



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Wirkung zweier neu synthetisierter diarylierter  
Imidazolderivate (PGU 105 HCl und PGU 175 HCl)  
auf isolierte Organe von Meerschweinchen

Lisa Mayr

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

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

# Widmung und Danksagung

---

Ich widme diese Diplomarbeit meiner Familie, da sie mich während meines gesamten Studiums immer unterstützt und motiviert hat und mich auch an schlechten Tagen wieder aufheitern konnte. Dafür bin ich sehr dankbar. Spezieller Dank gilt dabei auch meinem Bruder, der mir mit seinem fachlichen Wissen stets zur Seite gestanden ist.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik, der sich rund um die Uhr um uns Diplomanden gekümmert hat und uns mit Rat und Tat immer zur Seite stand. Seine nette, unkomplizierte Art und die familiäre Atmosphäre im Labor bereiteten mir eine schöne Zeit.

In diesem Sinne möchte ich mich auch bei meinen Kollegen bedanken, die mit mir gemeinsam im Labor gearbeitet haben. Ich werde die vielen lustigen Arbeitstage sehr vermissen. Auch an alle Freunde, die ich im Laufe meiner Zeit in Wien ins Herz geschlossen habe, möchte ich herzlichen Dank aussprechen und hoffe, dass so viele Kontakte wie möglich erhalten bleiben.

Zuletzt möchte ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Pharmazeutische Chemie und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Testsubstanzen bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ZIELSETZUNG UND AUFBAU.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. NATURSTOFF RESVERATROL.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Entdeckung und Vorkommen .....	3
1.2.2. Biosynthese .....	4
1.2.3. Biologische Funktion .....	5
1.2.4. Wirkungen .....	5
1.2.5. Pharmakokinetik .....	8
<b>2. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. TESTSUBSTANZEN .....</b>	<b>10</b>
2.1.1. PGU 105 HCl .....	10
2.1.2. PGU 175 HCl .....	10
2.1.3. Lösungsmittel .....	11
<b>2.2. PHYSIOLOGISCHE ELEKTROLYTLÖSUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. VERSUCHSTIERE .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. VERWENDETE ORGANE .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. Isolierung und Präparation der Organe .....	15
2.4.1.1. Verwendete Materialien.....	15
2.4.1.2. Isolierung und Präparation - Atrium dexter .....	16
2.4.1.3. Isolierung und Präparation - Musculus papillaris .....	16
2.4.1.4. Isolierung und Präparation - Arteria pulmonalis .....	16
2.4.1.5. Isolierung und Präparation - Aorta descendes .....	18
2.4.1.6. Isolierung und Präparation - Terminales Ileum .....	19
<b>2.5. VERSUCHSANORDNUNG.....</b>	<b>20</b>
2.5.1. Apparatur A .....	21
2.5.2. Apparatur B .....	23
2.5.3. Kraftwandler.....	25
2.5.4. Gasversorgung mit Oxymix .....	25

<b>2.6. VERSUCHSABLAUF.....</b>	<b>26</b>
2.6.1. Versuchsablauf – Terminales Ileum .....	26
2.6.2. Versuchsablauf – Aorta descendens .....	27
2.6.3. Versuchsablauf – Arteria pulmonalis .....	28
2.6.4. Versuchsablauf – Musculus papillaris .....	28
2.6.5. Versuchsablauf – Atrium dexter .....	29
<b>2.7. AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTIK.....</b>	<b>30</b>
2.7.1. Auswertung – Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum ....	30
2.7.2. Auswertung – Atrium dexter.....	30
2.7.3. Auswertung – Musculus papillaris .....	31
2.7.4. Statistik.....	31
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. TESTSUBSTANZ PGU 105 HCL.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. Ergebnisse – Aorta descendens .....	32
3.1.2. Ergebnisse – Arteria pulmonalis.....	35
3.1.3. Ergebnisse – Terminales Ileum.....	38
3.1.4. Ergebnisse – Atrium dexter .....	41
3.1.5. Ergebnisse – Musculus papillaris.....	44
<b>3.2. TESTSUBSTANZ PGU 175 HCL.....</b>	<b>47</b>
3.2.1. Ergebnisse – Aorta descendens .....	47
3.2.2. Ergebnisse – Arteria pulmonalis.....	50
3.2.3. Ergebnisse – Terminales Ileum.....	53
3.2.4. Ergebnisse – Atrium dexter .....	56
3.2.5. Ergebnisse – Musculus papillaris.....	59
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>7. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>75</b>

# 1. Einleitung

---

## 1.1. Zielsetzung und Aufbau

In dieser Diplomarbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen von zwei Derivaten des Naturstoffs Resveratrol dargelegt. Diese wurden am Department für medizinische/pharmazeutische Chemie der Universität Wien neu synthetisiert und tragen die Bezeichnung PGU 105 und PGU 175.

Betrachtet man die chemischen Strukturen, so handelt es sich bei Resveratrol um ein Trihydroxystilben, die beiden Testsubstanzen besitzen jedoch anstatt der Ethylengruppierung einen Imidazolring als Grundgerüst. Von diesem gehen ähnlich wie beim Naturstoff, jedoch unter Verlust der E- und Z-Isomerie, jeweils zwei Phenylringe aus, die mit unterschiedlichen Resten modifiziert wurden.

Zu untersuchen waren sowohl potentielle Effekte der Testsubstanzen auf die glatte Muskulatur anhand von Aorta-, Dünndarm- und Lungenarterienpräparaten, als auch die Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur von Vorhof und Papillarmuskel. Mit isometrischen Kontraktionsmessungen konnten spasmolytische Aktivitäten und Einflüsse auf Inotropie und Chronotropie ermittelt werden.

Im **1. Kapitel** befindet sich zuerst eine kurze Erläuterung der Zielsetzung der Arbeit und anschließend wird ein Einblick in Herkunft, Biosynthese und Pharmakokinetik, sowie in einen kleinen Teil der zahlreichen Wirkungen der Leitsubstanz Resveratrol gegeben.

Die genaue Durchführung der Versuche mitsamt den Vorbereitungen und verwendeten Materialien wird im **2. Kapitel** detailliert beschrieben. Hier findet man sowohl Informationen über die beiden Testsubstanzen und die verwendeten Versuchstiere, als auch den genauen Vorgang der Organentnahme und Präparation. Ebenfalls wird auf die Maßnahmen zu Erhaltung der Funktionen der Organe eingegangen und die genaue Zusammensetzung der Nährstofflösung aufgelistet. Auch die Versuchsanordnung, welche technische Aspekte enthält, befindet sich in diesem Abschnitt.

Die Ergebnisse der Versuche werden im **3. Kapitel** präsentiert. Anhand von Tabellen und Diagrammen werden die Wirkungen der Testsubstanzen auf die unterschiedlichen Organe erläutert. Die originalen Aufzeichnungen der jeweiligen Versuche befinden sich ebenfalls in diesem Kapitel.

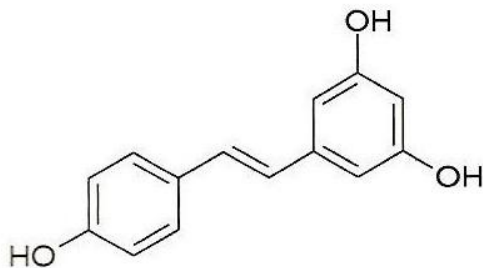
Anschließend werden die in Kapitel 3 angeführten Ergebnisse im **4. Kapitel** analysiert und diskutiert und die beiden Testsubstanzen sowohl untereinander, als auch mit ihrer Leitsubstanz Resveratrol hinsichtlich Wirkungen und chemischer Struktur verglichen.

Letztendlich gibt eine Zusammenfassung im **5. Kapitel** noch einmal einen kurzen Überblick über die wichtigsten in der Arbeit angeführten Fakten.

## 1.2. Naturstoff Resveratrol

Um einen kleinen Einblick in die Hintergründe der Arbeit zu bekommen, wird zuerst auf den Naturstoff Resveratrol, die Ausgangssubstanz der Testsubstanzen PGU 105 und PGU 175 eingegangen.

Abbildung 1: trans-Resveratrol



### 1.2.1. Entdeckung und Vorkommen

Bei Resveratrol handelt es sich chemisch gesehen um ein trans-3,5,4'-Trihydroxystilben, einzuordnen in die Gruppe der Phytoalexine. Sowohl der Naturstoff selber, als auch dessen Glycoside sind schon lange Bestandteil der traditionellen Medizin Chinas, Japans, Thailands und des Orients (Schmandke 2002).

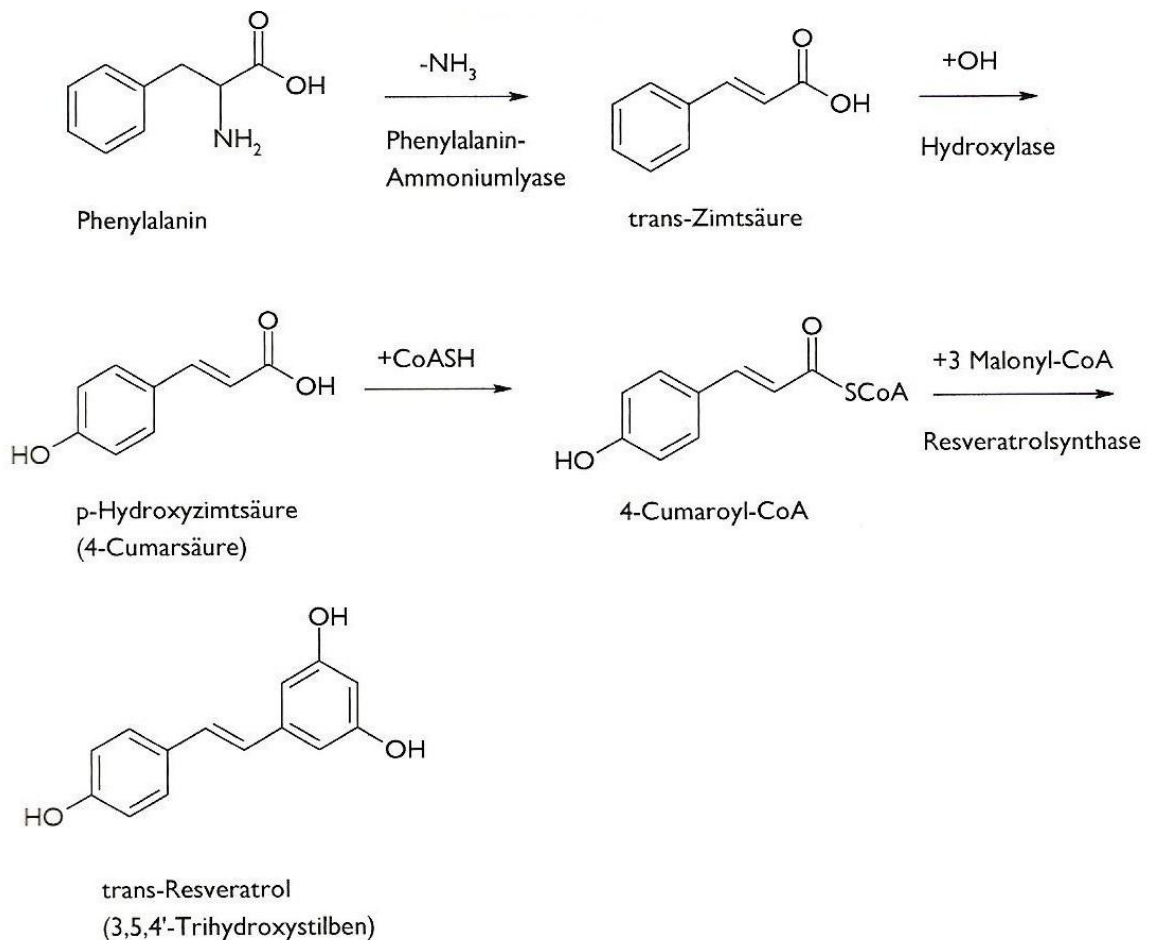
1963 wurde der Stoff erstmals von Nonomura et al. aus *Polygonum cuspidatum*, einem sogenannten Knötergewächs isoliert. 1976 brachten dann Langcake und Pryce den Nachweis vom Vorkommen in Weintraubenblättern und die Existenz der jeweiligen Glycoside konnte von Waterhouse et al. 1994 bewiesen werden. Dass Resveratrol auch ein Bestandteil der Polyphenol-Fraktion des Rotweins ist, sorgte in den neunziger Jahren für großes Aufsehen (Soleas et al. 1997).

In mehr als 70 Pflanzenarten konnte ein Vorkommen des Naturstoffes nachgewiesen werden. Dazu zählten, abgesehen von den bereits erwähnten Quellen, unter anderem die Maulbeere, Fichte, Lilie und Eukalyptus. Der größte Anteil wurde in der Kulturpflanze *Vitis vinifera* gefunden, welche der Familie der Vitaceae angehört und seit tausenden Jahren zur Weinproduktion verwendet wird.

Sowohl in den Reben, als auch in den Traubenkernen, Wurzeln und Stielen wurden die Polyphenole entdeckt. Die Weintraubenschale enthält jedoch die höchste Konzentration an Resveratrol (Celotti et al. 1996). In einer frischen Schale konnte ein Gehalt von 50 bis 100 µg/g nachgewiesen werden. Die Konzentration im Rotwein liegt bei 1,5 bis 3 mg/l (Jang et al. 1997). Die Höhe des Gehaltes an Resveratrol ist hauptsächlich von der Herstellung, also der Dauer der Extraktion der Hülsen abhängig. Dadurch, dass bei Weißwein und Traubensaft ein kürzerer Fermentierungsprozess stattfindet, ist auch die Menge an Polyphenolen geringer. Auch bei Erdnüssen befindet sich die höchste Konzentration des Stoffes in der Schale. Durch das Rösten nimmt dieser jedoch ab (Schmandke 2002).

### 1.2.2. Biosynthese

Abbildung 2: Darstellung der Biosynthese von Resveratrol





Die Synthese des Naturstoffes Resveratrol läuft über den Shikimisäure-Weg ab mit der Aminosäure Phenylalanin als Ausgangssubstanz. Diese wird durch das Enzym Phenylalanin-Ammoniumlyase desaminiert und in die trans-Zimtsäure übergeführt. Als weiterer Schritt erfolgt durch die sogenannte Hydroxylase eine Hydroxylierung am Phenylring zur p-Hydroxyzimtsäure. Als Schlüsselenzym der Biosynthese wird die Stilbensynthase, auch genannt Resveratrol-Synthase, bezeichnet. Diese katalysiert, ausgehend von der p-Hydroxyzimtsäure, die Cyclisierung aus einem Coumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA und somit die Bildung des Polyphenols (Schröder et al., Austin et al. 2004).

### **1.2.3. Biologische Funktion**

Resveratrol ist ein sogenannter Abwehrstoff, der bei Belastungen wie Infektionen, erhöhter UV-Belastung, Stress oder Trauma von der Pflanze gebildet wird. Bei solchen Stresssituationen kommt es folglich zur Induktion der Resveratrol-Synthase. Auch eine fungizide Wirkung wird dem Naturstoff zugeschrieben, da es der Gruppe der Phytoalexine angehört (Soleas et al. 1997, Hipskind und Paiva 2000, Becker et al. 2003). Aufgrund dessen versuchten Wissenschaftler die Resveratrolsynthasegene zu transformieren und so zum Beispiel Weinreben oder Tabak resistenter gegen Pilze zu machen (Hain et al. 1993, Coutos-Thevenot et al. 2001).

### **1.2.4. Wirkungen**

Neben der Pflanze zeigt Resveratrol auch im Körper des Menschen abwehrstärkende Funktionen. Eine große Menge an Studien, in denen die therapeutischen Eigenschaften und die verschiedenen Wirkungen des Naturstoffes untersucht wurden, ist bereits veröffentlicht worden. In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über einen kleinen Teil der zahlreichen Untersuchungen und Wirkungen von Resveratrol gegeben.

Allgemein kann man sagen, dass mäßiger Konsum von Wein im Vergleich zu Weinabstinenz, das Risiko früher zu sterben um die Hälfte vermindert, wie Grönbäck et al. anhand einer epidemiologischen Studie 1995 gezeigt hat.

Von großer Bedeutung sind der antioxidative Effekt des Resveratrols und die Wirkung auf den Fettstoffwechsel. 1993 wurde von Frankel et al. entdeckt, dass die kupferkatalysierte Oxidation des LDL (low density lipoprotein) signifikant mehr durch Rotwein und den darin enthaltenen Polyphenolen gehemmt wird, als durch  $\alpha$ -Tocopherol. Dies ist nicht nur auf die Chelatbildung von Resveratrol mit dem Kupfer zurückzuführen, sondern auch auf die Funktion als Radikalfänger. Aufgrund der chemischen Struktur des Naturstoffes kann angenommen werden, dass es über zwei verschiedene Wege zur Interaktion mit den Plasmaproteinen kommt. So erfolgt über den lipophilen Teil des Resveratrols eine Anreicherung in Plasmalipoproteinen proportional zum Fettgehalt. HDL (low density lipoprotein) ist weniger fetthaltig als LDL (low density lipoprotein) und somit ist die Anreicherung von Polyphenolen auch geringer. Dem hydrophilen Teil wird die Funktion als Radikalfänger zugeschrieben. Freie Radikale werden gefangen, noch bevor mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Membranen angegriffen werden können (Belguendouz et al. 1998, Frémont et al. 1999).

Auch über die Senkung der Serumtriglyceride, des VLDL (very low density lipoprotein)- und des LDL-Spiegels wurde eine Studie von Miura et al. mit Hepatom-infizierten Ratten 2003 durchgeführt. Schon zuvor wurde im Jahre 2000 von Kollar et al. anhand von Ratten mit Hypercholestereämie gezeigt, dass das Gesamtcholesterin durch Resveratrol und die im Rotwein enthaltenen Flavonoide reduziert werden konnte. 2001 konnten dann Laden und Porter die Ursache dafür finden, nämlich dass Resveratrol im Stande ist spezifisch die Squalenmonooxidase, ein essentielles Enzym der Cholesterinbiosynthese, zu hemmen.

Weitere Studien gibt es über einen positiven Effekt von Resveratrol auf das Gehirn. So berichteten Kiziltepe et al. 2004, dass die neuroprotektive Wirkung auf den verringerten oxidativen Stress und eine erhöhte NO-Freisetzung durch den Naturstoff zurückzuführen ist. Auch in Hinsicht auf die Abeta-induzierte Neurotoxizität bei Morbus Alzheimer spielt die protektive Wirkung durch Resveratrol auf das Gehirn eine große Rolle (Savaskan et al. 2003).

Große Bedeutung in der Forschung hat bis heute die anticancerogene Wirkung von Resveratrol, welche erstmals 1997 von Jang et al. im Tierversuch an Ratten entdeckt

wurde. Anhand dieser Studie zeigten sie den Effekt des Naturstoffes auf die Initiation, Promotion und Progression des Krebsverlaufes. Freie Radikale sind oft der Auslöser für die Entstehung eines Tumors und so ist besonders in Initiationsphase die antioxidative Wirkung des Polyphenols von großer Bedeutung. Durch Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass Resveratrol die Tumorgenese signifikant hemmt. Es wirkt auf viele Komponenten von intrazellulären Signaltransduktionswegen einschließlich pro-inflammatorischer Mediatoren, der Regulation von Zellwachstum und Apoptose und der Tumorangio-genese durch Modulation von essentiellen Kinasen, Transkriptionsfaktoren und deren Regulatoren (Kundu und Surh 2008). In einem ex vivo Experiment wurde gezeigt dass trans-Resveratrol sowohl die Produktion von inflammatorischen (TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) als auch anti-inflammatorischen (IL-6) Cytokine unterdrückt (Marier et al. 2005).

2010 untersuchten Yu et al. anhand einer Studie den Effekt von Resveratrol auf die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und die Angiogenese bei Mäusen mit Leberkrebs. Unter Behandlung mit dem Naturstoff wurde die VEGF- und mRNA-Expression signifikant gesenkt und auch das Wachstum des Tumors gehemmt. Sie kamen zum Entschluss, dass die Wirkung auf VEGF wahrscheinlich auf einer Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Leberzellen beruht.

Auch hinsichtlich Diabetes mellitus gibt es positive Wirkungen von Resveratrol. In der Studie von Su et al. 2006 konnte mit Versuchen an Ratten eine Senkung des Blutzuckers und Triglyceriden durch Resveratrol gezeigt werden. Weiters wurde bei Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 die Expression des Glucosetransporters GLUT 4 durch den Naturstoff gesteigert und somit die Glucoseaufnahme verbessert (Lekli et al. 2008). Resveratrol führte bei Mäusen, die kalorienreiche Nahrung bekamen, zu einer Erhöhung der Insulin-Sensibilität und der AMP-aktivierten Proteinkinase und einer Reduktion des IGF-1 (insulin-like growth-factor). Somit wurden die schädlichen Folgen von kalorienreicher Ernährung vorgebeugt und ein lebensverlängernder Effekt bei den Mäusen erzielt. (Baur et al. 2006). Auch bei Diabetes bedingten neuropathischen Schmerzen kann es durch Resveratrol, aufgrund dessen Einfluss auf die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie NO und TNF $\alpha$ , zu einer Linderung kommen (Sharma et. al. 2007).

Resveratrol besitzt weiters eine positive Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem. Dafür sind sowohl die Funktion als Antioxidans, als auch vasodilatierende Effekte und der Einfluss auf die Blutgerinnung von großer Bedeutung. Durch das Polyphenol wird die Bildung der Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, wie 5- bzw 12-HETE (Hydroxyeicosatetraenoat), HHT (Hydroxyheptadecatrienoat) und Thromboxan B<sub>2</sub>, unterdrückt. Es wird sowohl die durch Thrombin, als auch die durch ADP induzierte Plättchenaggregation gehemmt, im Gegensatz zu dem im Wein vorhandenen Ethanol, welcher nur die thrombininduzierte Aggregation hemmt (Kimura et al. 1985, Pace-Asciak et al. 1995). Weiters ist Resveratrol neben der COX-2 auch ein potentieller COX-1 Hemmer wodurch ebenfalls eine Hemmung der Plättchenaggregation hervorgerufen wird (Calamini et al. 2010, Sobotková et al. 2009). Weiters wird der Gewebefaktor TF (tissue factor), der Aktivator des extrinsischen Systems der Blutgerinnung, durch den Naturstoff gehemmt und somit die durch ihn ausgelöste Thrombenbildung (Di Santo et al. 2003).

In einer weiteren Studie wurde neben dem Flavonoid Quercetin auch der Effekt von Weinpolyphenolen auf die endotheliale Funktion und Dysfunktion untersucht mit dem Hintergrund eine mögliche protektive Rolle hinsichtlich Bluthochdruck, ischemic heart disease und Schlaganfall zu zeigen. In vivo konnte an hypertensiven Tieren gezeigt werden, dass durch die Polyphenole das Risiko einer endothelialen Dysfunktion gesenkt wurde, es zu einer Reduktion des Blutdruckes und des oxidativen Stress kam und somit Endorganschäden verhindert werden konnten (Perez Vizcaino et al. 2006).

### **1.2.5. Pharmakokinetik**

Studien zur Pharmakokinetik von Resveratrol ergaben, dass wenn es oral eingenommen wurde, es mit einer Bioverfügbarkeit von ca. 70% resorbiert wurde. Die Plasmahalbwertszeit betrug ungefähr 9h und die Ausscheidung erfolgte hauptsächlich renal. Da es zu einer raschen Metabolisierung der aufgenommenen Menge kam, konnte man nur mehr einen relativ kleinen unveränderten Teil im Plasma feststellen. Bei der Metabolisierung erfolgte sowohl eine Konjugation mit einer Schwefelsäure und Glucuronsäure, als auch kam es zur Hydrierung der Doppelbindung durch intestinale Keime.

Die in Harn und Serum nachgewiesenen Hauptmetabolite waren Trans-Resveratrol 3-O-glucuronid und trans-Resveratrol-3-O-sulfat. Bei jenem Anteil an Resveratrol welcher nicht metabolisiert wurde, kam es in Abhängigkeit der vorliegenden Fettsäuren vorwiegend zu Interaktion mit dem Plasmaprotein Albumin. Die Aufnahme in die Leberzellen erfolgte entweder aktiv über einen Carrier-vermittelten Transporter, oder passiv.

Die Akkumulation von Resveratrol und möglichen aktiven Metaboliten in den Epithelzellen führt zu den unterschiedlichen Wirkungen trotz des starken Metabolismus (Yu et al. 2002, Jannin et al. 2004, Walle et al. 2004).

Eine neuere Studie ergab, dass bei Verwendung von Pterostilbene, sogenannte methylierte Polyphenolanaloga, die Nachteile des Resveratrol-Metabolismus beseitigt wären. Im Vergleich zu Resveratrol mit 20% wiesen Pterostilbene eine Bioverfügbarkeit von etwa 80% auf. Auch die Plasmaspiegel waren deutlich höher als die des Naturstoffes. Die Spiegel der jeweiligen Glucuronide waren jedoch gleich. (Kapetanovic et al. 2010)

Eine wichtige Tatsache ist, dass Resveratrol Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 inaktiviert, wodurch Interaktionen mit zahlreichen Arzneistoffen, welche Substrate des CYP 3A4 sind, auftreten können (Chan et al. 2000)

## 2. Material und Methodik

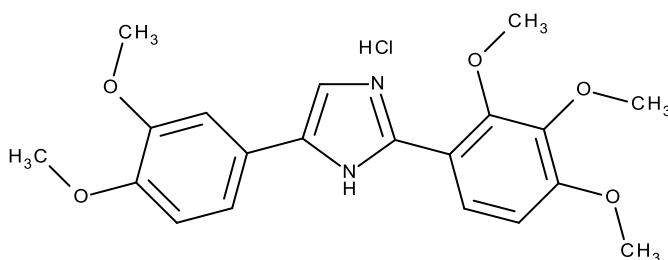
---

### 2.1. Testsubstanzen

Bei den für die Untersuchung verwendeten Testsubstanzen handelt es sich um zwei neu synthetisierte Derivate des bereits bekannten Naturstoffs Resveratrol. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Erker an der Fakultät für Lebenswissenschaften am Department für Pharmazeutische/Medizinische Chemie synthetisiert und bereitgestellt.

#### 2.1.1. PGU 105 HCl

Abbildung 3: chemische Struktur von PGU 105 HCl

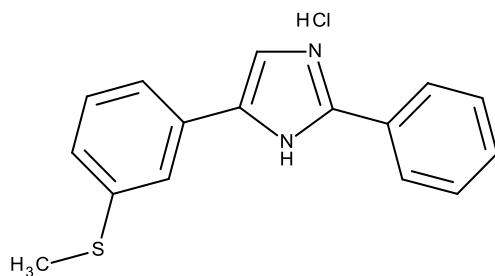


**MG:** 406,86 g/mol

**Nomenklatur:** 5-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-1*H*-imidazol Hydrochlorid

#### 2.1.2. PGU 175 HCl

Abbildung 4: chemische Struktur von PGU 175 HCl



**MG:** 302,82 g/mol

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

### 2.1.3. Lösungsmittel

Für die Durchführung der Versuche mussten die Testsubstanzen zuvor in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. Wonach PGU 105 in H<sub>2</sub>O löslich war, musste für PGU 175 aufgrund der höheren Lipophilie Dimethylsulfoxid (DMSO) gewählt werden. DMSO ist in diesem Fall besonders geeignet, da durch die dipolaren Eigenschaften dieses Lösungsmittels sowohl das Lösen lipophiler Substanzen ermöglicht wird, als auch das Vermischen mit H<sub>2</sub>O. Die geringe Eigenwirkung auf die Organe musste jedoch bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Je nach Fassungsvermögen der Organbäder (8 und 25 ml) wurden unterschiedliche Mengen an Testsubstanz eingewogen, damit nach kumulativer vollständiger Zugabe eine Endkonzentration von 100 µmol/l pro Gefäß erreicht werden konnte.

**Tabelle 1: Verwendete Einwaagen**

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz (100 µmol/l)
PGU 105	406,86 g/mol	8 ml	0,34 mg
		25 ml	1,02 mg
PGU 175	302,82 g/mol	8 ml	0,25 mg
		25 ml	0,76 mg

Die Testsubstanzen konnten erst appliziert werden, wenn die Messwerte des jeweiligen Organs konstant waren und sich eine Plateauphase eingestellt hat. Um die erwünschten Messkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l zu erreichen, wurden dann in zeitlichen Abständen von 45 Minuten 1, 2, 7, 20 und 70 µl der Stammlösung mit einer Finnmikropipette zugefügt. Das Einhalten der 45 Minuten war insofern wichtig, da eine „steady state“ erreicht werden musste und diese erst nach 45 Minuten als gesichert angenommen wird. Die genauen Zeitpunkte der Testsubstanzzugabe mussten am Papier neben den Graphen gekennzeichnet werden.

**Tabelle 2: Pipettierschema**

<b>Applizierte Menge der Stammlösung</b>		<b>Endkonzentration</b>
<b>PGU 105</b>	<b>PGU 175</b>	
1 µl	1 µl	1 µmol/l
2 µl	2 µl	3 µmol/l
7 µl	7 µl	10 µmol/l
20 µl	20 µl	30 µmol/l
70 µl	70 µl	100 µmol/l



## 2.2. Physiologische Elektrolytlösung

Um die isolierten Organe künstlich am Leben zu erhalten mussten diese sowohl zur Aufbewahrung, als auch für die Versuche selber in eine Nährstofflösung eingebracht und mit Oxymix bzw. Carbogen, einem Gemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, begast werden. Als Nährlösung wurde die sogenannte Tyrode verwendet, benannt nach dem Pharmakologen Maurice Vejury Tyrode. Diese entspricht einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung und musste zu Beginn jedes Versuchstages nach den Vorschriften von Reiter (1967) frisch zubereitet werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode

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

Für die Zubereitung wurden zuerst die vier in der Tabelle gelisteten Stammlösungen an NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> und NaHCO<sub>3</sub> in einem 2 Liter fassenden Messkolben vermischt. Nach genauer Einwaage der Glucose, wurde diese darin gelöst und zum gesamten Inhalt des Kolbens noch ca. 1,5 Liter Aqua dest. zugefügt. Anschließend folgte eine 10 – minütige Begasung mit Oxymix und währenddessen eine tropfenweise Zugabe von CaCl<sub>2</sub>. Die dadurch erlangte Sauerstoffsättigung und die langsame Applikation von CaCl<sub>2</sub> verhinderten die Bildung und das Ausfallen schwerlöslicher Calcium-Salze, was durch eine Trübung der Lösung erkennbar wurde. Zuletzt wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt und zur besseren Durchmischung geschwenkt.

### 2.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen unterschiedlicher Geschlechter des sogenannten „TRIK“ – Stammes verwendet. Diese sind nicht durch Inzucht, sondern durch Auszucht vermehrt worden und somit weitgehend gesünder und robuster. Die aus Graz stammenden Tiere waren nur wenige Wochen alt und ihr Gewicht betrug durchschnittlich 300 – 600 g.

Für die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit wurden ausgewählte innere Organe der Nagetiere verwendet. Meerschweinchen sind deshalb sehr gut geeignet, da die menschlichen Ionenkanäle denen der Meerschweinchen sehr ähnlich sind.

Zu Beginn jedes Versuchstages wurde ein Tier ausgewählt und mit einem gezielten Genickschlag getötet. Diese Art von Tötung ist laut Praxis die schonendste Methode, da sie sehr rasch vollzogen ist, das Meerschweinchen keinen Schmerz verspürt und der Stress gering gehalten wird.

Nach Öffnen des Thorax und Abdomen wurden zuerst Herz und Lunge entnommen, dann ein ca. 20 cm langes Stück des Dünndarms und zuletzt noch die Aorta. Die Organe wurden sofort in die Nährlösung gegeben und mit Oxymix begast.

**Abbildung 5: Versuchstier - Meerschweinchen**



## 2.4. Verwendete Organe

Damit die Versuche durchgeführt werden konnten mussten Herz, Dünndarm und Aorta noch weiter präpariert werden.

### 2.4.1. Isolierung und Präparation der Organe

#### 2.4.1.1. Verwendete Materialien

Zum Präparieren wurden die Organe in eine mit Tyrode befüllte Petrischale gelegt in der eine durch einen Gummischlauch fixierte Korkscheibe lag. Auf dieser Korkscheibe konnten die Organe mit Präpariernadeln gut befestigt werden. Da die Präparate teils sehr klein waren und Genauigkeit eine sehr große Rolle spielt, kam sehr oft ein Stereomikroskop zum Einsatz. Zusätzlich wurden noch Pinzetten, Spitzscheren, Federschere und Pasteurpipetten verwendet.

Abbildung 6: Stereomikroskop und weitere Materialien



#### **2.4.1.2. Isolierung und Präparation – Atrium dexter**

Das Herz wurde rasch aus dem geöffneten Thorax entnommen und für den Transport in ein mit Tyrode gefülltes Becherglas gelegt. Nach vorsichtigem Ausdrücken von überschüssigem Blut wurde es dann für die Präparation in eine Petrischale überführt und dort mit zwei Nadeln am Kork befestigt. In Folge wurden zuerst umliegendes Fett- und Lungengewebe und das Perikard entfernt und dann der rechte Vorhof durch einen Schnitt entlang des Sulcus coronarius von der rechten Herzkammer abgetrennt. Besonders wichtig war es, dass man während der gesamten Präparation aufpasste das Gewebe nicht zu überdehnen und den Sinusknoten nicht zu verletzen. Der Sinusknoten ist mit seiner Funktion als primärer Schrittmacher des Herzen essentiell für das Gelingen der Versuche. Nach Anbringen von kleinen Silberhäkchen an der Spitze und der Basis des Vorhofes mit zwei Fäden, konnte das fertige Präparat in die Versuchsapparatur „mit der Spitze nach unten“ eingespannt werden.

#### **2.4.1.3. Isolierung und Präparation – Musculus papillaris**

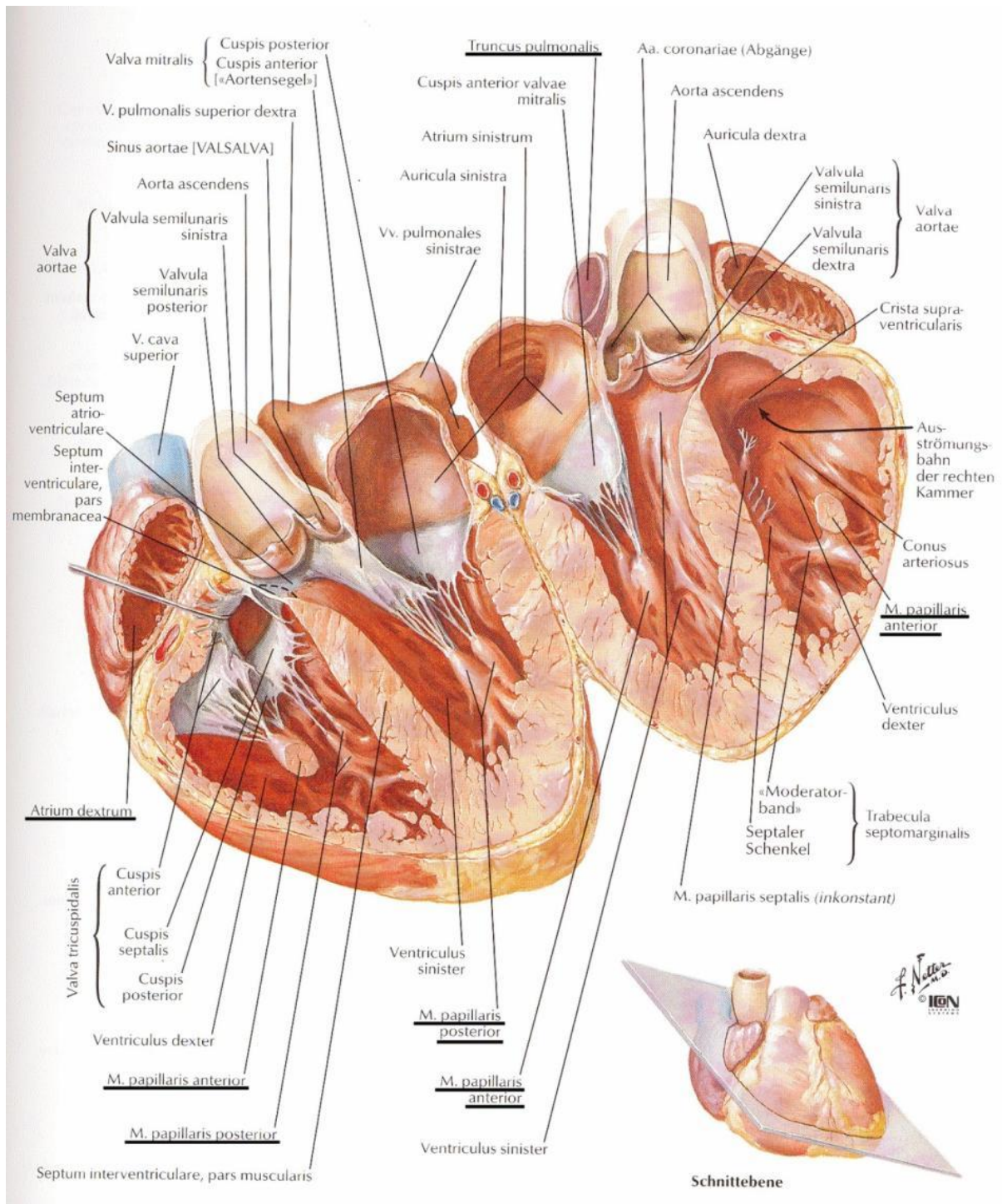
Die Papillarmuskeln befinden sich in den beiden Herzkammern, welche zuvor von den Vorhöfen abgetrennt wurden. Für deren Freilegung wurden die Kammern entlang des Septums bis hin zu Spitze aufgeschnitten und dann aufgeklappt. Bevor die Muskeln isoliert werden konnten, mussten die Purkinjefasern möglichst vollständig entfernt werden. Diese Fasern können aufgrund ihrer möglichen Spontanaktivität zu einer Beeinträchtigung der Versuche führen. Anschließend wurde am Ansatz der Papillarmuskeln mit einem Faden ein Silberhäkchen angebracht, die Sehne vorsichtig abgetrennt und letztendlich der Muskel isoliert ohne ihn zu überdehnen und zu beschädigen

#### **2.4.1.4. Isolierung und Präparation – Arteria pulmonalis**

Über die Arteria Pulmonalis wird sauerstoffarmes Blut von der rechten Herzkammer zur Lunge transportiert. Um diese isolieren zu können erfolgte zuerst ein Schnitt sehr nahe am Herz und dann ein weiterer vor jenem Abschnitt, wo die Auftrennung in die rechte und linke Arteria Pulmonalis beginnt.

Das gewonnene Gefäßstück, welches maximal einen Zentimeter lang war, wurde dann vorsichtig von Fettresten befreit und anschließend in zwei bis drei wenige Millimeter lange, ringförmige Stücke zerschnitten. Diese konnten dann, ohne Anbringen von Häkchen, direkt in die Apparaturen eingespannt werden.

**Abbildung 7: Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)**

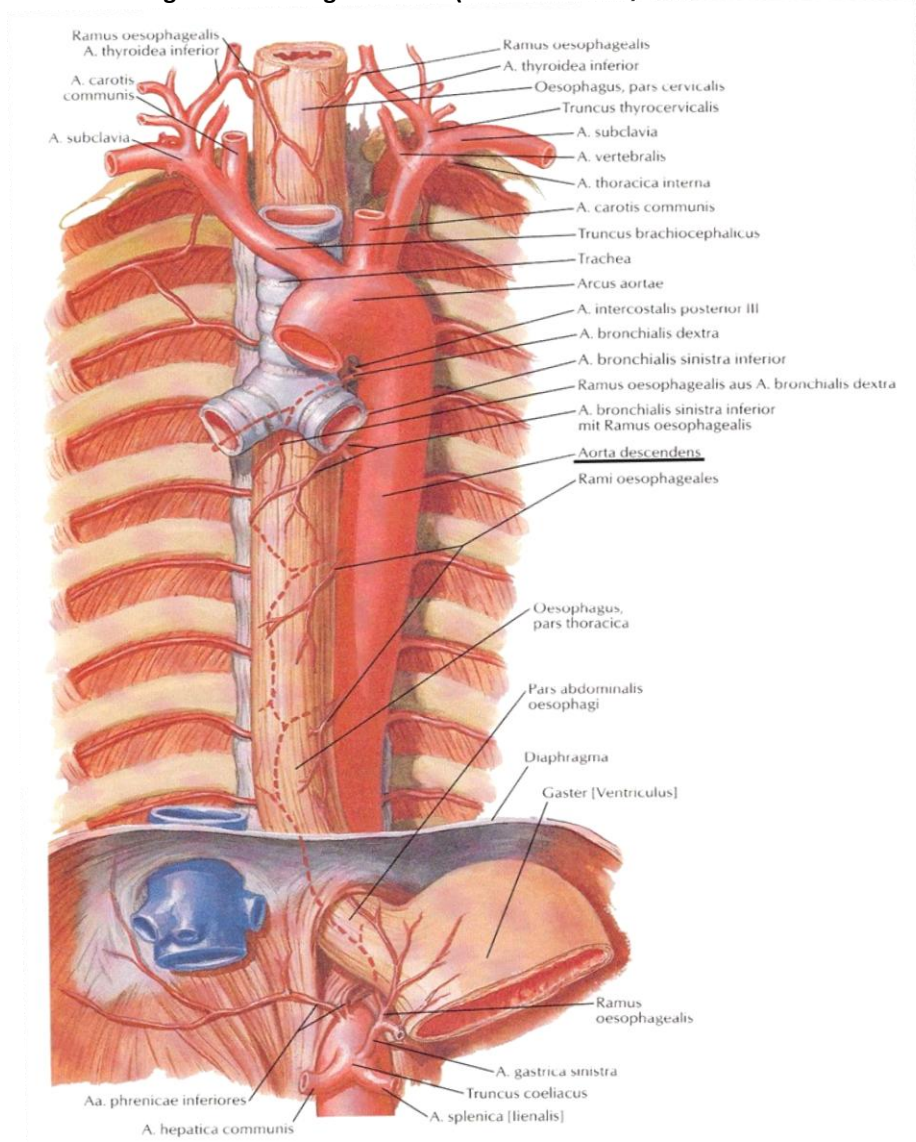


#### 2.4.1.5. Isolierung und Präparation – Aorta descendens

Da man für die Versuche nicht den Aortabogen verwendet, sondern die an der Wirbelsäule anliegende thorakale Aorta, musste der Brustkorb stark nach vorne gedrückt werden, um diese gut zu Gesicht zu bekommen. Mit einer Pinzette wurde die Aorta, ohne diese zu stark zu dehnen, vorsichtig vom Rückgrat wegezogen und mit einer Schere ein ca. drei Zentimeter langes Stück entlang der Wirbelsäule herausgeschnitten.

Die weitere Präparation folgte wieder in der mit Tyrode gefüllten Petrischale. Das mit zwei Stecknadeln am Kork fixierte Aortastück wurde sorgfältig von Gewebe- und Fettresten befreit und in 2-3mm dicke Ringe zerschnitten, welche wiederum direkt in die Apparaturen eingespannt werden konnten.

Abbildung 8: Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)



#### **2.4.1.6. Isolierung und Präparation – Terminales Ileum**

Ein weiteres Versuchsorgan war der Dünndarm, wofür das Abdomen der Länge nach mit einer Schere aufgeschnitten werden musste. Um zum terminalen Abschnitt zu gelangen, musste man zuerst den Übergang vom Dünndarm zum Dickdarm suchen. Dann wurde nach mehrmaligem Einschneiden des Mesenteriums ein ca. 20-30 Zentimeter langes Stück herausgezogen und abgetrennt. Um später noch erkennen zu können, welches das obere Ende des erhaltenen Darmstückes ist, wurde an der jejunalen Seite ein Faden angebunden. Beim anschließendem Überführen in ein Becherglas mit Tyrode und zusätzlichem begasen mit Oxymix konnte man sehr schön die bestehende Darmperistaltik beobachten.

Anschließend wurde dann wieder in der Petrischale präpariert, wobei dafür ein ca. 0,5 – 10 Millimeter langes Darmstück an beiden Enden schräg abgeschnitten werden musste damit dadurch die Öffnungen vergrößert wurden. Um aufgrund der Peristaltik ein Einrollen des Darmstückes zu verhindern, wurde es jeweils, an den durch das schräge abschneiden entstandenen Spitzen, mit einer Nadel am Kork befestigt. Nach Durchspülen mit einer Pasteurpipette um eventuell vorhandene Chymusreste zu entfernen, wurde dann jeweils ein Häkchen mit einem Faden an den Spitzen angebracht. Wichtig war es dabei darauf zu achten, dass die Darmöffnungen nicht zugebunden wurden, da sonst später eine gleichmäßige Durchspülung mit Testsubstanz verhindert wurde.

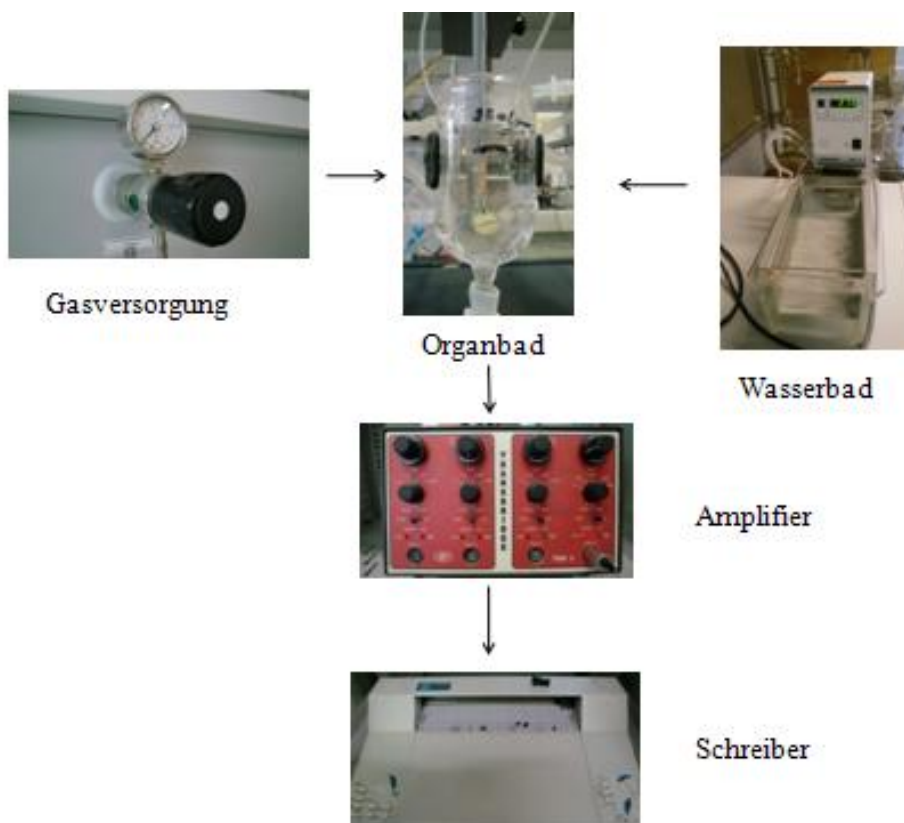
## 2.5. Versuchsanordnung

Für die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit war es besonders wichtig, in Hinsicht auf Temperatur, pH-Wert und O<sub>2</sub>-Versorgung, möglichst physiologische Bedingungen für die Organpräparate zu schaffen.

Im Labor standen zwei verschiedene Apparaturen (A und B) zur Verfügung. Wegen des unterschiedlichen Fixierungsschemas konnten die Papillarmuskeln nur in Apparatur A eingespannt werden, für Vorhof, terminales Ileum, Arteria pulmonalis und die Aorta wurde hauptsächlich die Apparatur B verwendet.

Die Organpräparate wurden auf einem Silberdraht befestigt, welcher über einen Verstärker mit einem Kraftwandler verbunden war. Kam es also zu einer Veränderung am Organ, so wurde die mechanische Kraft durch den Kraftwandler in eine elektrische Größe umgewandelt und mit einem Schreiber auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet.

Abbildung 9: Versuchsanordnung



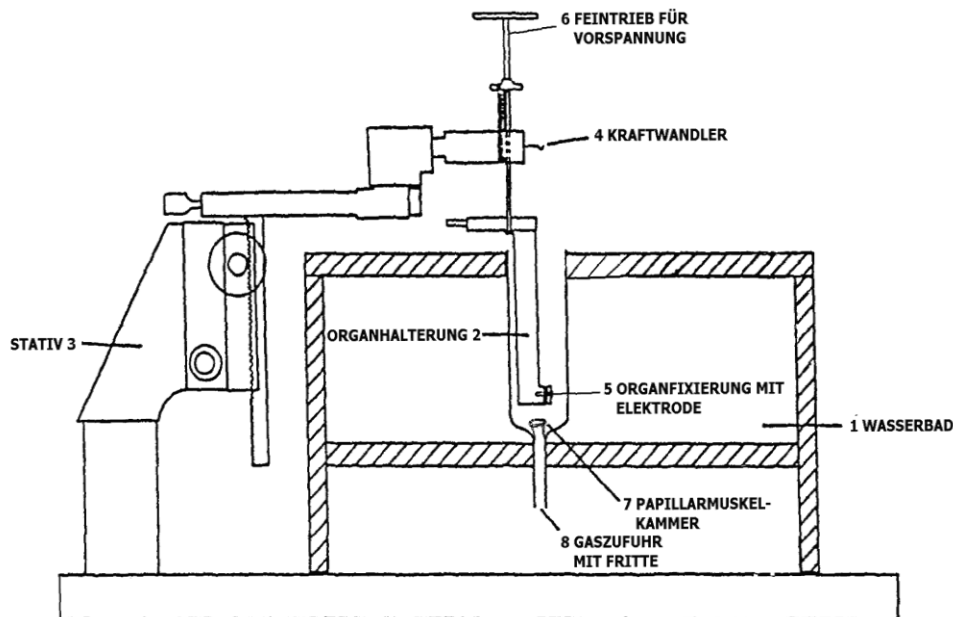


### 2.5.1. Apparatur A

Diese Apparatur wurde hauptsächlich für die Durchführung der Versuche am Papillarmuskel eingesetzt.

Das Gerät bestand aus einem großen beheiztem Wasserbad, in welches die Muskelkammer, das sogenannte Organbad eintaucht. Es war in den Deckel des Wasserbades eingebaut und wurde von unten über einen Schlauch durch eine Glasfritte mit Gas versorgt. Die Muskelkammer fasste mit einem Volumen von 28 ml, die für den Versuch benötigten 25 ml Tyrode, welche mindestens zehn Minuten vor Beginn des Versuches eingefüllt werden mussten, damit die Nährlösung sich der Temperatur des Wasserbades angleichen konnte. Um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen wurde dieses mit einer Heizspirale und einem Thermostat auf erforderliche 35 °C erwärmt.

Abbildung 10: Apparatur A



Das wie in Kapitel 2.4.1.3. vorbereitete Präparat wurde dann auf der Organhalterung angebracht, welche auf einem Stativ mit Stativschlitten und Feintrieb montiert war. Der Papillarmuskel wurde zuerst mit dem auf der Oberseite befestigten Silberhäkchen auf einen Silberdraht gehängt und dann am unteren Ende zwischen einer kleinen Plexiglasplatte und einer Elektrode eingeklemmt und über einen Schraubmechanismus festgezogen. Der Silberdraht dient dazu, um eine Verbindung zum Kraftwandler, das

eigentliche Messinstrument, herzustellen. Danach musste die Organhalterung samt Feintrieb und Kraftwandler so rasch wie möglich in die Muskelkammer abgesenkt werden, bis das Präparat vollständig in die temperierte, begaste Nährlösung eintauchte. Über den Feintrieb konnte anschließend der Abstand zwischen Kraftwandler und Steg verlängert und somit eine Vorspannung angelegt werden.

Dadurch dass die Papillarmuskeln nicht befähigt sind spontan zu schlagen, musste über die Elektrode ein elektrischer Reiz über einen sogenannten Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) zugeführt werden. Bei einer Kontraktion des Muskels kam es dann mit Hilfe des Silberdrahts zur Übertragung des Reizes auf den Kraftwandler, wo er weiter über einen Verstärker bis hin zum Schreiber geleitet wird.

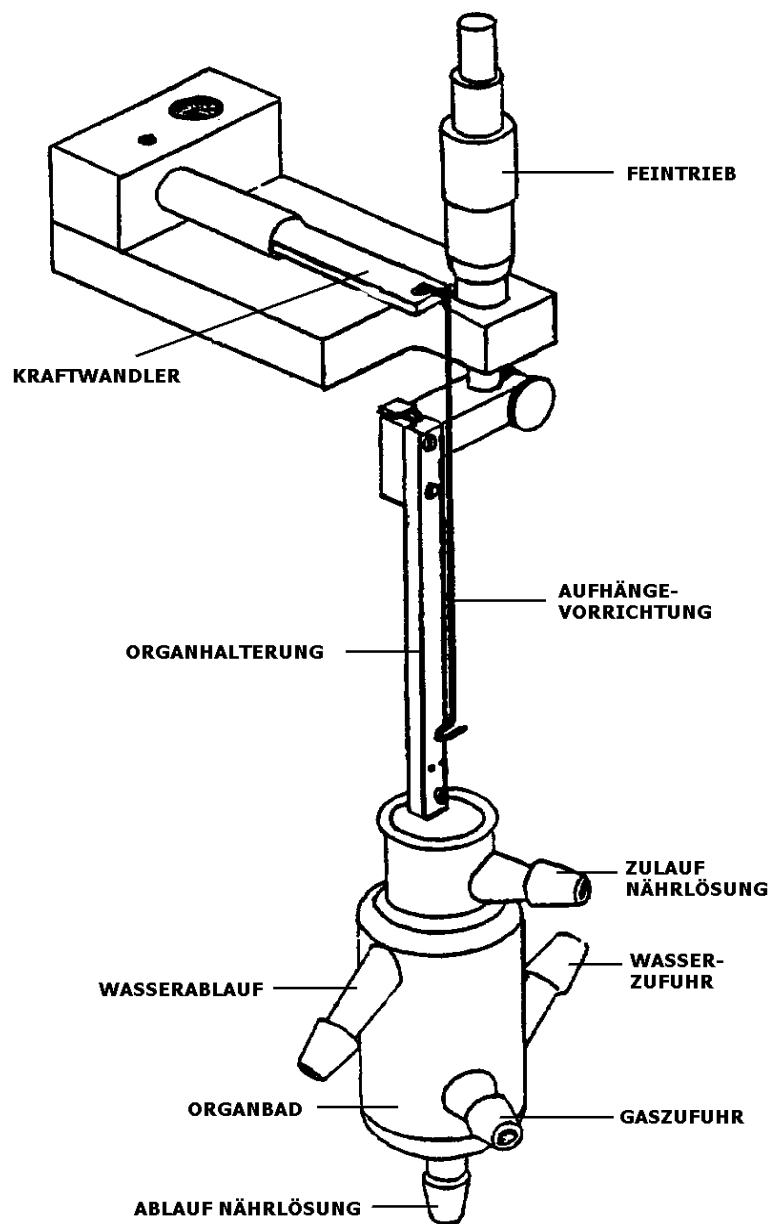
**Abbildung 11: Originale Abbildung der Apparatur A**



## 2.5.2. Apparatur B

Mit der zweiten Apparatur wurden die Versuche an Aorta, rechtem Vorhof, terminalen Ileum und Arteria pulmonalis durchgeführt. Vom Grundprinzip her entsprach diese der vorigen Apparatur A, jedoch unterscheiden sich die Form des Organbades, die Organfixierungsmöglichkeit an der entsprechenden Halterung, sowie die benötigte Temperatur von 37°C.

Abbildung 12: Apparatur B

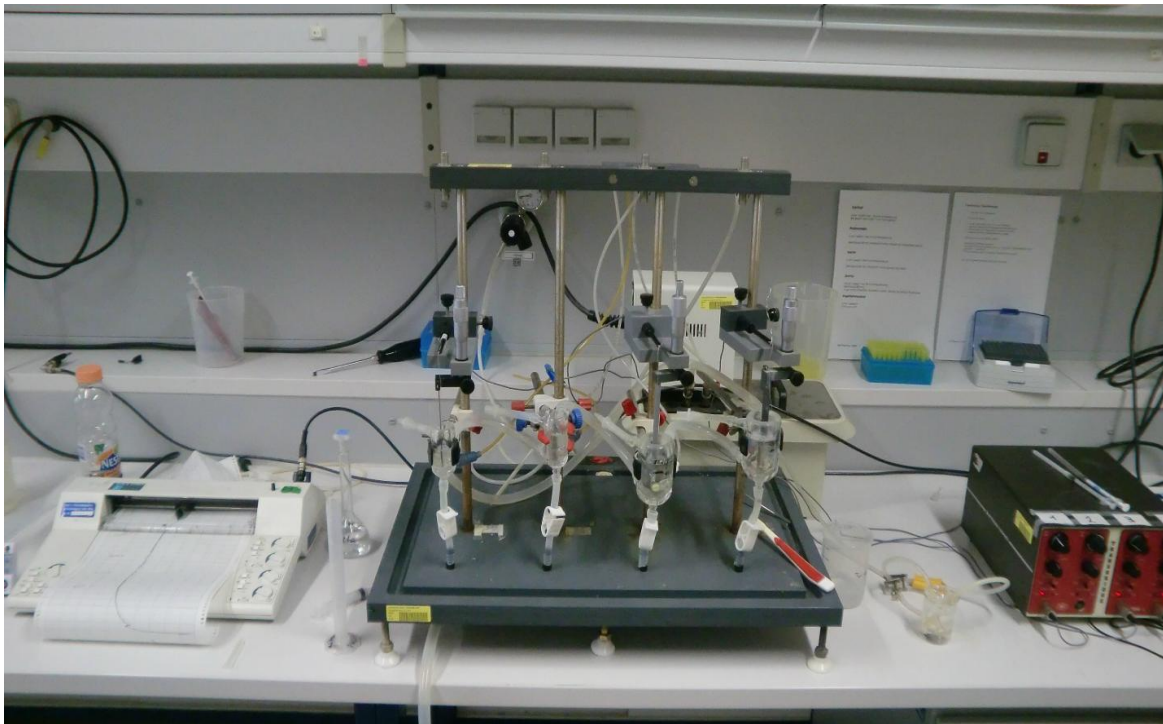


Als Organbad wurde hier ein doppelwandiges Glasgefäß eingesetzt, welches zwischen den Glaswänden mit 37°C warmen Wasser über einen Zu- und Abfluss durchspült wurde. Die Gaszufuhr erfolgte über einen seitlich angebrachten Schlauch und die Stärke konnte man mittels kleiner Schrauben regulieren.

Zum Einspannen der Präparate war hier eine Aufhängevorrichtung am Kraftwandler vorhanden und ein fixiertes Drahtstück unten am Steg. Damit wurden der Vorhof und das terminale Ileum jeweils mit den Haken eingehängt, die ringförmigen Präparate wie Aorta und Arteria pulmonalis konnten direkt eingespannt werden.

Nach dem Eintauchen der Organe in das mit Tyrode gefüllte Organbad, musste je nach vorgeschriebener Vorspannung, diese über den Feintrieb eingestellt werden. Über einen mit einer Quetschklemme verschlossenen Abfluss wurde dann die Nährlösung abgelassen und mit KCl chemisch eine Kontraktion ausgelöst. Die mechanische Kraft wurde wieder auf den Kraftwandler übertragen, wo er als elektrisches Signal weiter über einen Verstärker, bis hin zum Schreiber geleitet und zu Papier gebracht wurde.

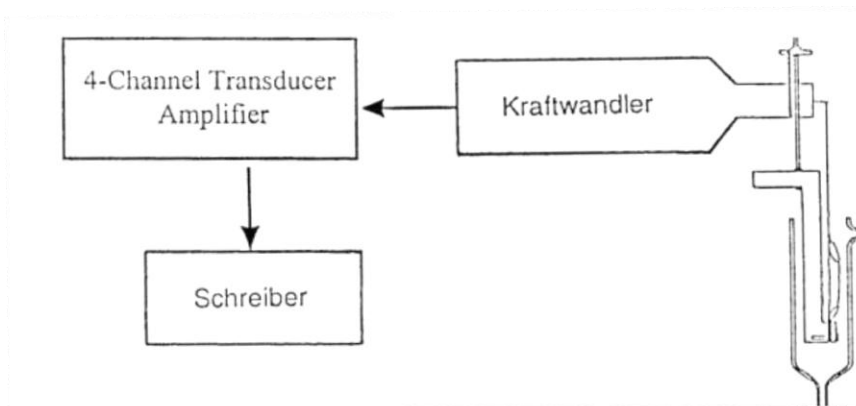
**Abbildung 13: Originale Abbildung der Apparatur B**



### 2.5.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler oder auch Transducers (Transbridge™ der Firma Precision Instruments, USA) war das eigentliche Messinstrument und essentiell bei allen Versuchsapparaturen. Durch diesen konnte die Kontraktionen der Organe gemessen werden, in dem eine Umwandlung der mechanischen Kraft in einen elektrischen Impuls durchgeführt wurde. Dieser Impuls wurde wiederum durch einen Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, WPI) intensiviert und über einen Schreiber (Flatbed Recorder, Modell BD 112 Dual Channel, Firma Kipp & Zonen) letztendlich auf Millimeterpapier visualisiert.

Abbildung 14: Schema der Signalgewinnung



### 2.5.4. Gasversorgung mit Oxymix

Das Durchspülen der Tyrode mit Oxymix, einem Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, war notwendig, damit die Organe ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurden, ein physiologischer pH-Wert von 7,2-7,4 konstant gehalten werden konnte und eine homogene Verteilung der Testsubstanzen im Organbad erfolgte.

Von einer zentralen Gasflasche ausgehend wurden die einzelnen Versuchsapparaturen jeweils über ein System von Schläuchen versorgt und das Gas am Eintritt ins Organbad durch eine Glasfritte fein zerstäubt. Schraubklemmen ermöglichten die Regulation der Gaszufuhr.

## **2.6. Versuchsablauf**

Wichtig war es, dass die Organbäder und die Halterungen immer gründlich gereinigt wurden, da mögliche Verunreinigungen von vorigen Testsubstanzen zu Verfälschungen der Ergebnisse führen könnten. Am Ende eines Versuchstages wurde das Organbad zur Reinigung mit 2%iger HCl gefüllt, nach kurzem Einwirken mit einer Bürste durchgeputzt und wieder abgelassen. Um Rückstände der HCl zu entfernen musste dann noch 2-3-mal mit Aqua bidest. gründlich nachgespült werden. Bevor man einen neuen Versuch startete musste wurde das Organbad einmal mit Tyrode selber gespület bevor es mit derselben aufgefüllt wurde.

Es war von Vorteil die Organbäder etwas früher einzuschalten, da sie eine gewisse Zeit benötigten, bis sie die eingestellte Temperatur erreicht hatten.

### **2.6.1. Versuchsablauf – Terminales Ileum**

Nach Beendigung der Präparation (siehe Kapitel 3.4.1.6.) wurde das Dünndarmpräparat möglichst rasch anhand der angebrachten Häkchen, mit dem jejunalen Ende nach oben und dem caecalen Ende nach unten zeigend, in die Apparatur eingehängt und darauf geachtet, dass es vorerst nicht gespannt wurde. Anschließend musste dieses sofort in das temperierte Organbad abgesenkt und mit Oxymix durchspült werden.

Als erstes wurde der Flachbettscheiber eingeschalten und die Spitze des Schreibers zurück zum Nullpunkt am Millimeterpapier gestellt. Weiters wurde der Amplifier aktiviert, wodurch der Schreiber oft verrutschte und wieder auf den Nullpunkt zurückgestellt werden musste. Da sich die Präparate in ihrer Plastizität unterscheiden, wurden durch sogenanntes „Vorspannen“, immer die gleichen Bedingungen geschaffen, was besonders wichtig für die Reproduzierbarkeit der Versuche war. Beim Dünndarmpräparat wurde bei 5 mV mittels Feintrieb eine Vorspannung von 5cm, was einem Zug von 4,9mN entspricht, angelegt. Danach stellte man die Spitze des Schreibers mit Hilfe des Verstärkers wieder auf den Nullpunkt und musste 20 Minuten abwarten. Es konnte passieren, dass man mit dem Feintrieb während der

Anpassungszeit öfter nachjustieren musste, da es öfter zu einer temperaturbedingten Abnahme der Spannung kam.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Schreiberspitze auf das Papier aufgesetzt, die Tyrode abgelassen und mit 25ml zuvor frisch zubereiteter 60 mM KCl-Lösung (450 mg KCl pro 100 ml Tyrode) wieder aufgefüllt. Ziel des Versuches war es, die spasmolytische Wirkung der Substanz zu messen und deshalb musste das Darmpräparat zuerst mittels KCl-Lösung chemisch kontrahiert werden. Die Kontraktion war zu Beginn sehr stark und konnte sogar mit freiem Auge am Organ beobachtet werden, nahm jedoch schnell wieder ab und pendelte sich erst nach einiger Zeit ein. Deshalb musste man mindestens 45 Minuten warten und konnte erst nach Erreichen einer konstanten Kontraktion mit dem Einspritzen der Testsubstanzen, wie in Kapitel 2.1.3. bereits besprochen, beginnen.

Konnte sich jedoch aufgrund stetig abnehmender Kontraktion, ohne Zugabe der Testsubstanz, keine Plateauphase einstellen, so musste der Versuch abgebrochen werden. Nach gründlicher Reinigung des Organbades, musste dann wieder mit einem neuen Präparat gestartet werden. Während des gesamten Versuches war besonders darauf zu achten, die gesamte Organaufhängung und das Präparat nicht zu berühren, da sonst die Messergebnisse negativ beeinflusst werden konnten.

### **2.6.2. Versuchsablauf – Aorta descendens**

Da dieses Präparat ringförmig war, konnte es ohne weitere Hilfsmittel direkt in die Apparatur eingehängt werden. Wichtig war es, dass man zuerst die Länge des L-förmigen Silberdrahtes der Größe des Gefäßringes anpasste und somit ein Überdehnen und Beschädigen verhinderte. Das Aortenstück wurde quer in die Apparatur eingespannt, in das temperierte und begaste Organbad abgesenkt und dann bei 10 mV eine Vorspannung von 19,4 mN angelegt. Während der 20-minütigen Anpassungszeit wurde eine eventuelle Abnahme der Spannung wieder mittels Feintrieb an den Nullpunkt angepasst. Nach Ablauf der Zeit musste zuerst auf 5mV umgestellt werden, (entspricht 9.81 mN) bevor die Tyrode abgelassen wurde. Um die Veränderung der Kontraktionskraft messen zu können, musste das Aortenstück wieder vorkontrahiert

werden und diesmal wurde eine 90 mM KCl-Lösung (670 mg KCl in 100 ml Tyrode) dafür verwendet. Die anfangs rasche Kontraktion war durch ein schnelles Ausschlagen des Schreibers nach links erkennbar, welches danach aber immer langsamer wurde und der Schreiber zuletzt stehen blieb, wodurch die maximale Kontraktion angezeigt wurde. Wiederum musste man mindestens 45 Minuten abwarten bis sich eine konstante Kontraktion und somit die Plateauphase eingestellt hatte. Dann erst konnte man mit der Substanzzugabe beginnen.

### **2.6.3. Versuchsablauf – Arteria pulmonalis**

Der Versuch verlief genauso wie bei der Aorta (Kapitel 2.6.2), jedoch lag während des gesamten Versuches eine Spannung von 5mV vor und somit betrug die Vorspannung 9,81mN.

### **2.6.4. Versuchsablauf – Musculus papillaris**

Nach der Präparation (Kapitel 2.4.1.3.) wurden die Papillarmuskeln, wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben, in die Apparatur B eingespannt und in das 35°C warme, mit Oxy mix durchperlte Organbad eingetaucht. Das Gerät wurde auf 5 mV sowie Speed 5 mm/sec eingestellt und die Spitze des Schreibers auf die Nulllinie gebracht. Die Vorspannung betrug 3.92mN und musste bei einer Abweichung des Wertes mit dem Feintrieb korrigiert werden, da die Ausgangsspannung mit der Kontraktionskraft in Korrelation steht. (Reiter 1967)

Wie bereits in Kapitel 2.5.1. erwähnt, besitzt der Papillarmuskel keine Spontanaktivität und musste deshalb, um zu kontrahieren, durch setzen von Rechteckimpulsen mit einer Dauer von 3ms bei einer Frequenz von 1Hz, gereizt werden. Die Reizstärke wurde über eine Isolation Unit so lange erhöht, bis man die Schwellenstromstärke erreichte und der Papillarmuskel zu kontrahieren begann. Um eine kontinuierliche Kontraktion des Muskels zu erhalten, sollte die eingebrachte Reizstärke noch um weitere 10% erhöht werden. Wurde die Reizstärke jedoch zu stark erhöht, konnte es passieren, dass es zur selbstständigen Entleerung der Catecholaminspeicher kam (Furchgott RF et al.



1959). Dies würde zu einem sogenannten „run down“, einer stetigen Abnahme der Kontraktionsamplitude und somit einer Verfälschung der Messwerte führen.

Nach ca. 20 Minuten Anpassungszeit konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden. Dabei wurden der Schreiber in Abständen von 5 Minuten auf das Papier gesetzt und immer 6 Amplituden pro Messung gezeichnet. Dies musste 45 Minuten lang durchgeführt werden, bis die Amplitudengröße konstant war und mit der Substanzzugabe nach dem bereits bekannten Schema (Kapitel 2.1.3.) gestartet werden konnte. Um einen breiteren Graphen zu erhalten, wurde bei der letzten Messung einer Konzentration noch zusätzlich eine Aufzeichnung der 6 Amplituden bei 20mm/sec durchgeführt.

### **2.6.5. Versuchsablauf – Atrium dexter**

Mit denen, in Kapitel 2.4.1.2. beschrieben, angebrachten Silberhäkchen wurde das Vorhofpräparat vorsichtig in die vorgeformten Häkchen der Organhalterung ohne Spannung eingehängt und wiederum ins temperierte, begaste Organbad abgesenkt. Das Organ durfte auf keinen Fall zu stark gedehnt werden, da dies eine Fehlfunktion, der durch den Sinusknoten ermöglichten Spontanaktivität, zu Folge haben konnte.

Der Versuch wurde wie zuvor bei 5 mV sowie Speed 5 mm/sec, aber einer Vorspannung von 10,4mN durchgeführt. Im Gegensatz zum Papillarmuskel ist der Vorhof, wie bereits erwähnt, zur spontanen Aktivität befähigt und nach dem Eintauchen in die Nährlösung kann man im Idealfall ein sofortiges Schlagen beobachten. Nach der 20-minütigen Gewöhnungsphase konnten wieder die Kontrollmessungen durchgeführt werden. Der Schreiber musste ebenfalls alle 5 Minuten auf das Papier gesetzt werden, jedoch wurde hier auf sechs 1 Zentimeter langen Kästchen die Schlagfrequenz aufgezeichnet, was bei der eingestellten Geschwindigkeit von 5mm/sec jeweils 12 Sekunden dauerte. Nun mussten die Zacken am Papier gezählt werden, so lange, bis die Frequenz über 4 Messungen konstant blieb. Dann konnte die Applikation der Testsubstanzen nach dem bereits bekannten Pipettierschema (Kapitel 2.1.3.), mit fortsetzender Messung der Schlagfrequenz in 5 minütigen Abständen, begonnen werden.

## **2.7. Auswertung der Daten und Statistik**

### **2.7.1. Auswertung – Aorta , Arteria pulmonalis, terminales Ileum**

Nach erzwungener Kontraktion der Organe mit KCl, wurde bei den Versuchen mit Aorta und Arteria pulmonalis auf eine mögliche vasodilatierende Wirkung, beim Darm auf eine spasmolytische Wirkung der Testsubstanzen untersucht. Die Substanzzugabe, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde, musste jeweils neben der erhaltenen Kontraktionskurve gekennzeichnet werden, damit später eventuelle Veränderungen durch die applizierten Konzentrationen ermittelt werden konnte. Dazu wurden dann die Abstände zwischen der Nulllinie und den zuvor markierten Stellen an der Kurve mit einem Lineal abgemessen und mit dem jeweiligen, in Abhängigkeit der eingesetzten mV-Werte, benötigten Eichungsfaktor multipliziert. Mit diesem Faktor erhielt man die Werte in mN und er betrug bei 5 mV 0,98, bei 2mV 0,196 und bei 10mV 1,96.

Für die prozentuelle Berechnung einer Veränderung der Kontraktionskraft durch die Testsubstanzen wurde als Referenzwert jener Wert eingesetzt, an dem vor Applikation der ersten Konzentration eine konstante Kontraktion des Organs herrschte. Durch Erstellen einer Konzentrations-Wirkungskurve aus allen ermittelten Werten konnte dann, wenn vorhanden, die  $EC_{50}$  berechnet werden.

### **2.7.2. Auswertung – Atrium dexter**

Ziel der Versuche am rechten Vorhof war es, die Wirkung der Testsubstanzen auf die Chronotropie (Schlagfrequenz) des Sinusknotens zu überprüfen. Dazu wurden die Herzschläge über 12 Sekunden lang, das entsprach 6 Kästchen zu je 1 cm Länge am Millimeterpapier, mittels Flachbettschreiber aufgezeichnet und anschließend gezählt. Durch Multiplikation der ermittelten Werte mit 5, erhielt man dann die Anzahl der Herzschläge pro Minute. Wieder wurden die Einflüsse der Substanzen mittels Referenzwert prozentuell berechnet und anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt.

### **2.7.3. Auswertung – Musculus papillaris**

Bei den Papillarmuskeln wurde eine mögliche Veränderung der Inotropie (Kontraktionskraft) nach Zugabe der Testsubstanzen untersucht. Dazu wurde die Länge der aufgezeichneten Amplituden mit einem Lineal abgemessen und abhängig vom den verwendeten mV wieder mit dem Eichfaktor multipliziert. Bei einer Durchführung des Versuches bei 5mV wurde mit 0,98, bei 2mV stattdessen mit 0,196 multipliziert. Der ermittelte Referenzwert wurde wieder als Ausgangswert für die prozentuelle Berechnung herangezogen und eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

### **2.7.4. Statistik**

Bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel musste man die geringe Eigenwirkung berücksichtigen und diese von den erhaltenen Werten abziehen. Zur weiteren Auswertung wurde, unter Verwendung des Programmes „Sigma Plot 9.0“, das arithmetische Mittel der Werte, sowie der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet und anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve graphisch dargestellt. Bei einer starken Wirkung konnte daraus die  $EC_{50}$ , jene effektive Konzentration, bei der es zu einer 50%igen Änderung des Referenzwertes kommt, eingezeichnet und abgelesen werden. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu ermitteln, wurde weiters ein sogenannter Student-T-Test durchgeführt. Dabei wurden Ergebnisse die unter 5 % ( $P < 0,05$ ) bzw. 1 % ( $P < 0,01$ ) lagen als signifikant und unter 0,1 % ( $P < 0,001$ ) als hochsignifikant bewertet.

# 3. Ergebnisse

---

## 3.1. Testsubstanz PGU 105 HCl

### 3.1.1. Ergebnisse – Aorta descendens

Für die Untersuchung einer vasodilatierenden Wirkung von PGU 105 auf die glatte Muskulatur der Aorta wurden vier Versuche durchgeführt. Von den erhaltenen Messwerten wurden die arithmetischen Mittelwerte berechnet und ein Referenzwert von  $8,43 \pm 1,36$  mN ermittelt.

Bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  der Testsubstanz kam es bereits zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft, eine  $EC_{50}$  wurde jedoch nicht erreicht.

Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche von PGU 105 HCl an der Aorta

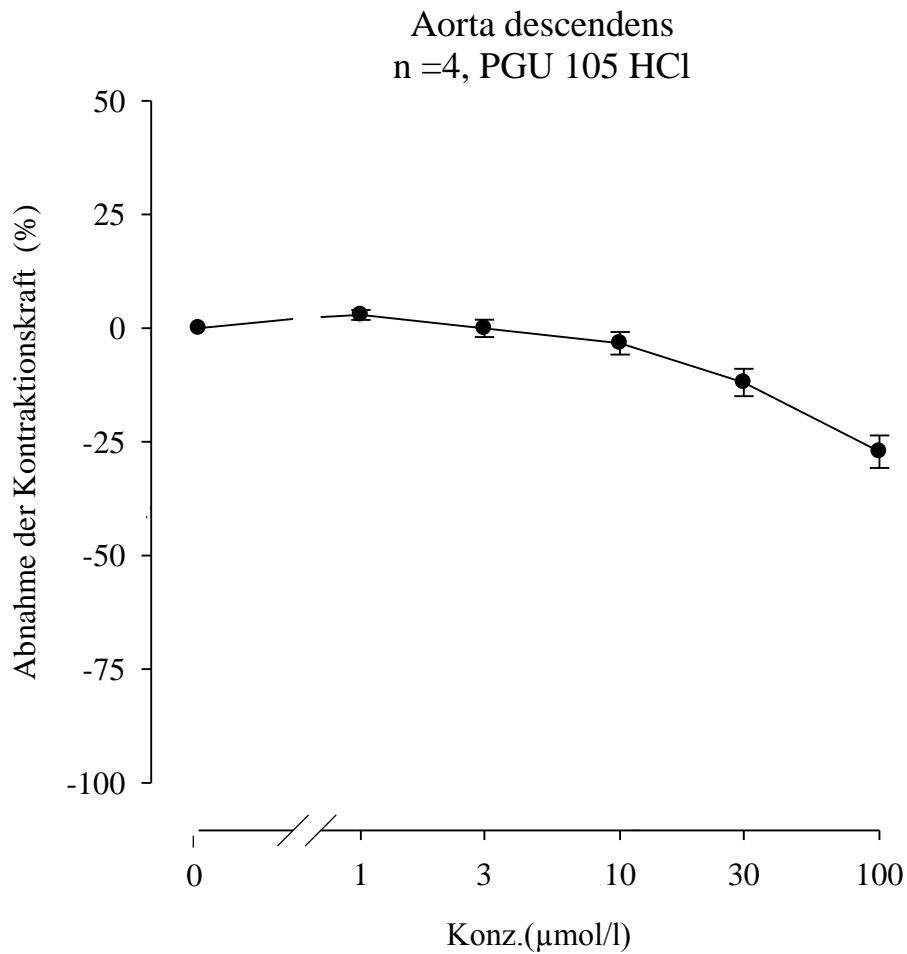
PGU 105 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,43 \pm 1,36$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$8,70 \pm 1,49$	$2,90 \pm 1,09$	4	n.s.
3	$8,36 \pm 1,20$	$-0,05 \pm 1,91$	4	n.s.
10	$8,09 \pm 1,18$	$-3,34 \pm 2,49$	4	n.s.
30	$7,35 \pm 1,04$	$-11,96 \pm 2,99$	4	n.s.
100	$6,03 \pm 0,74$	$-27,17 \pm 3,57$	4	0,05

Legende zu Tabelle 4:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

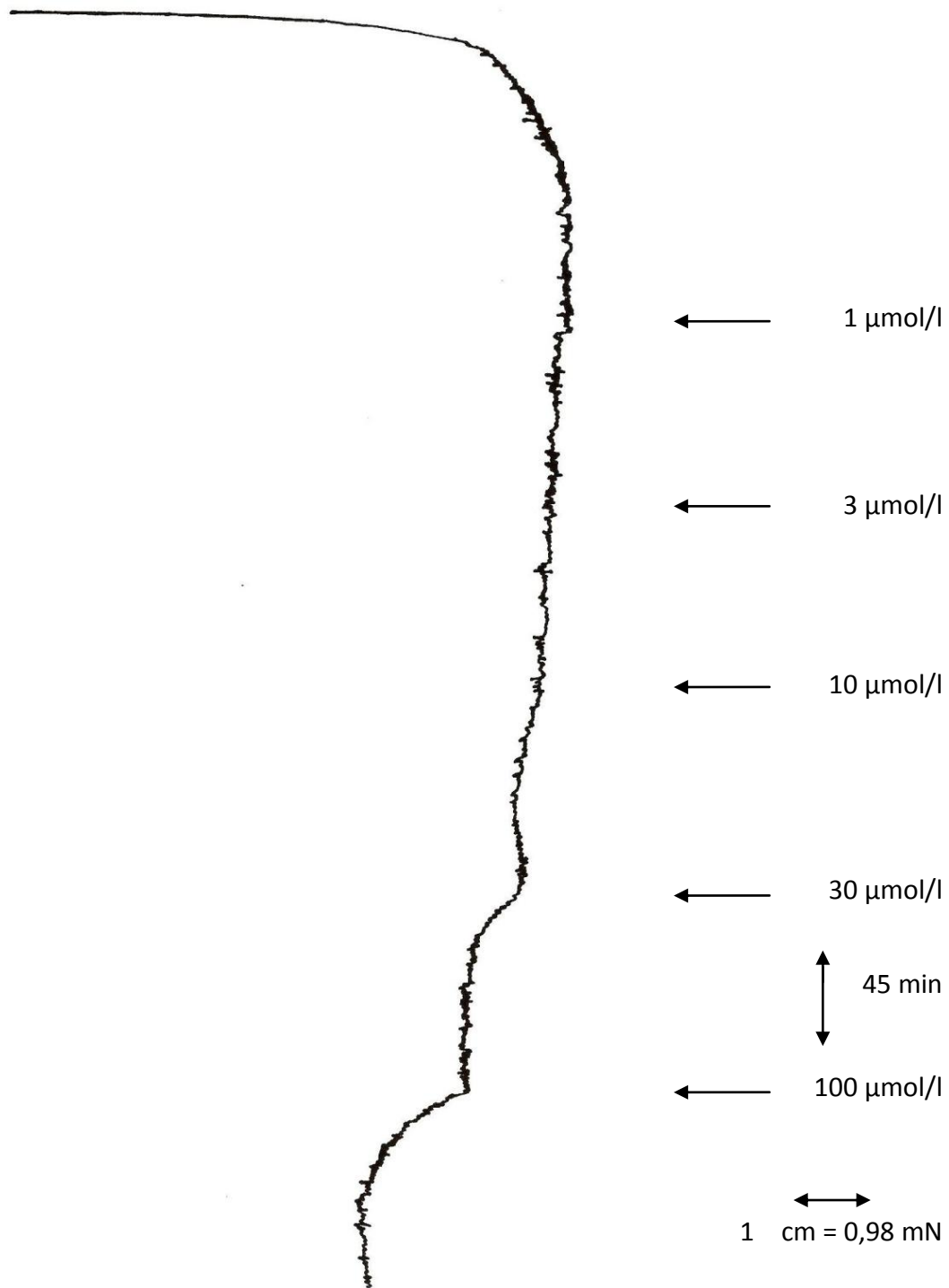
Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 105 HCl an der Aorta



Legende zu Diagramm 1:

Hier wird die Wirkung von PGU 105 auf die glatte Muskulatur der Aorta graphisch dargestellt. Es ist eine leichte spasmolytische Wirkung auf der Konzentrations-Wirkungskurve erkennbar. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentrationen werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 105 HCl auf die Aorta



Legende zu Abbildung 15:

Diese Abbildung zeigt die originale Aufzeichnung des Wirkungsverlaufs von PGU 105 auf die Aorta. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 3.1.2. Ergebnisse – Arteria pulmonalis

Ebenfalls vier Versuche wurden für die Untersuchung einer eventuell dilatierenden Wirkung der Testsubstanz auf die Lungenarterie durchgeführt. Die erhaltenen Messwerte wurden arithmetisch gemittelt und ein Referenzwert von  $11,81 \pm 2,00$  mN bestimmt.

Hier blieb die Kontraktionskraft nach den ersten zwei Substanzzugaben relativ konstant, ab  $10 \mu\text{mol/l}$  kam es jedoch zu einer Abnahme, welche sich mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz weiter verstärkte. Eine  $EC_{50}$  wurde nur knapp nicht erreicht.

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche von PGU 105 HCl an der Lungenarterie

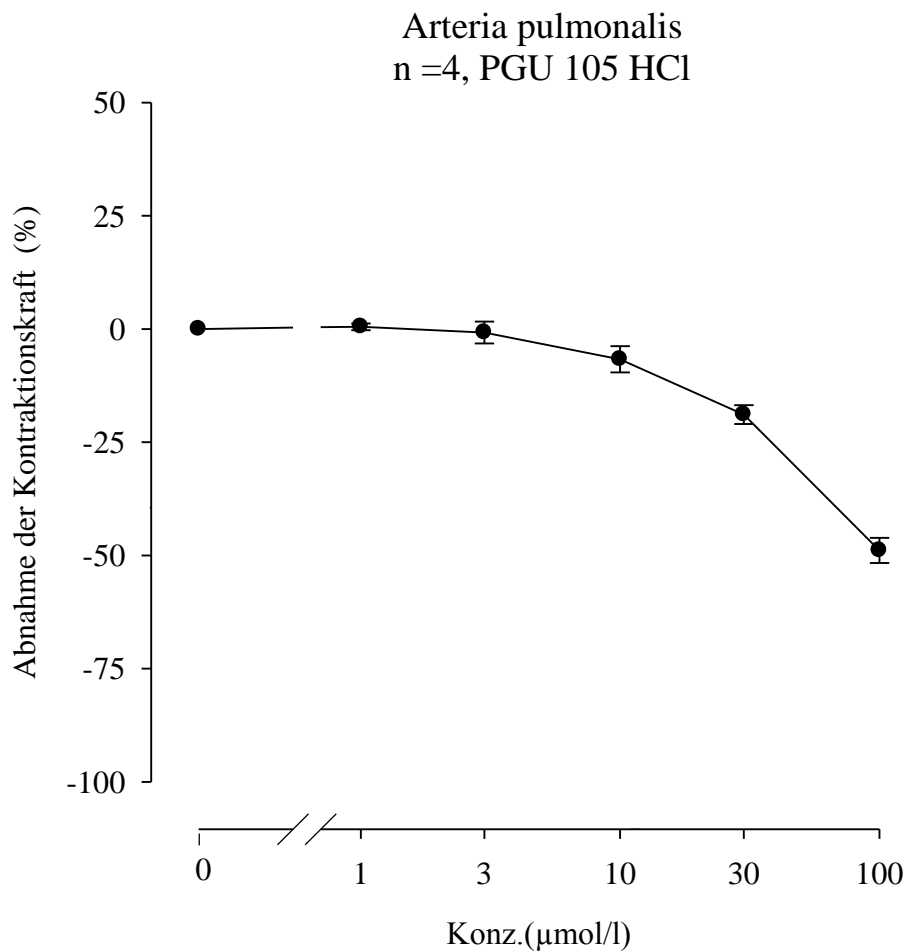
PGU 105 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,81 \pm 2,00$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$11,91 \pm 2,07$	$0,47 \pm 0,74$	4	n.s.
3	$11,74 \pm 2,05$	$-0,79 \pm 2,41$	4	n.s.
10	$10,98 \pm 1,85$	$-6,69 \pm 2,90$	4	n.s.
30	$9,48 \pm 1,49$	$-18,90 \pm 2,06$	4	0,05
100	$5,90 \pm 0,83$	$-48,9 \pm 2,77$	4	0,01

Legende zu Tabelle 5:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 105 HCl an der Lungenarterie

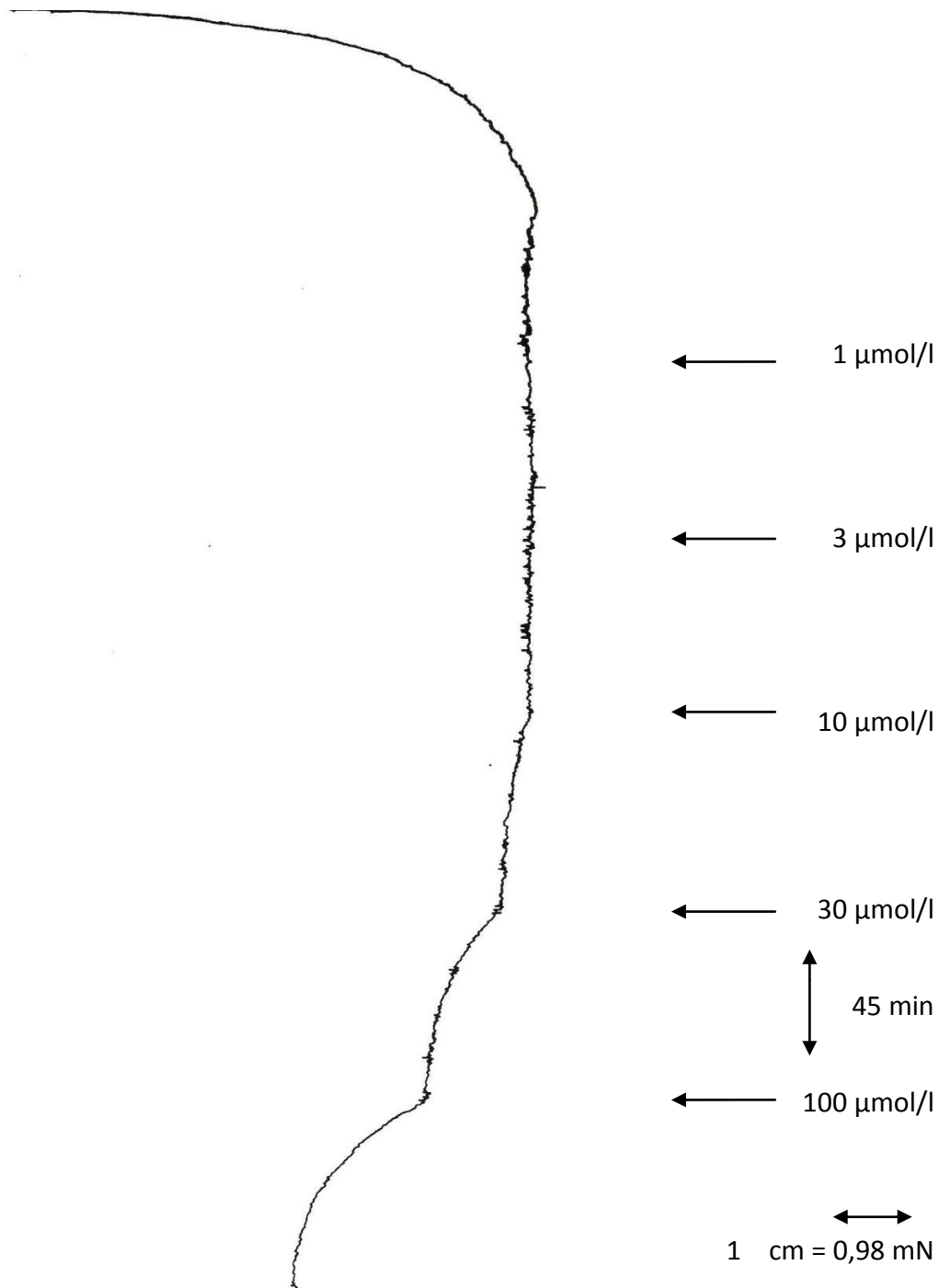


Legende zu Diagramm 2:

In Diagramm 2 wird der Effekt von PGU 105 auf die Lungenarterie graphisch dargestellt. Eine vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz zeigt sich ab einer Konzentration von 10 µmol/l und nimmt mit zunehmender Substanzkonzentration weiter zu. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung.



Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 105 HCl auf die Lungenarterie



Legende zu Abbildung 16:

In der originalen Aufzeichnung ist die spasmolytische Wirkung auf die Lungenarterie in höheren Konzentrationen von PGU 105 deutlich sichtbar. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 3.1.3. Terminales Ileum

Fünf Versuche wurden für die Untersuchung der Wirkung von PGU 105 auf die glatte Muskulatur des Dünndarms durchgeführt und die Messwerte arithmetisch gemittelt. Der ermittelte Referenzwert lag bei  $10,62 \pm 0,98$  mN.

Schon nach Zugabe der ersten Konzentration kam es zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft und bei  $100 \mu\text{mol/l}$  war der Darm beinahe vollständig dilatiert. Aufgrund der starken Wirkung konnte eine  $EC_{50}$  von  $17 \mu\text{mol/l}$  anhand der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt werden.

Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche von PGU 105 HCl am Dünndarm

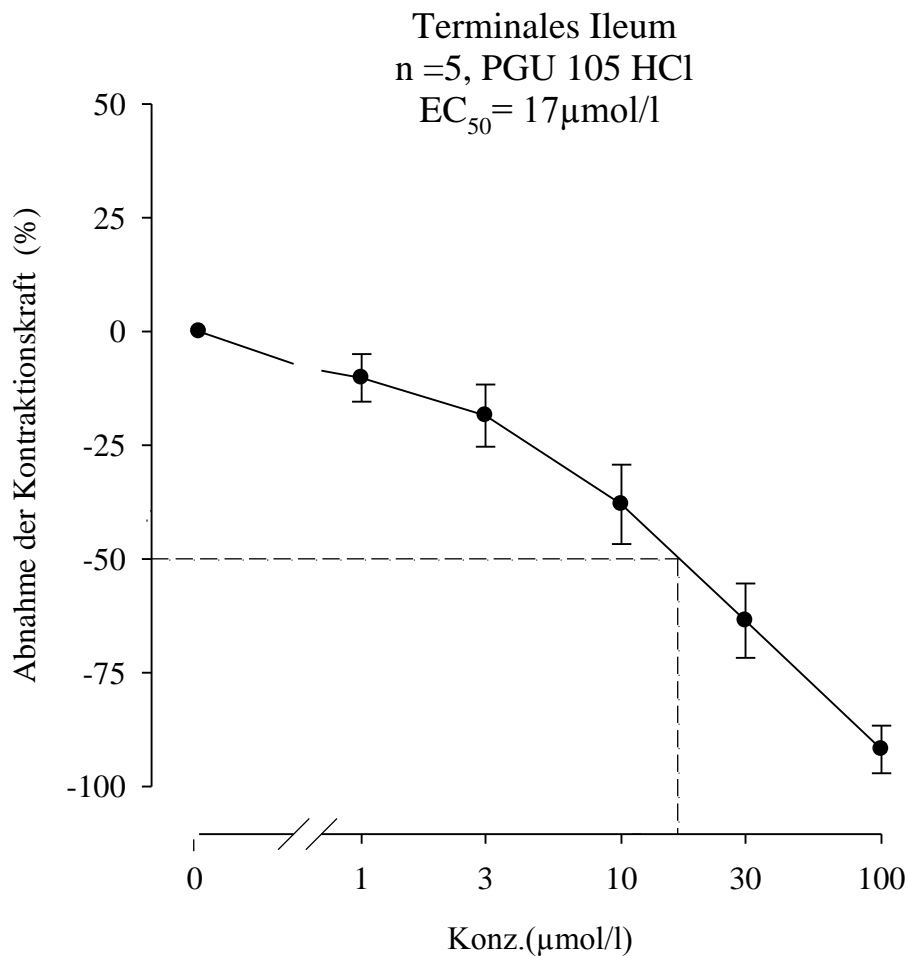
PGU 105 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,62 \pm 0,98$	$0,00 \pm 0,00$	5	--
1	$9,55 \pm 1,02$	$-10,21 \pm 5,22$	5	n.s.
3	$8,69 \pm 1,07$	$-18,5 \pm 6,83$	5	0,06
10	$6,70 \pm 1,19$	$-37,99 \pm 8,73$	5	0,01
30	$4,09 \pm 1,13$	$-63,58 \pm 8,17$	5	0,001
100	$1,02 \pm 0,64$	$-91,87 \pm 5,21$	5	0,001

Legende zu Tabelle 6:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

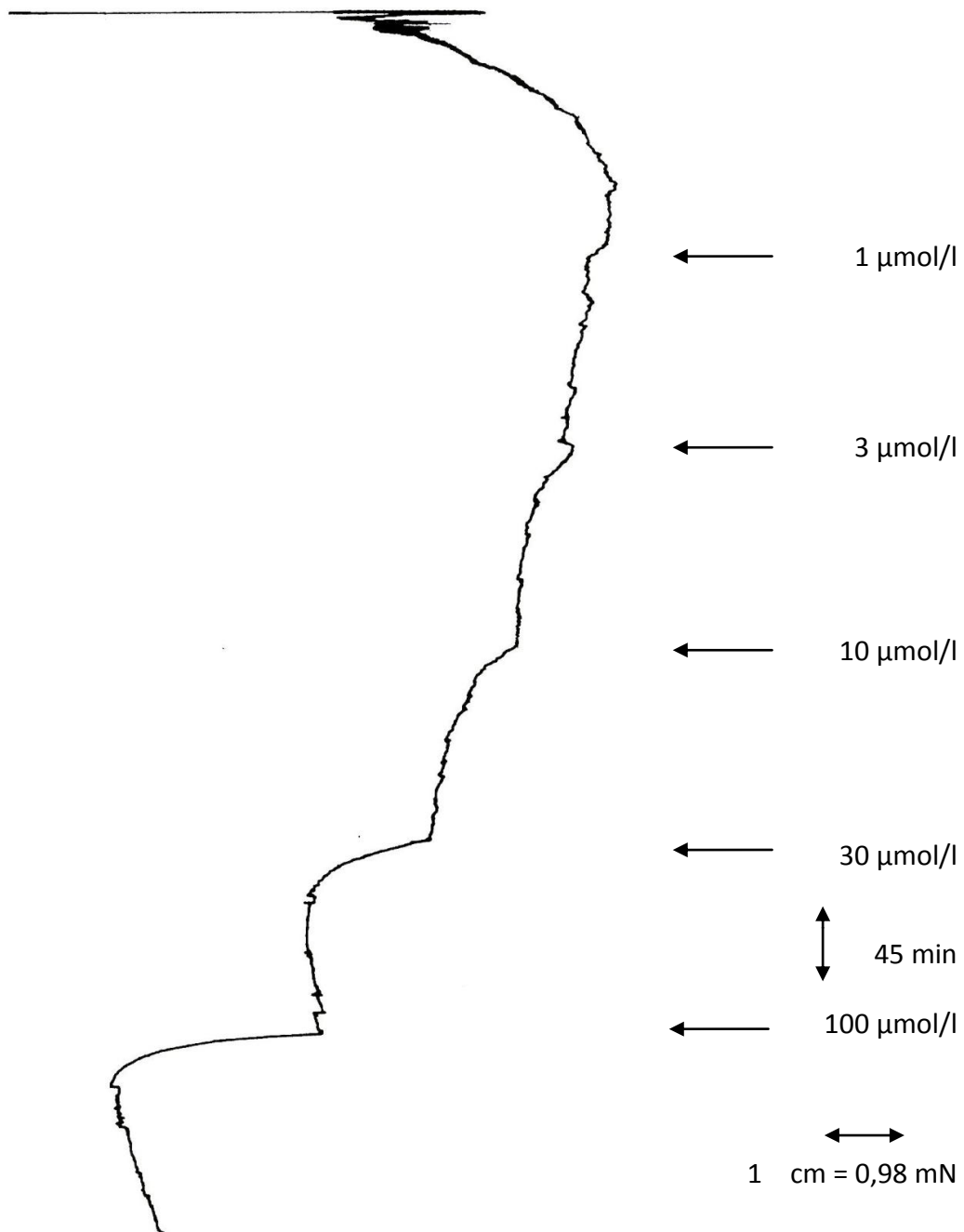
Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 105 am Dünndarm



Legende zu Diagramm 3:

Die graphische Darstellung zeigt die starke spasmolytische Wirkung von PGU 105 auf die glatte Muskulatur des Dünndarms. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ , auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung. Nach Einzeichnen der strichlierten Linien konnte die  $EC_{50}$  von  $17 \mu\text{mol/l}$  auf der y-Achse abgelesen werden.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 105 HCl auf den Dünndarm



Legende zu Abbildung 17:

Diese Abbildung zeigt die mit einem Schreiber durchgeführte, originale Aufzeichnung der Wirkung von PGU 105 auf den Dünndarm. Nach der ersten Substanzzugabe ist eine stetige Abnahme der Kontraktionskraft ersichtlich, die bereits nach 3 µmol/l in eine stufenartige übergeht. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 3.1.4. Ergebnisse – Atrium dexter

Beim rechten Vorhof wurde eine mögliche Veränderung der Schlagfrequenz durch PGU 105 anhand von vier Versuchen getestet, wobei der Referenzwert bei  $245,00 \pm 6,12$  Schläge pro Minute lag.

Die Schlagfrequenz blieb bei den geringen Konzentrationen zu Beginn relativ konstant. Es kam sogar anfangs zu einer geringfügigen Erhöhung, ab  $30 \mu\text{mol/l}$  zeigte sich aber eine leichte negativ chronotrope Wirkung, jedoch ohne Erreichen einer  $\text{EC}_{50}$ .

Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche von PGU 105 HCl auf den rechten Vorhof

PGU 105 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$245,00 \pm 6,12$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$245,00 \pm 12,08$	$-0,14 \pm 2,79$	4	n.s.
3	$247,50 \pm 10,90$	$0,92 \pm 2,45$	4	n.s.
10	$247,50 \pm 11,64$	$0,94 \pm 3,01$	4	n.s.
30	$237,35 \pm 7,77$	$-3,06 \pm 1,93$	4	n.s.
100	$210,00 \pm 13,70$	$-14,42 \pm 4,21$	4	n.s.

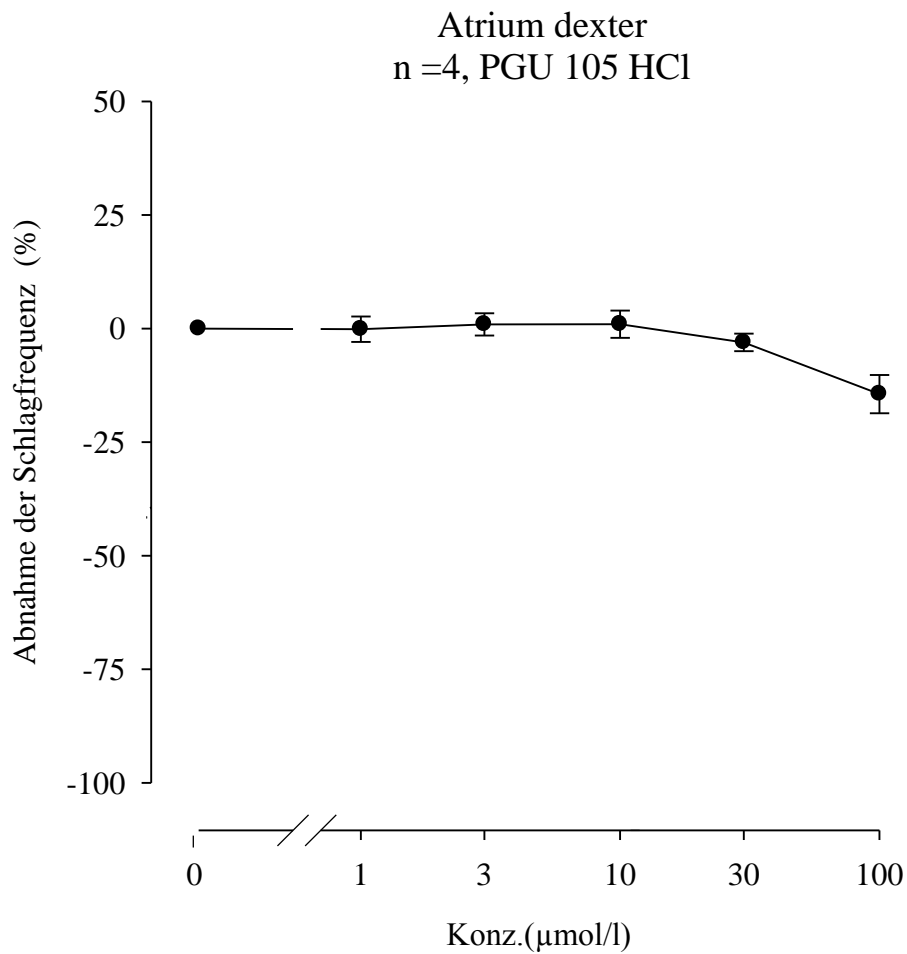
Legende zu Tabelle 7:

f = Schlagfrequenz

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

x = Anzahl der Schläge

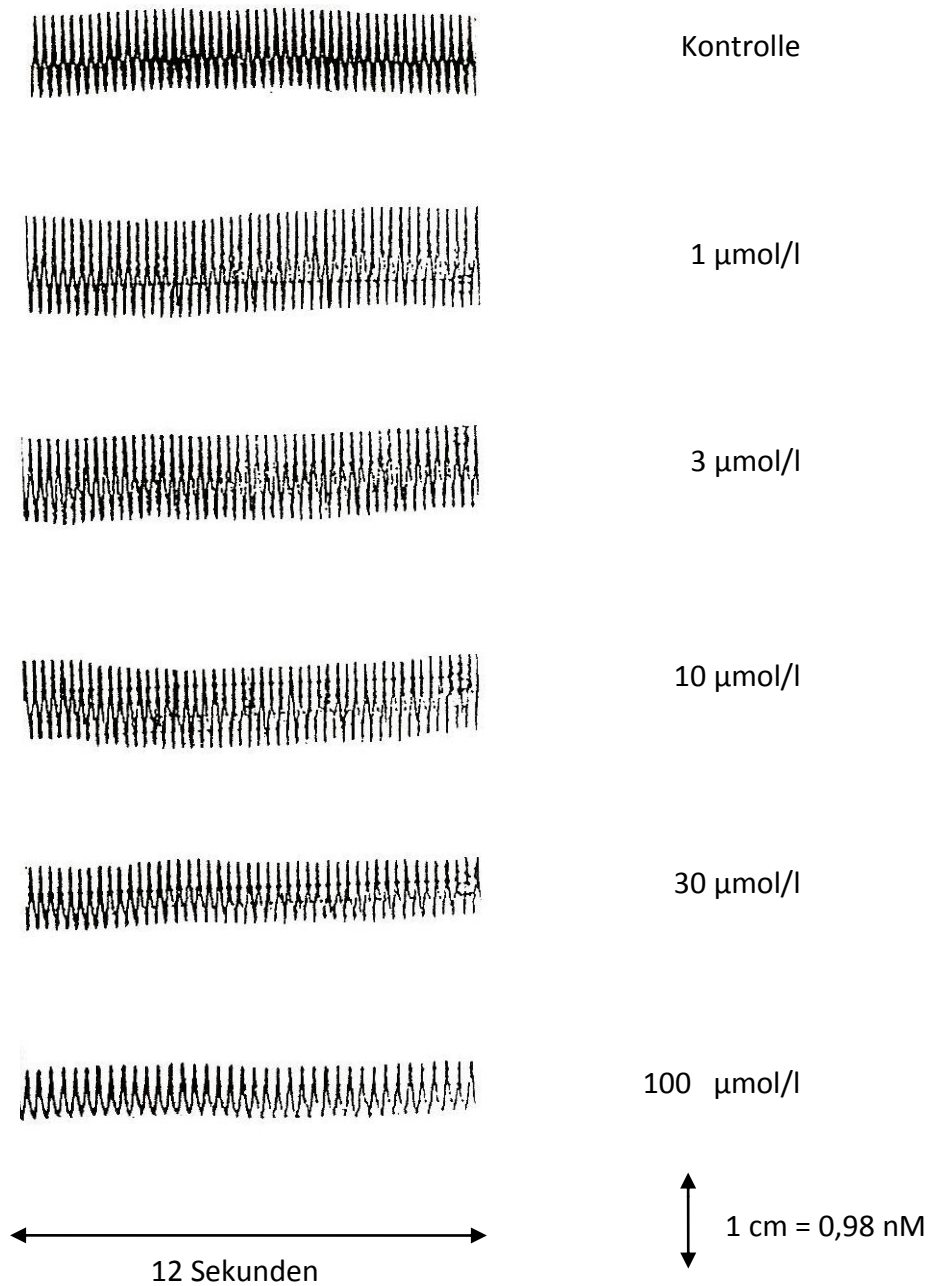
Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 105 auf den rechten Vorhof



Legende zu Diagramm 4:

In Diagramm 4 wird die Wirkung von PGU 105 auf die Schlagfrequenz des Vorhofes graphisch dargestellt. Erst in höheren Konzentrationen ist ein geringer negativ chronotroper Effekt erkennbar. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse wird diesmal die Abnahme der Schlagfrequenz in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden mittels Punkten gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 105 HCl auf den Vorhof



Legende zu Abbildung 18:

Diese Abbildung zeigt die originale Aufzeichnung der negativ chronotrope Wirkung von PGU 105 auf den Sinusknoten des rechten Vorhofes. Die Amplituden wurden jeweils in einem Zeitraum von 12 Sekunden mittels Schreiber aufgezeichnet.

### 3.1.5. Ergebnisse – Musculus papillaris

Anhand von vier Versuchen wurde der Einfluss von PGU 105 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels gemessen. Ausgehend vom Referenzwert, welcher  $2,47 \pm 1,11$  mN betrug, konnte das Ausmaß der Wirkung ermittelt werden.

Während die Inotropie bei niedrigen Konzentrationen vorerst positiv durch die Testsubstanz beeinflusst wurde, nahm sie bei höheren Konzentrationen jedoch wieder stark ab. Eine  $EC_{50}$  wurde aber nicht erreicht.

**Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche von PGU 105 HCl am Papillarmuskel**

PGU 105 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$2,47 \pm 1,11$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$3,19 \pm 1,32$	$15,75 \pm 4,63$	4	n.s.
3	$3,38 \pm 1,49$	$19,09 \pm 4,56$	4	n.s.
10	$3,68 \pm 1,65$	$28,72 \pm 6,04$	4	0,05
30	$3,58 \pm 1,55$	$27,45 \pm 4,70$	4	0,05
100	$2,49 \pm 1,31$	$3,27 \pm 5,58$	4	n.s.

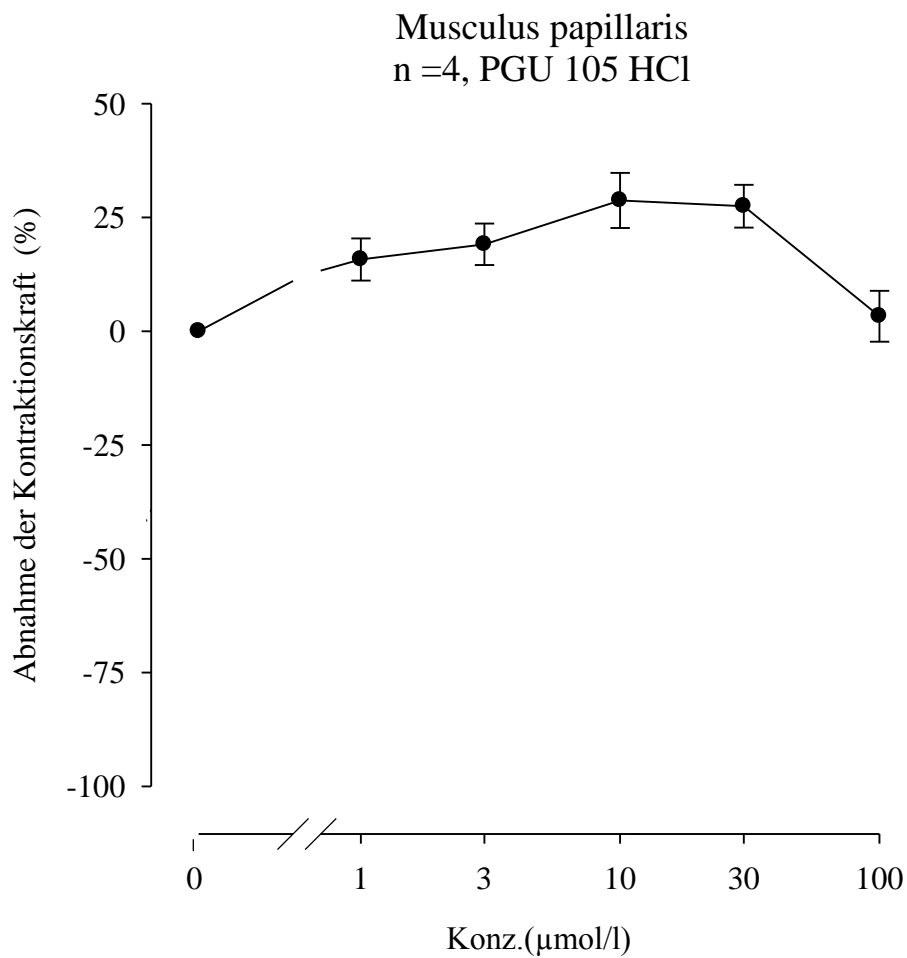
Legende zu Tabelle 8:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwerts



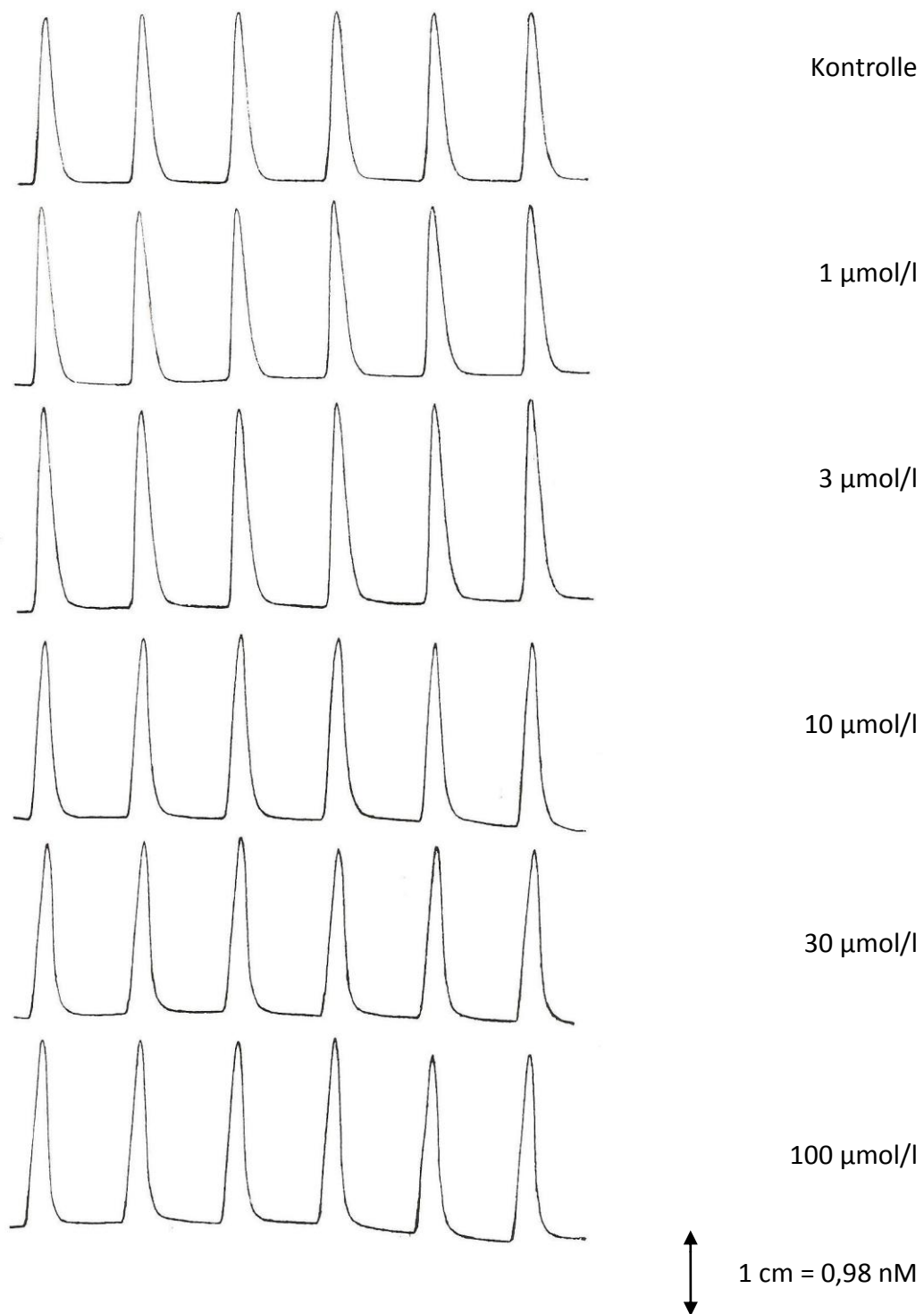
Diagramm 5: Dosis-Wirkungskurve von PGU 105 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Diagramm 5:

Anhand des Diagramms wird die Änderung der Schlagfrequenz des Papillarmuskels, verursacht durch PGU 105, graphisch dargestellt. Wo zu Beginn noch ein positiv inotroper Effekt vorliegt, geht die Wirkung im Laufe der Konzentrationserhöhung letztendlich in eine negativ inotrope über. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung.

Abbildung 19: Originale Aufzeichnung der Wirkung von PGU 105 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 19:

Die über den Flachbettschreiber aufgezeichneten Amplituden der elektrisch gereizten Papillarmuskeln, zeigen den konzentrationsabhängigen Einfluss von PGU 105 auf die Inotropie.

## 3.2. Testsubstanz PGU 175 HCl

### 3.2.1. Ergebnisse – Aorta descendens

Um eine mögliche dilatierende Wirkung von PGU 175 auf die Aorta feststellen zu können, wurden vier Versuchsreihen durchgeführt und nach arithmetischem Mittelwert der Messwerte ein Referenzwert von  $8,58 \pm 1,06$  mN festgelegt.

Anders als bei PGU 105 trat hier schon nach der zweiten Substanzzugabe eine beträchtliche Dilation der glatten Muskulatur ein und eine beinahe vollständige Relaxation der Aorta wurde bei der höchsten Konzentration erhalten. Aufgrund der starken Wirkung wurde eine  $EC_{50}$  von  $19,8 \mu\text{mol/l}$  erzielt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche von PGU 175 HCl an der Aorta

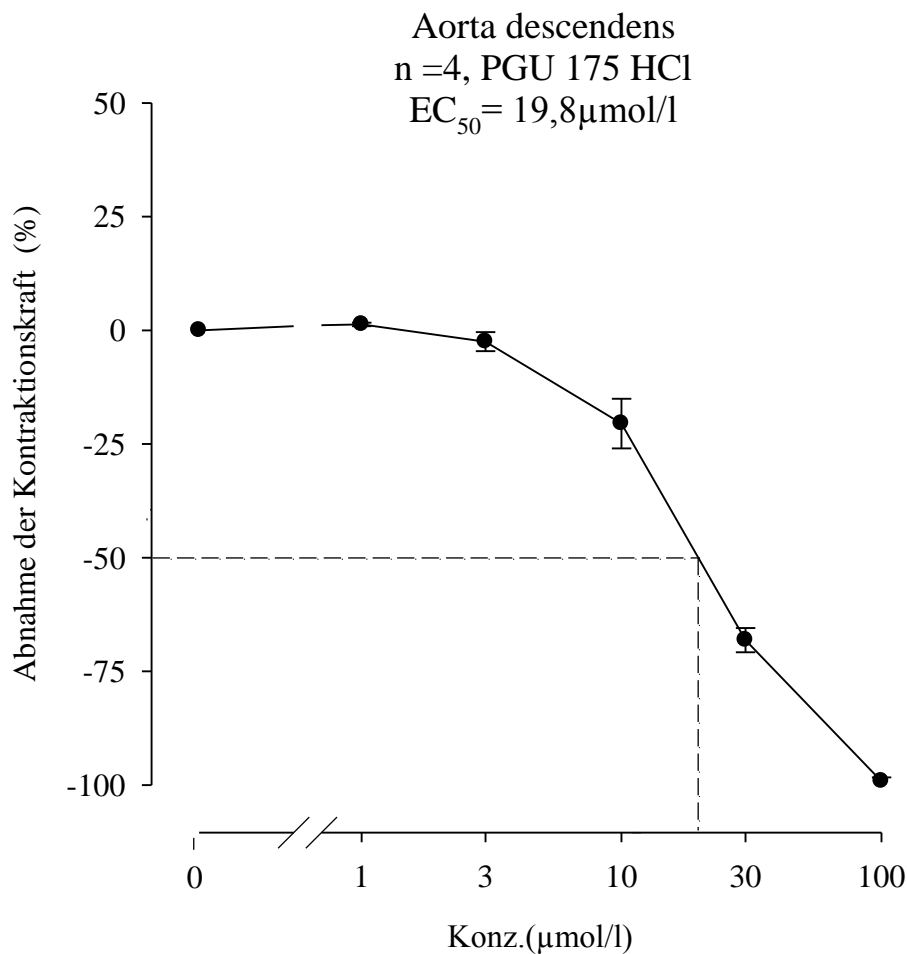
PGU 175 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,58 \pm 1,06$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$8,69 \pm 1,07$	$1,31 \pm 0,38$	4	n.s.
3	$8,41 \pm 1,06$	$-2,51 \pm 2,09$	4	n.s.
10	$6,91 \pm 1,06$	$-20,51 \pm 5,46$	4	0,01
30	$2,73 \pm 0,38$	$-68,14 \pm 2,68$	4	0,001
100	$0,07 \pm 0,07$	$-99,16 \pm 0,84$	4	0,001

Legende zu Tabelle 9:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwerts

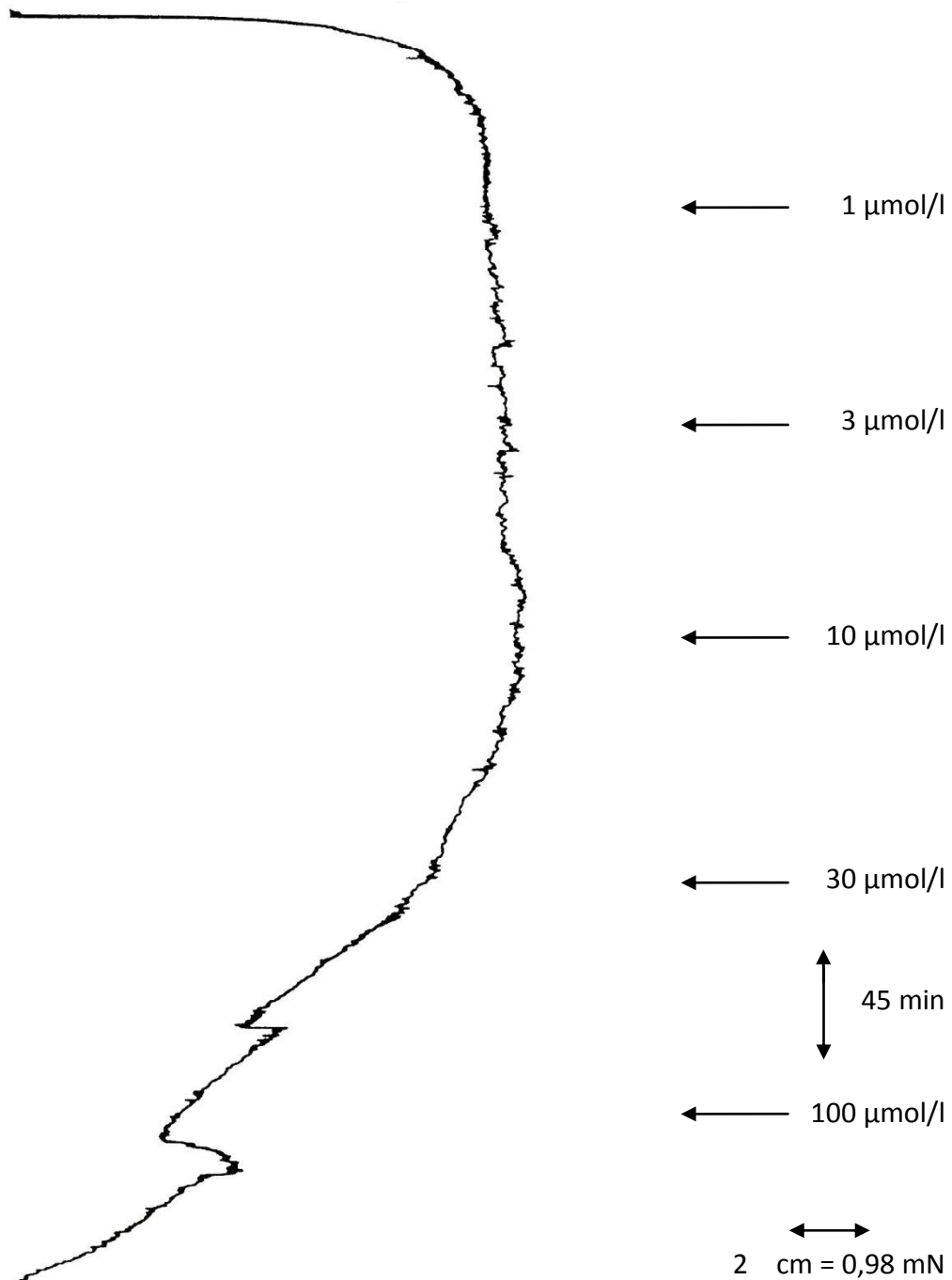
Diagramm 6: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 175 HCl an der Aorta



Legende zu Diagramm 6:

Im Diagramm wird anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve der Effekt von PGU 175 auf die glatte Muskulatur der Aorta graphisch dargestellt. Schon ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  ist eine deutliche vasodilatierende Wirkung erkennbar, die durch Erhöhung der Konzentration in eine fast vollständige Relaxation übergeht. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in, auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung. Durch Einzeichnen der strichlierten Linien konnte die  $EC_{50}$  von 19,8  $\mu\text{mol/l}$  auf der y-Achse abgelesen werden.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 175 HCl auf die Aorta



Legende zu Abbildung 20:

Diese Abbildung zeigt die originale Aufzeichnung des Flachbettschreibers der vasodilatierenden Wirkung von PGU 175 auf die glatte Muskulatur der Aorta. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 3.2.2. Ergebnisse – Arteria pulmonalis

Die Lungenarterie wurde ebenfalls auf einen potentiellen dilatierenden Effekt von PGU 175 auf die glatte Muskulatur getestet. Nachdem die erhaltenen Messwerte pro Konzentration arithmetisch gemittelt wurden, konnte ein Referenzwert von  $13,16 \pm 1,32$  mN bestimmt werden.

PGU 175 besaß, wie auch bei der Aorta, eine starke dilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur. Dieses Mal jedoch konnte der Effekt schon ab der ersten Konzentration beobachtet werden. Nach Zugabe von  $30 \mu\text{mol/l}$  nahm die Kontraktionskraft am meisten ab, bei der letzten Substanzzugabe sank sie auf beinahe 15% des Ausgangswertes ab. Die  $EC_{50}$  lag bei  $18,5 \mu\text{mol/l}$ .

Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche von PGU 175 HCl an der Lungenarterie

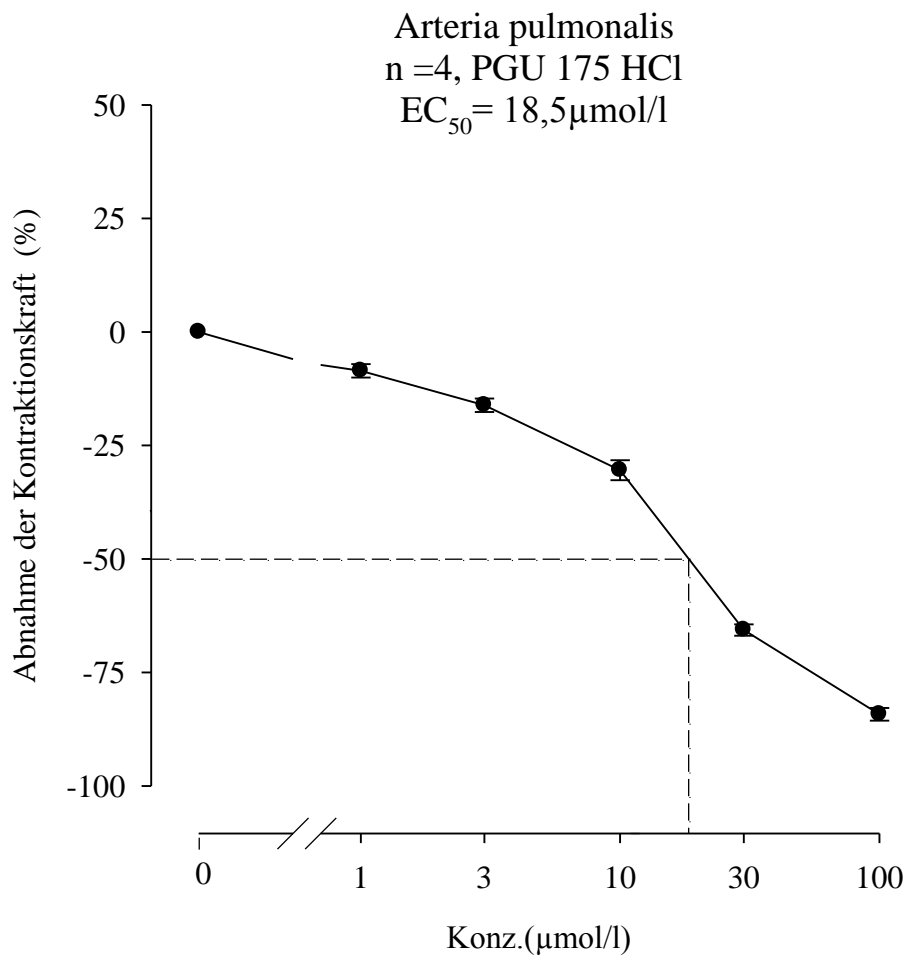
PGU 175 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$13,16 \pm 1,32$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$11,99 \pm 0,80$	$-8,57 \pm 1,47$	4	n.s.
3	$10,99 \pm 0,67$	$-16,15 \pm 1,50$	4	0,05
10	$9,09 \pm 0,47$	$-30,47 \pm 2,20$	4	0,01
30	$4,48 \pm 0,23$	$-65,66 \pm 1,26$	4	0,001
100	$1,86 \pm 0,25$	$-84,23 \pm 1,39$	4	0,001

Legende zu Tabelle 10:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

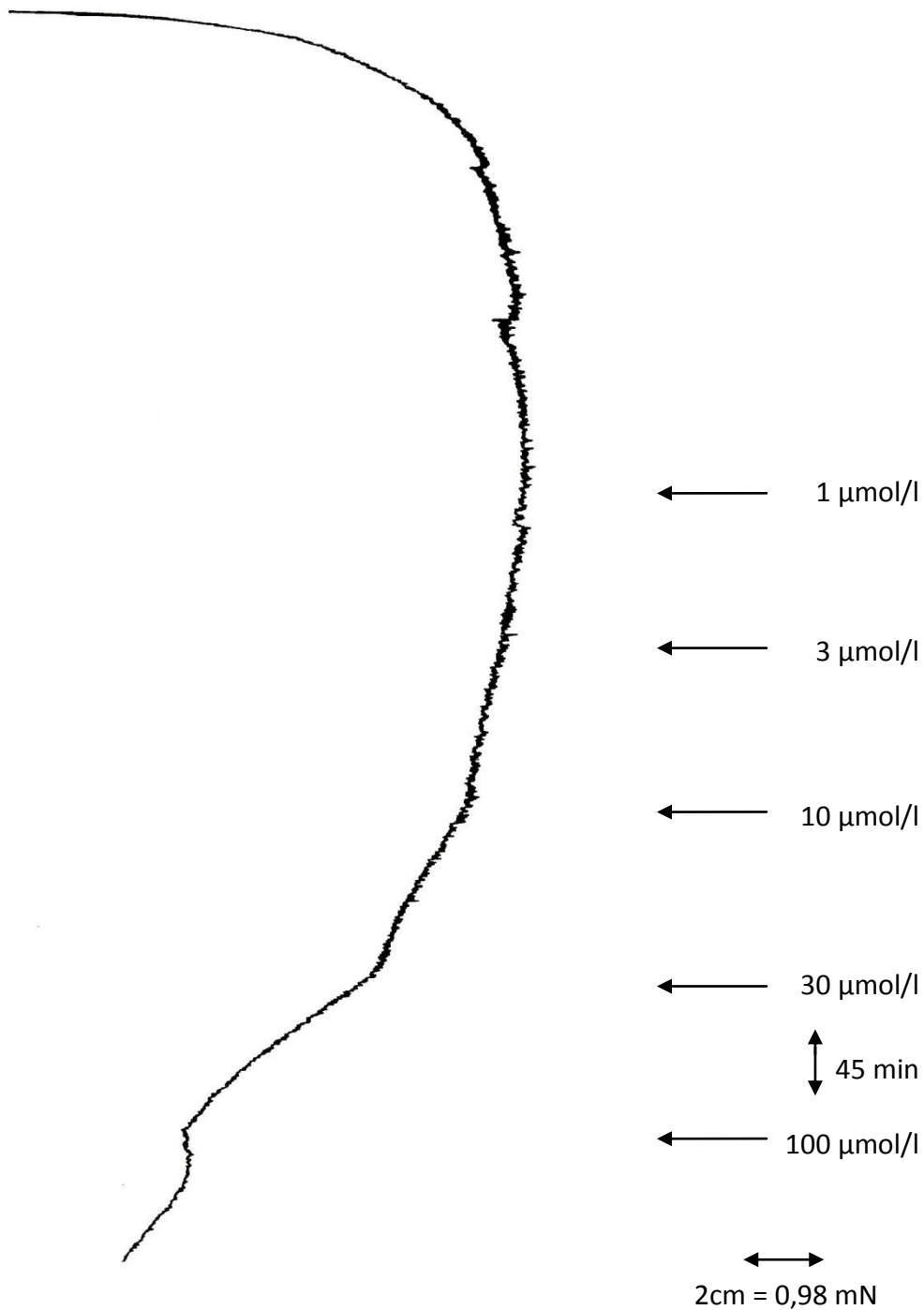
Diagramm 7: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 175 HCl an der Lungenarterie



Legende zu Diagramm 7:

Anhand des Diagramms wird der Einfluss von PGU 175 auf die Lungenarterie graphisch dargestellt. Die starke Abnahme der Kontraktionskraft erfolgte aufgrund einer vasodilatierenden Aktivität der zu testenden Substanz. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ , auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung. Durch Einzeichnen der strichlierten Linien konnte die  $EC_{50}$  auf der y-Achse abgelesen werden. Sie betrug  $18,5 \mu\text{mol/l}$ .

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 175 HCl auf die Lungenarterie



Legende zu Abbildung 21:

In der Abbildung wird die originale Aufzeichnung des Schreibers der vasodilatierenden Wirkung von PGU 175 auf die Lungenarterie dargestellt. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.



### 3.2.3. Ergebnisse – Terminales Ileum

Um eine mögliche spasmolytische Wirkung von PGU 175 auf die glatte Muskulatur des Dünndarms untersuchen zu können wurden drei Versuche durchgeführt. Wiederum wurde das arithmetische Mittel der Messwerte berechnet und ein Referenzwert von  $10,62 \pm 0,98$  mN ermittelt.

Ein spasmolytischer Effekt auf das Präparat trat schon bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  ein und verstärkte sich mit jeder weiteren Substanzzugabe. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  kam es jedoch wieder zu einer Kontraktionszunahme, die wahrscheinlich auf ein Ausfallen der Substanz im Organbad zurückzuführen ist.

**Tabelle 11: Ergebnisse der Versuche von PGU 175 HCl am Dünndarm**

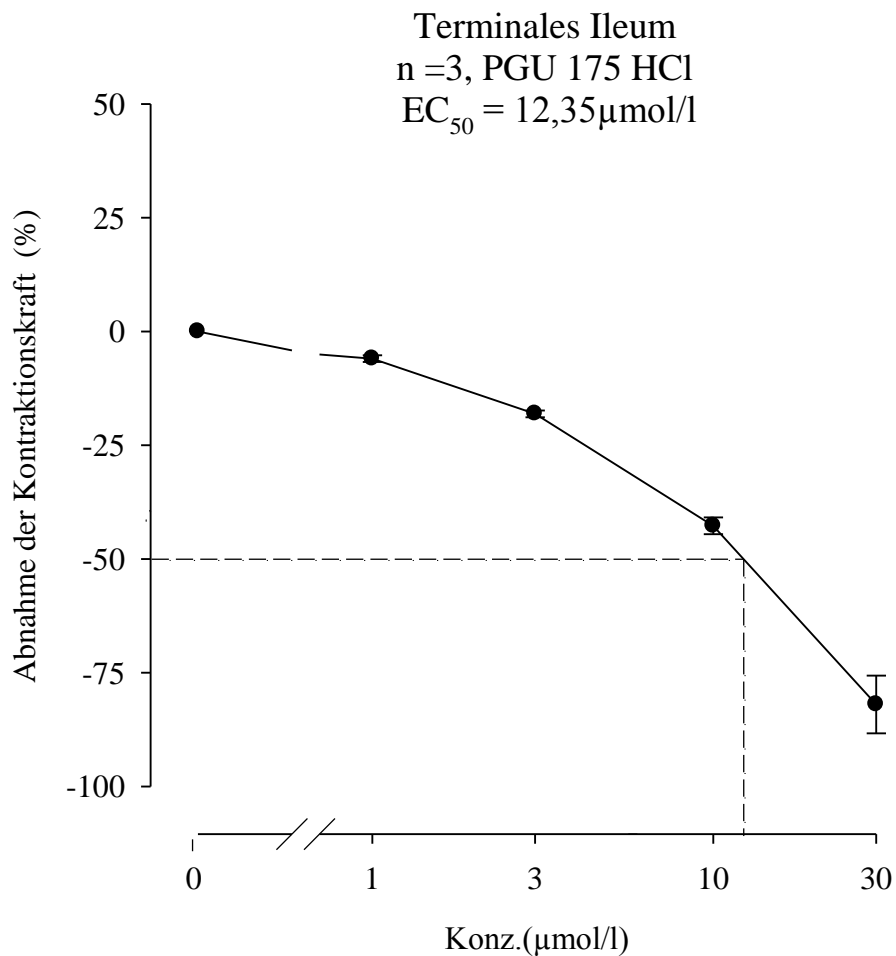
PGU 175 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$12,58 \pm 0,91$	$0,00 \pm 0,00$	3	--
1	$11,82 \pm 0,81$	$-5,97 \pm 0,73$	3	n.s.
3	$10,29 \pm 0,71$	$-18,11 \pm 0,74$	3	0,05
10	$7,23 \pm 0,70$	$-42,73 \pm 1,58$	3	0,01
30	$2,15 \pm 0,58$	$-81,99 \pm 6,35$	3	0,001
100	$2,87 \pm 0,25$	$-76,67 \pm 3,90$	3	0,001

Legende zu Tabelle 11:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

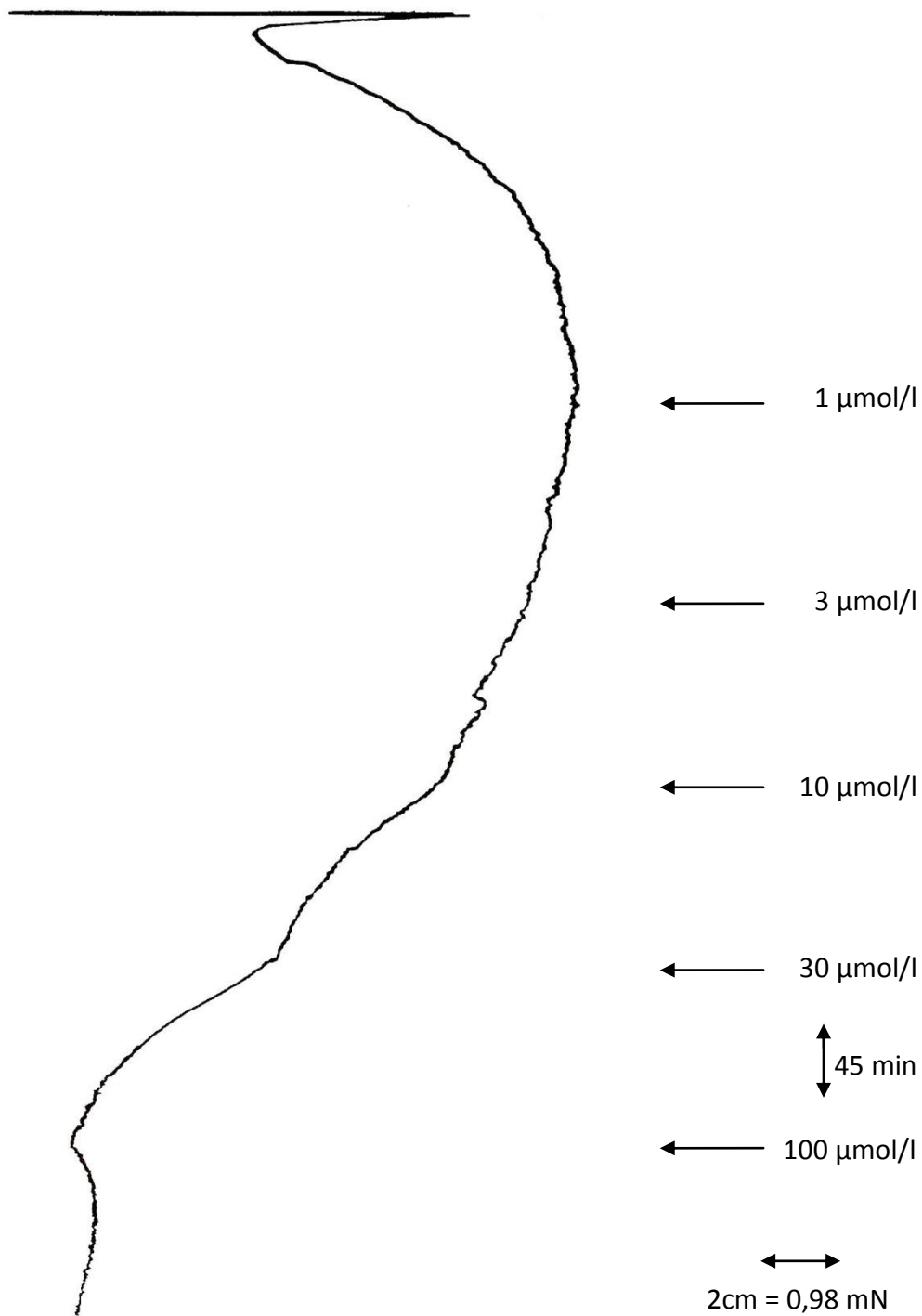
Diagramm 8: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 175 HCl am Dünndarm



Legende zu Diagramm 8:

Der Graph zeigt deutlich die spasmolytische Wirkung von PGU 175 auf die glatte Muskulatur des Dünndarms. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ , auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung. Über die strichlierten Linien konnte die  $EC_{50}$  von  $18,5 \mu\text{mol/l}$  auf der y-Achse abgelesen werden.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 175 HCl auf den Dünndarm



Legende zu Abbildung 22:

In dieser Abbildung wird die originale Aufzeichnung des Versuches mittels Flachbettscheiber gezeigt. Die spasmolytische Aktivität von PGU 175 ist am Verlauf der Kurve deutlich zu erkennen. Anhand der Pfeile werden die Zeitpunkte der Substanzzugabe gekennzeichnet, welche alle 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 3.2.4. Ergebnisse – Atrium dexter

Ein möglicher chronotroper Effekt von PGU 175 auf den Sinusknoten im rechten Vorhof wurde anhand von drei Versuchen getestet. Die aufgezeichneten Schläge pro Minute wurden arithmetisch gemittelt und mit einem Referenzwert von  $155,00 \pm 8,66$  Schlägen pro Minute weitergerechnet.

Im Gegensatz zu PGU 105 lag hier eine starke negativ chronotrope Wirkung vor, die schon nach der ersten Konzentration ersichtlich war. Bei  $100 \mu\text{mol/l}$  kam es jedoch zu einem völligen Stillstand des Sinusknotens. Eine  $EC_{50}$  von  $38 \mu\text{mol/l}$  konnte erreicht werden.

**Tabelle 12: Ergebnisse der Versuche von PGU 175 HCl auf den rechten Vorhof**

PGU 175 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$155,00 \pm 8,66$	$0,00 \pm 0,00$	3	--
1	$148,30 \pm 9,28$	$-4,34 \pm 2,20$	3	n.s.
3	$136,67 \pm 8,33$	$-11,82 \pm 2,69$	3	n.s.
10	$128,33 \pm 14,81$	$-17,46 \pm 7,48$	3	0,05
30	$98,33 \pm 16,91$	$-37,34 \pm 8,12$	3	0,05
100	$0,00 \pm 0,00$	$-100 \pm 0,00$	3	0,001

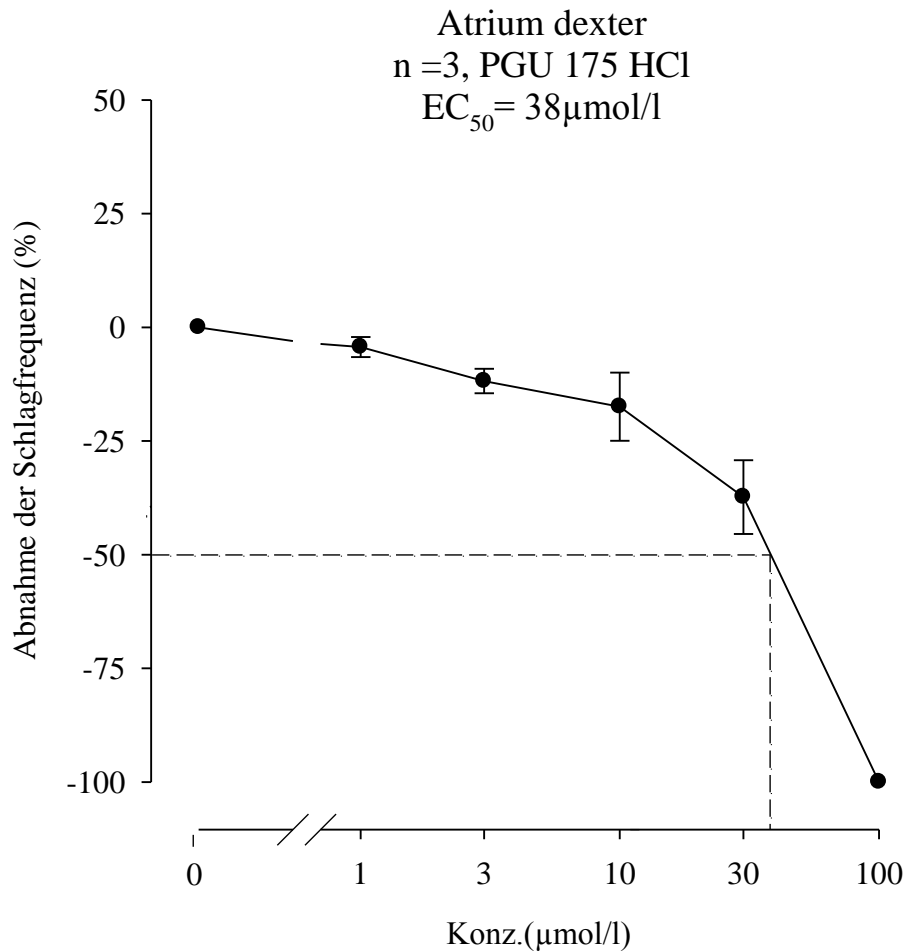
Legende zur Tabelle 12:

f = Schlagfrequenz

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

x= Anzahl der Schläge

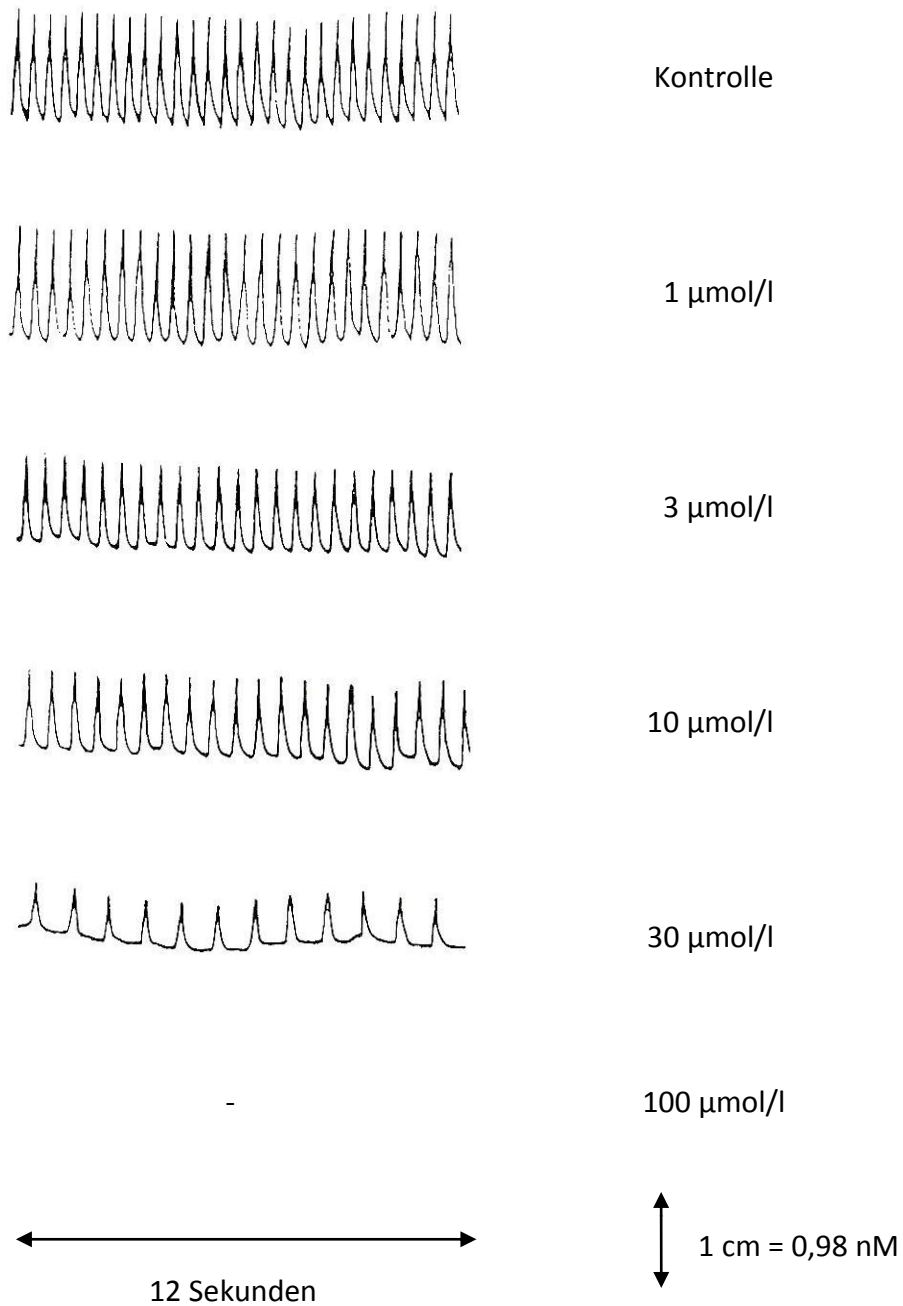
Diagramm 9: Konzentrations-Wirkungskurve von PGU 175 HCl auf den rechten Vorhof



Legende zu Diagramm 9:

Anhand der Konzentrations-Wirkungskurve wird der Einfluss von PGU 175 auf den rechten Vorhof graphisch dargestellt. Aufgrund der starken negativ chronotropen Wirkung kam es zu einem völligen Stillstand des Sinusknotens nach Zugabe der letzten Konzentration. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in μmol/l, auf der y-Achse wird wieder die Abnahme der Schlagfrequenz in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung. Nach Einzeichnen der strichlierten Linien konnte die EC<sub>50</sub> von 38 μmol/l auf der y-Achse abgelesen werden.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 175 HCl auf den Vorhof



Legende zu Abbildung 23:

In der Abbildung wird die originale Aufzeichnung des Schreibers der negativ chronotrope Wirkung von PGU 175 auf den Sinusknoten des rechten Vorhofes gezeigt. Die Amplituden wurden jeweils in einem Zeitraum von 12 Sekunden mittels Schreiber aufgezeichnet. Nach Zugabe von 100 µmol/l hörte der Vorhof jedoch auf zu schlagen.

### 3.2.5. Ergebnisse – Musculus papillaris

Vier Versuchsreihen wurden durchgeführt um die Wirkung von PGU 175 auf die Inotropie elektrisch gereizter Papillarmuskeln zu testen. Die erhalten Messwerte der jeweiligen Konzentrationen mussten wiederum arithmetisch gemittelt und ein Kontrollwert festgelegt werden. Dieser belief sich auf  $0,95 \pm 0,10$  mN

Der Versuch zeigte eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz, eine  $EC_{50}$  wurde jedoch knapp nicht erreicht.

Tabelle 13: Ergebnisse der Versuche von PGU 175 HCl am Papillarmuskel

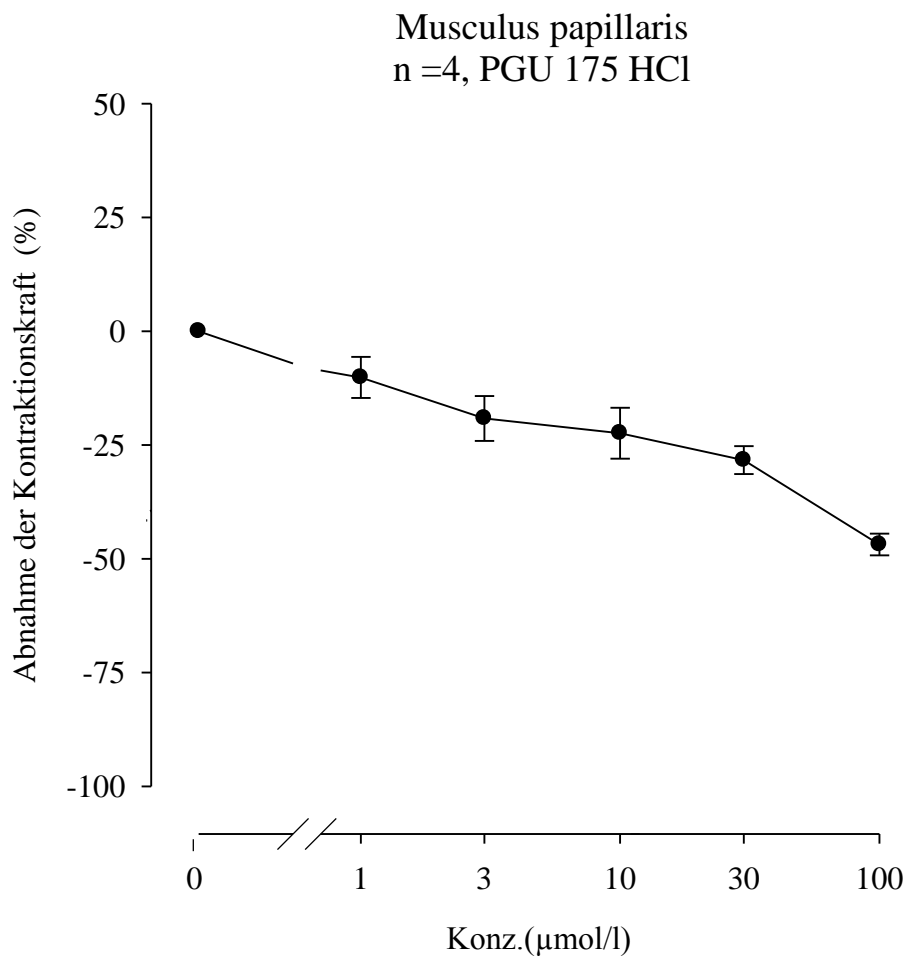
PGU 175 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$0,95 \pm 0,10$	$0,00 \pm 0,00$	4	--
1	$0,84 \pm 0,05$	$-10,17 \pm 4,50$	4	n.s.
3	$0,76 \pm 0,04$	$-19,17 \pm 4,92$	4	n.s.
10	$0,73 \pm 0,04$	$-22,42 \pm 5,60$	4	n.s.
30	$0,68 \pm 0,07$	$-28,33 \pm 3,07$	4	n.s.
100	$0,50 \pm 0,05$	$-46,88 \pm 2,39$	4	0,05

Legende zu Tabelle 13:

$f_c$  = Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Diagramm 10: Dosis-Wirkungskurve PGU 175 HCl auf den Papillarmuskel

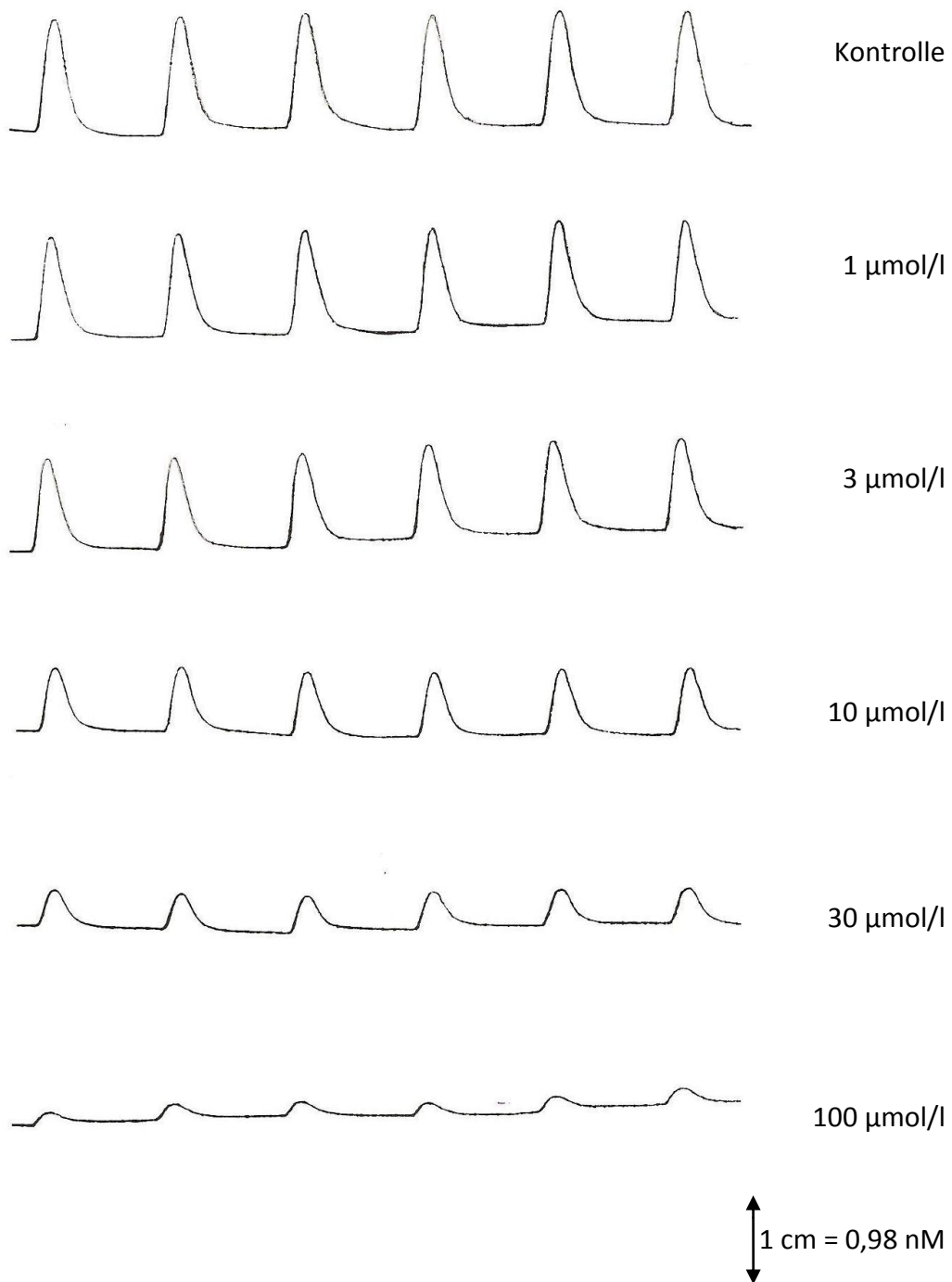


Legende zu Diagramm 10:

In Diagramm 10 wird die kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft der Papillarmuskeln nach der Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von PGU 175 graphisch dargestellt. Die x-Achse steht für die verwendeten Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in % gezeigt. Die gemittelten Werte der jeweiligen Konzentration werden durch Punkte gekennzeichnet, die Balken zeigen die Standardabweichung.



Abbildung 24: Originale Aufzeichnung der Wirkung von PGU 175 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 24:

In dieser Abbildung sind die originalen Aufzeichnungen der Amplituden der Papillarmuskeln dargestellt. Die negativ inotrope Wirkung ist anhand der abnehmenden Größen der Amplituden mit zunehmender Konzentration ersichtlich.

## 4. Diskussion

---

Der praktische Teil der Diplomarbeit beruhte auf die Untersuchung der Wirkung von zwei neu synthetisierten Resveratrol-Derivaten, PGU 105 und PGU 175, auf isolierte Meerschweinchenorgane.

Eine Präsentation und Auswertung der Ergebnisse von den jeweiligen Versuchen ist bereits in Kapitel 4 zu finden, in diesem Kapitel geht es nun darum, die Ergebnisse zu bewerten und zu diskutieren.

Der Effekt der Testsubstanz PGU 105 auf Aortapräparate zeigte nur in der letzten Konzentrationsstufe eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft, eine  $EC_{50}$  wurde auch nicht erreicht. Im Gegensatz dazu trat bei PGU 175 bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  eine signifikante Kontraktionsabnahme ein, die ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  bereits statistisch als hochsignifikant galt. Eine beinahe vollständige Relaxation wurde mit einer Gesamtabnahme von 99,16% erreicht in Bezug auf den Referenzwert. Die  $EC_{50}$  lag bei  $19,8 \mu\text{mol/l}$ . Resveratrol zeigte im Vergleich mit PGU 175 ebenfalls eine Abnahme der Kontraktionskraft, jedoch war diese erst ab einer Konzentration von  $300 \mu\text{mol/l}$  signifikant, was auf eine deutlich geringere Wirkung schließen lässt. Auch eine  $EC_{50}$  konnte erst bei  $145 \mu\text{mol/l}$  erreicht werden (Lötsch 2004).

Schon 1996 zeigten zwei Wissenschaftler anhand einer Studie den dilatierenden Effekt von Resveratrol an isolierten Rattenaorten. Es kam dabei zu einer Aufhebung der sowohl durch Noradrenalin, als auch durch Phenylephrin verursachten Vorkontraktion. Die beiden kamen zum Entschluss, dass die Relaxation des Aortenpräparates durch Resveratrol nicht über den NO-vermittelten Weg, sondern über den NO (Stickstoffmonoxid)-vermittelten Weg verlief (Chen und Pace-Asciak 1996).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass es durch Resveratrol zu einer gesteigerten Expression der NO-Synthase und somit zur Bildung von NO kam. Der vasodilatierende Effekt erfolgte also nicht über Prostaglandine und ist auch nicht auf die

phytoöstrogenen Eigenschaften des Naturstoffes zurückzuführen (Gehm et al. 1997, Naderali et al. 2000, Wallerath et al. 2002).

Ähnlich wie bei der Aorta, wurde auch bei der Arteria pulmonalis keine  $EC_{50}$  durch PGU 105 erreicht. Eine signifikante Änderung der Kontraktionskraft trat jedoch diesmal schon ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  ein. Der Effekt von PGU 175 war im Vergleich mit der Aorta, auf die Lungenarterie noch stärker. Schon ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  trat einer Kontraktionsänderung ein, die statistisch als signifikant galt und ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  bereits als hochsignifikant bezeichnet werden konnte. Eine Gesamtabnahme von 84,23% in Bezug auf den Referenzwert konnte erreicht werden, die  $EC_{50}$  war mit 18,5  $\mu\text{mol/l}$  noch niedriger als bei der Aorta. Bei Resveratrol trat eine Dilation des Gefäßes, wie auch bei PGU 105, ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  ein, im Unterschied dazu erwies sich diese aber erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  statistisch als signifikant (Lötsch 2004).

Anders war der Effekt von PGU 105 auf den Dünndarm. Bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  trat eine signifikante spasmolytische Wirkung ein, die ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  als hochsignifikant bezeichnet werden konnte. Als einziges Präparat konnte hier erstmals durch PGU 105 eine  $EC_{50}$  erreicht werden, welche bei 17  $\mu\text{mol/l}$  lag. Mit einer Gesamtabnahme von 91, 87% bezüglich auf den Referenzwert, war das Präparat am Ende des Versuches beinahe vollständig relaxiert. Bei PGU 175 kann kein Vergleich mit der Gesamtabnahme gemacht werden, da die Kontraktion bei 100  $\mu\text{mol/l}$  möglicherweise aufgrund von Ausfällen der Substanz im Organbad wieder zunahm. Somit war die gesamte Abnahme der Kontraktion unbekannt und es konnte nur der Wert bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  verwendet werden, welcher 81,99 % betrug. Erstaunlich war die erreichte  $EC_{50}$  bei 12,7  $\mu\text{mol/l}$ , der niedrigste Wert aller im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Versuche. Im Vergleich zu den beiden Derivaten, war die Wirkung von Resveratrol deutlich geringer. So wurde eine  $EC_{50}$  erst bei 46,4  $\mu\text{mol/l}$  erreicht und die gesamte Kontraktionsabnahme belief sich nur auf 69,77 % bezogen auf den Referenzwert (Lötsch 2004).

**Tabelle 14: Effekt von PGU 105 HCl, PGU 175 HCl und Resveratrol auf die glatte Muskulatur**

<b>Organpräparat</b>	<b>PGU 105 HCl EC<sub>50</sub> (µmol/l)</b>	<b>PGU 175 HCl EC<sub>50</sub> (µmol/l)</b>	<b>Resveratrol EC<sub>50</sub> (µmol/l)</b>
<b>Aorta</b>	>100	19,8	145
<b>Arteria pulmonalis</b>	>100	18,5	126
<b>Terminales Ileum</b>	17,00	12,35	46,4

Dadurch, dass die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit nur bis zu einer Konzentration von 100 µmol/l durchgeführt wurden, konnte die genaue EC<sub>50</sub> von PGU 105 bei der Aorta und Arteria pulmonalis nicht ermittelt werden.

In der oben angeführten Tabelle wird ersichtlich, dass der Effekt von PGU 175 auf alle Organpräparate deutlich stärker ist, als die von Resveratrol. Bei Aorta und Arteria pulmonalis konnte mit der Testsubstanz eine ungefähr 7-fach stärkere Wirkung erzielt werden. Die EC<sub>50</sub> beim terminalen Ileum war bei PGU 175 ebenfalls um das 4-fache niedriger als beim Naturstoff. Auch der spasmolytische Effekt von PGU 105 auf den Dünndarm war deutlich höher als der von Resveratrol. Mit einer EC<sub>50</sub> von 17 µmol/l erreichte die Testsubstanz die 3-fache Wirkung seiner Leitsubstanz.

In Hinsicht auf die Inotropie kam es bei PGU105 ab einer Konzentration von 10 µmol/l vorerst zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktionskraft um 28,72%, ab 100 µmol/l fiel diese jedoch wieder auf den Ausgangswert zurück. Im Gegensatz dazu konnte bei PGU 175 eine negativ inotrope Wirkung beobachtet werden, die aber erst ab einer Konzentration von 100 µmol/l statistisch signifikant war. Das Erreichen einer EC<sub>50</sub> wurde nur knapp verfehlt. Resveratrol wies zwar eine schwache inotrope Wirkung auf, jedoch war diese weder statistisch signifikant, noch konnte, wie auch bei den Testsubstanzen, eine EC<sub>50</sub> erzielt werden (Lötsch 2004).

Nur einen sehr geringen Effekt hatte PGU 105 auf spontan schlagende Vorhöfe. Es wurde weder eine  $EC_{50}$  erreicht noch konnten signifikante Werte ermittelt werden. Anders dazu war die Wirkung von PGU 175. Schon ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz, die bei 100  $\mu\text{mol/l}$  sogar hochsignifikant war und die starke Wirkung letztendlich zum völligen Stillstand des Vorhofes führte. Eine  $EC_{50}$  von 38  $\mu\text{mol/l}$  konnte erreicht werden. Resveratrol selber erzielte nur eine Gesamtabnahme der Schlagfrequenz von 39,14 %. Erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  konnte eine statistisch signifikante negativ chronotrope Wirkung ermittelt werden, eine  $EC_{50}$  wurde nicht erreicht (Lötsch 2004)

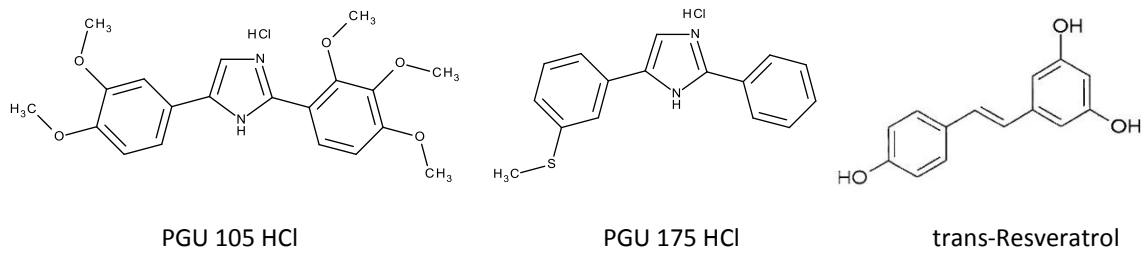
**Tabelle 15: Effekt von PGU 105 HCl, PGU 175 HCl und Resveratrol auf die quergestreifte Muskulatur**

<b>Organpräparat</b>	<b>PGU 105 HCl <math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>PGU 175 HCl <math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>Resveratrol <math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>
<b>Musculus papillaris</b>	>100	>100	>100
<b>Atrium dexter</b>	>100	38,00	>100

Anhand der angeführten Tabelle wird gezeigt, dass sowohl bei den Testsubstanzen, als auch bei Resveratrol selber, keine allzu große Wirkung auf die Papillarmuskeln festgestellt werden konnte. Auch bei den Vorhöfen hatten weder PGU 105 noch der Naturstoff einen deutlichen Effekt, anders war dies jedoch bei PGU 175. Aufgrund der ausgeprägten negativ chronotropen Wirkung konnte eine  $EC_{50}$  von 38  $\mu\text{mol/l}$  erzielt werden.

Da die Testsubstanzen und deren Leitsubstanz unterschiedliche Einflüsse auf die Organpräparate zeigen, sollte man die Unterschiede der Strukturformeln näher betrachten. In Abbildung 25 werden die chemischen Strukturen von PGU 105, PGU 175 und Resveratrol nebeneinander dargestellt, um diese besser vergleichen zu können.

**Abbildung 25: Strukturformeln von PGU 105 HCl, PGU 175 HCl und Resveratrol**



Bei der chemischen Struktur des Resveratrols handelt es sich um ein sogenanntes Trihydroxystilben. Betrachtet man im Vergleich dazu die beiden Testsubstanzen, so besitzen diese einen Imidazolring anstatt der Ethylengruppierung. Dieser Austausch hat einen Verlust der bei der Muttersubstanz vorhandenen E- und Z- Isomerie als Folge. Von diesem Imidazolring geht in den Positionen 2 und 5 jeweils ein Benzolring mit unterschiedlichen Substituenten weg. Im Unterschied zu den Derivaten, ist an den beiden Benzolringen des Resveratrols in den Positionen 3, 5 und 4` jeweils eine freie Hydroxylgruppe angebracht. Bei PGU 105 wurde die Hydroxylgruppe in Position 5 entfernt, aber stattdessen zusätzlich noch drei in den Positionen 1, 2 und 3` angebracht. Weiters sind hier alle fünf Hydroxylgruppen methyliert, wodurch der lipophile Charakter erhöht und der hydrophile reduziert wird. PGU 175 besitzt hingegen überhaupt nur mehr einen Methylsulfanyl-Rest in Position 3, wodurch die Lipophilie ebenfalls erhöht wird.

Die strukturellen Veränderungen von PGU 105 im Vergleich zu Resveratrol, führten wahrscheinlich zu keiner Verbesserung, wenn nicht sogar zu einer Verschlechterung der Wirkung auf die Aorta und Arteria pulmonalis. Für einen genaueren Vergleich würden weitere Versuchsreihen bei Konzentrationen bis zu 300  $\mu\text{mol/l}$  benötigt werden, um herauszufinden, ob und bei welcher Konzentration eine  $\text{EC}_{50}$  durch PGU 105 erreicht wird. Anderes ist jedoch der Effekt dieser Testsubstanz auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums. Offensichtlich begünstigen hier die strukturellen Veränderungen des Resveratrols die spasmolytische Wirkung. Dies könnte eventuell auf die Einführung des Imidazolringes oder auch auf die Methylierung des Restes in Position 3 zurückzuführen sein, da bei PGU 175 ein ähnlicher Effekt zu beobachten ist.

Der 7-fach stärkere Effekt von PGU 175 auf die Aorta und Arteria pulmonalis im Gegensatz zu Resveratrol könnte auf das Wegfallen der Reste in den Positionen 3 und 5 und die Einführung des Thiomethyl-Rest in Position 4` bei zurückzuführen sein. Der Austausch der Ethylengruppierung durch den Imidazolring kann offensichtlich nicht damit in Verbindung gebracht werden, da bei PGU 105 keine Verstärkung der Wirkung erzielt werden konnte.

Das Fehlen der Reste in den Positionen 3 und 5 könnte auch der Grund sein für den verstärkten Effekt auf die Chronotropie spontan schlagender rechter Vorhöfe im Vergleich zu Resveratrol. Die Einführung zusätzlicher Reste bei PGU 105 zeigte eine Verminderung der negativ chronotropen Wirkung verglichen mit der Leitsubstanz.

## 5. Zusammenfassung

---

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von zwei, am Department für medizinische/pharmazeutische Chemie der Universität Wien, neu synthetisierten Resveratrol-Derivaten, PGU 105 und PGU 175, an isolierten Meerschweinchenorganen getestet. Hauptaugenmerk war dabei das Erreichen einer  $EC_{50}$ , jener Konzentration bei der die Hälfte des Kontrollwertes erreicht wurde. Untersucht wurden sowohl potentielle Effekte auf die glatte Muskulatur anhand von Aorta-, Dünndarm- und Lungenarterien-Präparaten, als auch die Wirkung der Testsubstanzen auf die quergestreifte Muskulatur von Vorhof und Papillarmuskel. Anhand von isometrischen Kontraktionsmessungen konnten spasmolytische Aktivitäten und Einflüsse auf Inotropie und Chronotropie ermittelt werden.

Anschließend wurden die beiden Testsubstanzen sowohl untereinander, als auch mit ihrer Leitsubstanz Resveratrol in Hinsicht auf deren Wirkungen und die chemische Struktur verglichen. Es stellte sich heraus, dass das Fehlen der Reste in den Positionen 3 und 5 und die Einführung des Thiomethyl-Rest in Position 4` mit einer Verstärkung der dilatierenden Wirkung auf Aorta und Arteria pulmonalis einherging. Weiters konnte ein erhöhter negativ chronotroper Effekt, durch Reduzieren der Anzahl der Reste, auf den rechten Vorhof festgestellt werden. Der Austausch der Ethylengruppe durch einen Imidazolring, sowie die Methylierung des Restes in Position 3 schien Ursache für den verstärkten spasmolytischen Einfluss auf das terminale Ileum im Vergleich zu Resveratrol zu sein, da dies bei beiden Testsubstanzen beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Vergleich zu Resveratrol durch PGU 175 eine verstärkte dilatierende Wirkung bei allen Präparaten mit glatter Muskulatur hervorgerufen wurde und auch ein erhöhter negativ chronotroper Effekt am rechten Vorhof beobachtet werden konnte. PGU 105 führte ebenfalls zu einer verstärkten spasmolytischen Wirkung am terminalen Ileum, der Effekt auf den rechten Vorhof fiel jedoch geringer aus als bei Resveratrol. Der Einfluss der beiden Testsubstanzen auf die quergestreifte Muskulatur des Papillarmuskels war ebenfalls stärker, jedoch konnte keine  $EC_{50}$  erreicht werden.



## 6. Literaturverzeichnis

---

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

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

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

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

Calamini B, Ratia K, Malkowski MG, Cuendet M, Pezzuto JM, Santarsiero BD, Mesecar AD (2010) Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem J* 429: 273-282

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

Chen CK, Pace-Asciak CR (1996) Vasorelaxant activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol* 27: 363-366

Coutos-Thévenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M (2001) In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot* 52: 901-910

Di Santo A, Mezzetti A, Napoleone E, Di Tommaso R, Donati MB, De Gaetano G, Lorenzet R (2003) Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost* 1: 1089-1095

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

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

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

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

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

Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stöcker RH, Stenzel K (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156

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

Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch (2004). 9. Auflage, Gruyter

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, Lançon 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

Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL (2010) Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, in Druck

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

Kiziltepe U, Turan NN, Han U, Ulus AT, Akar F (2004) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 40: 138-45

Kollár P, Kotolová H, Necas J, Karpíšek M, Bartosíková L, Karesová 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 (2008) Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 269: 243-261

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

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

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

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

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

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

Naderali EK, Doyle PJ, Williams G (2000) Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci* 98: 537-543

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

Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963) Chemical constituents of Polygonaceous plants – first studies on the components of Ko-Jo-Kon (*Polygonum cuspidatum* sieb et zucc). *Yakugaku Zasshi* 83: 988-990

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

Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R (2006) Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 40: 1054-1065

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

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

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

Schröder G, Browns JWS, Schröder J (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase – cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Europ J Biochem* 172: 161-166

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

Sobotková A, Másová-Chrastinová L, Suttnar J, Stikarová J, Májek P, Reicheltová Z, Kotlín R, Weisel JW, Malý M, Dyr JE (2009) Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. *Free Radic Biol Med* 47: 1707-1714

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

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

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

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. *Circ* 106: 1652-1658

Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM (1994) The occurrence of piceid as a stilbene glucosid in grape berries. *Phytochem* 37: 571-573

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

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

# 7. Curriculum vitae

---

## ***Persönliche Daten***

Vor- und Zuname: Lisa Johanna Mayr  
Geboren am: 10. August 1988 in Linz  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: ledig

## ***Schulbildung***

1994-1998 VS Leonding  
1998-2006 BRG Linz Fadingerstraße, Matura mit Auszeichnung

## ***Studium***

Seit 10/2006 Studium der Pharmazie, Universität Wien  
28.09.2007: Abschluss der 1. Diplomprüfung  
29.10.2010: Abschluss der 2. Diplomprüfung

## ***Stipendien***

2008, 2009 & 2010 Leistungsstipendien der Universität Wien nach den StudFG  
2011 Leistungsstipendium für den 2. Studienabschnitt von der pharmazeutischen Gehaltskasse für Österreich

## ***Ferialpraxis***

07/2008 Apotheke Haid Center  
08/2009 Apotheke am Schillerpark