universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Profil eines neu synthetisierten Imidazolderivats (PGU 189 HCl) an isolierten Organen von Meerschweinchen“

Verfasserin

Melanie Loser

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Realisierung dieser Diplomarbeit bedanken. Er war ein ausgesprochen freundlicher Betreuer und stand immer mit Rat und Tat zur Seite.

Weiters bedanke ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Erker und dem Department für Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der untersuchten Testsubstanz.

Besonderer Dank gilt den Menschen, die im Laufe der Studienjahre zu guten Freunden wurden. Durch sie bestand der Unialltag auch aus vielen fröhlichen Stunden und wurde durch unzählige tolle Gespräche und lustige Momente bereichert.

Ein weiteres Dankeschön gilt meiner Cousine Fabienne Gilet, die sich bereit erklärt hat, die Diplomarbeit Korrektur zu lesen.

Ganz herzlich möchte ich auch meinen Freundinnen und meinem Freund danken, die zu jeder Zeit für mich da waren und mir stets ein offenes Ohr liehen. Ich bin sehr glücklich, mit ihnen so viele schöne Stunden erlebt haben zu dürfen und dankbar für die positive Energie, die sie mir geschenkt haben.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht und mich all die Jahre immerzu unterstützt haben. Nur durch ihre Liebe, Motivation und Hilfsbereitschaft ist es mir gelungen diesen Weg zu gehen. Ich schätze mich unheimlich glücklich, solch eine wundervolle Familie haben zu dürfen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Ziel der Diplomarbeit 1
1.2. Leitsubstanz Resveratrol 2
1.2.1. Struktur 2
1.2.2. Natürliches Vorkommen 2
1.2.3. Französisches Paradoxon 3
1.2.4. Biologische Wirkungsweise 3
1.2.5. Wirkungen 4
1.2.6. Pharmakokinetik 7
2. Methoden und Materialien 8
2.1. Testsubstanz PGU 189 HCl 8
2.2. Nitro-L-Arginin 9
2.3. Bereitung der Stammlösungen 9
2.3.1. Bereitung der Stammlösung von PGU 189 HCl 9
2.3.2. Bereitung der Kaliumchloridlösungen 10
2.4. Versuchstiere 11
2.5. Isolierung und Präparation der Organe 12
2.5.1. Atrium cordis dexter – Rechter Vorhof 12
2.5.2. Arteria pulmonalis - Lungenarterie 13
2.5.3. Musculus papillaris – Papillarmuskel 13
2.5.4. Aorta descendens – absteigender Teil der Aorta 15
2.5.5. Terminales Ileum – Darm 15
2.6. Nährlösung 16
2.6.1. Zubereitung der Nährlösung 16
2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen 18
2.7.1. Versuchsapparatur A 18
2.7.2. Versuchsapparatur B 20

2.7.3. Kraftwandler 22
2.7.4. Gasversorgung 22
2.8. Versuchsdurchführung 23
2.8.1. Versuchsablauf - Vorhof 24
2.8.2. Versuchsablauf - Lungenarterie 25
2.8.3. Versuchsablauf - Aorta 26
2.8.4. Versuchsablauf - Terminales Ileum 26
2.8.5. Versuchsablauf - Papillarmuskel 28
2.8.6. Versuchsablauf zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin 28
2.9. Auswertung der Ergebnisse 29
2.9.1. Auswertung der Ergebnisse des Atrium cordis dexter 29
2.9.2. Auswertung der Ergebnisse von Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminalem Ileum 30
2.9.3. Auswertung der Ergebnisse des Musculus papillaris 30
2.9.4. Statistik 30
3. Ergebnisse 32
3.1. Ergebnisse Testsubstanz PGU 189 HCl 32
3.1.1. Ergebnisse Atrium cordis dexter 32
3.1.2. Ergebnisse Arteria pulmonalis 36
3.1.3. Ergebnisse Musculus papillaris 39
3.1.4. Ergebnisse Aorta descendens 42
3.1.5. Ergebnisse Terminales Ileum 45
3.2. Ergebnisse zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit Nitro – L – Arginin 49
3.2.1. Ergebnisse mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin 49
3.2.2. Ergebnisse mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin 52
4. Diskussion 56
4.1. Versuchsreihe an der quergestreiften Muskulatur der Herzpräparate 56
4.2. Versuchsreihe an den Organen mit glatter Muskulatur 58

4.2.1. Versuchsreihe – Arteria pulmonalis 59
4.2.2. Versuchsreihe - Aorta descendens 60
4.2.3. Versuchsreihe - Terminales Ileum 60
4.3. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und Nitro-L-Arginin an Aortapräparaten 60
4.3.1. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und 30 µmol/l Nitro-L-Arginin 61
4.3.2. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und 100 µmol/l Nitro-L-Arginin 61
5. Zusammenfassung 62
6. Literaturverzeichnis 64
7. Curriculum vitae 67

1. Einleitung

1.1. Ziel der Diplomarbeit

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die pharmakologische Wirkung der Substanz PGU 189 HCl an isolierten Meerschweinchenorganen untersucht. Die verwendete Testsubstanz wurde am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert und leitet sich vom Naturstoff Resveratrol ab, der chemisch sehr stark modifiziert wurde.

Für die Versuche wurden fünf verschiedene Arten von Organpräparaten herangezogen. Zum einen wurden die Aorta und die Pulmonalarterie der Tiere isoliert, um an ihnen die vasodilatierende Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur zu eruieren. Zum anderen wurde an Darmpräparaten die spasmolytische Wirkung getestet.

Des Weiteren wurden Präparate des Vorhofes angefertigt, anhand derer ermittelt wurde, ob die Substanz PGU 189 HCl eine positiv oder negativ chronotrope Wirkung aufweist. Zur Bestimmung der Inotropie fanden isolierte Papillarmuskelpräparate Verwendung.

Darüber hinaus wurden an der Aorta Versuche zur Ermittlung des möglichen Wirkmechanismus durchgeführt.

1.2. Leitsubstanz Resveratrol

Da dieser Diplomarbeit die pharmakologische Untersuchung der Testsubstanz PGU 189 HCl zugrunde liegt, wird in diesem Kapitel der Naturstoff Resveratrol vorgestellt, von dem sich die zu untersuchende Materie ableitet.

1.2.1. Struktur

Chemisch gesehen stellt die Substanz Resveratrol ein trans-3,5,4'-Trihydroxystilben dar. Resveratrol weist also eine polyphenolische Grundstruktur auf, bei der die beiden Phenylreste transständig sind.

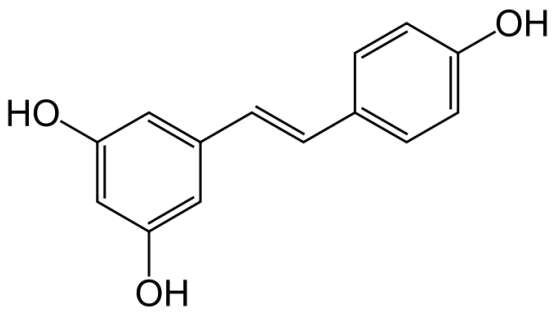


Abbildung 1: Strukturformel von Resveratrol

1.2.2. Natürliches Vorkommen

Resveratrol ist eine Substanz, die natürlicherweise in verschiedenen Pflanzen vorkommt. Sie gehört zur Gruppe der Flavonoide und zeichnet sich durch ihren polyphenolischen Charakter aus.

Bereits in mehr als 70 Pflanzenarten wurde Resveratrol detektiert, zu denen prominente Vertreter wie Fichte, Eukalyptus und Maulbeeren gehören. Eine Pflanzenfamilie, die sich als besonders reich an Resveratrol erwiesen hat, ist die Familie der Vitaceae. Die zu ihr gehörende Pflanze Vitis vinifera, die Weinrebe, birgt einen sehr hohen Resveratrol-Gehalt. Zu finden ist der Pflanzenstoff sowohl in den Traubenkernen, als auch in den Wurzeln und Reben. Die Schale roter Weintrauben ist besonders reich an Resveratrol, wo es die Funktion

eines Phytoalexins erfüllt und beispielsweise der Abwehr von Grauschimmel dient (Celotti et al. 1996).

Da zur Weinherstellung die Trauben von Vitis vinifera verwendet werden, ist auch in diesem Resveratrol enthalten. Während die frischen Traubenschalen einen Gehalt von 50 – 100 µg/g besitzen, liegt der Wert an Resveratrol in Rotwein bei 1,5 – 3 mg/l (Jang et al. 1997). Die Konzentration an Resveratrol in Wein ist abhängig von der Dauer der Hülsenextraktion bei der Herstellung. Weil bei der Gewinnung von Rotwein eine längere Fermentationsdauer von Nöten ist, findet sich in diesem ein wesentlich höherer Gehalt an Resveratrol als in Traubensaft und Weißwein (Schmandke 2002).

1.2.3. Französisches Paradoxon

In den neunziger Jahren erlangte die Substanz Resveratrol großes Interesse, nachdem es in der Polyphenolfraktion von Rotwein nachgewiesen wurde (Soleas et al. 1997).

Dies führt zu einer möglichen Erklärung des „französischen Paradoxons“, welches darauf beruht, dass die Rate an koronaren Herzerkrankungen in Frankreich deutlich niedriger liegt als in anderen vergleichbar entwickelten Ländern, obwohl die Franzosen einen hohen Verzehr an fettreichen Speisen, sowie massiven Tabak- und Alkoholkonsum aufweisen (Criqui et al. 1994).

Es wird allerdings vermutet, dass dieser positive Effekt des Rotweines nicht allein auf den hohen Gehalt an Resveratrol zurückzuführen ist, sondern eher auf die enthaltene Menge an Ethanol. Dieses Phänomen wurde nämlich auch bei mäßigem Konsum von anderen alkoholhaltigen Getränken beobachtet, wenn diese zu den Mahlzeiten eingenommen wurden und das Essen andere Flavonoidquellen, z.B. Gemüse, enthielt (Teuscher et al. 2004).

1.2.4. Biologische Wirkungsweise

In der Pflanze selbst wird Resveratrol erst bei äußerer Stresseinwirkung synthetisiert. Es ist also ein Metabolit, der erst entsteht, wenn die Pflanze gewissen Faktoren wie UV-Bestrahlung, Ozoneinwirkung, Gewebezerstörung oder Pilzbefall exponiert ist. Die Substanz übernimmt somit die Funktion eines Abwehrstoffes. Diese Art von Inhaltsstoff wird als

Phytoalexin bezeichnet und dient dem Eigenschutz der Pflanze. Wenige Stunden nach der Stresssituation wird bereits die Bildung von Resveratrol in der Pflanze induziert (Schmandke et al. 2002).

1.2.5. Wirkungen

Nicht nur im pflanzlichen Organismus erfüllt Resveratrol eine protektive Funktion. In zahlreichen Studien wurden die positiven Effekte dieses Naturstoffes auf den menschlichen Organismus untersucht und nachgewiesen. In diesem Kapitel wird auf die zahlreichen nennenswerten Eigenschaften dieser Substanz näher eingegangen und ihre therapeutischen Einsatzgebiete erläutert.

Einfluss auf den Fettstoffwechsel

Eine der wohl wichtigsten biologischen Funktionen von Resveratrol stellt die positive Beeinflussung der Serumlipide dar. Die Substanz ist in der Lage, spezifisch die menschliche Squalenmonooxidase zu hemmen, ein Enzym, das eine entscheidende Schlüsselfunktion in der endogenen Cholesterinbiosynthese einnimmt. Das ist vermutlich der Grund, warum Resveratrol maßgeblich an der Verhinderung der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt ist (Laden und Porter 2001).

In einer Studie an Ratten mit Hypercholesterinämie konnte gezeigt werden, dass im Rotwein enthaltenes Resveratrol und die Flavonoidfraktion das Gesamtcholesterin signifikant senken (Kollar et al. 2000). Zudem wurde die Beeinflussung der Oxidationsrate von LDL (low density lipoprotein) durch Resveratrol beobachtet. Es wurde festgestellt, dass die Substanz die kupferkatalysierte Oxidation weitaus mehr beeinflusst als α-Tocopherol (Frankel et al. 1993).

Antioxidative Eigenschaften

Neben der Hemmung der Oxidation von LDL wurden noch weitere antioxidative Effekte beobachtet, die sich nicht nur auf die Serumlipide und das Gefäßsystem auswirken, sondern auch auf andere Organe einen positiven Einfluss ausüben. So konnte gezeigt werden, dass Resveratrol ebenso die antioxidative Kapazität des Radikalfängers Glutathion zu steigern vermag, was anhand von Zellkulturen bewiesen wurde. Dadurch konnte diesem Naturstoff bei

beta-Amyloid-Peptid-induzierter Neurotoxizität ein neuroprotektiver Effekt beigemessen werden. Deshalb ist der Rückschluss möglich, dass bei moderatem Rotweinkonsum die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken verringert ist (Savaskan et al. 2003).

Auch bei in vivo Versuchen konnte bereits die neuroprotektive Wirkung von Resveratrol nachgewiesen werden. In Experimenten mit Ratten wurde belegt, dass Resveratrol im Stande ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und über neuroprotektive Eigenschaften verfügt (Virgili et al. 2000).

Wie Belguendouz et al. 1998 veranschaulichten, verfügt Resveratrol auch über die Eigenschaften eines Radikalfängers. Sie zeigten auf, dass dieser Inhaltsstoff des Rotweines sich einerseits an die Plasmalipoproteine anlagert und andererseits mit seinem wasserlöslichen Anteil imstande ist, freie Radikale abzufangen. Dadurch vermag es den Angriff dieser auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) und somit die Membranen zu verhindern.

Antikarzinogene Eigenschaften

Diesem Polyphenol konnte bereits im Jahre 1997 eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Resveratrol in drei Stadien der Krebsentstehung eingreift, angefangen bei der Initiationsphase über die Promotionsphase bis zur Progression. In Versuchen an Mäusen wurde entdeckt, dass vermutlich die Eigenschaften als Radikalfänger die Initiation der Tumorgenese verhindern (Jang et al. 1997). Aufgrund dieser antimutagenen und antitumoralen Wirkung rückte das Phytoalexin in den Mittelpunkt vieler Studien.

Auf der Suche nach dem möglichen Wirkmechanismus zeigte Dong 2003, dass diese Natursubstanz das Tumorsupressorgen p53 aktiviert und die Apoptose der entarteten Zelle einleitet. An dieser Resveratrol-induzierten Stimulierung sind auch MAP-Kinase, ERKs, JNKs oder p38-Kinasen beteiligt.

Ebenfalls auf der Suche nach einer Möglichkeit zur Prophylaxe der Krebsentstehung mittels Substanzen, die in der Natur vorkommen, wurde von Kundu et al. 2004 nachgewiesen, dass Resveratrol in die intrazelluläre Signalkaskade, vermittelt durch NF-kappaB, eingreift.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass diese interessante Substanz die Fähigkeit besitzt, die Ribonukleotid-Reduktase und die DNA-Synthese von Säugetierzellen zu beeinflussen, was möglicherweise einen zukünftigen Ansatzpunkt in der Krebsprävention am Menschen darstellen könnte (Fontcave et al. 1998).

Antiinflammatorische Eigenschaften

Es wird vermutet, dass die Ursache für die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol auch in den antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Substanz begründet liegt. So wurde in Zellkulturen nachgewiesen, dass der Naturstoff die Fähigkeit besitzt, die Cyclooxygenase-2 zu inhibieren und somit auch in die Prostaglandinsynthese einzugreifen (Subbaramaiah et al. 1999). Weitere Untersuchungen dieser Materie ergaben, dass die antiphlogistische Wirkung der Substanz in höherem Maße durch die Hemmung der COX-1 bedingt ist (Szewczuk et al. 2004).

Einfluss auf die Blutgerinnung und vasodilatierende Wirkung

Der in roten Trauben und Wein enthaltenen Substanz wird zudem ein Einfluss auf die Blutgerinnung und den Tonus der Gefäßmuskulatur zugeschrieben. So konnte in Versuchen an humanen Endothelzellen nachgewiesen werden, dass Resveratrol einerseits zu einer langfristigen Erhöhung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) führt, sowie zum anderen auch die kurzfristige Produktion von bioaktiven NO fördert. Dadurch kommt es zu einer Vasodilatation, auf die die Herz-Kreislauf-schützende Funktion von Resveratrol zurückzuführen sein könnte (Wallerath et al. 2002).

Kimura et al. wiesen 1985 einen blutgerinnungshemmenden Effekt dieses Polyphenoles nach, indem sie die Wirkung von verschiedenen Stilbenderivaten auf den Arachidonsäuremetabolismus untersuchten, wobei sie feststellten, dass Resveratrol neben der Bildung von 5-HETE und HHT auch die Bildung von Thromboxan B2 hemmt. Dies wurde durch weitere Studien bestätigt, in denen zudem detektiert wurde, dass Resveratrol außerdem die Entstehung von 12-HETE unterdrückt. Durch diese Effekte wird vermutet, dass an der gefäßprotektiven Wirkung von Rotwein nicht allein der Ethanolgehalt verantwortlich ist, sondern dass ebenso das Stilbenderivat an der schützenden Wirkung vor koronaren Herzkrankheiten beteiligt ist. Im Gegensatz zu reinem Ethanol kam es bei den Versuchen mit

Resveratrol nicht nur zur Hemmung der Thrombin-vermittelten Plättchenaggregation, sondern ebenso zur Inhibition der ADP-abhängigen Zusammenlagerung der Thrombozyten (Pace-Asciac et al. 1995).

1.2.6. Pharmakokinetik

Die vielfältigen positiven Wirkungen von Resveratrol, die in zahlreichen in vitro und in vivo Versuchen, sowie in epidemiologischen Studien nachgewiesen wurden, verlangen nun nach einem Beleg, inwiefern dieser Naturstoff tatsächlich aus der Nahrung aufgenommen wird und wie er im humanen Organismus metabolisiert wird. Für die therapeutische Anwendung des Stoffes spielen Adsorption und Bioverfügbarkeit, sowie die Eliminierung eine essentielle Rolle.

Um dieser Thematik auf den Grund zu gehen, untersuchten Forscher die pharmakokinetischen Eigenschaften dieses interessanten Naturstoffes. Sie kamen zu dem Fazit, dass oral appliziertes Resveratrol resorbiert wird und dabei eine Bioverfügbarkeit von 70% aufweist. Nach einer durchschnittlichen Plasmahalbwertszeit von annähernd neun Stunden, wird es vorwiegend auf renalem Wege ausgeschieden. Im Plasma liegt die Hauptmenge der aufgenommenen Substanz allerdings nicht in freier Form vor. Da es sich hierbei um eine eher lipophile Substanz handelt, wird ihr im Organismus rasch durch Bindung an Glucuronsäure und Schwefelsäure ein hydrophiler Charakter verliehen, um die Elimination zu beschleunigen. Die Metabolite trans-Resveratrol-3-O-sulfat und trans-Resveratrol-3-O-glucuronid konnten sowohl im Blut als auch im Urin detektiert werden. Der Anteil an Substanz, der nicht in konjugierter Form im Plasma vorlag, zeichnete sich durch die Bindung an das Plasmaprotein Albumin aus, die durch die Anwesenheit von Fettsäuren noch verstärkt wurde. Wahrscheinlich liegt die Wirksamkeit von Resveratrol trotz dieser Konjugationsmechanismen in einer möglichen biologischen Aktivität der Metabolite (Yu et al. 2002, Jannin et al. 2004, Walle et al. 2004).

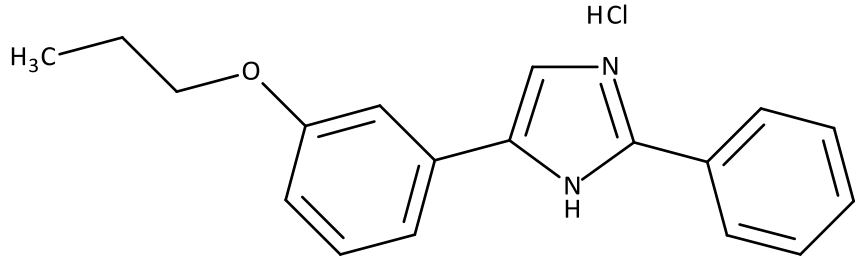
In der klinischen Anwendung könnte die Tatsache eine Rolle spielen, dass Resveratrol in Versuchen eine inhibierende Wirkung auf das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 aufwies, was zu Interaktionen mit Stoffen führen könnte, die ebenfalls Substrate dieses Enzymes sind (Chan et al. 2000).

2. Methoden und Materialien

Das folgende Kapitel liefert genaue Einblicke in die praktische Durchführung dieser Diplomarbeit.

2.1. Testsubstanz PGU 189 HCl

Als zu untersuchende Substanz für diese wissenschaftliche Arbeit wurde PGU 189 HCl verwendet, eine chemische Verbindung, die im Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien in der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Erker synthetisiert wurde und zur pharmakologischen Untersuchung an isolierten Meerschweinchenorganen an das Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien weitergeleitet wurde. PGU 189 HCl stellt ein Derivat des Naturstoffes Resveratrol dar.



2-Phenyl-4-(3-propoxyphenyl)-1*H*-imidazol-hydrochlorid

MG: 314,81 g/mol

Abbildung 2: Strukturformel der Testsubstanz PGU 189 HCl samt chemischer Nomenklatur und Molekulargewicht

2.2. Nitro-L-Arginin

In der zweiten Hälfte des praktischen Teiles der Diplomarbeit wurde der Wirkmechanismus von PGU 189 HCl untersucht. Hierfür wurde eine weitere Substanz für die Versuche herangezogen. Es handelt sich dabei um Nitro-L-Arginin, ein Derivat der Aminosäure L-Arginin, die eine der proteinogenen Aminosäuren darstellt.

Im Gefäßendothel befindet sich die eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid – Synthase), die dazu befähigt ist NO (Stickstoffmonoxid) zu synthetisieren, das zur Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur führt. NO, früher als endothelium-derived relaxing Factor EDRF bezeichnet, gehört zu den wichtigsten Vasodilatoren. Die kurzlebige Substanz, die nach wenigen Sekunden wieder zerfällt, wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Die Erschlaffung der glatten Gefäßmuskulatur kommt dadurch zustande, dass NO die Guanylatzyklase aktiviert, wodurch es zu einer Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration kommt (Huppelsberg et al. 2005).

Durch das Einspritzen von Nitro-L-Arginin ins Organbad wurde die eNOS inhibiert, wodurch der Wirkmechanismus der Testsubstanz untersucht werden konnte.

2.3. Bereitung der Stammlösungen

2.3.1. Bereitung der Stammlösung von PGU 189 HCl

Aus der Testsubstanz, die für die Versuche in gelöster Form appliziert werden musste, um eine gleichmäßige Verteilung im Organbad zu erzielen, wurde an jedem Versuchstag eine Stammlösung hergestellt. Dafür musste ganz zu Beginn ein Lösungsmittel für die Substanz bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass PGU 189 HCl optimal in DMSO (Dimethylsulfoxid) löslich war. Da dieses Lösungsmittel eine Eigenwirkung auf die Kontraktionskraft der Organe ausübte, wurde dieser experimentell ermittelte Wert von den erhaltenen Ergebnissen mit der Testsubstanz abgezogen.

Für die Berechnung der täglich frisch zubereiteten Stammlösungen wurden das Molekulargewicht der Testsubstanz sowie das Verfassungsvolumen des jeweiligen Organbades herangezogen.

Stammlösung	Molekulargewicht (g/mol)	Volumen des Organbades	Einwaage in mg für eine Konzentration von 100 µmol/l im Organbad
PGU 189 HCl	314,81	8 ml	0,79
PGU 189 HCl	314,81	25 ml	0,25

Tabelle 1: Stammlösungen von PGU 189 HCl

2.3.2. Bereitung der Kaliumchloridlösungen

Für die Versuche an den Präparaten der Arteria pulmonalis, der Aorta descendens und des terminalen Ileums war es von Nöten eine Vorkontraktion der Organe durchzuführen, um daraufhin die eventuell dilatierende beziehungsweise spasmolytische Wirkung der Testsubstanz überprüfen zu können. Mit Hilfe einer Kaliumchloridlösung konnten die Organe zur maximalen Kontraktion angeregt werden.

Für die Vorkontraktion der Pulmonalarterie und der Aorta wurde eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung benötigt und für die Experimente am Darm kam eine 60 mmolare Lösung zur Anwendung. Die Werte für die Konzentrationen der Kaliumchloridlösungen wurden experimentell ermittelt.

Die Kaliumchlorid-Stammlösungen wurden jeden Tag frisch bereitet. Für die Herstellung der 90 mmolaren Lösung wurden 0,67 g Kaliumchlorid in einen Messkolben, der ein Volumen von 100 ml besaß, eingewogen und dann bis zum Meniskus mit Nährlösung (Vergl. Kapitel 2.6.) aufgefüllt. Nach anschließendem Durchschütteln war die Lösung zur Verwendung bereit. Analog wurde bei der Herstellung der 60 mmolaren Lösung für die Darmpräparate vorgegangen. Hier wurden jedoch 0,45 g Kaliumchlorid in den 100 ml Messkolben eingewogen. Danach erfolgte wieder die Auffüllung des Messkolbens mit Tyrode-Lösung bis zum Meniskus mit anschließender gründlicher Durchmischung.

2.4. Versuchstiere

Zur pharmakologischen Untersuchung der Testsubstanz PGU 189 HCl wurden die isolierten Organe von Meerschweinchen verwendet. Die Tiere stammten aus einer Zucht und gehörten zu sogenannten „TRIK“-Stämmen, was bedeutet, dass bei diesen Tieren Inzucht vermieden wurde und die gekreuzten Meerschweinchen ein möglichst geringes Verwandtschaftsverhältnis aufwiesen.

Der Grund für die Verwendung von Meerschweinchenorganen als Testobjekte ist der, dass die Ionenkanäle dieser Tiere denen des Menschen ähneln. Zudem sind die Organe optimal für die Größe der verwendeten Versuchsapparaturen geeignet.

Die Tiere wurden am Morgen des jeweiligen Versuchstages durch einen Genickschlag getötet, der erfahrungsgemäß die schmerzloseste und schnellste Methode der Tötung darstellt. Die verwendeten Tiere wiesen zum Zeitpunkt ihres Einsatzes stets ein Lebensalter von wenigen Wochen auf, um eine möglichst gleichbleibende Qualität der Organe zu sichern. Die herangezogenen Meerschweinchen wogen im Durchschnitt 300-600 g. Pro Tag wurden die Organe eines Meerschweinchens für die Versuche isoliert.

2.5. Isolierung und Präparation der Organe

Das folgende Kapitel beschreibt die Entnahme und Präparation der für die Versuche notwendigen Organe.

Abbildung 3: Stereomikroskop und Utensilien zur Präparation der Meerschweinchenorgane

2.5.1. Atrium cordis dexter – Rechter Vorhof

Nach Tötung des Versuchstieres durch einen Genickschlag wurde dessen Thorax mit Hilfe einer OP-Schere aufgeschnitten. Zuerst wurde das noch schlagende Herz entnommen und sofort in ein Becherglas transferiert, das mit Nährlösung gefüllt war und über einen Schlauch mit Oxymix (Vergl. Kapitel 2.7.4.) versorgt wurde, um das Herz mit dem entsprechenden Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 zu umspülen.

Zu Präparation des rechten Vorhofes wurde das Herz nun in eine Petrischale gelegt, deren Boden mit einer Korkscheibe bedeckt war. Zur Fixierung der Korkschicht wurde ein Gummischlauch ringförmig in die Petrischale gelegt, um die Korkplatte nach unten zu drücken und in ihrer Position zu stabilisieren (Vergl. Abbildung 3). Die Petrischale war ebenfalls mit Nährlösung gefüllt. Am Korkboden konnte das Herz nun vorsichtig mit Stecknadeln befestigt werden.

Nun konnte das Herz von überschüssigem Fett- und Lungengewebe gereinigt werden, das mit Hilfe einer feinen Schere weggeschnitten wurde. Nach Lokalisation des rechten Vorhofes wurde dieser vorsichtig unter Zuhilfenahme von Pinzette und Schere herauspräpariert.

Anschließend wurde der Vorhof selbst wieder mit zwei Stecknadeln auf der Korkplatte in der Petrischale befestigt. So konnte nun am unteren und am oberen Ende mit einem Faden jeweils ein Silberhäkchen angebracht werden, das durch die Knoten des Fadens fixiert wurde. Diese Silberhäkchen sollten später dazu dienen, den Vorhof in der Versuchsapparatur zu befestigen. Dieser gesamte Vorgang fand unter einem Stereomikroskop statt. Nach Abschluss der Präparation wurde der Vorhof wieder in ein Becherglas mit Nährlösung gebracht, wo er unter Begasung mit Oxymix bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt werden konnte.

2.5.2. Arteria pulmonalis - Lungenarterie

Vom in der Petrischale fixierten Herzen konnte nun die Arteria pulmonalis durch einen Schnitt sehr nahe am Herzen abgetrennt werden. Der zweite Schnitt wurde kurz vor Teilung des Gefäßes in linke und rechte Arteria pulmonalis durchgeführt.

Nachdem das Gefäß von überflüssigem Fettgewebe mittels Federschere befreit worden war, wurde es in ca. zwei bis drei Millimeter lange Stücke unterteilt, die so später ohne Befestigung eines Silberhäkchens aufgrund ihrer ringförmigen Struktur in der Versuchsapparatur eingespannt werden konnten. Diese so vorbereiteten Präparate der Lungenarterie wurden sodann in ein Becherglas mit Nährlösung eingebracht, in dem sie mit Oxymix umspült wurden, um sie bis zum Versuchsbeginn unter physiologischen Bedingungen zu lagern.

2.5.3. Musculus papillaris – Papillarmuskel

Das Herz konnte nun, nach der Abtrennung des rechten Vorhofes von den Kammern, aufgeschnitten werden. Dies geschah entlang des Septums zur Herzspitze hin. Das Herz wurde daraufhin aufgeklappt und in dieser Position wieder mit Nadeln in der Petrischale befestigt.

Nun waren die Papillarmuskeln sowohl in der linken als auch in der rechten Kammer erkennbar. Die Herausforderung bestand jetzt darin, die Purkinje-Fasern, die ebenfalls einen wesentlichen Bestandteil des Erregungsleitungssystems darstellen, vom Papillarmuskel abzulösen, da sie durch ihre autonome Schlagfähigkeit den Versuch gestört hätten. An der Sehne, an der der Papillarmuskel in der Herzkammer befestigt ist, wurde nun wieder mit Hilfe eines Fadens ein Silberhäkchen angebracht und daraufhin der Papillarmuskel nach Durchtrennen der Sehne aus der Herzwand herausgeschnitten. So präpariert wurde er wieder in einem Becherglas mit physiologischer Nährlösung und unter Begasung mit Oxymix bis zum Beginn des Versuches aufbewahrt.

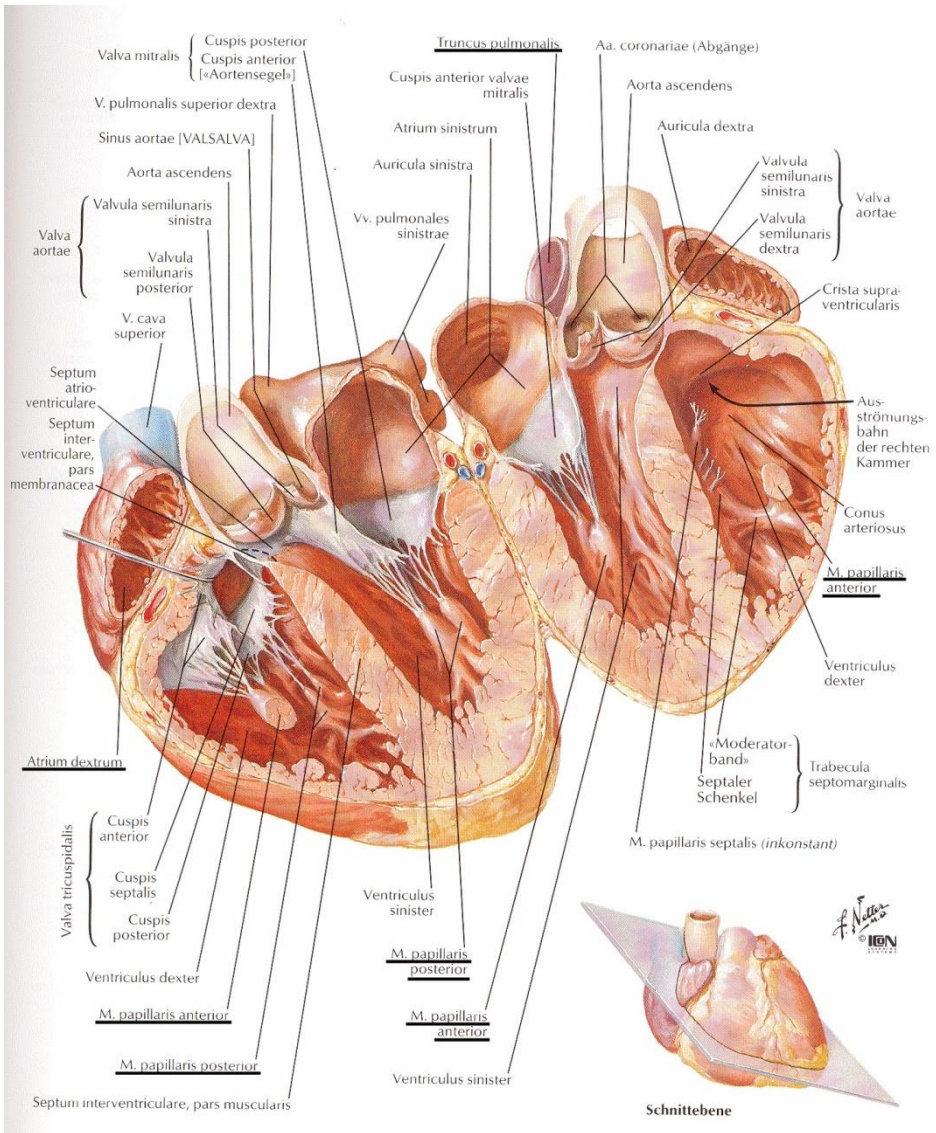


Abbildung 4: Darstellung der Herzanatomie (Netter 2003)

2.5.4. Aorta descendens – absteigender Teil der Aorta

Für die Versuche wurde die thorakale Aorta verwendet, die entlang der Wirbelsäule der Versuchstiere verläuft. Um einen freien Zugriff darauf zu haben, musste von einer assistierenden Person die Wirbelsäule nach vorn gedrückt werden. In dieser Position konnte dann mit Hilfe von Schere und Pinzette die Aorta abgetrennt werden. Die Aorta wurde am oberen Ende in die Pinzette eingeklemmt und sodann vorsichtig mit der Schere entlang der Wirbelsäule abgetrennt. Es galt darauf zu achten, dass die Aorta dabei nicht zu sehr gedehnt wurde.

Nach der Entnahme wurde die Aorta in eine vorbereitete Petrischale mit Korkboden, die wiederum mit Nährlösung befüllt war, gelegt. Dort wurde sie mit zwei Präpariernadeln am oberen und am unteren Ende befestigt und unter Zuhilfenahme von Federschere und Pinzette von Muskel- und Fettgewebe befreit. Anschließend konnte sie wieder in zwei bis drei Millimeter lange Stücke geschnitten werden, die dann später so, ohne Silberhaken, in der Versuchsapparatur angebracht werden konnten. Bis zum Beginn des Versuches wurden die Aortaringe in einem Becherglas mit Nährlösung unter Zugabe von Oxymix aufbewahrt (Vergl. Abbildung 10).

2.5.5. Terminales Ileum – Darm

Das terminale Ileum stellt den Übergang des Dünndarmes in den Dickdarm dar. Das entsprechende Stück wurde im geöffneten Köper des Versuchstieres lokalisiert und mit einer Schere abgeschnitten. Kurz unterhalb dieser Schnittstelle wurde der Darm dann mit einem Bindfaden abgebunden. Nach einer Länge von ca. 20 cm wurde dann der zweite Schnitt gesetzt.

Dieses Darmstück wurde daraufhin zur weiteren Präparation in eine Petrischale mit Korkboden und Nährlösung gelegt. Dort wurden etwa 1 cm lange Stücke schräg abgeschnitten. An diesen schrägen Enden wurden die Darmstücke dann wieder mit Präpariernadeln am Korkboden fixiert.

Nun konnten wiederum mittels eines Bindfadens Silberhäkchen am oberen und am unteren Ende dieses Darmstückes angebracht werden. Es war darauf zu achten, dass durch das Zuknoten das Darmlumen nicht abgeschnürt wurde, sodass später in der Versuchsapparatur die Flüssigkeit mit der Wirksubstanz ungehindert durch den Darm zirkulieren konnte.

Falls im Darm noch etwaige Reste enthalten waren, konnten diese mit einer Pasteurpipette durchgespült werden. Bis zum Beginn des Versuches wurden die präparierten Darmstücke wieder in einem Becherglas mit Nährlösung und mit Oxymix umspült aufbewahrt.

2.6. Nährlösung

Für das Weiterleben der isolierten Organe war es von Nöten, sie in einer physiologischen Nährlösung, auch Tyrode genannt, aufzubewahren, die die Organe mit allen nötigen Elektrolyten versorgte. So wurde versucht ein körperähnliches Milieu zu schaffen. Die Organe wurden vor den Versuchen in Bechergläsern mit Tyrode aufbewahrt. Auch bei den Versuchen selbst befanden sie sich in den Organbädern der Versuchsapparaturen, die ein bestimmtes Volumen dieser physiologischen Nährlösung enthielten. Dies stellte einen wichtigen Punkt zur Gewährleistung des Überlebens der Organe dar, der neben der Aufrechterhaltung der physiologischen Temperatur in der Versuchsapparatur und der Versorgung mit Oxymix unverzichtbar war.

2.6.1. Zubereitung der Nährlösung

An jedem Morgen eines Versuchstages wurde frische Tyrode, die einer modifizierten Krebs–Henseleit–Lösung entsprach, hergestellt. Für die Zubereitung wurde ein 2-Liter-Messkolben verwendet.

Großteils wurden die Komponenten nicht als Reinsubstanz eingewogen, sondern aus Stammlösungen entnommen, die schon im Vorhinein hergestellt worden waren. Nachdem NaCl, KCl, $NHCO_3$, $MgSO_3$ und KH_2PO_4, sowie die Glucose in den Messkolben eingebracht worden waren, wurde letzterer zu ¾ mit Aqua bidestillata aufgefüllt und gut umgeschüttelt. Anschließend wurde nun diese Mischung im Messkolben für 20 Minuten mit Oxymix begast. Daraufhin wurde das $CaCl_2$ mit einer elektrischen Pipette Tropfen für Tropfen hinzugefügt, während die Nährlösung immer noch mit Oxymix begast wurde. Diese Zugabe von $CaCl_2$

musste sehr langsam erfolgen, um das Ausfallen von Calziumsalzen zu verhindern, was sich in einer Trübung der Lösung geäußert hätte. Nach der vollständigen Zugabe des $CaCl_2$ wurde der Messkolben schließlich mit Aqua bidestillata bis zum Meniskus aufgefüllt und nochmals gut umgeschüttelt.

Die Zusammensetzung der Tyrode bestanden aus folgenden Komponenten in den angegebenen Konzentrationen:

Substanz	**Molekulargewicht**	**Stammlösung**	**Menge Stammlösung/l Tyrode**	**Konzentration (mmol/l)**
NaCl	58,442 g/mol	1000,25 g/5 l	33,60 ml	115,01
KCl	74,550 g/mol	50,33 g/5 l	35,00 ml	4,73
$NaHCO_3$	84,010 g/mol	125,00 g/5 l	83,70 ml	24,91
$MgSO_4$	120,370 g/mol	147,02 g/5 l	1,18 ml	0,29
KH_2PO_4	136,090 g/mol	62,00 g/250 ml	1,18 ml	2,15
$CaCl_2$	110,980 g/mol	34,00 g/250 ml	3,20 ml	3,92
Glucose	180,160g/mol	Reinsubstanz	1,98 g	-

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährlösung

2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen

Die Versuche an den isolierten Organen wurden in zwei verschiedenen Apparaturen durchgeführt. Für die Experimente am Papillarmuskel wurde die Apparatur A herangezogen. Für die Untersuchungen an den Präparaten der Lungenarterie, der Aorta, des Darmes sowie des Vorhofes wurde die Apparatur B benutzt.

Die Organe wurden in den Versuchsapparaturen stets mit Sauerstoff versorgt. Der PH-Wert und die Temperatur spiegelten physiologische Bedingungen wieder, was für das Gelingen der Experimente eine grundlegende Rolle spielte.

Das Einspannen der isolierten Organe erfolgte mit Hilfe eines Silberdrahtes, der über das obere Ende am sogenannten Kraftwandler befestigt war. Die mechanischen Veränderungen der Organe wurden dadurch in ein elektrisches Signal umgewandelt und im Anschluss daran über einen Amplifier verstärkt. Von diesem aus wurde das Signal dann zum Schreibgerät transferiert, wo es als Kurve dokumentiert wurde.

2.7.1. Versuchsapparatur A

Diese Apparatur wurde herangezogen, um die Wirkung der Testsubstanz PGU 189 HCl auf den Papillarmuskel festzustellen. Sie diente dazu zu eruieren, ob die Substanz zu einer Erhöhung oder Verringerung der Kontraktionskraft des Muskels führte.

Die Apparatur verfügte über ein Wasserbad, das jeden Morgen mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt wurde. Anschließend wurde die integrierte Heizspirale eingeschalten, um das Wasserbad auf die richtige Temperatur von 35° Celsius aufzuheizen. Dieser Vorgang ließ sich durch einen Thermostat genau kontrollieren.

In der Abdeckplatte des Wasserbades war das Organbad eingelassen, sodass dieses in die gefüllte Wanne eintauchte. Der isolierte und präparierte Papillarmuskel ließ sich in dieser Konstruktion fixieren, indem der untere Teil des Muskels zwischen einem Plexiglasscheibchen und einer Elektrode eingeklemmt wurde, die mit einem Schraubenzieher festgeschraubt wurden. Der obere Teil des Papillarmuskels, an dem in der Vorbereitungsphase schon das Silberhäkchen angebracht worden war, wurde über letzteres an einem Silberdraht

befestigt. Dieser Silberdraht führte in weiterer Folge zum sogenannten Kraftwandler, welcher das Messwerkzeug des Versuches darstellte. Die Organhalterung sowie der Kraftwandler befanden sich auf einem Plastiksteg, der über eine Halterung und einen Stativschlitten an einem Stativ befestigt war. Durch diesen Stativschlitten konnte die Höhe verstellt werden und das Präparat in das Organbad eingetaucht werden. Beim Einspannen des Organs durfte nicht zu viel Zeit vergehen, um das Präparat nicht durch unphysiologische Bedingungen zu schädigen.

Das Organbad wurde auf der unteren Seite über eine Fritte mit einströmenden Oxymix versorgt.

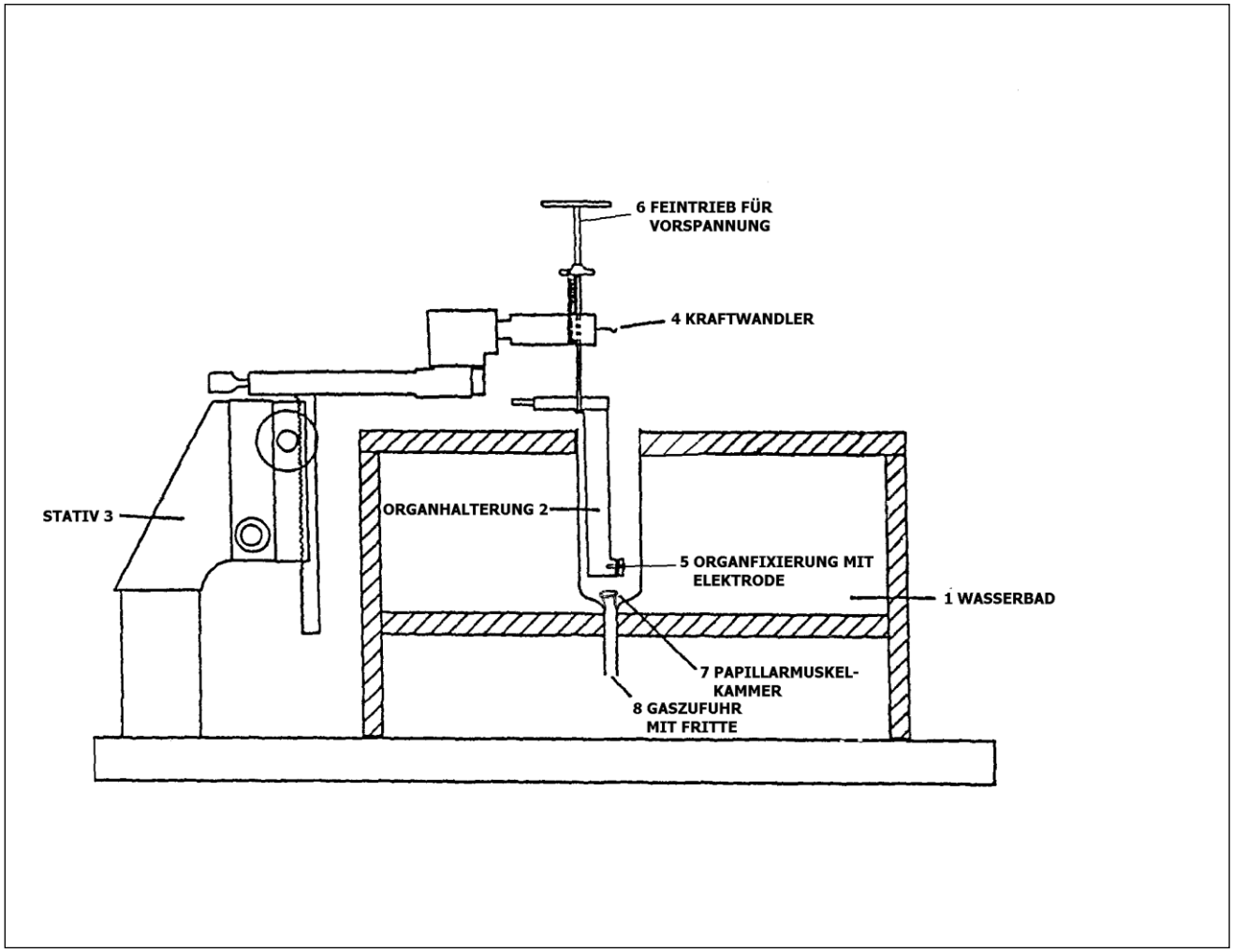


Abbildung 5: Darstellung der Versuchsapparatur A

2.7.2. Versuchsapparatur B

Diese Apparatur, die für die Experimente an Vorhof, Aorta, Pulmonalarterie und Darm herangezogen wurde, ähnelte der Versuchsapparatur A, allerdings unterschied sie sich von dieser durch die Art des Organbades, sowie in der Funktionsweise der Aufhänge-Vorrichtung der Präparate.

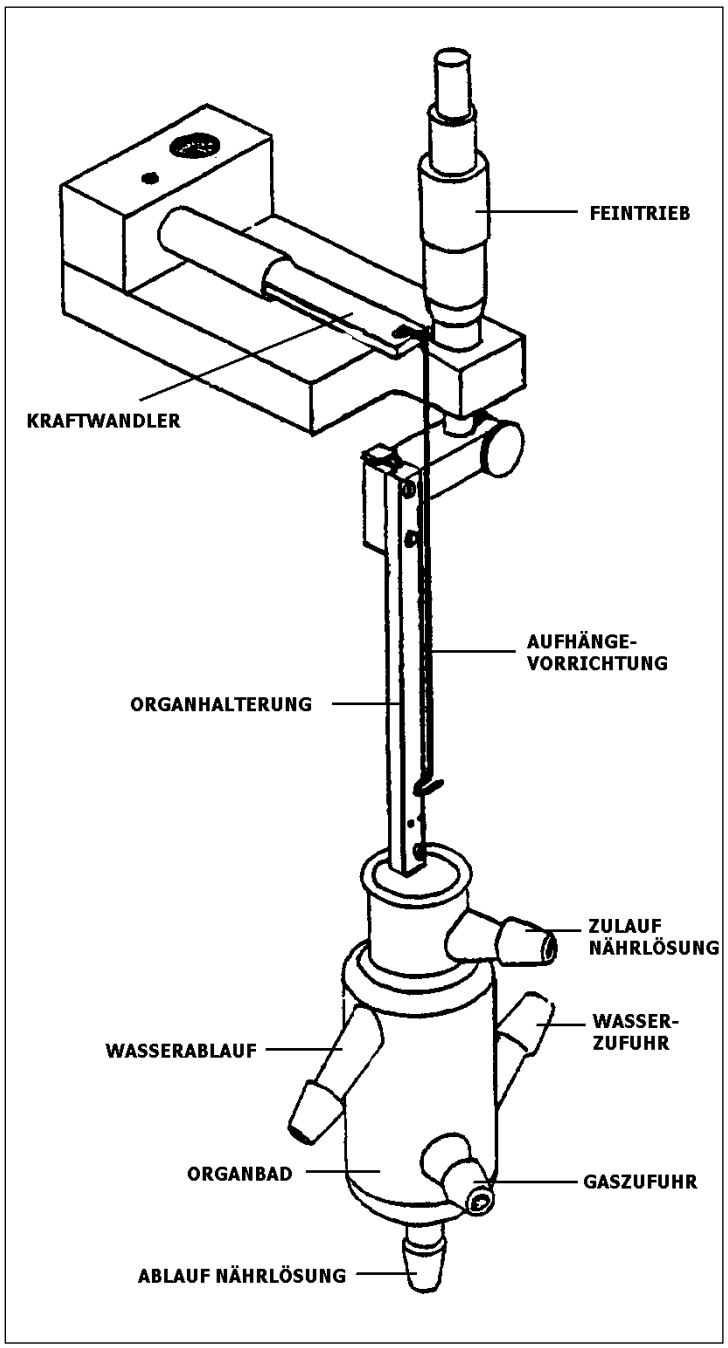


Abbildung 6: Darstellung der Versuchsapparatur B

Das Organbad bestand aus einem doppelwandigen Glaszylinder, in dessen Zwischenbereich das temperierte Wasser zirkulieren konnte. Dies erfolgte über einen Zufluss durch einen Schlauch am unteren Ende sowie einen Abflussschlauch am oberen Ende. Die Temperatur des Wasserbades wurde mit einem Thermostat kontrolliert und konstant auf 37° Celsius gehalten.

Der Innenraum des Glaszylinders fungierte als eigentliches Organbad, das mit einer genau abgemessenen Menge an Nährlösung befüllt wurde. Am oberen Ende war das Organbad offen, sodass die Organhalterung mit der Aufhängevorrichtung hier eingebracht werden konnte. Das untere Ende des Organbades wurde durch einen Schlauch abgeschlossen, der über eine Quetschklemme verschlossen beziehungsweise geöffnet werden konnte. Auf diese Art und Weise konnte das Organbad geleert und gereinigt werden.

Die Präparate wurden über einen Silberdraht an der unteren Seite der Organhalterung sowie über einen weiteren Silberdraht, der am Kraftwandler befestigt war, fixiert. Mittels eines Feintriebes konnte die verlangte Vorspannung angelegt werden, diese sollte bei allen Versuchen einheitlich sein, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Das eingespannte Organ wurde auch hier durch ein einströmendes Gasgemisch versorgt.

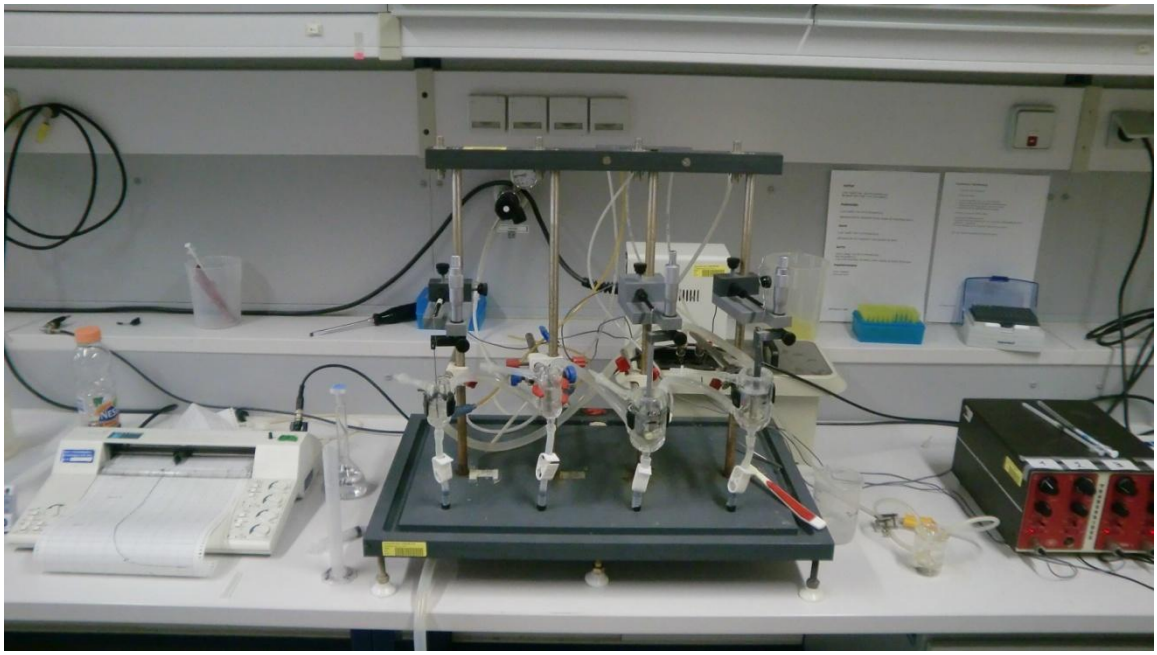


Abbildung 7: Originalabbildung der Apparatur B mit Schreibgerät (links) und Verstärker (rechts)

2.7.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler, über den beide Apparaturen verfügten, war das eigentliche Messinstrument im Versuchsablauf. Durch die Kontraktion der Muskulatur der eingespannten Organe wurde eine mechanische Kraft erzeugt, die der Kraftwandler in einen elektrischen Impuls umwandelte. Durch die Änderung der Kontraktionskraft kam es zu einer Veränderung des elektrischen Widerstandes. Dieses Signal, die Veränderung des Stromflusses, wurde nach der Umwandlung von einem Verstärker („4-Channel-Transducer-Amplifier“, World Precisions Instruments) intensiviert. Durch Weiterleitung an ein Schreibgerät („Single Channel Model BD 112 Flatbed Recorder“, Kipp & Zone), das mit einer steten Papierzufuhr versorgt war, wurde die Kontraktion durch einen Filzschreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Diese Kurven wurden im Anschluss an die Versuche ausgewertet.

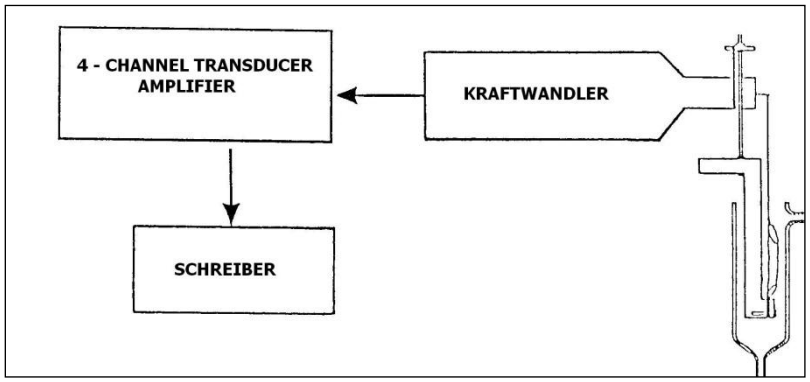


Abbildung 8: Darstellung der Signalübertragung

2.7.4. Gasversorgung

Die Gasversorgung erfolgte mittels eines Gemisches aus 95% O_2 und 5% CO_2, welches als Oxymix bezeichnet wurde. Die isolierten Organe wurden stets damit versorgt, sowohl in den Bechergläsern während der Vorbereitungszeit als auch im Organbad der Versuchsapparaturen. Bei der Bereitung der Nährlösung wurde diese schon während des Herstellungsprozesses 20 Minuten mit Oxymix begast.

Die Versorgung der isolierten Organe in den Versuchsapparaturen mit dem Gasgemisch erfolgte über Schläuche, gespeist von einer zentralen Gasflasche. Über ein Schlauchsystem

gelangte das Gemisch zu den Apparaturen, wo es über eine Fritte in das Organbad einströmte und sich fein verteilte.
Durch Schraubklemmen an den Plastikschläuchen konnte die Permeabilität der Schläuche reguliert werden und so die Intensität des Einstromes geregelt werden.

Die Begasung der Organe wurde während des gesamten Versuchsablaufes gewährleistet, und war von unerlässlicher Notwendigkeit zur Versorgung der Organe mit Sauerstoff. Weiters konnte auf diese Art der physiologische pH-Wert von 7,2 – 7,4 konstant gehalten werden. Auch für die gute Verteilung des Wirkstoffes spielte die Durchspülung mit Oxymix eine essentielle Rolle.

2.8. Versuchsdurchführung

Zu Beginn jedes Versuchstages wurden die Organbäder der einzelnen Apparaturen gereinigt, um einen ungestörten Ablauf der Versuche zu ermöglichen und eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die Organbäder wurden aus diesem Grund mehrere Male mit Aqua bidestillata gespült. Anschließend wurde das Organbad einmal mit Nährlösung durchgespült. Am Abend jedes Versuchstages wurden dieselben mit 2%iger Salzsäure gereinigt, um auskristallisierte Rückstände der Nährlösung zu beseitigen. Im Anschluss daran erfolgte ein mehrmaliges Ausspülen der Bäder mit Aqua bidestillata. In der Apparatur A musste dies immer mit Hilfe einer Plastikspritze erfolgen, um die Flüssigkeiten abzusaugen. Bei der Apparatur B hingegen könnten die Waschflüssigkeiten durch Öffnen der Quetschklemme abgelassen werden.

Nach der Reinigung der Organbäder am Morgen konnte dann die genau abgemessene Menge an Nährlösung in das Bad eingebracht werden. Des Weiteren wurde nun die Gasversorgung sichergestellt, indem die Ventile geöffnet wurden. Das Gasgemisch sollte in einem konstanten Strom die Nährlösung durchperlen, sowohl ein zu hoher Einstrom wäre ungünstig gewesen, weil dies zu einem Überschwappen des Organbades hätte führen können, als auch ein zu geringer Strom hätte einen Nachteil mit sich gebracht, da dadurch die Organe mit Sauerstoff unterversorgt gewesen wären. Zudem wurden die Organbäder bereits während der Herstellungsphase der Nährlösung auf die richtige Temperatur gebracht.

Nach diesen Vorbereitungen konnten die Organpräparate in die Apparaturen eingebracht werden, um dort an den Silberdrähten befestigt zu werden. Dies musste mit größter Vorsicht geschehen, um die Organe nicht zu überdehnen oder zu verletzen. Daraufhin folgte die Anpassungsphase, in der sich die Organe stabilisieren und an die gegebenen Bedingungen akklimatisieren konnten. Bei den glattmuskulären Präparaten folgte danach die Vorkontraktion mit Hilfe der Kaliumchloridlösung.

Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte im weiteren Verlauf der Versuche mit Finnpipetten (Fa. Labsystem, Finnland) in ansteigender Konzentration. Zwischen jedem Pipettierschritt lagen 45 Minuten. Bei der Zugabe der Testsubstanz war darauf zu achten, die Drähte in den Versuchsapparaturen nicht zu berühren, weil dies zu einer Störung der Messung geführt hätte. In folgendem Pipettierschema sind die Konzentrationsstufen der Substanzzugabe ersichtlich:

Zugegebene Menge an PGU 189 HCl	Konzentration im Organbad
1 µl	1 µmol/l
2 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

Tabelle 3: Pipettierschema

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden nun die genauen Versuchsabläufe an den einzelnen isolierten Organen näher beschrieben.

2.8.1. Versuchsablauf - Vorhof

Nach der Vorbereitung der Versuchsapparatur B wurde der präparierte Vorhof (Vergl. Kapitel 2.5.1.) über die beiden Silberdrähte eingehängt und anschließend in die Nährlösung eingetaucht, die bereits mit Oxymix versorgt wurde. Auch die Temperatur des Bades von 35° Celsius war gegeben. Nun wurde der Verstärker in Betrieb genommen und eine Vorspannung von 10,4 mN an das Organ angelegt. Hierauf folgte eine 60-minütige Anpassungsphase, in der sich der Vorhof auf seine Schlagfrequenz einpendeln konnte. Nach Verstreichen dieser Zeit wurden die Schläge des Vorhofes über den Schreiber aufgezeichnet. Alle fünf Minuten wurde

die Frequenz der Schläge auf 6 cm des Millimeterpapieres aufgezeichnet, die einer Dauer von 12 Sekunden entsprachen. Die Geschwindigkeit des Papiervorschubes betrug immer konstant 5 mm/s.

Sobald sich die Schlagfrequenz nicht mehr änderte und eine Gleichmäßigkeit aufwies, wurde der Kontrollwert (100% ± 0,00) ermittelt und mit der kumulativen Zugabe der Substanz in steigender Konzentration begonnen. Alle 45 Minuten wurde die nächsthöhere Konzentration eingespritzt. Während des ganzen Versuches wurden die Schläge des Vorhofes alle 5 Minuten aufgezeichnet.

2.8.2. Versuchsablauf - Lungenarterie

Zunächst musste das vorbereitete ringförmige Präparat in die Versuchsapparatur B eingebracht werden. Dazu wurden zuerst die beiden Silberdrähte L-förmig verbogen und in den richtigen Abstand zueinander gebracht. Daraufhin wurde das Präparat vorsichtig mit einer Pinzette horizontal daran aufgehängt, wobei es wichtig war, das Organ nicht zu überdehnen. Nachdem das Präparat zwischen den beiden Drähten angebracht war, wurde die Organhalterung in das Organbad abgesenkt, das mit Tyrode befüllt war und wo es wieder mit Oxymix umspült wurde.

Nun wurden der Schreiber und der Verstärker in Betrieb genommen. Nachdem eine Vorspannung von 5 mV angelegt worden war, wurde der Schreiber wieder auf den Nullpunkt versetzt und mit dem Feintrieb auf 9,81 mN eingestellt. Diese Vorspannung diente dazu, dass der Muskel im Laufe des Versuches seine maximale Kontraktionskraft entwickeln konnte und eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben war. Auch hier benötigte das Organ eine Anpassungsphase von etwa 20 Minuten.

Um das Gefäß nun maximal zu kontrahieren, damit dann im Versuch die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz überprüft werden konnte, wurde das Präparat mit einer 90 mmolaren KCl-Lösung versetzt. Diese wurde jeden Tag aufs Neue hergestellt, indem jeweils 0,67 g KCl in 100 ml Tyrode gelöst wurden (Vergl. Kapitel 2.3.2.).

Nachdem die ersten 20 Minuten verstrichen waren, wurde der Schreiber über die Tasten „record on“ und „pen down“ aktiviert. Daraufhin wurde die Nährlösung aus dem Organbad

abgelassen, indem die Quetschklemme geöffnet wurde. Nachdem die komplette Menge an Tyrode abgeflossen war, wurde die Quetschklemme wieder verschlossen und das Organbad mit einer genau abgemessenen Menge an KCl-Lösung versetzt. Bei der Apparatur mit dem kleineren Organbad waren dies 8 ml, bei jener mit dem größeren Volumen waren es 25 ml.
Dies führte zur Kontraktion des Präparates der Arteria pulmonalis, welche sich durch ein starkes Ausschlagen nach links auf dem Millimeterpapier äußerte. Nun wurde das Präparat so lange beobachtet, bis es sich konstant auf einen Wert eingependelt hatte und den Zustand maximaler Kontraktion erreicht hatte. Dieser Wert wurde als Kontrollwert herangezogen.

Nachdem sich ein Plateau eingestellt hatte, wurde die Testsubstanz in der niedrigsten Konzentration eingespritzt. In Abständen von jeweils 45 Minuten wurden dann die weiteren Konzentrationen der Testsubstanz kumulativ hinzugefügt. Der ganze Versuchsablauf wurde bis zum Ende über den Schreiber aufgezeichnet.

2.8.3. Versuchsablauf - Aorta

Die Vorgehensweise bei den Versuchen an der Aorta war ähnlich der der Arteria pulmonalis. Auch hier wurden die ringförmigen Präparate der Aorta an den beiden Silberdrähten in der Apparatur B befestigt. Die Vorgehensweise bei den Versuchen mit der Aorta war analog wie bei den Experimenten mit der Arteria pulmonalis. Der Unterschied zur Arteria pulmonalis bestand in der Vorspannung, die hier 10 mV betrug. Mit dem Feintrieb wurde diese wieder auf 19,6 mN eingestellt. Erst nach dem Erreichen des Plateauwertes durch die Vorkontraktion wurde die angelegte Spannung von 10 mV auf 5 mV umgestellt.

2.8.4. Versuchsablauf - Terminales Ileum

Für die Versuche wurden die bereits vorbereiteten Präparate des Darmes über die in der Apparatur B befindlichen Silberdrähte eingehängt. Sodann wurde die Organhalterung in die Nährlösung eingetaucht, die schon auf 37° Celsius vortemperiert und mit Oxymix begast war.
Nun wurden der Schreiber und der Verstärker eingeschalten und nach einer Spanne von 20 Minuten, die mittels einer Stoppuhr gemessen wurde, wurde eine Vorspannung von 5 mV angelegt und dann der Schreiber auf die Position Null zurückgesetzt.

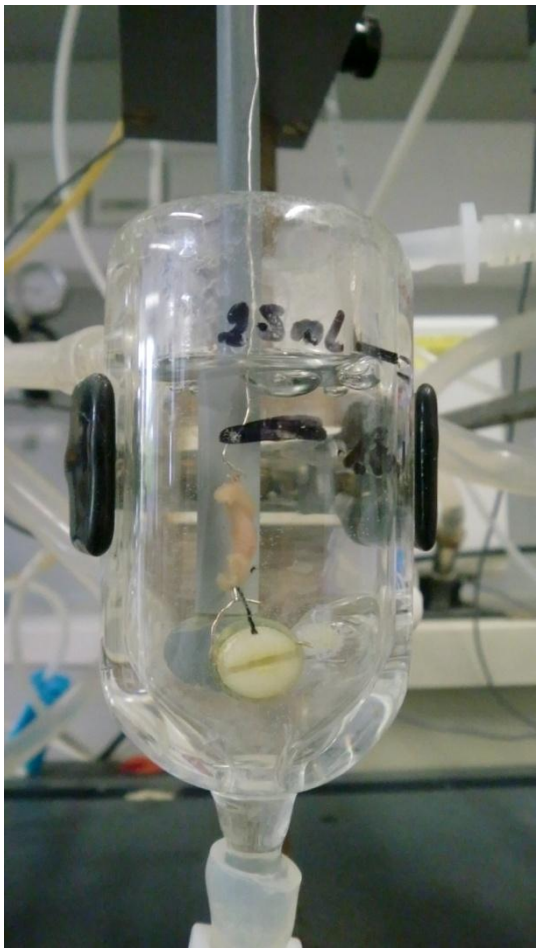


Abbildung 9: Originalabbildung eines in der Versuchsapparatur fixierten Darmpräparates

Darauf wurde zur Kontraktion der glatten Muskulatur des Darmes eine genau abgemessene Menge einer 60 mmolaren KCl-Lösung zugesetzt, wodurch es zu einem Ausschlagen der Kurve nach links kam. Im großen Organbad entsprach dies einem Volumen von 25 ml, im kleineren einer Menge von 8 ml. Die KCl-Lösung wurde durch Einwiegen von 0,44 g KCl in 100 ml Tyrode hergestellt. Jetzt konnte der Verlauf der Kontraktion beobachtet werden, bis sich ein Plateau einstellte, was rund 1- 1,5 Stunden dauerte. Wenn die maximale Kontraktion des Darmes konstant 100% betrug, konnte mit dem Einspritzen der ersten Konzentration der Testsubstanz begonnen werden. Der Schreiber zeichnete kontinuierlich den Verlauf der Kurve auf. Die nächsthöhere Konzentration der Testsubstanz wurde jeweils nach 45 Minuten eingespritzt.

2.8.5. Versuchsablauf - Papillarmuskel

Das Präparat des Papillarmuskels wurde wie in Kapitel 2.7.1. beschrieben in die Versuchsapparatur A eingehängt.

Im Gegensatz zum Vorhof besaßen die Papillarmuskelpräparate keine autonome Schlagfähigkeit, daher war zur Stimulation ein elektrischer Impuls notwendig. Dies geschah mit Hilfe eines Reizgerätes. Alle 15 Sekunden wurde von einem Accupulser ein Stromschlag verabreicht. Diese Reizungen, die Rechteckimpulse von 3 ms darstellten und eine Frequenz von 1 Hz aufwiesen, wurden so lange erhöht bis es zur wiederholten Kontraktion des Muskels kam. Daraufhin wurde die Stromstärke noch einmal um 10% gesteigert. Nachdem an den Papillarmuskel eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt worden war, wurde die Kontraktionskraft des Muskels vom Schreiber aufgezeichnet. Der Papiervorschub des Schreibers betrug 5 mm/s und die Stromstärke des Schreibers wies 5 mV bzw. 2 oder 1 mV auf, wenn notwendig.

Alle 5 Minuten wurden die Kontraktionen des Muskels dokumentiert. Nach einer Anpassungsphase von 45 Minuten wurde die Amplitude der aufgezeichneten Zacken vermessen. Hatte sich der Papillarmuskel auf eine konstante Kontraktionskraft eingependelt, wurde die Geschwindigkeit des Papiernachschubes auf 20 mm/s umgestellt, um ein genaueres Messen zu ermöglichen. Nun konnte mit der Zugabe der niedrigsten Konzentration der Testsubstanz begonnen werden. Alle 45 Minuten erfolgte eine weitere kumulative Zugabe der Substanz in der nächsthöheren Konzentration. Bei der jeweils letzten Messung wurde die Geschwindigkeit des Schreibgerätes auf 20 mm/s umgestellt, um eine breitere Darstellung der Kurve zu erhalten.

2.8.6. Versuchsablauf zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin

Für die Bestimmung des Wirkmechanismus wurden Präparate der Aorta herangezogen. Diese wurden wie in Kapitel 2.7.2. beschrieben in die Apparatur eingehängt. Auch hier wurde zur Vorkontraktion wieder eine 90 mmolare KCl- Lösung herangezogen. Nach Erreichen der Plateauphase, also der maximalen Kontraktion, wurde Nitro-L-Arginin zugesetzt. Dies geschah in 2 Versuchsreihen, einmal mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin und einmal mit 30 µmol/l. Nach einer Spanne von 45 Minuten wurde dann jeweils die Testsubstanz PGU 189

HCl in einer Konzentration von 20 µmol/l zugesetzt. Nach weiteren 45 Minuten war das Ende des Versuches erreicht.

Abbildung 10: Originalabbildung der ringförmigen Präparate der Aorta descendens

2.9. Auswertung der Ergebnisse

2.9.1. Auswertung der Ergebnisse des Atrium cordis dexter

Die Versuche an den isolierten Vorhofpräparaten dienten dazu, den Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie zu eruieren. Daher wurde vom Schreibgerät die Schlagfrequenz des Vorhofes aufgezeichnet. Der Papierdurchlauf wies eine Geschwindigkeit von 5 mm/s auf, wodurch der jeweils aufgezeichnete Bereich von 6 cm eine Zeitspanne von 12 Sekunden wiedergab. Die Anzahl der Schläge auf 6 cm bzw. 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier wurden abgezählt und mit 5 multipliziert, wodurch man die Schlagfrequenz pro Minute erhielt. Alle 5 Minuten wurde eine Messung durchgeführt. Sobald die Schlagfrequenz drei Mal hintereinander konstant war, wurde dieser Wert als 100% angenommen. Sodann wurde die Zugabe der Testsubstanz in ansteigender Konzentration durchgeführt. Die Werte, die daraus resultierten, wurden prozentuell zu den 100% betrachtet, wodurch der Einfluss auf die Chronotropie ersichtlich wurde.

2.9.2. Auswertung der Ergebnisse von Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminalem Ileum

An den Präparaten der Aorta sowie der Arteria pulmonalis wurde die vasodilatierende Aktivität der Testsubstanz ermittelt, beim Darm war es die spasmolytische Wirksamkeit. Bei allen drei Versuchsreihen wurde eine Kontraktionskurve erstellt. Durch Zugabe von KCl kam es zur maximalen Kontraktion, die beim Erreichen der Plateauphase mit 100% gleichgesetzt wurde. Mit einem Lineal wurde nach Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz die Entfernung zum Nullpunkt abgemessen. Die abgemessene Strecke musste mit einem Eichungsfaktor mulipliziert werden, und zwar bei den Messungen bei 5 mV mit 0,98, bei 2 mV mit 0,2 und bei 10 mV mit 1,2.

Daraus wurde die prozentuelle Vasodilatation errechnet, die sich anhand einer Dosis-Wirkungskurve darstellen ließ. So konnte der EC_{50}-Wert abgelesen werden.

2.9.3. Auswertung der Ergebnisse des Musculus papillaris

Beim Papillarmuskel wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Inotropie gemessen. Die Ergebnisse wurden dadurch ermittelt, dass die Amplitude der aufgezeichneten Schläge vermessen und je nach Stromstärke mit einem Faktor multipliziert wurde. Bei 2 mV betrug dieser 0,2, bei 5 mV 0,98. Diese Werte wurden anhand der 100%, die durch die konstante Amplitude der Zacken vor dem Einspritzen der ersten Substanzkonzentration ermittelt wurden, prozentuell umgerechnet. So konnte festgestellt werden, inwiefern die Substanz die Inotropie der Präparate beeinflusste.

2.9.4. Statistik

Die Ergebnisse wurden durch Berechnung des Mittelwertes aus den einzelnen erhaltenen Werten einer Versuchsreihe an einem Organ gewonnen. Zudem wurde dabei immer der Standardfehler (SEM) der Mittelwerte berechnet. Dies geschah mit Hilfe des Programmes „Sigma Plot 9.0“. Dieses wurde ebenfalls verwendet um die Dosis-Wirkungskurven zu erstellen, mittels derer auf graphischem Wege der EC_{50}-Wert bestimmt werden konnte. Dieser Wert gibt die Konzentration wieder, bei der im Verlauf des Versuches die halbmaximale Wirkung auftrat.

Weiters wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit P festgelegt. Bei Werten, die unterhalb von 5% ($P < 0,05$) bzw. 1% ($P < 0,01$) lagen, galt das Ergebnis als signifikant. Bei solchen unter 0,1% ($P < 0,001$) galten sie als hochsignifikant.

Da das Lösungsmittel DMSO eine Eigenwirkung auf die Organe aufwies, wurden diese Werte, die experimentell ermittelt wurden, von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen.

3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Versuche aus dem praktischen Teil der Diplomarbeit näher beschrieben.

3.1. Ergebnisse Testsubstanz PGU 189 HCl

3.1.1. Ergebnisse Atrium cordis dexter

Am rechten Vorhof wurde der Einfluss der Testsubstanz PGU 189 HCl auf die Schlagfrequenz ermittelt. Es wurden vier Präparate verwendet, an denen eine Veränderung der Chronotropie gezeigt werden konnte. Die Substanz PGU 189 HCl wurde in Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l im Abstand von 45 Minuten getestet. Vor der Substanzzugabe betrug der errechnete Kontrollwert 192,50 ± 14,93 Schläge pro Minute. Im Laufe der Versuchsreihe fiel der Wert stetig ab. Bei 30 µmol/l lag die Schlagfrequenz nur mehr bei 110,00 ± 10,61 Schlägen pro Minute.

PGU 189 HCl (µmol/l)	f± SEM (x/min)	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	192,50 ± 14,93	0 ± 0,00	4	-
1	170,00 ± 14,86	-11,90 ±1,87	4	0,05
3	152,50 ± 11,81	-20,75 ± 1,68	4	0,05
10	132,50 ± 11,09	-31,21 ± 2,42	4	0,01
30	110,00 ± 10,61	-42,76 ± 3,92	4	0,01
100	8,75 ±8,75	-96,12 ±3,88	4	0,001

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchungen mit PGU 189 HCl an den isolierten Vorhofpräparaten

In der angeführten Tabelle spiegelt f die Schlagfrequenz des Vorhofes wieder. Die Werte sind zum einen in Schlägen pro Minute angegeben, zum anderen in Prozent. SEM gibt den Standardfehler der errechneten Mittelwerte wieder. Des Weiteren sind in der Tabelle die Anzahl der Versuche n, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit P notiert. Die Werte in der Tabelle spiegeln die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz wieder.

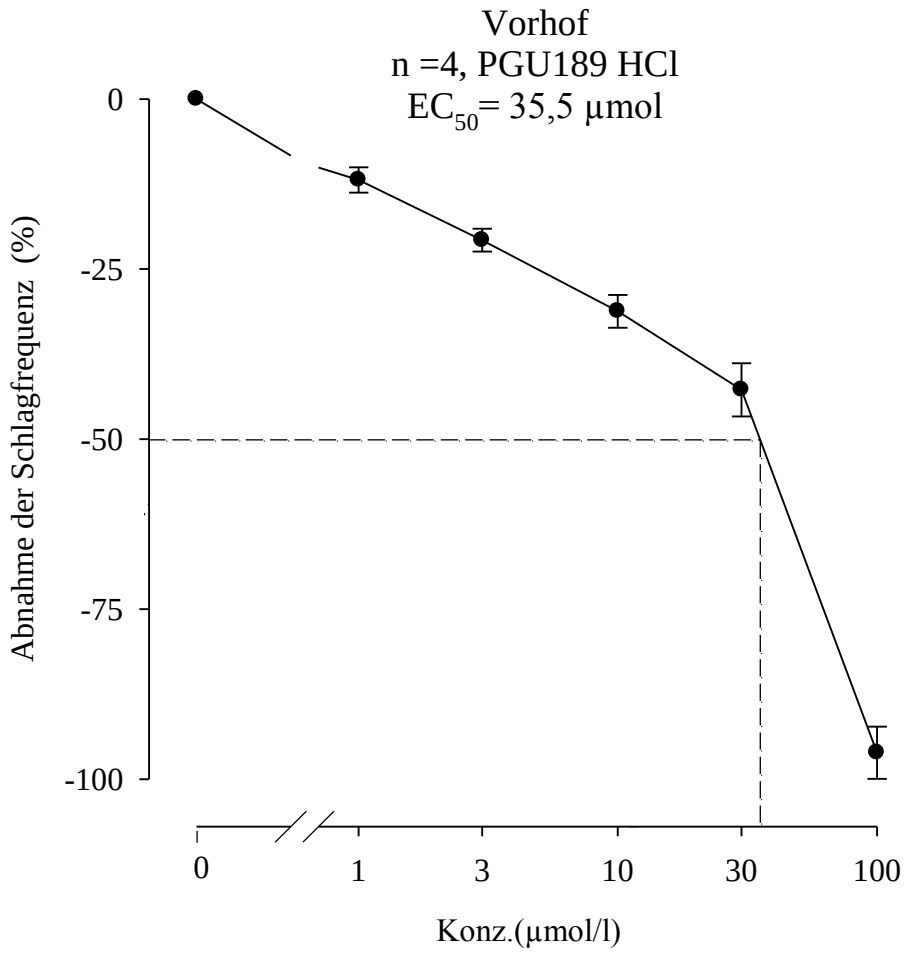


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 189 HCl an Präparaten von Atrium cordis dexter

Diese Abbildung ist eine graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von PGU 189 HCl an Präparaten des rechten Vorhofes. Im Diagramm stellt die x-Achse die Konzentration der Testsubstanz im Organbad in µmol/l dar, die y-Achse gibt die Schlagfrequenz des Vorhofes in Prozent an. Die senkrechten Balken stehen für den Standardfehler der Mittelwerte.

Wie in diesem Graphen ersichtlich, sinkt die Schlagfrequenz mit steigender Substanzzugabe. Der EC_{50}-Wert wurde bei 35,5 µmol/l erreicht.

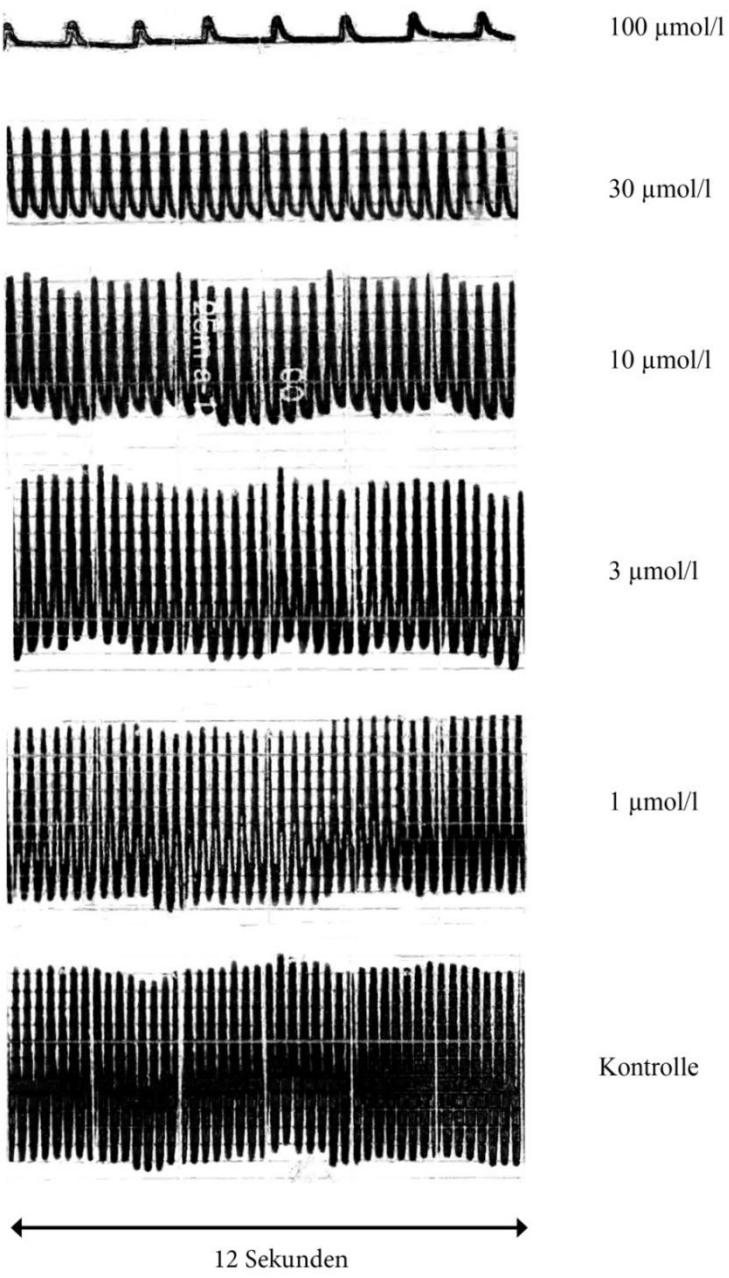


Abbildung 12: Originalaufzeichnung eines Versuches von PGU 189 HCl an einem Vorhofpräparat

Die Originalaufnahme zeigt die Abnahme der Schlagfrequenz mit steigender Substanzzugabe. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden jeweils im Abstand von 45 Minuten zugesetzt.

3.1.2. Ergebnisse Arteria pulmonalis

An der Pulmonalarterie wurde die Wirkung von PGU 189 HCl auf die glatte Muskulatur des Gefäßes festgestellt. Die Versuche wurden mit vier Präparaten durchgeführt, der Versuchsablauf gestaltete sich wie in Kapitel 2.8.2. beschrieben. Anhand des errechneten Mittelwertes vor der Substanzzugabe wurde der Kontrollwert festgelegt, der 8,93 ± 1,37 mN betrug und gleich 0,00 ± 0,00 % gesetzt wurde. Im Laufe des Versuches nahm die Kontraktionskraft stetig ab und betrug am Schluss der Untersuchung, nach Zugabe der höchsten Konzentration an PGU 189 HCl 3,52 ± 0,92 mN.

PGU 189 HCl (µmol/l)	**f_c± SEM (mN)**	**fc ± SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
Kontrolle (0)	8,93 ± 1,37	0,00 ± 0,00	4	-
1	8,53 ± 1,48	-4,99 ± 4,27	4	-
3	8,18 ± 1,59	-9,60 ± 4,39	4	0,05
10	6,15 ± 1,48	-32,82 ± 7,60	4	0,01
30	3,62 ± 0,95	-60,15 ± 7,51	4	0,01
100	3,52 ± 0,92	-61,54 ± 6,65	4	0,01

Tabelle 5: Wirkung von PGU 189 HCl auf die Präparate der Arteria pulmonalis bezüglich der Kontraktionskraft

In der abgebildeten Tabelle beschreibt f_c die Kontraktionskraft. Diese ist sowohl in mN als auch in Prozent angegeben. SEM gibt den Standardfehler des Mittelwertes an. Ebenfalls sind der Tabelle die Anzahl der Versuche sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit P zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden unter Abzug der Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO berechnet.

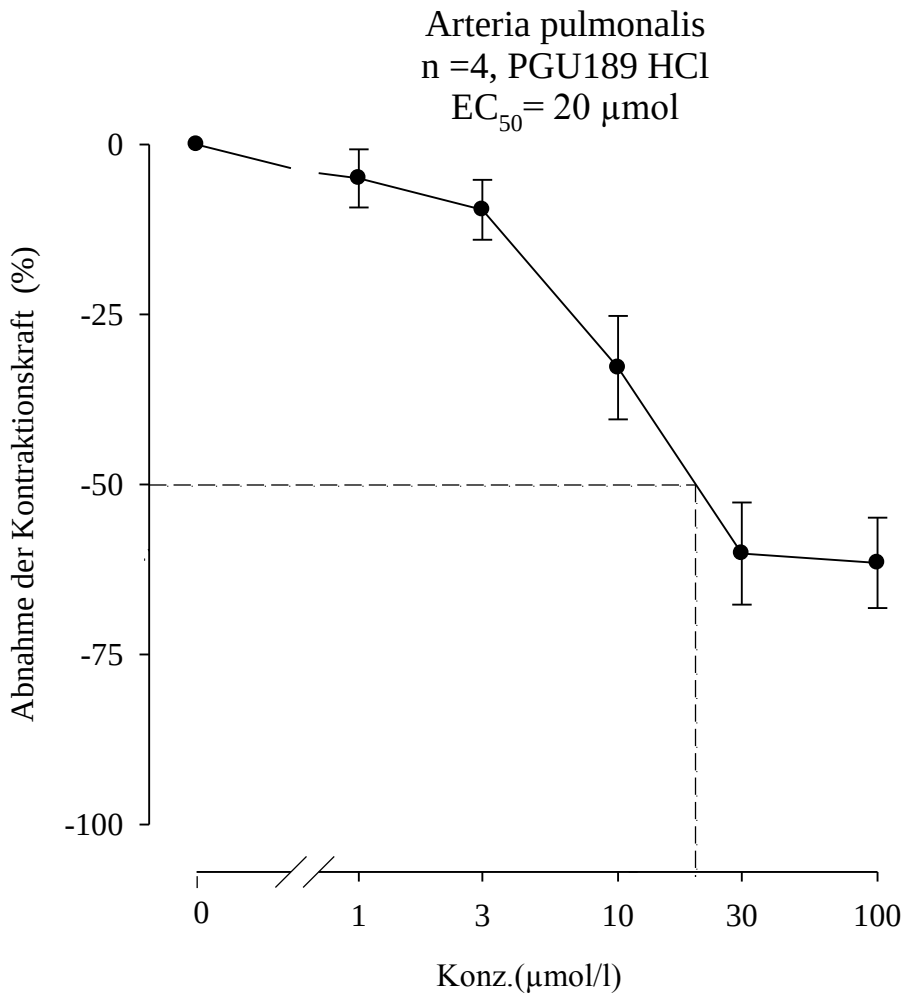


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 189 HCl an den Präparaten von Arteria pulmonalis

Der dargestellte Graph spiegelt die Abnahme der Kontraktionskraft durch Zugabe der Testsubstanz PGU 189 HCl wieder. Die x-Achse beschreibt die zugesetzte Konzentration an PGU 189 HCl in µmol/l. Die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken spiegeln den Standardfehler wider.

Bereits bei einer Konzentration von 1 µmol/l der Testsubstanz ist eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft ersichtlich. Der EC_{50} – Wert liegt bei 20 µmol/l.

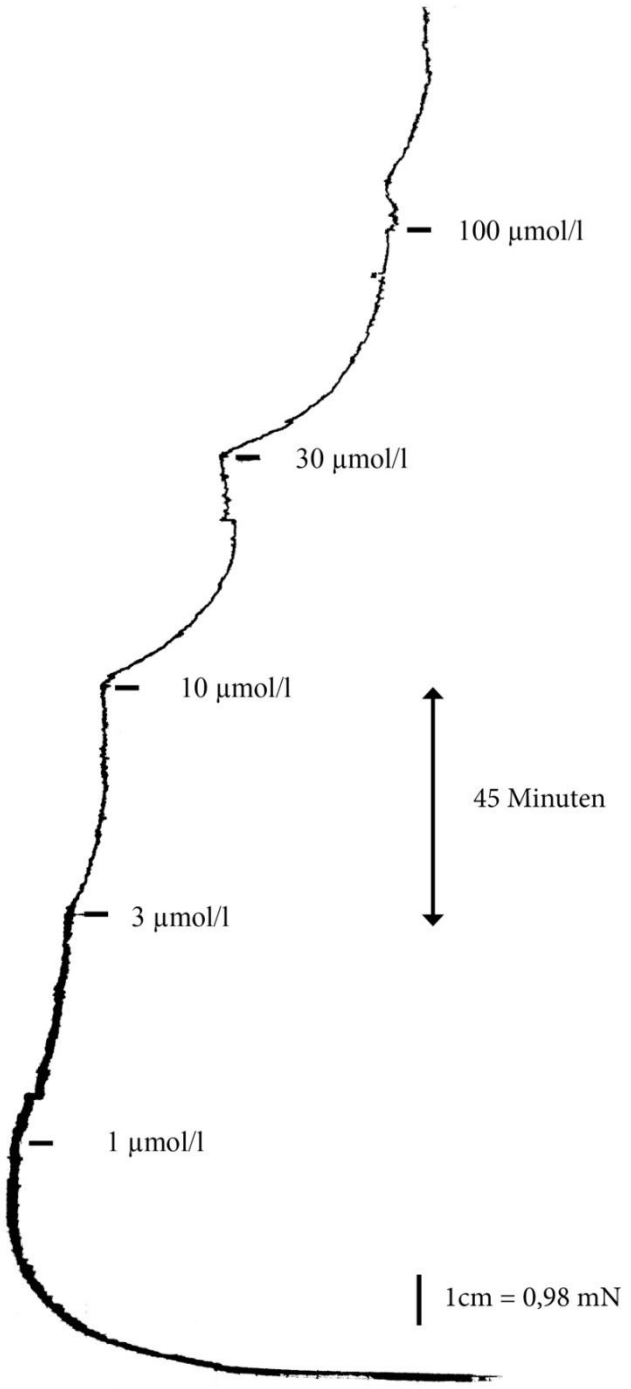


Abbildung 14: Originalaufzeichnung eines Versuches von PGU 189 HCl an einem Präparat der Arteria pulmonalis

In der Originalabbildung ist die Abnahme der Kontraktionskraft der Lungenarterie zu erkennen. Die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen von PGU 189 HCl ist ebenfalls ersichtlich.

3.1.3. Ergebnisse Musculus papillaris

Um zu den Ergebnissen für die Wirkung von PGU 189 HCl an isolierten Papillarmuskelpräparaten zu gelangen, wurden vier Versuche durchgeführt. Der Ablauf derselben gestaltete sich wie in Kapitel 2.8.5. beschrieben. Der Kontrollwert betrug vor der Zugabe der ersten Substanzkonzentration 0,74 ± 0,15 mN. Im Laufe der Versuche kam es zu einer stetigen Abnahme der Inotropie am Papillarmuskel. So fiel die Kontraktionskraft bei einer Substanzmenge von 10 µmol/l bereits auf 0,40 ± 0,12 mN ab, was einer Abnahme von -47,28 ± 6,02 % entspricht. Bei der letzten Konzentration von 100 µmol/l betrug die Kontraktionskraft nur noch 0,30 ± 0,07 mN bzw. -59,32 ± 4,89 %.

PGU 189 HCl (µmol/l)	f_c± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	0,74 ± 0,15	0,00 ± 0,00	4	-
1	0,60 ± 0,12	-17,92 ± 4,37	4	0,05
3	0,56 ± 0,16	-25,37 ± 7,96	4	0,05
10	0,40 ± 0,12	-47,28 ± 6,02	4	0,01
30	0,32 ± 0,09	-57,05 ± 4,20	4	0,01
100	0,30 ± 0,07	-59,32 ± 4,89	4	0,01

Tabelle 6: Ergebnisse der Untersuchungen mit PGU 189 HCl an isolierten Papillarmuskelpräparaten

Die Tabelle veranschaulicht die negativ inotrope Wirkung von PGU 189 HCl an isolierten Papillarmuskelpräparaten in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konzentrationen. Die Kontraktionskraft f_c ist angegeben sowie der Standardfehler der Mittelwerte SEM. In der Tabelle finden sich ebenfalls Informationen über die Anzahl der Versuche sowie über die Irrtumswahrscheinlichkeit P. Die Ergebnisse wurden unter Abzug der Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO berechnet.

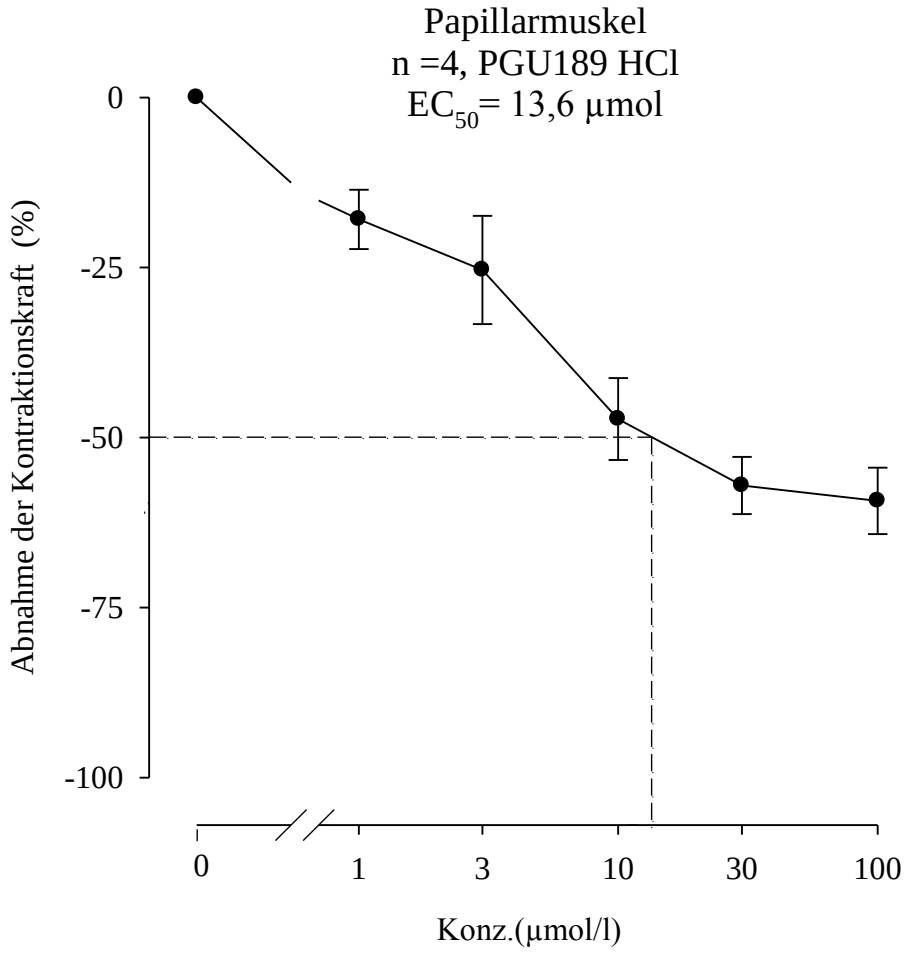


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 189 HCl an Präparaten von isolierten Papillarmuskeln

In der Abbildung ist die Abnahme der Kontraktionskraft am Papillarmuskel durch Einwirken der Testsubstanz ersichtlich. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen, auf der y-Achse finden sich die Werte für die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft. Der Standardfehler der Mittelwerte ist in Form der senkrechten Balken dargestellt. Der EC_{50} – Wert wurde auf graphischem Wege ermittelt und liegt bei 13,6 µmol/l.

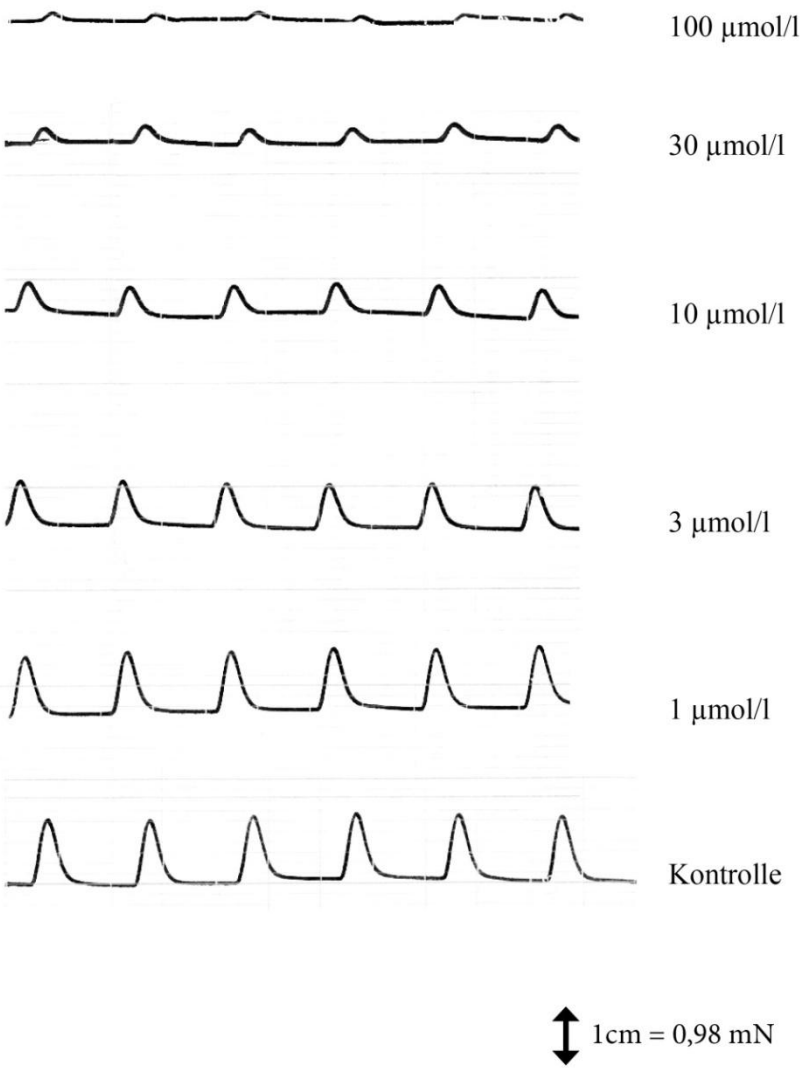


Abbildung 16: Originalaufzeichnung eines Versuches von PGU 189 HCl an einem Papillarmuskelpräparat

In der Originalabbildung ist die Abnahme der Inotropie durch Zugabe der Testsubstanz in steigender Konzentration erkennbar.

3.1.4. Ergebnisse Aorta descendens

Die Versuche an den Präparaten der Aorta erfolgten wie in Kapitel 2.8.3. beschrieben. Zur Ermittlung der vasodilatierenden Wirkung wurden fünf isolierte Organe herangezogen. Diese wurden jeweils mit Kaliumchloridlösung, die eine Konzentration von 90 mmol/l aufwies kontrahiert. Der ermittelte Wert während der Kontrollphase betrug 6,31 ± 1,02 mN. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte alle 45 Minuten, beginnend bei 1 µmol/l. Die folgenden Konzentrationsstufen waren 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l. Im Verlauf des Versuches nahm die Kontraktionskraft stetig ab, bei einer Konzentration von 1 µmol/l lag die Kontraktionskraft bei -4,76 ± 2,21%, wohingegen sie nach Zugabe der höchsten Konzentration an PGU 189 HCl bis auf -83,71 ± 5,45 % abfiel, was einer Kontraktionskraft von 1,15 ± 0,54 mN entspricht.

PGU 189 HCl (µmol/l)	**f_c± SEM (mN)**	**fc ± SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
Kontrolle (0)	6,31± 1,02	0,00 ± 0,00	5	-
1	6,06 ± 1,09	-4,76 ± 2,21	5	-
3	5,57 ± 0,97	-12,11 ± 2,93	5	0,05
10	4,28 ± 0,77	-32,03 ± 5,33	5	0,01
30	1,99 ± 0,59	-67,60 ± 9,27	5	0,01
100	1,15 ± 0,54	-83,71 ± 5,45	5	0,001

Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche an Aortapräparaten mit PGU 189 HCl

Die Tabelle zeigt die Veränderung der mittleren Kontraktionskraft f_c durch Einfluss von PGU 189 HCl in mN und in Prozent sowie die mittleren Standardfehler (SEM). Ebenso sind die Anzahl der verwendeten Präparate sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben.

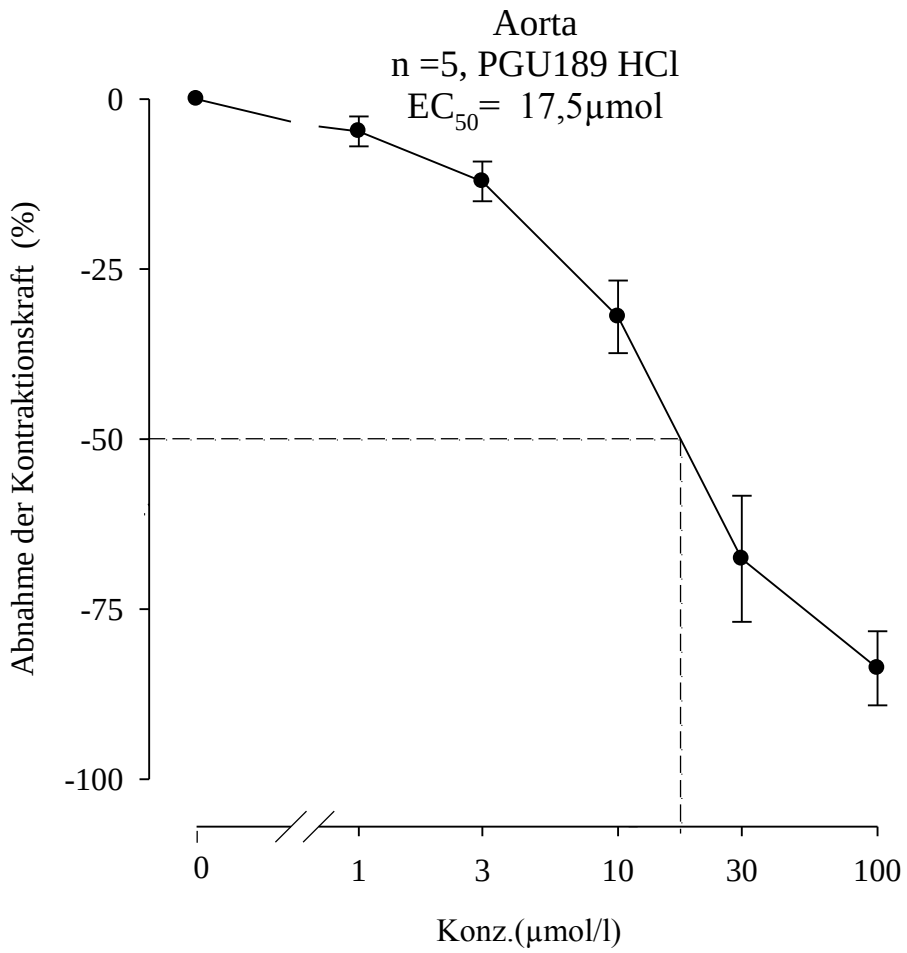


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 189 HCl an den Präparaten von Aorta descendens

In dieser Abbildung wird die Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta durch die Zugabe von PGU 189 HCl in unterschiedlichen Konzentrationsstufen graphisch dargestellt. Auf der x-Achse ist die Konzentration von PGU 189 HCl in µmol/l angegeben, auf der y-Achse findet sich die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die senkrechten Balken veranschaulichen die Standardfehler. Der EC_{50}– Wert wurde bei 17,5 µmol/l erreicht, somit ist die stark vasodilatierende Wirkung von PGU 189 HCl ersichtlich.

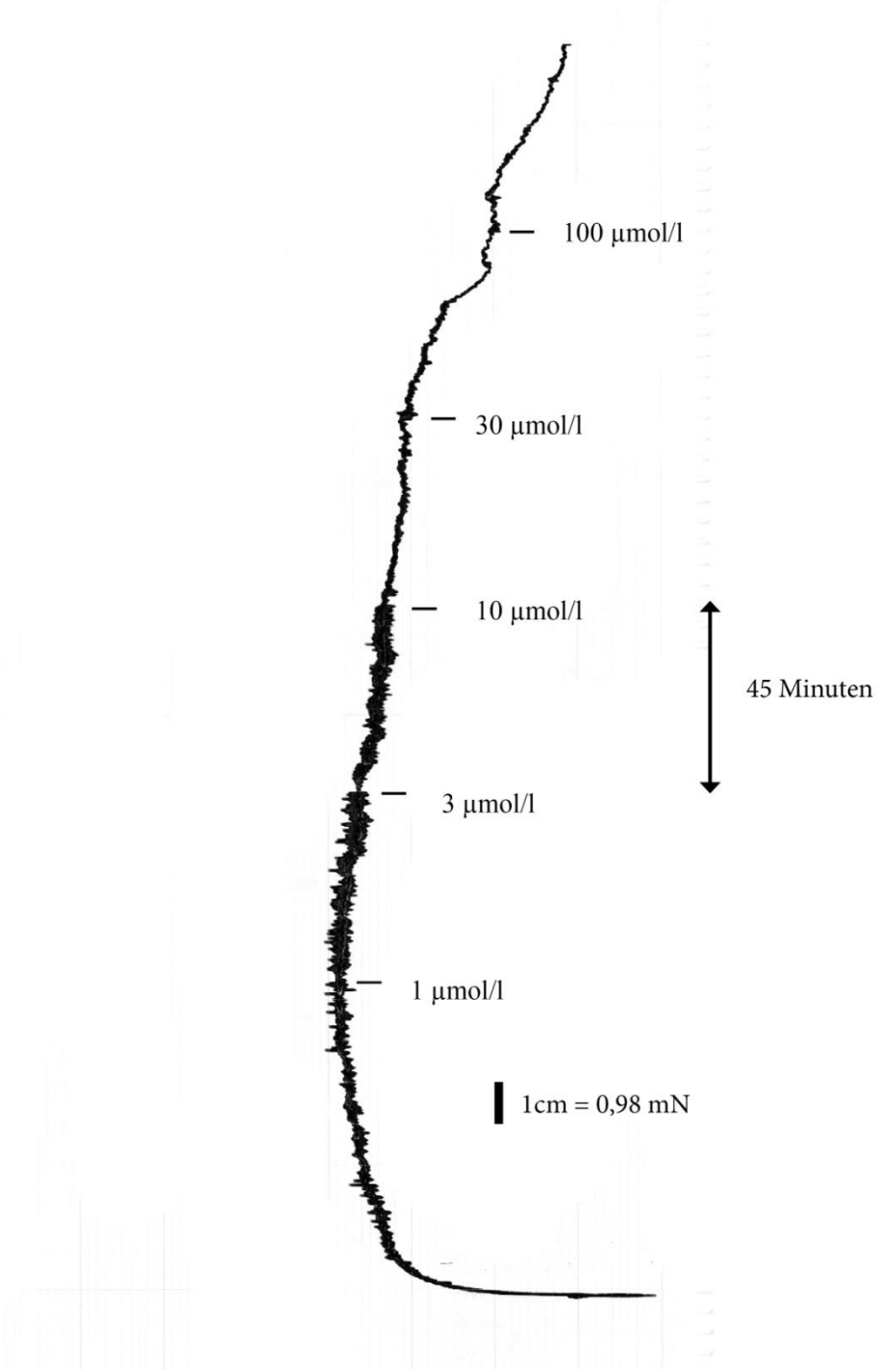


Abbildung 18: Originalaufzeichnung eines Versuches von PGU 189 HCl an einem Aortapräparat

Die Abnahme der Kontraktionskraft an einem Präparat der Aorta ist in dieser Originalabbildung ersichtlich. Die Testsubstanz wurde immer in einem Abstand von 45 Minuten injiziert.

3.1.5. Ergebnisse Terminales Ileum

Für die Experimente mit PGU 189 HCl an isolierten Darmpräparaten wurden vier Versuchsansätze herangezogen. Der Ablauf gliederte sich bei jedem Versuch wie in Kapitel 2.8.4. beschrieben. Zu Beginn des Versuches wurden die Organpräparate mit Kaliumchloridlösung, die eine Konzentration von 60 mmol/l aufwies, vorkontrahiert. Aus den Werten, die bei dieser Maximalkontraktion erreicht wurden, ließen sich das arithmetische Mittel in mN und in Prozent sowie der Standardfehler berechnen. Die erhaltenen Ergebnisse betrugen bei diesem Kontrollwert 9,21 ± 2,29 mN. Im Verlauf der Versuche kam es zu einer steten Abnahme der Kontraktionskraft des Darmes. Bei der Gabe von 1 µmol/l der Testsubstanz PGU 189 HCl fiel die mittlere Kontraktionskraft bereits auf 6,36 ± 1,59 mN ab, was einem Wert von -30,31 ± 4,23 % entspricht. Bei einer Konzentration von 100 µmol/l am Versuchsende wies der Darm nur mehr eine Kontraktionskraft von 0,70 ± 0,35 mN bzw. -94,36 ± 2,95 % auf.

PGU 189 HCl (µmol/l)	f_c± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	9,21 ± 2,29	0,00 ± 0,00	4	-
1	6,36 ± 1,59	-30,31 ± 4,23	4	0,01
3	4,37 ± 1,03	-55,29 ± 4,80	4	0,01
10	2,18 ± 0,74	-77,75 ± 3,14	4	0,001
30	0,85 ± 0,43	-92,22 ± 3,38	4	0,001
100	0,70 ± 0,35	-94,36 ± 2,95	4	0,001

Tabelle 8: Ergebnisse der Untersuchungen mit PGU 189 HCl an den Präparaten des terminalen Ileums

Die Tabelle zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums durch Einfluss der Testsubstanz PGU 189 HCl. Die Kontraktionskraft f_c ist in mN sowie in Prozent angegeben. Zusätzlich gibt die Tabelle noch Auskunft über den Standardfehler SEM. Ebenso sind die Anzahl der Versuche n und die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben.

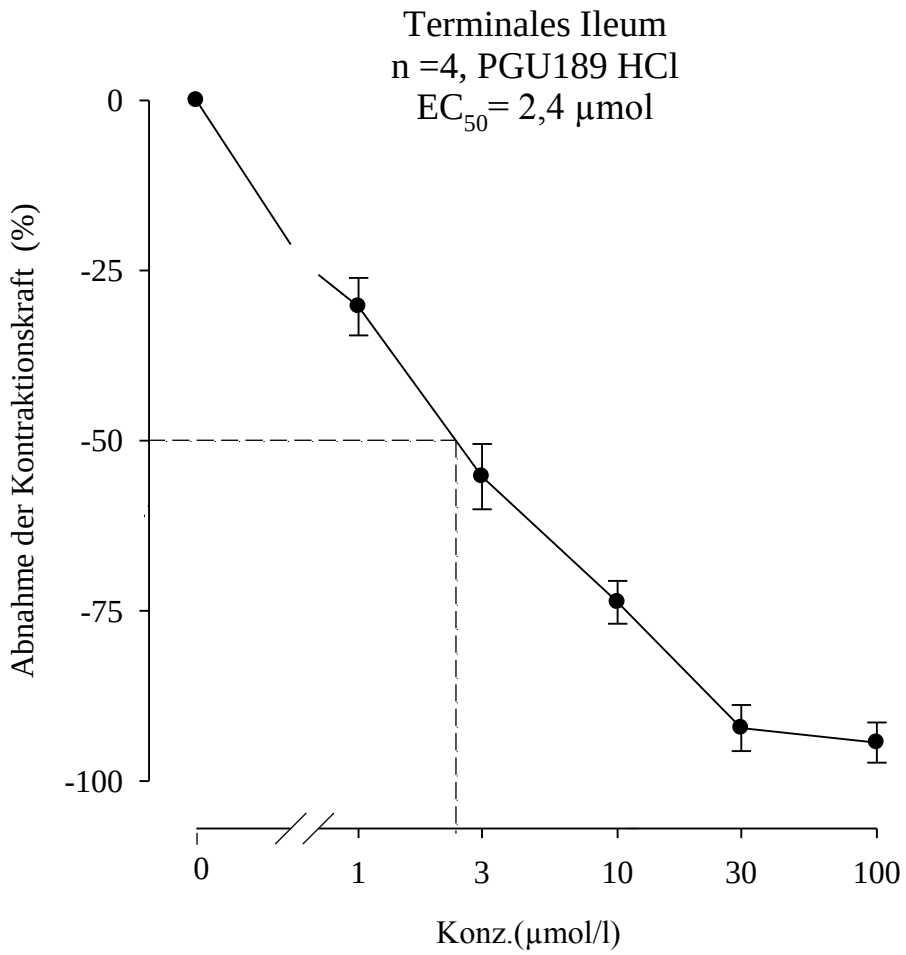


Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 189 HCl auf Präparate des terminalen Ileums

Die graphische Darstellung der Wirkung von PGU 189 HCl auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums spiegelt die starke spasmolytische Wirkung der Testsubstanz wider. Die x-Achse in der Graphik gibt die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l an. Auf der y-Achse ist die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft vermerkt. Die senkrechten Balken symbolisieren den Standardfehler der arithmetischen Mittelwerte. Der EC_{50} – Wert liegt bei 2,4 µmol/l und wurde auf graphischem Wege bestimmt.

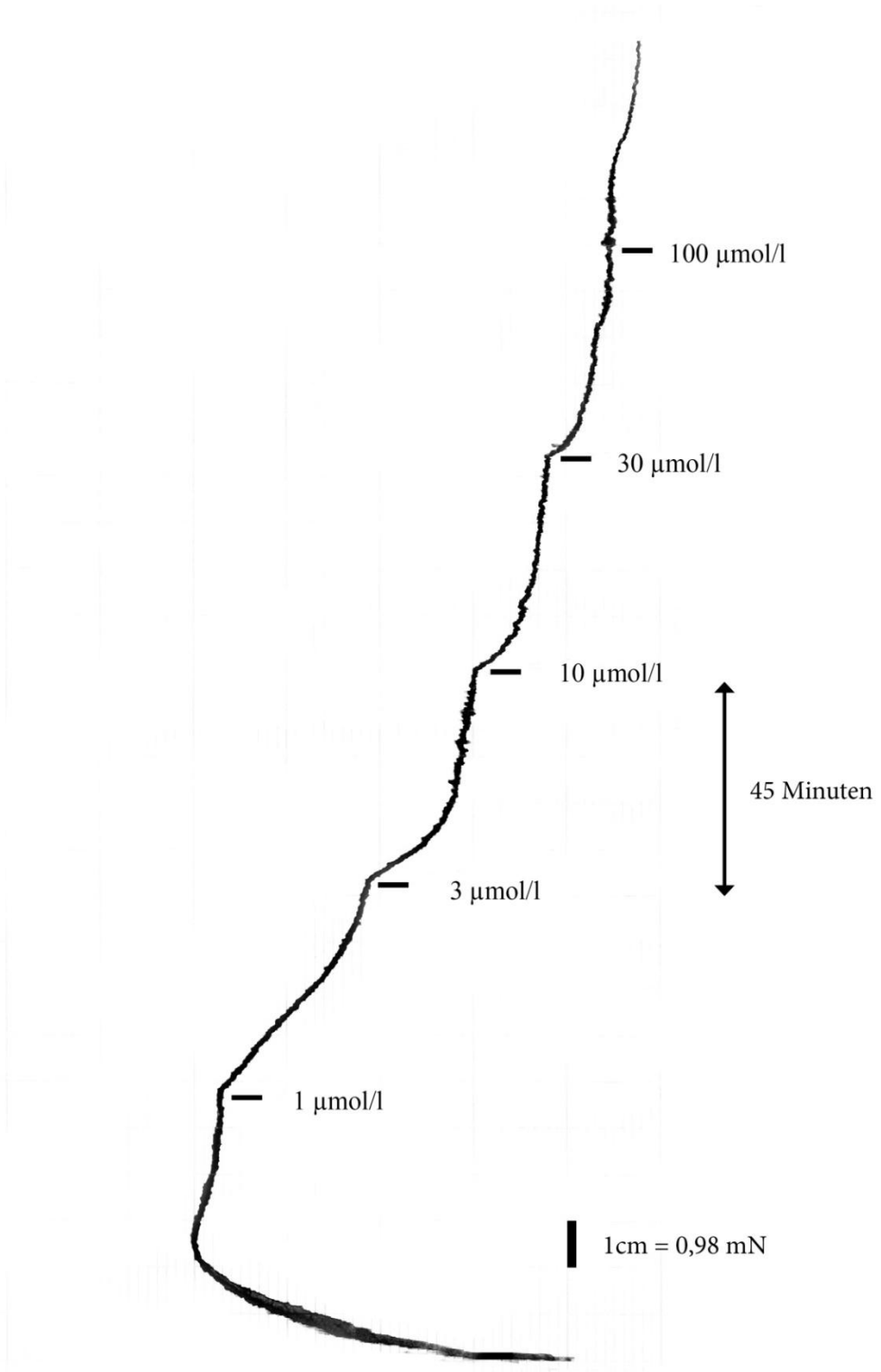


Abbildung 20 Originalaufzeichnung eines Versuches von PGU 189 HCl an einem Präparat des Terminalen Ileums

Diese Originalabbildung stellt die Abnahme der Kontraktionskraft im Laufe des Versuches dar. Alle 45 Minuten erfolgte die nächsthöhere Substanzzugabe.

3.2. Ergebnisse zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit Nitro – L – Arginin

Dieses Kapitel umfasst die Ergebnisse zur Ermittlung des möglichen Wirkmechanismus anhand von Versuchen mit Nitro-L-Arginin. Die Versuchsreihe wurde im Anschluss an die Experimente an den einzelnen isolierten Organen mit PGU 189 HCl durchgeführt. Zur Bestimmung des Wirkmechanismus wurden die Präparate der Aorta descendens verwendet. Die Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Nitro-L-Arginin durchgeführt, um eine Hemmung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) zu erzielen.

3.2.1. Ergebnisse mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin

Diese Versuchsreihe an den Präparaten der Aorta descendens wurde, wie in Kapitel 2.8.6. beschrieben, durchgeführt. Nachdem die Vorkontraktion die Plateauphase erreicht hatte, wurde der Kontrollwert ermittelt, der bei 5,45 ± 0,61 mN lag. Daraufhin wurde Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 30 µmol/l dem Organbad zugesetzt, wodurch die Kontraktionskraft noch etwas anstieg und einen Wert von 5,68 ± 0,80 mN erreicht. Nach 45 weiteren Minuten wurde PGU 189 HCl in einer Konzentration von 20 µmol/l eingespritzt. Die Kontraktionskraft lag am Ende des Versuches bei 3,32 ± 0,87 mN.

Konzentration (µmol/l)	f_c± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	5,45 ± 0,61	3	-
30 µmol/l Nitro-L-Arginin	5,68 ± 0,80	3	-
20 µmol/l PGU 189 HCl	3,32 ± 0,87	3	0,05

Tabelle 9: Ergebnisse der Bestimmung des Wirkmechanismus von PGU 189 HCl mit 30 µmol/l Nitro-L-Arginin an Präparaten von Aorta descendens

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit PGU 189 HCl angeführt. F_c symbolisiert die Kontraktionskraft in mN, SEM die Standardfehler der Mittelwerte. Weiters gibt n die Anzahl der Versuche an und P die Irrtumswahrscheinlichkeit. Es sind die jeweiligen Konzentrationen der eingesetzten Substanzen in µmol/l ersichtlich.

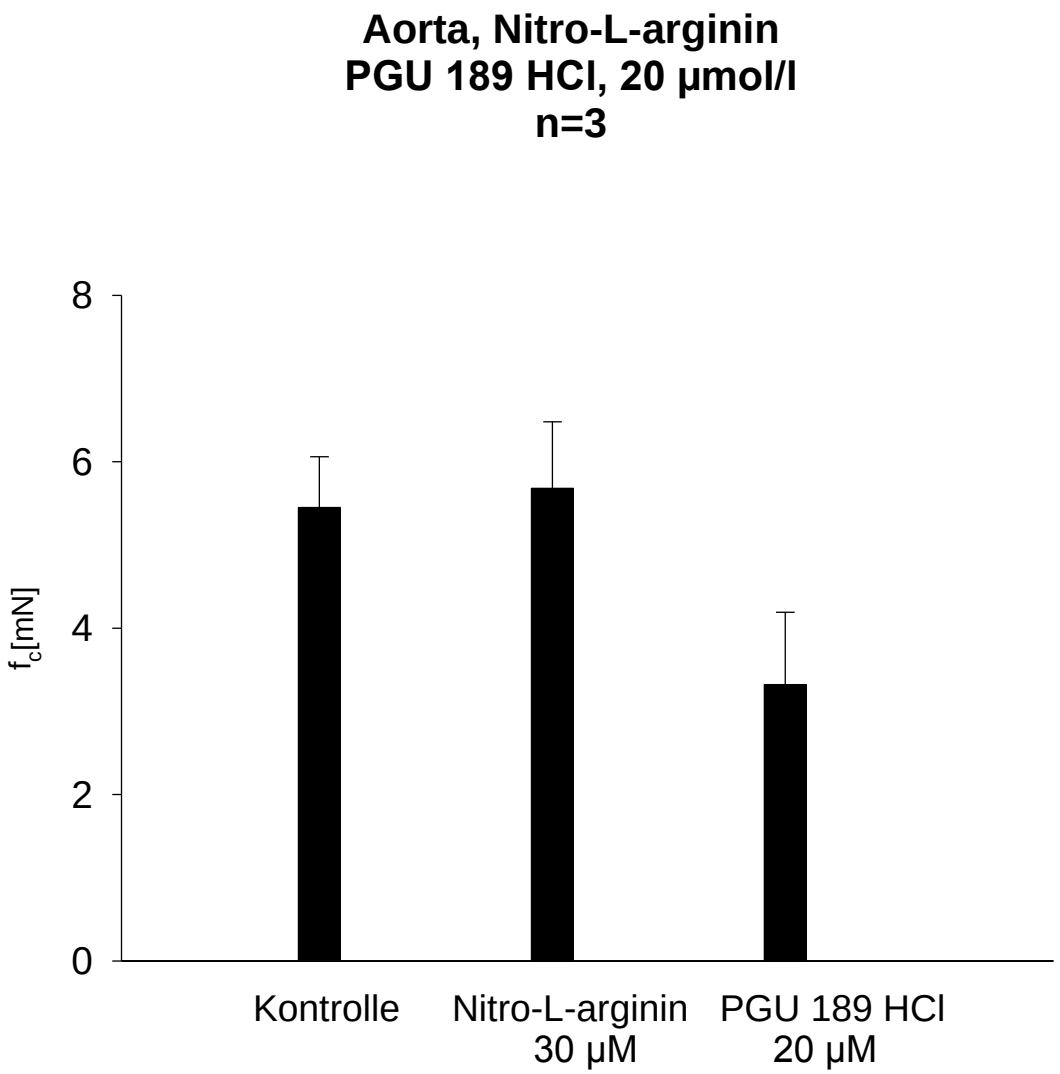


Abbildung 21: Balkendiagramm zur Darstellung der Versuche mit PGU 189 HCl und Nitro-L-Arginin (30 µmol/l) an Aortapräparaten

Diese graphische Darstellung der Versuche zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit PGU 189 HCl ist ein Balkendiagramm, in dem die x-Achse für die Konzentration der Substanzen in µmol/l steht und die y-Achse die Kontraktionskraft wiedergibt. Die Balken stehen für die errechneten Mittelwerte der Versuchsreihe und die senkrechte Verlängerung an deren oberen Ende jeweils für die Standardfehler.

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass es nach der Vorkontraktion durch Zugabe von 30 µmol/l Nitro-L-Arginin zu einer weiteren Steigerung der Kontraktionskraft kam. Durch die Zugabe von 20 µmol/l PGU 189 HCl kam es im Anschluss daran zu einer Dilatation der Gefäßmuskulatur der Aortapräparate.

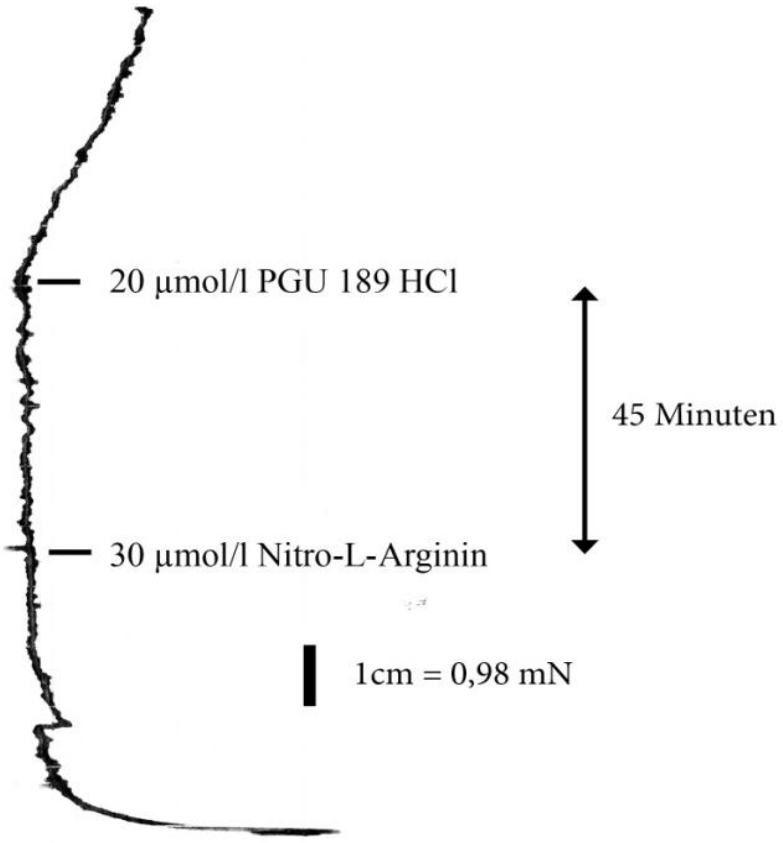


Abbildung 22: Originalaufzeichnung eines Versuches zur Bestimmung des Wirkmechanismus von PGU 189 HCl mit Nitro-L-Arginin (30 µmol/l)

Wie in dieser Originalabbildung zu erkennen ist, steigt die Kontraktionskraft nach Zugabe von Nitro-L-Arginin nochmals leicht an. Nach Zusetzen der Testsubstanz ist die Dilatation der Gefäßmuskulatur der Aorta ersichtlich.

3.2.2. Ergebnisse mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin

Die zweite Versuchsreihe zur Bestimmung des Wirkmechanismus gestaltete sich ebenfalls wie in Kapitel 2.8.6. beschrieben. Auch hier wurde zuerst das Erreichen der Plateauphase abgewartet und daraufhin der Kontrollwert ermittelt, der 7,43 ± 2,33 mN betrug. Daraufhin wurde Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100 µmol/l eingespritzt. Nach 45 Minuten wurde erneut die Kontraktionskraft bestimmt, wobei ein Wert von 7,82 ± 2,53 mN erreicht

wurde. Nun wurden 20 µmol/l PGU 189 HCl eingebracht. Nach 45 Minuten betrug der Wert schlussendlich 6,22 ± 2,97 mN.

Konzentration (µmol/l)	**f_c± SEM (mN)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
Kontrolle (0)	7,43 ± 2,33	3	-
100 µmol/l Nitro-L-Arginin	7,82 ± 2,53	3	-
20 µmol/l PGU 189 HCl	6,22 ± 2,97	3	n.s.

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung des Wirkmechanismus von PGU 189 HCl mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin an Präparaten von Aorta descendens

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit PGU 189 HCl ersichtlich. F_c steht für die Kontraktionskraft in mN, SEM gibt die Standardfehler der Mittelwerte an. Zudem symbolisiert n die Anzahl der Versuche und P die Irrtumswahrscheinlichkeit. Die jeweiligen Konzentrationen der eingesetzten Substanzen sind in der Tabelle in µmol/l aufgelistet.

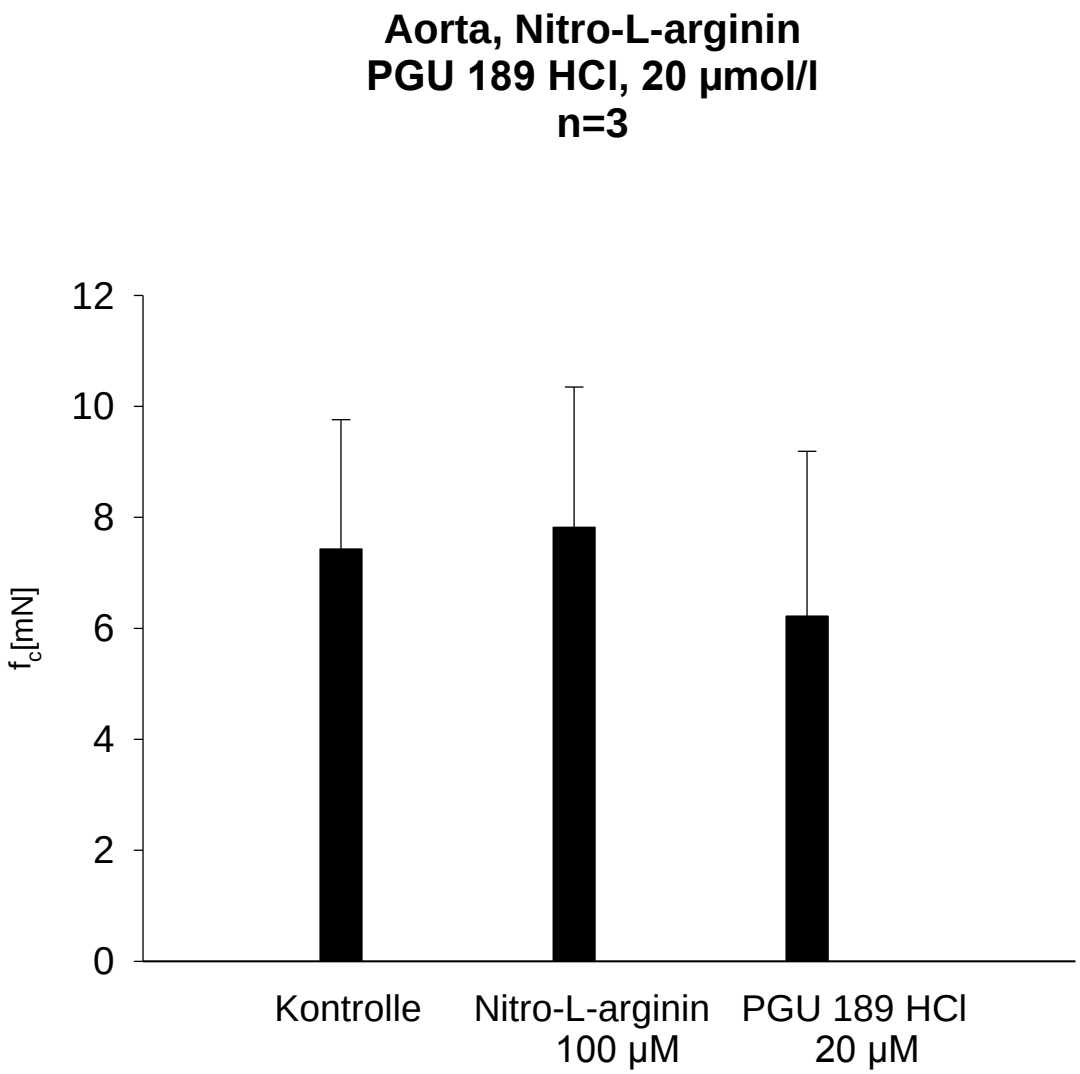


Abbildung 23: Balkendiagramm zur Darstellung der Versuche mit PGU 189 HCl und Nitro-L-Arginin (100 µmol/l) an Aortapräparaten

Dieses Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung des Wirkmechanismus mit PGU 189 HCl, in dem die x-Achse die Konzentrationen der jeweiligen Substanzen in µmol/l angibt und die y-Achse für die Kontraktionskraft steht. Die errechneten Mittelwerte der Versuchsreihe sind als Balken dargestellt und die senkrechten Linien an deren oberen Ende symbolisieren die Standardfehler.

In dieser graphischen Darstellung ist erkennbar, dass es nach der Vorkontraktion durch Zugabe von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin zu einem weiteren Anstieg der Kontraktion kam. Das Einspritzen von 20 µmol/l PGU 189 HCl führte daraufhin zu einer Erschlaffung der Gefäßmuskulatur.

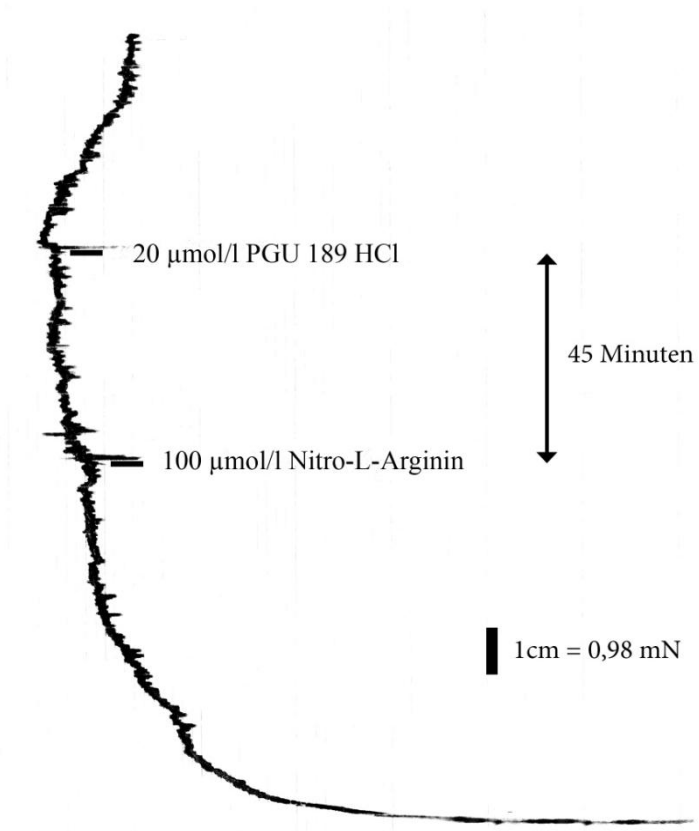


Abbildung 24: Originalaufzeichnung eines Versuches zur Bestimmung des Wirkmechanismus von PGU 189 HCl mit Nitro-L-Arginin (100 µmol/l)

Diese Originalaufnahme veranschaulicht die leichte Zunahme der Kontraktionskraft durch das Einspritzen von Nitro-L-Arginin. 45 Minuten später wurde PGU 189 HCl injiziert, worauf es zu einer Vasodilatation kam.

4. Diskussion

Der Inhalt dieser Diplomarbeit ist die pharmakologische Untersuchung des neu synthetisierten Stoffes PGU 189 HCl. Die Versuche wurden an fünf verschiedenen Arten von isolierten Meerschweinchenorganen durchgeführt.

Anhand der Herzmuskelpräparate wurde die Wirkung der Testsubstanz auf die quergestreifte Muskulatur beobachtet. Dies geschah an Präparaten des Atrium cordis dexter sowie des Musculus papillaris. Am Vorhof wurde ermittelt, ob die Substanz eine negativ oder positiv chronotrope Wirkung aufweist. Der Papillarmuskel wurde zur Beobachtung der Inotropie herangezogen.

An den glattmuskulären Organpräparaten der Arteria pulmonalis, der Aorta descendens, sowie des terminalen Ileums wurden ebenfalls Untersuchungen durchgeführt. An der Aorta und der Pulmonalarterie bestand die Aufgabe in der Ermittlung der vasodilatierenden Wirkung. Die Organpräparate des Darmes dienten zur Bestimmung der spasmolytischen Aktivität der Testsubstanz.

Im Kapitel 2. sind die genauen Abläufe der Versuche detailliert beschrieben. Die gesamten Ergebnisse der Untersuchungen sind in Kapitel 3. zu finden. Das vorliegende Kapitel widmet sich nun der Zusammenfassung und der genaueren Betrachtung der gewonnen Ergebnisse.

4.1. Versuchsreihe an der quergestreiften Muskulatur der Herzpräparate

Als Präparate für die Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von PGU 189 HCl auf die Herzmuskulatur diente zum einen der isolierte rechte Vorhof, welcher verwendet wurde um die chronotropen Eigenschaften der Testsubstanz zu ergründen. Zum anderen wurden Präparate des Papillarmuskels eingesetzt, um Erkenntnisse über die inotrope Wirkung der Substanz zu gewinnen. Im Gegensatz zum Vorhof, der durch den Sinusknoten eine Spontanaktivität besitzt und folglich einer autonomen Schlagfrequenz folgt, musste der Papillarmuskel durch eine angelegte Elektrode stimuliert und somit zur Kontraktion angeregt werden.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Testsubstanz auf beide Organpräparate Einfluss ausübte. Es nahmen mit steigender Substanzzugabe sowohl die Schlagfrequenz des Vorhofes als auch die Kontraktionskraft des Papillarmuskels ab. Beim Vorhof musste zum Erreichen des EC_{50}-Wertes eine Substanzmenge von 35,5 µmol/l hinzugefügt werden. Da beim Papillarmuskel eine geringere Konzentration an Testsubstanz notwendig war, um die halbmaximale Wirkung zu erreichen, sodass der EC_{50}-Wert bei 13,6 µmol/l lag, ist deutlich erkennbar, dass die Wirkung am Papillarmuskel stärker ausgeprägt ist als am Vorhof.

Organpräparat	**PGU 189 HCl f_c± SEM(%) bei 100 µmol/l (Endkonzentration)**	**EC_{50} (µmol/l)**
Atrium cordis dexter	-96,12 ± 3,88	35,5
Musculus papillaris	-59,32 ± 4,89	13,6

Tabelle 11: Vergleich der EC_{50}-Werte von Vorhof und Papillarmuskel sowie Gegenüberstellung der prozentuellen Wirkung bei maximaler Substanzkonzentration

Diese Tabelle verdeutlicht die Wirkung an den beiden verschiedenen Organtypen durch Gegenüberstellung der jeweiligen EC_{50}-Werte sowie durch den Vergleich der Wirkung bei der höchsten Konzentration an Testsubstanz im Organbad. Wie dieser Darstellung zu entnehmen ist, weist die Substanz am Papillarmuskel einen niedrigeren EC_{50}-Wert auf, was auf eine stärkere Wirksamkeit hindeutet, da weniger an Substanz für die halbmaximale Wirkung notwendig ist.

Hingegen liegt der prozentuelle Wert der Wirkung nach der letzten Substanzzugabe beim Papillarmuskel deutlich höher als beim Vorhof. Wenn man sich die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 11 im dritten Kapitel ansieht, ist ersichtlich, dass bei der Versuchsreihe am Vorhof die Schlagfrequenz kontinuierlich abfällt und sie erst nach der letzten Konzentration von 100

µmol/l noch stärker sinkt. Beim Papillarmuskel hingegen verläuft die Kurve regelmäßiger (Vergl. Abbildung 15) und besitzt keinen derartigen sprunghaften Abfall der Kontraktionskraft nach der letzten Substanzzugabe. Dadurch ist die niedrigere prozentuelle Wirkung am Papillarmuskel trotz geringerem EC_{50}-Wert erklärbar.

Durch die gesamte Versuchsreihe an den Herzmuskelpräparaten konnte eine Wirkung von PGU 189 HCl auf selbige festgestellt werden. Sowohl eine negativ chronotrope Wirkung konnte gezeigt werden als auch eine noch stärker ausgeprägte negativ inotrope Wirkung.

4.2. Versuchsreihe an den Organen mit glatter Muskulatur

Durch die Versuche an den Organpräparaten, die sich durch glatte Muskulatur auszeichnen, sollte untersucht werden, ob die Testsubstanz PGU 189 HCl einen Einfluss auf deren Kontraktionskraft ausübt. Dazu gehörten die Aorta und die Pulmonalarterie, an denen die vasodilatierenden Eigenschaften untersucht wurden, sowie Darmpräparate, an denen die spasmolytische Aktivität des Stoffes ermittelt wurde.

Die exakte Vorgehensweise und die Abläufe der einzelnen Versuche sind in Kapitel 2. genauer erläutert. Im dritten Teil der Arbeit sind die gesamten Ergebnisse zu den Versuchen an den einzelnen Organen detailliert aufgelistet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die Substanz PGU 189 HCl auf alle drei glattmuskulären Organpräparate einen Einfluss hatte. Es kam an der Pulmonalarterie und an der Aorta zu einer dilatierenden Wirkung und am Darm zeigten sich ebenfalls spasmolytische Effekte. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht durch die Darstellung der Kontraktionskraft am Ende der Substanzzugabe und anhand der Auflistung der EC_{50}-Werte die Wirkstärke der Testsubstanz an den verschiedenen Organtypen.

Organpräparat	PGU 189 HCl f_c± SEM (%) bei 100 µmol/l (Endkonzentration)	EC_{50} (µmol/l)
Arteria pulmonalis	-61,54 ± 6,65	20
Aorta descendens	-83,71 ± 5,45	17,5
Terminales Ileum	-94,36 ± 2,95	2,4

Tabelle 12: Vergleich der EC_{50}-Werte der Pulmonalarterie, der Aorta und des Darmes sowie Gegenüberstellung der prozentuellen Kontraktionskraft bei 100 µmol/l

Die Parameter, die in der Tabelle angeführt sind, zeigen, dass die Wirkung der Testsubstanz auf die Pulmonalarterie und auf die Aorta in einem ähnlich Ausmaß zu beobachten waren. Bei den Untersuchungen an der Pulmonalarterie ergab sich ein EC_{50}-Wert von 20 µmol/l und bei der Aorta lag selbiger bei 17,5 µmol/l. Am Darm wurde die halbmaximale Wirkung bereits bei 2,4 µmol/l festgestellt.

Auch in Bezug auf die Kontraktionskraft, die bei Vorhandensein von PGU 189 HCl in einer Konzentration von 100 µmol/l auftrat, zeigten die Ergebnisse für die Pulmonalarterie und die Aorta in beiden Fällen einen niedrigen Wert. Bei der Pulmonalarterie ergab sich hierbei ein Wert von -61,54 ± 6,65%, welcher bei der Aorta bei -83,71 ± 5,45 % lag.

4.2.1. Versuchsreihe – Arteria pulmonalis

Bei der Versuchsreihe an der Arteria pulmonalis wurde insgesamt ein stetiger Abfall der Kontraktionskraft beobachtet, wie in Kapitel 3.1.2. graphisch veranschaulicht wird. Von einem Wert von 8,93 ± 1,37 mN, der bei der maximalen Kontraktion des Gefäßes ermittelt wurde, sinkt das Ausmaß der Kontraktion im Verlauf des Versuches stetig ab. Bei den ersten

beiden Substanzkonzentrationen verläuft die Kurve noch etwas flacher, ab der dritten Konzentration ist der Verlauf etwas steiler. Nach dem letzten Einspritzen der Testsubstanz flacht die Wirkung dann wieder etwas ab (Vergl. Abbildung 13). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe an der Pulmonalarterie lassen also Rückschlüsse auf die vasodilatierenden Eigenschaften von PGU 189 HCl zu und zeigen den erweiternden Effekt auf dieses Gefäß.

4.2.2. Versuchsreihe - Aorta descendens

Auch die an der Aorta durchgeführte Versuchsreihe hatte zum Ziel, die vasodilatierenden Eigenschaften der Testsubstanz zu ermitteln. Wie die in Kapitel 3.1.4. aufgelisteten Ergebnisse veranschaulichen, verfügt PGU 189 HCl über eine ausgeprägte Wirkung an der glatten Muskulatur der Testobjekte. Ausgehend von einem Kontrollwert, der bei 6,31 ± 1,02 mN lag, fiel die Kontraktionskraft bis zum Ende des Experimentes auf 1,15 ± 0,54 mN ab. Dies stellt einen Verlust von über 80 % dar. Der ermittelte EC_{50}-Wert lag bei 17,5 µmol/l. Somit ist die Konklusion dieser Versuchsreihe, dass die Testsubstanz auch an den Präparaten der Aorta descendens eine starke vasodilatierende Wirkung aufweist.

4.2.3. Versuchsreihe - Terminales Ileum

Im Zentrum dieser Versuchsreihe stand die Aufklärung der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz PGU 189 HCl auf die Muskulatur der Darmpräparate. Auch hier konnte ein eindeutiger Effekt beobachtet werden. Anhand der Tabelle 8 in Kapitel 3.1.5. lässt sich erkennen, dass die Kontraktionskraft von anfänglichen 0,00 ± 0,00 % im Laufe des Versuches auf -94,36 ± 2,95 % abfällt. Anhand der Konzentrations-Wirkungskurve in Abbildung 19 konnte ein EC_{50}-Wert von 2,4 µmol/l bestimmt werden. In allen durchgeführten Versuchsreihen war dies die niedrigste Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt erreicht wurde. Somit ist die Schlussfolgerung dieser Versuchsreihe, dass PGU 189 HCl eine starke spasmolytische Wirkung auf die Muskulatur der isolierten Darmpräparate aufweist.

4.3. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und Nitro-L-Arginin an Aortapräparaten

Zur Bestimmung des möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanz wurden zwei weitere Versuchsreihen an isolierten Organen durchgeführt. Hierfür wurden wiederum Aortapräparate verwendet. Mit Hilfe der Substanz Nitro-L-Arginin sollte die endotheliale NO-Synthase der

Gefäße blockiert werden, sodass diese nicht mehr imstande war, NO zu produzieren. Nach Zusetzen der Testsubstanz galt es zu ermitteln, ob es infolgedessen zu einer Gefäßdilatation kam. Hierfür wurden zwei Reihen an Experimenten durchgeführt, deren Ablauf in Kapitel 2.8.6. beschrieben ist.

4.3.1. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und 30 µmol/l Nitro-L-Arginin

Wie in den übrigen Versuchen an der Aorta setzte man auch hier eine Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion der Organe ein. Nach Erreichen der Plateauphase konnte Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 30 µmol/l in das Organbad eingebracht werden. Wie im Balkendiagramm in Abbildung 21 zu erkennen ist, kam es daraufhin zu einer leichten Verstärkung der Kontraktionskraft. Nach einer Spanne von 45 Minuten wurde dann die Testsubstanz in einer Konzentration von 20 µmol/l hinzugefügt. Durch eine Messung nach weiteren 45 Minuten ließ sich eine klare Dilatation des Gefäßes feststellen. Wie Tabelle 9 verdeutlicht, fiel die Kontraktion somit vom maximalen Wert, der bei 5,68 ± 0,80 mN lag, auf 3,32 ± 0,87 mN ab.

4.3.2. Versuchsreihe mit PGU 189 HCl und 100 µmol/l Nitro-L-Arginin

Mittels der Durchführung dieser Versuche sollte ebenso der Wirkmechanismus der Testsubstanz geklärt werden. In dieser Versuchsreihe wurde Nitro-L-Arginin jedoch in einer Konzentration von 100 µmol/l nach dem Einpendeln auf die maximale Kontraktionskraft zugesetzt. Hierdurch stieg die Kontraktionskraft nochmals leicht an. Nach Verstreichen von 45 Minuten wurden dann 20 µmol/l PGU 189 HCl ins Organbad eingespritzt. Anhand der Tabelle 10 in Kapitel 3.2.2. ist ersichtlich, wie sich die Werte für die Kontraktionskraft im Laufe der Versuche verändern. Die maximale Kontraktion der Gefäße lag bei 7,82 ± 2,53 mN und fiel zu Ende des Versuches auf 6,22 ± 2,97 mN ab.

Diese beiden Versuchsreihen zeigen also, dass PGU 189 HCl imstande ist eine Vasodilatation herbeizuführen, nachdem die eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) durch Nitro-L-Arginin blockiert worden ist. Somit könnte der mögliche Wirkmechanismus der Substanz auf einer endothelialen Ausschüttung von Stickstoffmonoxid beruhen. Zusätzliche andere Wirkmechanismen sind allerdings möglich, zu deren Abklärung weitere Versuche notwendig wären.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die neu synthetisierte Substanz PGU 189 HCl, die sich vom Naturstoff Resveratrol ableitet, hinsichtlich ihres pharmakologischen Wirkprofils untersucht. Die Versuche wurden an fünf Arten von isolierten und präparierten Meerschweinchenorganen durchgeführt.

Zum einen wurde die Wirkung auf die glattmuskulären Präparate der Aorta descendens, der Arteria pulmonalis und des Terminalen Ileums ermittelt. An der Aorta und der Lungenarterie galt es zu eruieren, ob die Testsubstanz einen vasodilatierenden Effekt aufweist. Bei den Präparaten des Darmes stand die spasmolytische Aktivität im Mittelpunkt der Untersuchungen. Des Weiteren wurde die Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens anhand von Präparaten des Atrium cordis dexter und des Musculus papillaris erforscht. Im Zentrum der Untersuchungen am Vorhof stand der Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie, beim Papillarmuskel lag das Augenmerk auf der Beobachtung des Effektes bezüglich der Inotropie.

Die Durchführung der Versuche an den täglich frisch extrahierten Organen bedurfte der Einhaltung physiologischer Gegebenheiten, um das Weiterleben der Testobjekte zu gewährleisten. So wurden die Organe während des gesamten Versuchsablaufes mit temperierter physiologischer Nährlösung und einem speziellen Gasgemisch versorgt. Mittels Testapparaturen, in denen die Organe eingespannt waren, wurde die mechanische Veränderung der Präparate unter Einfluss von PGU 189 HCl gemessen, in ein elektrisches Signal transferiert und von einem Schreibgerät aufgezeichnet.

Die erhaltenen Ergebnisse ließen eine eindeutige pharmakologische Wirkung der Testsubstanz an allen untersuchten Organen erkennen. Zum einen wurde an den Präparaten des Vorhofes ein negativ chronotroper Effekt beobachtet, zum anderen erwies sich die Substanz bei den Untersuchungen am Papillarmuskel als negativ inotrop. Des Weiteren war an den glattmuskulären Präparaten der Aorta, der Lungenarterie und des Darmes ein Einfluss auf die Kontraktionskraft ersichtlich. Dies spiegelte sich in einer vasodilatierenden Wirkung auf die Muskulatur der Aorta descendens und der Arteria pulmonalis wider. Am Terminalen Ileum wurde ein spasmolytischer Effekt nachgewiesen. Anhand von Dosis-Wirkungskurven konnten die EC_{50}-Werte der einzelnen Versuchsreihen bestimmt werden. Bei den Präparaten

des Atrium cordis dexter lag der ermittelte Wert bei 35,5 µmol/l, am Papillarmuskel wurde dieser bei 13,6 µmol/l festgestellt. Der halbmaximale Effekt an den Präparaten der Aorta lag bei einer Konzentration von 17,5 µmol/l, bei den Untersuchungen an der Pulmonalarterie war dieser bei 20 µmol/l zu beobachten. Der niedrigste EC_{50}-Wert wurde an den Präparaten des Terminalen Ileums ermittelt, wo er bei einer Konzentration von 2,4 µmol/l zu finden war.

Im Fokus zweier zusätzlicher Versuchsreihen an den Präparaten der Aorta stand weiters die Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanz PGU 189 HCl. Hierbei wurde durch Zugabe von Nitro-L-Arginin die eNOS der Gefäße blockiert, um zu ergründen, ob die daraufhin zugesetzte Testsubstanz in der Lage ist, eine Erweiterung des Gefäßes zu bewirken. Es wurde in beiden Fällen eine Dilatation der Aorta festgestellt, wodurch man auf eine Freisetzung von endothelialem NO als einen von möglichen weiteren Wirkmechanismen schließen kann.

6. Literaturverzeichnis

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

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

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

Criqui MH, Ringel BL (1994) Does diet or alcohol explain the french paradox? Lancet 344: 1719-1723

Dong Z (2003) Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutat Res 523/524: 145-150

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

Huppelsberg J, Walter K, Huckstorf C (2005) Kurzlehrbuch Physiologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

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

Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1985) Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. Biochim Biophys Acta 834:275-278

Kollar P, Kotolova H, Neca J, Karpisek M, Bartosikova L, Karesova P (2000) Experimental study of resveratrol and flavonoids in red wine with regard to their possible hypolipemic effects. Vnitr Lek 46: 856-860

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

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

Netter FH (2003) Atlas Anatomie des Menschen. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

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

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Sphan F (2003) Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid nerotoxicity. Gerontology 49: 380-383

Schmandke H (2002) Resveratrol und Piceid in Weintrauben und Erdnüssen sowie daraus hergestellte Produkte. Ernährungs-Umschau 9: 349-352

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

Subbaramaiah K, Michaluart P, Chung WJ, Tanabe T, Telang N, Dannenberg AJ (1999) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial celss. Ann NY Acad Sci 889: 214-23

Szewczuk LM, Forti L, Stilvala LA, Penning TM (2004) Resveratrol is a peroxidise-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

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

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

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

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

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

7. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name:	Melanie Loser
Geburtsdatum:	07.10.1985
Geburtsort:	Bregenz
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung:

September 1992 - Juli 1996:	Volksschule Augasse, Bregenz
September 1996 - Juli 2000:	Bundesgymnasium Blumenstraße, Bregenz
September 2000 - Juli 2004:	Bundesgymnasium Gallus, Bregenz
22. Juni 2004:	Reifeprüfung am Bundesgymnasium Gallus, Bregenz
Oktober 2005:	Beginn Pharmaziestudium

Praktika:

2001:	Public Service (ganzjähriges Schulprojekt: „Arbeit für das Gemeinwesen“)
September 2004 - April 2005:	Au-Pair-Aufenthalt in Spanien mit Besuch einer Sprachschule
Juni - August 2005:	Praktikum bei Bregenz Tourismus & Stadtmarketing
Juli - August 2006:	Praktikum bei Bregenz Tourismus & Stadtmarketing
Juli - August 2007:	Bahnhofapotheke Bregenz
Februar 2008:	Bahnhofapotheke Bregenz
Juli 2008:	Bahnhofapotheke Bregenz
Juli 2009:	Bahnhofapotheke Bregenz
September 2009:	TCM-Summer-School, Chengdu, China
Februar 2012 – März 2013	Alte Löwen-Apotheke, Wien