer leichten Relaxation des Gefäßringes. Bei einem Kontrollwert von $11,61 \pm 0,36$ mN konnte, nach Zugabe der beiden Substanzen, ein Endwert von $11,17 \pm 0,62$ mN ermittelt werden. Es ließ sich also beobachten, dass PGU186 HCl eine endotheliale NO-Ausschüttung entgegen der antagonistischen Wirkung von Nitro-L-Arginin bewirkte.

Anhand dreier Versuche wertete man die erhaltenen Ergebnisse dieser Versuchsreihe aus. Auch hier führte man dem Organbad, nach Stabilisierung des isolierten Präparates, 100 µl der Nitro-L-Arginin-Stammlösung hinzu und wartete daraufhin 45 Minuten ab. Nun wurde in das jeweilige Organbad die Testsubstanz in einer Konzentration von 20 µmol/l pipettiert. Man wartete weitere 45 Minuten ab, um den laufenden Versuch abzuschließen.

Die ermittelten Ergebnisse zu dieser Versuchsreihe sind in Kapitel 4.2.2 nachzulesen. In dieser Versuchsreihe konnte, im Vergleich zu den äquivalenten Versuchen an isolierten Präparaten der Pulmonalarterie, eine noch stärkere Relaxation der Organpräparate beobachtet werden. Bei einem Kontrollwert von $3,72 \pm 0,74$ mN wurde, nach Zugabe der 100 µl der Nitro-L-Arginin-Stammlösung und der 20 µl der PGU186 HCl-Stammlösung, ein Endwert von $1,08 \pm 0,29$ mN ermittelt. Eines der Messergebnisse dieser Versuchsreihe wird anhand einer Originalaufzeichnung in Abbildung 20 gezeigt.

Auch hier kann man aufgrund der resultierenden Relaxation, welche durch PGU186 HCl entgegen des NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin ausgelöst wurde, darauf schließen, dass die Testsubstanz imstande ist, eine endotheliale Ausschüttung des Botenstoffes Stickstoffmonoxid zu bewirken.

Die letzte durchgeführte Versuchreihe beschäftigte sich wiederum mit der Analyse des Wirkmechanismus der Testsubstanz PGU186 HCl unter Verwendung des NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin. Auch hier zog man drei der durchgeführten Versuche heran, um die erhaltenen Messergebnisse auszuwerten. Man versetzte, nach Erreichen eines steady state, das Organbad ebenfalls mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin und wartete 45 Minuten ab, damit sich das isolierte Organ in diesem Milieu stabilisieren konnte. Danach pipettierte man eine Badkonzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ an Testsubstanz hinzu und wartete erneut 45 Minuten ab, bevor man den Versuch beendete.

In Kapitel 4.2.3 werden die erhaltenen Ergebnisse dieser Versuchsreihe genau aufgezeigt. Dabei konnten die auffälligsten Reaktionen hinsichtlich der Untersuchung des Wirkmechanismus beobachtet werden. Bei einem Kontrollwert von $6,86 \pm 0,78$ mN ließ sich nach Zugabe der 100 μl Nitro-L-Arginin-Stammlösung bereits eine Relaxation bei einem Mittelwert von $5,6 \pm 0,64$ mN beobachten. Die spasmolytische Wirkung auf die isolierten Organe des terminalen Ileum wurden nach Zugabe der Testsubstanz so weit verstärkt, dass nach Ablauf der 45 Minuten der Nullpunkt weit überschritten war.

PGU186 HCl zeigte hier also eine so stark relaxierende Wirkung, dass die maximal mögliche Spasmolyse – trotz der NO-antagonistischen Wirkung von Nitro-L-Arginin – erreicht wurde. Dies führt zur Annahme, dass die Wirkung der Testsubstanz zumindest teilweise durch eine NO-Freisetzung zustande kommt – wobei andere mögliche Wirkmechanismen jedoch nicht auszuschließen sind. Zur genaueren Aufklärung des Wirkmechanismus von PGU186 HCl wären weitere Versuche mit anderen Agonisten bzw. Antagonisten notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich damit, die Wirkung der neu synthetisierten Substanz PGU186 HCl anhand spezifischer in-vitro-Untersuchungen zu testen und anschließend die erhobenen Versuchsergebnisse zu analysieren und zu interpretieren. Die Testsubstanz wurde 2010/2011 an der Universität Wien am Institut für Pharmazeutische Chemie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Erker, neu synthetisiert. Die besagten Untersuchungen wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Studenik im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit, am Department für Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Wien durchgeführt. Als Versuchsobjekte dienten isolierte Organpräparate des Meerschweinchens.

Im Focus standen einerseits die möglichen dilatierenden bzw. spasmolytischen Effekte auf glattmuskuläre Organpräparate von Arteria pulmonalis, Aorta descendens und Ileum terminalis und andererseits der Einfluss der Testsubstanz auf Inotropie und Chronotropie an isolierten Präparaten von Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris, welche beide Herzmuskulatur aufweisen.

Die Organe, an denen man die Versuche durchführte, wurden täglich frisch entnommen und nach Isolierung und Präparierung in ein mit Oxymix begastetes Organbad, welches mit Hilfe eines Wasserbades auf die gewünschte Temperatur erwärmt wurde, übergeführt. Nach einer Anpassungsphase, die dazu diente, dass sich das isolierte Organ in seiner neuen, künstlichen Umgebung anpassen konnte, wurde mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz ins Organbad begonnen. So konnte beobachtet werden, welche Effekte die Testsubstanz bei steigender Konzentration auf die jeweiligen Organe bewirkte.

Die glattmuskulären Organe wurden jeweils mit einer geeigneten KCl-Tyrode-Lösung vorkontrahiert. Folglich ließ sich an Präparaten der Pulmonalarterie und der Aorta eine Dilatation der Gefäßringe und an isolierten Darmpräparaten ein spasmolytischer Effekt beobachten. An den Präparaten der Herzmuskulatur konnte sowohl eine negativ-chronotrope Wirkung am rechten Vorhof als auch eine negativ-inotrope Wirkung am Papillarmuskel festgestellt werden.

Die Versuchsergebnisse wurden mit Hilfe eines Flachbrettschreibers auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Anhand der erhaltenen Aufzeichnungen konnten die Versuche anschließend durch spezifische Berechnungen ausgewertet werden. In weiterer Folge erstellte man entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Diese dienten dazu, die Versuchsergebnisse graphisch darzustellen und ermöglichten die Erhebung von EC_{50} -Werten, wenn die Wirkung der Testsubstanz aussagekräftig war. EC_{50} -Werte geben den halbmaximalen Effekt in $\mu\text{mol/l}$ an.

Die Substanz PGU186 HCl erzielte bei allen fünf Versuchsreihen signifikante und aussagekräftige Effekte. Somit konnten auch entsprechend fünf EC_{50} -Werte erhoben werden: Der höchste EC_{50} -Wert mit $38 \mu\text{mol/l}$ wurde bei der Versuchsreihe mit den Papillarmuskeln ermittelt. $15,05 \mu\text{mol/l}$ betrug der EC_{50} -Wert an den isolierten Aortenpräparaten. Ähnliche EC_{50} -Werte erhielt man bei Versuchsreihen am rechten Vorhof mit $6,7 \mu\text{mol/l}$ und an der Pulmonalarterie mit $6,6 \mu\text{mol/l}$. Der niedrigste EC_{50} -Wert wurde bei der Versuchsreihe mit isolierten Präparaten des Darms erhoben, er betrug $1,21 \mu\text{mol/l}$.

Man kann folglich daraus schließen, dass PGU186 HCl eine Substanz ist, die sowohl stark dilatierende bzw. spasmolytische Wirkungen als auch intensiv negative-chronotrope und negativ-inotrope Wirkungen aufweist.

In weiterer Folge wurden drei Versuchsreihen an den glattmuskulären Organen zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Testsubstanz durchgeführt. Man testete, ob PGU186 HCl trotz Einwirkung des NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin imstande war, eine Relaxation der isolierten Organpräparate auszulösen.

Da dies der Fall war, kann man den Schluss ziehen, dass die beobachtete Relaxation der Organpräparate, die durch die Zugabe der Testsubstanz PGU186 HCl ausgelöst wurde, zumindest teilweise auf eine NO-Freisetzung aus dem Gefäßendothel zurückzuführen ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München

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

Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141: 3657-3667

Campbell Neil A, Reece Jane B (2006) Biologie, 6. Auflage, Pearson Education Deutschland GmbH, München

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

Chan WK, Delucci AB (2000) Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4. *Life Sci.* 67: 3103-3112

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

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

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457

Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 14138-14143

Hänzel R, Sticher O (2010) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

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

Hunnius (1998) *Pharmazeutisches Wörterbuch*, 8. Auflage, Walter de Gruyter Berlin New York

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

Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lancon A, Latruffe N (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol.* 68: 1113-1118

Krejcy K, Schwarzacher S, Raberger G (1993) Distribution and metabolism of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L arginine methylester in canine blood in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 347: 342-345

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

Mutschler E, Thews G, Vaupel P (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

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

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F (2003) Red wine ingredient resveratrol protects from beta-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 JW, Schröder J (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase – cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem.* 172: 161-169

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

Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U (2004) Biogene Arzneimittel – Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

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

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652-1658

Szewczuk LM, Forti L, Stilvala LA, Penning TM (2004) Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2 – a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem.* 279: 22727-22737

Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, Van Breeman RB (2002) Human, rat, and mouse metabolism of Resveratrol. *Pharm Res.* 19: 1907-1914

8. CURRICULUM VITAE

Name: Kora Koch
Geburtsdatum: 29. Mai 1985
Wohnort: 7000 Eisenstadt
Staatsbürgerschaft: Österreich

Familie: **Vater:** Mag. Gerhard Rennisch, Betriebswirt
 Mutter: Mag. Maria Koch, Lehrerin

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule (Eisenstadt)
4 Jahre Bundesgymnasium (Eisenstadt)
4 Jahre Oberstufenrealgymnasium (Eisenstadt)
2001/2002 Auslandsjahr an einer amerikanischen High
School (Downers Grove North, Illinois)
Reifeprüfung: 2003 (Eisenstadt)

Seit 2003 Studium der Pharmazie an der Universität
Wien
Jänner 2011 Beginn der Diplomarbeit am Department für
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Bisherige Tätigkeiten: Februar 2004 Marienapotheke Eisenstadt
Juli/ August 2004 Marienapotheke Eisenstadt
Juli / August/ September 2005 Marienapotheke
Eisenstadt
August 2006 Marienapotheke Eisenstadt
Juli 2007 Baxter Wien
Juli 2008 Baxter Wien
August 2009 Marienapotheke Eisenstadt
Dezember/Jänner 2009/2010 Marienapotheke
Eisenstadt
Juli 2010 Marienapotheke Eisenstadt
Seit Oktober 2010 geringfügig beschäftigt bei
Marienapotheke Eisenstadt
Juli 2011 Marienapotheke Eisenstadt