

V. Pharmakologischer Teil

Die in dieser Arbeit hergestellten Carbacycline wurden bei der Schering AG, Berlin auf mögliche pharmakologischen Wirkung getestet ^[E]. Eine bei der Schering AG angewandte Prüfmethode der physiologischen Wirksamkeit von Prostaglandinen und Carbacyclinen ist die Thrombozytenaggregation. In dieser Prüfmethode wird die Wirksamkeit der Induktion einer Thrombozytenaggregation durch die zu prüfenden Substanzen getestet.

V.1. Beschreibung der Testmethode der Thrombozytenaggregation

V.1.1. Material und Methode

Diese *in vitro* Prüfmethode benötigt menschliches Blut gesunder Spender. Die gespendeten Blutproben werden nach der Blutentnahme sofort mit *in vitro* Antikoagulanzen (hier lösliche Salze der Zitronensäure) versetzt, die durch Chelatisierung von Ca^{2+} die Koagulation hemmen. Die Citratvollblutproben werden wie folgt gewonnen und für die Messung vorbereitet:

ADP (Sigma-Aldrich) wird als Stammlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung angesetzt, die bei -20 °C gelagert, eine Woche haltbar ist. Am Versuchstag wird die ADP-Lösung weiter mit 0.9 %-iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Konzentration bezieht sich auf die Endkonzentration in der Küvette.

Iloprost® (**29**, ZK 36374) zeigt ein dem natürlichen Prostacyclin (**10**) gleiches Wirkprofil und eine ähnliche Wirkstärke ^[171a,660]. Aus diesem Grund hat sich Iloprost® als internationaler Standard in der Prostacyclin-Forschung bewährt. Carbacyclin hat zwar ebenso das gleiche Wirkprofil wie Prostacyclin, seine Wirkstärke beträgt aber nur etwa 1/30 des Prostacyclins PGI_2 . Iloprost® wird deshalb auch in diesem Test als Vergleichssubstanz verwendet.

^[E] Die pharmakologische Prüfung der Substanzen und die Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Untersuchung wurden von Frau Dr. McDonald bei der Schering AG ausgeführt. Frau Dr. McDonald bin ich für die Überlassung der Ergebnisse sehr zum Dank verpflichtet.

V.1.2. Präparation der Thrombozyten

Citratvollblut (1 Teil Natriumcitratlösung 3.8 % + 9 Teile venöses Vollblut) wird von gesunden Spendern gewonnen, die mindestens eine Woche vor der Blutentnahme nicht unter Einnahme von Medikamenten standen. Das Blut wird 20 Minuten bei 100 g zentrifugiert und der Überstand als plättchenreiches Plasma (PRP) abgenommen. Plättchenarmes Plasma (PPP) wurde durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 1600 g gewonnen. PRP wird mit PPP verdünnt, so daß eine Plättchenkonzentration von 3×10^8 Plättchen pro ml Plasma ($\pm 10\%$) entsteht. Diese Plasmaprobe wird während des Versuches in verschlossenen Kunststoffröhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Thrombozytenaggregation:

Die Aggregation wird in 1.5 ml Glasküvetten bei 37 °C unter kontinuierlichem Rühren (800 Upm) photometrisch gemessen. Die bei Aggregatbildung abnehmende Lichtstreuung der PRP-Probe wird mit einem Acht-Kanal-Aggregometer (Schering AG) erfaßt.

Die Kanäle des Aggregometers werden vor Versuchsbeginn mit PPP und PRP als 100 % und 0 % Aggregation kalibriert. Eine unbehandelte Probe muß als Wert der maximalen Aggregation bei jedem Durchlauf vorhanden sein, auf den sich die behandelten Proben in % Änderung beziehen. Die Aggregation wird durch Zugabe von ADP (5 μ M) ausgelöst. Messungen können innerhalb von 4 Stunden nach PRP-Herstellung durchgeführt werden. Die zu prüfenden Substanzen werden 1 Minute vor Aggregationsauslösung dem PRP zugesetzt.

Die zu testenden Carbacycline wurden bei der Schering AG mit firmeninternen ZK Nummern versehen, die Zuweisung dieser Nummern erfolgte wie in Abbildung 23 angegeben:

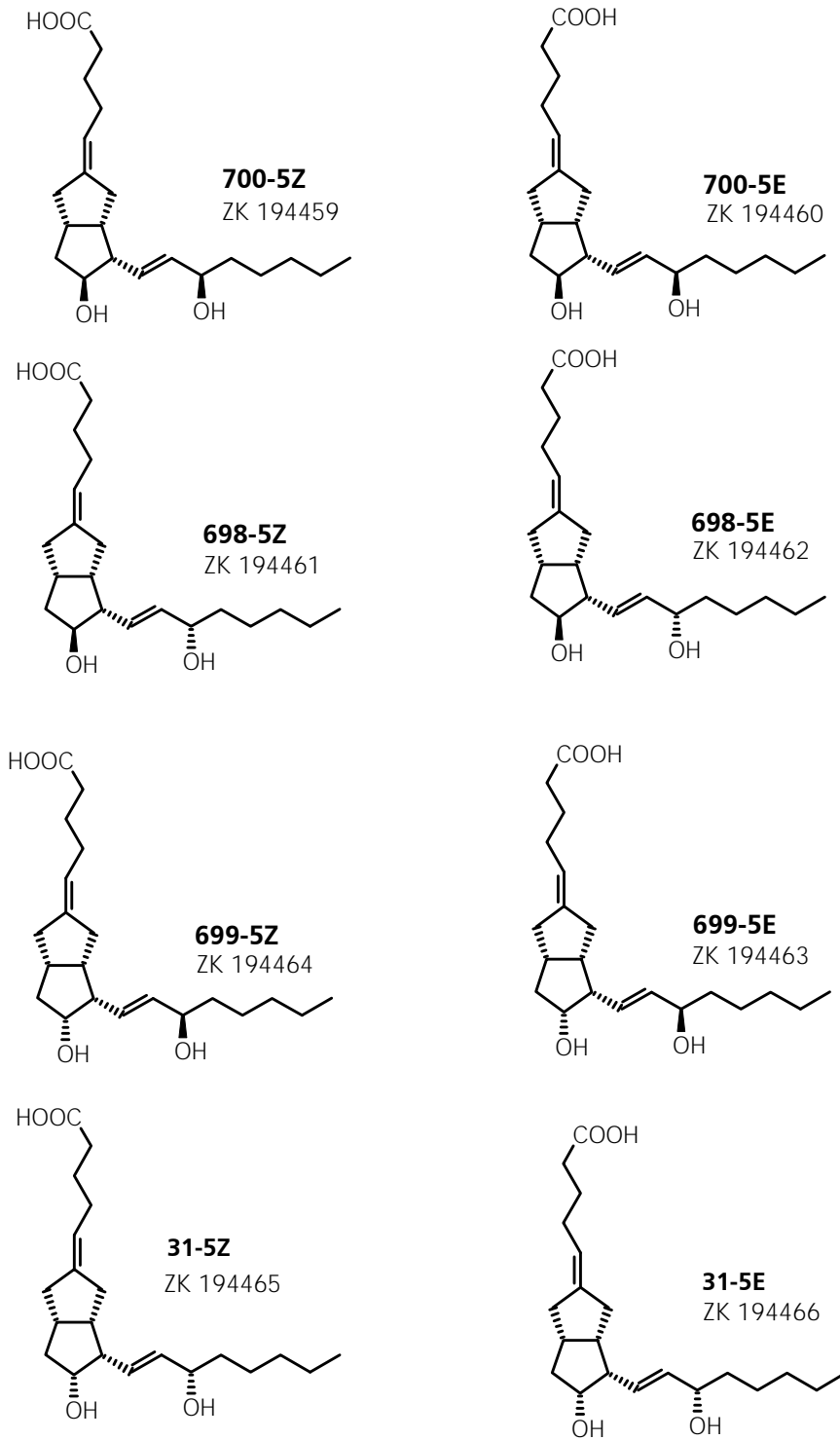


Abbildung 23

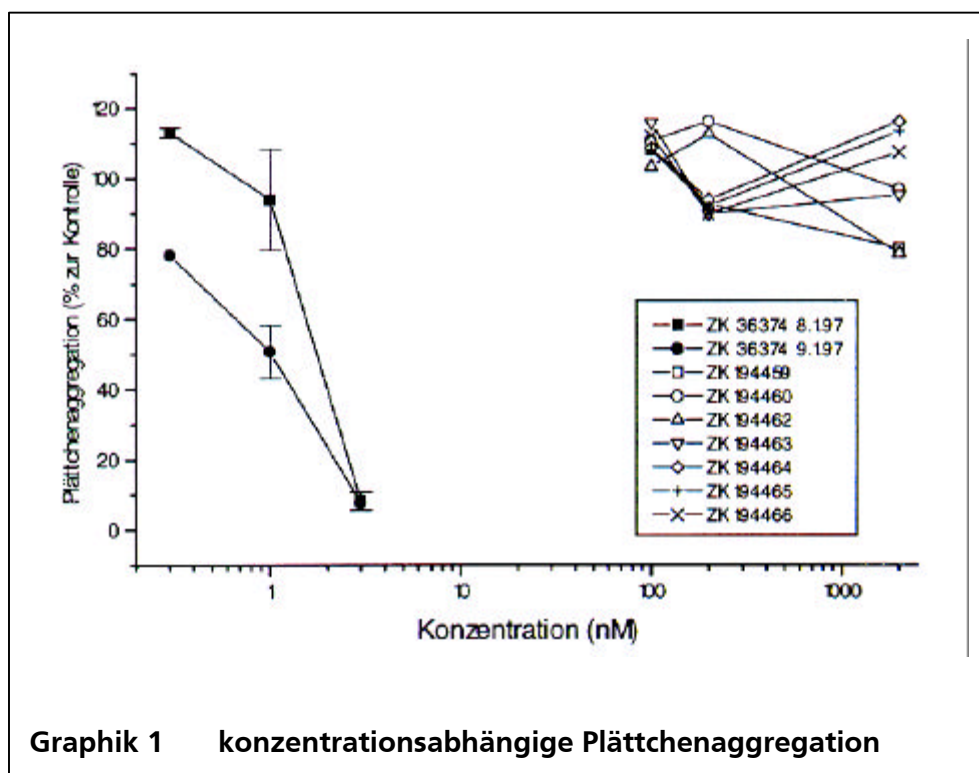
Formeln von Carbacyclinen und ZK-Nummer Zuweisung

V.2. Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dieser Testmethode zusammengestellt.

Tabelle 8 Ergebnisse des Plättchenaggregation			
Substanz (ZK-Nummer)	Hemmung der Plättchenaggregation	Stimulierung der Plättchenaggregation	Beeinflussung der durch Iloprost® induzierten Plättchen-aggregations-hemmung
194459, 700-5Z	keine	keine	keine
194460, 700-5E	keine	keine	keine
194461, 698-5Z	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
194462, 698-5E	keine	keine	keine
194463, 699-5Z	keine	keine	keine
194464, 699-5E	keine	keine </td <td>keine</td>	keine
194465, 31-5Z	keine	keine	keine
194466, 31-5E	keine	keine	keine
36374 (Iloprost®), 29	stark	--	

In den nachfolgenden Graphiken sind die quantitativen Ergebnisse graphisch dargestellt. Aus Graphik 1 ist die konzentrationsabhängige Plättchenaggregation der getesteten Carbacycline ersichtlich.



Während Iloprost® in einer Konzentration von 3 nM wirksam eine Aggregation bei Zugabe von 5 µM ADP zu verhindern vermag, zeigen die getesteten Verbindungen bei jeweils drei Messungen in Konzentrationen von 100 nM, 1000 nM und 2000 nM keine Aggregationshemmung. Da die Konzentration der getesteten Verbindungen relativ hoch war, kann von einer Unwirksamkeit der getesteten Verbindungen in der Aggregationshemmung ausgegangen werden.

Aus Graphik 2 ist ersichtlich, wie sich die getesteten Carbacycline auf die durch Iloprost® induzierte Aggregationshemmung auswirken. Aus diesem Vergleich ist eine synergistische bzw. antagonistische Wirkung der getesteten Verbindung ablesbar. Die getesteten Verbindungen zeigen keine Veränderung der Aggregationshemmung von Iloprost® als Standard. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Testsubstanzen keine Prostacyclin-Rezeptoreigenschaften aufweisen. Eine Rezeptorinhibition tritt nicht auf, da Iloprost® unverändertes Wirkprofil aufweist. Die getesteten Carbacycline verdrängen Iloprost® nicht vom Prostacyclin-Rezeptor.

