

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Wendt)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

**Der Einfluss von Antibiotika auf die Gefäßkontraktilität in vitro
- eine experimentelle Studie**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2008

Vorgelegt von: Johanna Hellmuth
geb. am: 01.01.1977
in: Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. med. C.-D. Heidecke

1. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Lehmann (Greifswald)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. C. D. Spies (Berlin)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Loefflerstr. 23 b

Tag der Disputation: 12.09.2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	4
2. Theoretische Vorbetrachtungen	
2.1. Die glatte Muskelzelle	5
2.2. Aufbau	5
2.3. Erregungsmechanismen	5
2.4. Intrazelluläre Mechanismen der Steuerung des Gefäßtonus	6
2.5. Membranpotential und Ionenkanäle	6
2.6. Kaliumkanäle	7
2.7. Regulation des intrazellulären Kalziums	7
2.8. Antibiotika	8
3. Aufgabenstellung	11
4. Material und Methoden	12
4.1. Tiere.....	12
4.2. Präparation.....	12
4.3. Versuchsablauf.....	12
4.4. Auswertung	15
4.5. Statistik.....	16
4.6. Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen.....	16
4.7. Pufferlösung.....	17
4.8. Geräte und Zubehör.....	17
4.9. Software.....	18
5. Ergebnisse	19
5.1. Medikamente.....	20
5.1.1. Tobramycin.....	20
5.1.2. Vancomycin.....	21
5.1.3. Metronidazol.....	22

5.1.4.	Imipenem.....	23
5.2.	Reinsubstanzen.....	24
5.2.1.	Tobramycin	24
5.2.2.	Vancomycin.....	25
5.2.3.	Metronidazol.....	26
5.2.4	Neomycin	27
5.3.	Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin	28
5.3.1.	Natrium-EDTA	28
5.3.2.	Natriummetabisulfit	29
5.3.3.	Phenol	30
5.4.	Medikamente und Reinsubstanzen ohne Vorkontraktion	30
5.5.	Vergleich Medikamente Reinsubstanzen-Zusatzstoffe.....	31
6.	Diskussion	33
6.1.	Diskussion der Methoden	34
6.2.	Antibiotika.....	35
6.3.	Mögliche Mechanismen der Relaxation.....	38
6.3.1.	Rezeptorvermitteltes System (Phosphatidylinositolkaskade).....	38
6.3.2.	Antibiotika und das Rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade).....	39
6.3.3.	Die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle)	39
6.3.4.	Der Einfluss von Antibiotika auf Kaliumkanäle	40
6.3.5.	Weitere Mechanismen.....	42
6.3.5.1.	Kalzium und der intrazelluläre Kontraktionsmechanismus.....	42
6.3.5.2.	Stickstoffmonoxid (NO)-Mechanismus.....	43
6.3.5.3.	Unspezifische Mechanismen.....	44
6.4.	Diskussion Antibiotika – Relaxationsmechanismus.....	44
6.5.	Klinische Relevanz	45
7.	Zusammenfassung	47
8.	Literaturverzeichnis	48
9.	Anhang	56
9.1	Abkürzungsverzeichnis	56
9.2	Veröffentlichungen	58

9.3	Eidesstattliche Erklärung	59
9.4	Lebenslauf	60
9.5	Danksagung	61

1. Einleitung

Die Sepsis ist eine generalisierte Entzündungsreaktion des gesamten Organismus auf eine Infektion. Ihr Ausgangspunkt ist in vielen Fällen eine schwere bakterielle Infektion und die damit verbundene Aussaat der Erreger und ihrer Toxine in die Blutbahn. Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr zwischen 44000 und 95000 Menschen an einer schweren Sepsis, von denen 30-50 % während ihres Krankenhausaufenthaltes versterben [Moerer et al.]. Zu den klinischen Symptomen septischer Patienten zählen der Verlust des peripheren Gefäßwiderstandes, das Auftreten von generalisierten Ödemen und eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung. All diese Veränderungen münden schließlich, über multiple Organdysfunktionen, im Multiorganversagen. Bei allen septischen Patienten kommt es zu vasoregulatorischen Störungen, so dass diese, neben der Bekämpfung der zugrunde liegenden Infektion, im Zentrum der therapeutischen Behandlung stehen.

Bisher ist nicht bekannt ob Antibiotika einen Einfluss auf die Kontraktilität der Gefäße haben. Für verschiedene Antibiotika (Imipenem, Polymixin B, Ceftaxidim) ist bekannt, dass sie unterschiedliche Endotoxinbindungskapazitäten besitzen [Baldwin et al., Cohen et al., Cooperstock et al.]. Beim Zerfall gramnegativer Bakterien kommt es zur Endotoxinfreisetzung mit nachfolgender Aktivierung einer Mediatorenkaskade. Diese Mediatoren verschlechtern die Mikrozirkulation durch eine Vasodilatation mit einem hieraus resultierenden Schockgeschehen. Darüber hinaus kann die Antibiotikatherapie selbst durch Freisetzung mikrobieller Produkte, wie Endotoxin, vorübergehend zu einer Aggravierung der Sepsissymptome führen [Natanson et al., Shenep et al.]. Es kann jedoch vermutet werden, dass die Vasodilatation der Gefäße nach Antibiotikagabe nicht alleine auf der Endotoxinfreisetzung beruht. Es zeigte sich auch, dass einige Substanzen selbst zu einer Vasodilatation führen können [Ahdal et al., Sokoll et al., Dupuis et al.]. Sollten derartige Auswirkungen auch auf die Mikrozirkulation gefunden werden, hätte dies für den klinischen Einsatz von Antibiotika eine große Bedeutung. Aus diesen Gründen wird in dieser Studie der Einfluß verschiedener Antibiotika auf die Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur untersucht. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von Tobramycin, Vancomycin, Metronidazol, Imipenem und Neomycin auf die glatte Gefäßmuskulatur zu untersuchen. Ergänzend hierzu wurde bei Tobramycin, Vancomycin und Metronidazol sowohl das Medikament als auch die Reinsubstanz getestet.

2.Theoretische Vorbetrachtungen

2.1 Die glatte Muskelzelle

2.1.1 Aufbau

Alle Blutgefäße besitzen einen gleichartigen Wandaufbau. Sie setzen sich in der Regel aus Intima, Media und Adventitia zusammen. Die Intima besteht aus einem einschichtigen Endothel, das die innere Oberfläche der Gefäße auskleidet. Die als Media bezeichnete mittlere Schicht enthält vor allem ringförmig angeordnete glatte Muskelzellen, zwischen denen Elastin, Kollagen und Proteoglykane eingelagert sind. Die äußere Schicht, Adventitia, besteht aus Bindegewebe und elastischen Fasern. Die Adventitia ist mit dem Bindegewebe des Organs verbunden, durch das der jeweilige Gefäßabschnitt läuft. In ihr verlaufen Nerven, die vor allem adrenerge und cholinerge Nervenfasern enthalten und die die vegetative Steuerung des Gefäßtonus leisten [Junqueira et al.]. Glatte Muskelzellen der Media sind verantwortlich für den Gefäßtonus. Eine Änderung des Kontraktionsgrades führt zu Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation.

2.1.2 Erregungsmechanismen

Der strukturelle Aufbau und der Funktionsablauf der glatten Muskulatur unterscheiden sich stark von dem der quergestreiften Skelettmuskulatur. Es werden zwei Arten der Erregungsauslösung unterschieden [Murphy et al.]. Einerseits die elektromechanische Kopplung: Bei der elektromechanischen Kopplung löst eine Erregung (elektrochemisches Signal) ein mechanisches Ereignis (Kontraktion) aus. Hierbei kommt es primär zu einer Veränderung des Membranpotentials, das hauptsächlich unter dem Einfluss von Kalium steht. Diese Veränderung des Membranpotentials aktiviert spannungsabhängige Kalziumkanäle, es kommt zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Einfluss von Kalzium aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum. Dieser Konzentrationsanstieg des intrazellulären Kalziums führt zur Kontraktion der glatten Muskelzelle [Rembold et al.]. Andererseits die pharmakomechanische Kopplung (dieser Mechanismus wird von nun an als Rezeptorvermitteltes System = Phosphatidylinositolkaskade bezeichnet): Die primäre Kontrolle erfolgt durch das vegetative Nervensystem. Durch Hormone bzw. Neurotransmitter kommt es zur Aktivierung von Rezeptoren die über eine Signaltransduktionskette (Phosphatidylinositolkaskade) eine Freisetzung des Kalziums aus dem intrazellulären

sarkoplasmatischen Retikulum hervorrufen und somit zu einer Muskelkontraktion führen [Endo et al.]. Hierbei kommt es nicht zu einer Veränderung des Membranpotentials [Rembold et al.].

2.1.3. Intrazelluläre Mechanismen der Steuerung des Gefäßtonus

Die glatte Muskulatur besteht aus Schichten spindelförmiger Zellen. Als kontraktile Elemente enthalten die Zellen glattmuskuläre F-Aktin-Tropomyosin und Myosin-II-Filamente. Die Kontraktionen werden durch Filamentgleiten von Aktin und Myosin vermittelt. Beide Moleküle sind so angeordnet, dass sie unter ATP-Verbrauch teleskopartig ineinander gleiten können. Die Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird durch den Anstieg und den Abfall des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels reguliert [Somlyo & Somlyo]. Eine ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verursacht über die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) eine Kontraktion der glatten Muskelzellen. Die MLCK phosphoryliert die 20 kDa Leichtketten des Myosins am Serin 19 und aktiviert die kontraktile Myosin-Adenosin- Triphosphatase (ATPase) [Bennett & Waldman, Horowitz et al.]. Eine sinkende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration inaktiviert die Myosin-Leichtketten-Kinase verbunden mit einer Dephosphorylierung der Myosin-Leichtketten durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) und führt zur Relaxation der glatten Muskelzellen [Somlyo & Somlyo]. Im glatten Muskel wird die Sensitivität des kontraktiven Apparates gegenüber Kalzium durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert. Diese ändern die Aktivität der MLCP.

2.1.4 Membranpotential und Ionen-Kanäle

Der Tonus der quergestreiften Muskulatur und des Herzmuskels wird durch Aktionspotentiale, also raschen Wechsel des Membranpotentials gesteuert. Bei der glatten Gefäßmuskulatur erfolgt dies über eine kontinuierliche Membranpotentialveränderung. Bei normalem intravasalem Druck liegt das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen, in vivo zwischen -40 und -55 mV, in vitro zwischen -40 und -60 mV. Verantwortlich für dieses Potential sind hauptsächlich Kaliumionen (K^+) und Chloridionen (Cl^-). Das Gleichgewichtspotential für K^+ liegt bei -85 mV, das für Cl^- bei -31 mV [Nelson et al.]. Bereits sehr geringe Veränderungen des Membranpotentials können zu erheblichen Änderungen des Tonus der glatten Muskelzelle und somit des Gefäßdurchmessers führen. Die Kopplung zwischen Muskelkontraktibilität und Membranpotential wird vorwiegend durch

spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Plasmamembran gewährleistet, wobei Potentialänderungen um 3 mV den Kalziumeinstrom verdoppeln oder halbieren können.

2.1.5 Kaliumkanäle

In der glatten Muskulatur der Gefäße wird der Gefäßtonus hauptsächlich durch das Membranpotential bestimmt, welches durch die Kaliumkanäle gesteuert wird. Zu den Kaliumkanälen gehören: die kalziumaktivierten Kaliumkanäle [Brayden et al., Peng et al., Archer et al.], die ATP-sensitiven Kaliumkanäle [Clapz et al., Smirnov et al.] und die verzögerten Gleichrichtungskaliumkanäle [Peng et al.], synonym den spannungsaktivierten Kaliumkanälen. Die unterschiedlichen Kanäle nehmen in unterschiedlichen Situationen Einfluss auf das Membranpotential und somit auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration. Dies ermöglicht, dass bei unterschiedlichen Anforderungsbedingungen durch das Zusammenspiel der verschiedenen K^+ -Systeme exakt abgestimmt, die entsprechende Kaliumkonzentration intrazellulär erzeugt werden kann. Hieraus resultieren sehr fein justierte Potentialveränderungen, die über die spannungsabhängigen Kalziumkanäle und somit die intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, den Tonus der Gefäße, der Situation bedarfsgerecht angepasst, regulieren.

2.1.6 Regulation des intrazellulären Kalziums

Kalzium, als second messenger spielt eine entscheidende Rolle in der Steuerung von Kontraktion und Kontraktilität der Muskelzellen. Die neuronale Reizung über das vegetative Nervensystem oder die pharmakologische Beeinflussung der glatten Muskulatur (Rezeptorvermitteltes System) wird über die Phosphatidylinositolkaskade vermittelt. Die Aktivierung eines α_1 -Rezeptors durch z.B. Adrenalin bewirkt eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C, die das Arachidonsäurederivat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ öffnet Kalziumkanäle in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, was über entsprechenden Zwischenschritte und Regulationsmechanismen zur Kontraktion der glatten Muskelzelle führt [Smith et al.]. Da die zur Verfügung stehende intrazelluläre Kalziumkonzentration des sarkoplasmatischen Retikulums „begrenzt“ ist, hat das vegetative Nervensystem einen modulierenden Einfluß auf den Gefäßtonus. Bei der elektromechanischen Kopplung kommt es zum Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle. Da die extrazelluläre Kalziumkonzentration um ein vielfaches höher liegt als die intrazelluläre, stellt der Extrazellularraum eine „unerschöpfliche“ Kalziumquelle dar. Das zytoplasmatische

Kalzium im glatten Muskel aktiviert die Myosin-Leichtkettenkinase und über weitere Zwischenschritte kommt es zur Aktivierung der kontraktilen Filamente der Zelle.

Um eine Relaxation auszulösen muss der Kalziumspiegel im Sarkoplasma auf seinen Ruhewert gesenkt werden [Miller et al.]. Hierfür existieren verschiedene Mechanismen, wie die kalziumtransportierende ATPase der Plasmamembran (PMCA) [Hao et al., Carafoli et al.], die kalziumtransportierende ATPase des sarko(endo)plasmatischen Retikulums (SERCA) [Wu et al., Levin et al., Cohen et al.], der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) [Blaustein et al., Miura et al., Hilgemann et al.] und die mitochondriale Kalziumpumpe [Kikuchi et al., Jy et al.]. Durch diese Reduktion der sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration kommt es über weitere Zwischenschritte zur Entspannung kontraktilen Filamente und somit zur Relaxation bzw. Vasodilatation. Ein wichtiger Mechanismus für die Relaxation ist auch die NO-Freisetzung des Endothels, welches die cGMP-Produktion steigert und über weitere Zwischenschritte die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst (Proteinkinase G).

2.2. Antibiotika

Antibiotika können nach ihrer zellulären Wirkung unterteilt werden. Einerseits gibt es die Gruppe der bakteriostatischen Antibiotika, die das Wachstum der Organismen hemmen wie z.B. Tetracycline, Makrolide oder Sulfonamide, andererseits gibt es die Gruppe der bakteriziden Antibiotika, wie z.B. die β -Laktamantibiotika, Aminoglykoside oder die Gyrasehemmer, die zum Zelluntergang führen [Karow/Lang]. Die Antibiotika beeinflussen nicht nur die Bakterien, sondern können auch inhibitorisch Einflüsse auf die Zellen des menschlichen Organismus aufweisen.

Zum Beispiel verringert Gentamycin die glomeruläre Filtrationsrate der Niere, indem es zu einer Kontraktion der Mesangiumzellen des Nephrons führt [Morales et al.]. Antracycline können durch den Einfluss auf die Bildung von Mediatoren wie NO und Endothelin auf den Tonus von glatten Muskelzellen einwirken. [Wakabayashi et al.]. Inhibitorische Effekte auf Zellen des Myocards sind ebenfalls in vivo nachgewiesen worden [Sterba et al., Ganame et al., Guimaraes-Filho et al.].

Den relaxierenden Effekt von Antibiotika auf glatte Muskelzellen des Ileums, Cerebralarterien und auf glatte Muskelzellen von Zellkulturen zeigt die folgende Tabelle:

	Ileum	A.cerebralis	Zellkultur	Referenzen
Dibekacin	+++			Said AA et al.
Neomycin B	+++	++	+++	Goodman FR et al., Gergawy M et al., Wickman G et al., Said AA et al.
Tetracycline	+++			Said AA et al.
Gentamicin	++	+++	++	Goodman FR et al., Gergawy M et al., Wickman G et al., Said AA et al.
Streptomycin	++	+++	++	Gergawy M et al., Said AA et al.
Kanamycin A	++	++	++	Goodman FR et al., Gergawy M et al., Wickman G et al., Said AA et al.
Tobramycin	+			Said AA et al.
Ribostamycin	+			Said AA et al.
Amikacin	+			Said AA et al.
Ampicillin	0			Said AA et al.

Tabelle 2.2 Effekte von Antibiotika auf die glatte Muskelzelle

In der vorliegenden Arbeit wurden Tobramycin, Vancomycin, Imipenem, Metronidazol und Neomycin sowie einige Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin untersucht. Tobramycin gehört in die Gruppe der Aminoglykoside und hemmt die bakterielle Proteinsynthese. Aminoglykoside, zu dem auch das Neomycin gehört, werden als Kombinationspräparate bei einer gezielten und ungezielten Therapie von schweren Infektionen wie zum Beispiel einer Pneumonie oder Sepsis eingesetzt. Vancomycin zählt zu den Glykopeptiden und hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand. Vancomycin ist ein Reserveantibiotikum für schwere Staphylokokkeninfektionen und wird bei der Antibiotika-assoziierten Enterokolitis eingesetzt. Metronidazol, ein Nitroimidazol-Derivat greift in die Nukleinsäuresynthese anaerober Bakterien und Protozoen ein. Imipenem / Cilastatin ist ein β -Laktam-Antibiotikum zur parenteralen Therapie von bakteriellen Infektionen. Es besteht aus dem Wirkstoff Imipenem,

welches mit Cilastatin-Natrium - einer antibiotisch nicht aktiven Substanz - kombiniert wurde, um den metabolischen Abbau von Imipenem in der Niere zu verhindern sowie dessen Nephrotoxizität zu senken. Imipenem hemmt die Quervernetzung der Bakterienzellwandpeptidoglykane. Es wirkt gegen grampositive und gramnegative Bakterien und wird zur Initialtherapie lebensbedrohlicher Infektionen eingesetzt [Karow/Lang-Roth].

3. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Studie war es herauszufinden, wie die glatte Gefäßmuskulatur der Rattenaorta auf verschiedene Antibiotika reagiert. Untersucht wurden Tobramycin, Vancomycin, Imipenem, Metronidazol und Neomycin. Medikamente stellen Stoffgemische aus der Wirksubstanz und einer Vielzahl an Zusatzstoffen dar. Um einen möglichen Einfluß der Zusatzstoffe dieser Medikamente nachzuweisen, wurden einerseits die Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin (Phenol, Natriummetabisulfit und Natrium-EDTA), andererseits die Reinsubstanzen Tobramycin, Vancomycin und Imipenem selbst auf mögliche Effekte auf den Tonus der Gefäßmuskulatur untersucht. Um einen vasodilatierenden Effekt der verschiedenen Substanzen nachzuweisen, müssen die Gefäße zuvor präkontrahiert werden. Hierfür wurden zum einem Phenylephrin als α 1-Sympatomimetikum eingesetzt, zum anderen wurde über eine Verschiebung des Membranpotentials durch Kaliumchloridlösungen in verschiedenen Konzentrationen von 20 mM und 40 mM eine Präkontraktion der Gefäße erzeugt. Durch die zwei verschiedenen Formen der Präkontraktion sollte der Einfluss der verschiedenen Substanzen auf das rezeptorassoziierte System (pharmakomechanische Kopplung) sowie das System des Membranpotentials (elektromechanische Kopplung) untersucht werden. Die Experimente wurden in vitro an den Aorten von Ratten mit steigenden Antibiotikakonzentrationen durchgeführt.

Somit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Welchen Einfluss haben die Medikamente Tobramycin, Vancomycin, Imipenem und Metronidazol auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur?
- Zeigen die Medikamente im Vergleich zu den Reinsubstanzen ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Relaxation?
- Welche Rolle spielen die Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin: Phenol, Natriummetabisulfit und Natrium-EDTA?
- Kann der Relaxationsmechanismus durch den Einsatz verschiedener Präkontraktoren wie Phenylephrin und Kaliumchlorid (in den Konzentrationen 20 mM und 40 mM) unterschiedlich beeinflusst werden?

4. Material und Methoden

4.1 Tiere

Alle Tests an Tieren wurden nach den Richtlinien der Ernst-Moritz-Arndt-Universität für Tierversuche und gemäß des geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt. Verwendet wurden männliche und weibliche Ratten (EMAU, Abteilung Versuchstierkunde, Tierhaus Karlsburg, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 250-350 g. Alle Tiere wurden in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Kleintiernahrung gehalten.

4.2 Präparation

Nach einer Thiopental-Injektion (100mg/kg) wurde das Tier durch Eröffnung der thorakalen Aorta entblutet. Die Aorta wurde entnommen und unter dem Mikroskop in Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle Nr.2.7-1) liegend von anhaftendem Gewebe befreit und in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten.

4.3 Versuchsablauf

Zu Beginn eines jeden Versuchs wurden die Aortenringe in die Halterung des Messsystems (Kraft-Übermittler, ITA-25, EMKA Tech., Frankreich) eingespannt. (siehe Abbildung 2.3-1). Bei dem Kraftwandler handelte es sich um einen isometrischen Wandler. Das elektrische Signal wurde verstärkt (STA 2808, EMKA Tech., Frankreich) und mit einem Schreiber (Rikadenki multipen recorder, R50-Serie, Hugo Sachs Elektronik, Freiburg, Deutschland) registriert. Das Ergebnis wurde in Form einer kumulativen Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Das System mit zwei Metallhaken und den Ringpräparationen befand sich in einem doppelwandigen Organbad, welches innen mit Krebs-Henseleit-Lösung (20 ml) gefüllt war, die konstant bei einer Temperatur von 37 °C gehalten wurde. Im Organbad mündete eine Zuleitung über die ständig Sauerstoff und Kohlendioxid (95 %/ 5 %) zugeführt wurde, die eine gute Oxygenierung und Verteilung der verwendeten Substanzen gewährleistete.

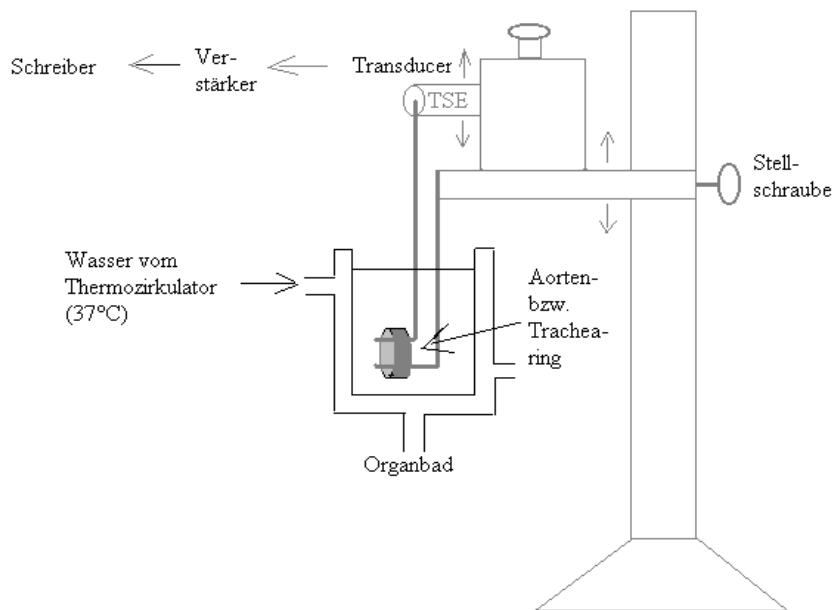


Abb. 2.3-1 Skizze des Versuchsaufbaus [Maskow (2005)]

Nach einer Phase der Stabilisierung wurde der glatte Muskel stufenweise manuell auf seine optimale Länge vorgespannt, welche in Vorversuchen etabliert wurde und einem Gegengewicht von ungefähr 2 Gramm entsprach. Diese Vorbereitung der Aortenringe dauerte 60 Minuten und diente dazu die Aortenringe in einen stabilen Zustand zu bringen. Anschließend wurde an den Präparationen, eingespannt im Organbad, eine Testkontraktion ausgelöst. Auf diese Weise wurde zu Beginn des Versuches die Intaktheit der Aorta überprüft. Als Präkontraktoren dienten das α -Sympathomimetikum Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl. Nach dem Beweis der Vitalität der Aorta wurden die Präparationen durch eine Waschung mit der Krebs-Henseleit-Lösung in den zuvor beschriebenen stabilen Ausgangszustand zurückversetzt. Nun erfolgte für die Versuchsdurchführung die Präkontraktion mit Phenylephrin, 20 mM KCL oder 40 mM KCL. Nach einer Stabilisierungsphase der präkontrahierten Aorta wurden in aufsteigender Dosis die Antibiotika in das Organbad gegeben.

Zwischen den einzelnen Applikationen der verschiedenen Dosen wurden ebenfalls zur sicheren Beurteilung der Reaktion entsprechende definierte Pausen (5 Minuten) eingehalten. Verwendet wurden Tobramycin, Vancomycin, Imipenem und Metronidazol. Es wurden Tests sowohl mit den Medikamenten (Tobramycin, Vancomycin, Imipenem, Metronidazol) als auch mit den Reinsubstanzen (Tobramycin, Vancomycin, Metronidazol, Neomycin) sowie den Zusatzstoffen des Medikamentes Tobramycin (Phenol, Natriummetabisulfit und Natrium-EDTA) durchgeführt. Nach Abschluss der Antibiotikamesserie wurde eine erneute Vitalitätsprüfung der Aorta durchgeführt. Hierfür wurden die Aortenringe durch eine erneute Waschung mit der Krebs-Henseleit-Lösung in den Ausgangszustand zurückversetzt. Ein Einfluss durch Präkontraktoren oder Antibiotika bzw. Zusatzstoffe konnte somit ausgeschlossen werden. Daraufhin wurden sie erneut mit Phenylephrin ($PE\ 5 \times 10^{-8}$) präkontrahiert, so konnte festgestellt werden ob die relaxierenden Effekte reversibel waren. Anschließend wurde durch die Zugabe von Acetylcholin eine Vasodilatation der Aorta herbeigeführt, dies bewies die Funktionsfähigkeit des Endothels. Es wurde zunächst eine Versuchsreihe mit $n=3$ durchgeführt, wenn kein Effekt zu verzeichnen war, wurden keine weiteren Versuche gemacht.

4.4 Auswertung

Die Veränderungen im Gefäßtonus wurden durch einen Schreiber registriert und sahen wie folgt aus:

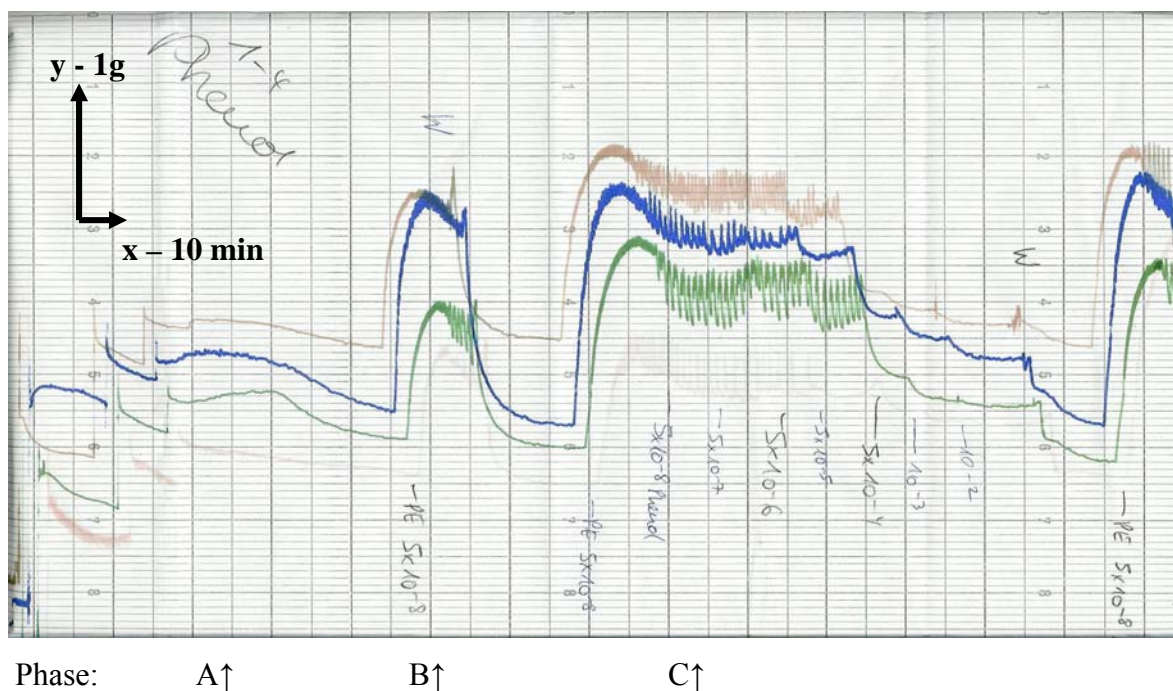


Abb. 2.4-1 Darstellung des erfassten Gefäßtonus am Schreiber

(y-Achse: 1g = 2 Kästchen; x-Achse: 10 min = 1 Kästchen)

A= Ausgangszustand der Aorta

B= Maximale Auslenkung durch die Präkontraktion (gleich 100 %)

C= Durch die Antibiotika verursachte Veränderung des Gefäßtonus

Bei allen Präparationen wurden zunächst die absoluten Werte in Gramm sowohl der maximal erreichten Kontraktion, als auch sämtlicher Konzentrationsstufen der Antibiotika bestimmt. Der Ausgangszustand der gewaschenen Aorta wurde gleich 0 gesetzt (Phase A). Die maximale Auslenkung initial durch die Präkontraktion wurde gleich 100 % gesetzt (Phase B). Ein durch die Antibiotika verursachte Veränderung des Gefäßtonus (Phase C) (Vasodilatation) wurde in Relation zur maximalen Spannung in Phase B gesetzt. Die Daten werden in Prozent von der maximalen Kontraktion angegeben.

4.5 Statistik

Bei allen Präparationen wurden zunächst die absoluten Werte in Gramm sowohl der maximal erreichten Kontraktion, als auch sämtlicher Konzentrationsstufen der Antibiotika bestimmt. Die absoluten Werte der einzelnen Kontraktionsstufen wurden dann in Relation zur maximalen Spannung gesetzt. Im Folgenden wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, Standardfehler). Für die statistische Auswertung wurden die Varianzanalyse und der Student-t-Test für paarige Stichproben eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0.05$ bestimmt. Die mittlere Wirkkonzentration zur halbmaximalen Kontraktion (EC50) wurde nicht ermittelt weil es zu keiner Vollrelaxation kam. Die Angabe erfolgte als negativer Logarithmus der Antibiotika-Konzentration.

4.6 Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen

Acetylcholin

(Acetylcholinhydrochlorid) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Imipenem/Cilastatin (Medikament) Zienam ,MSD, Deutschland

Kaliumchlorid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Metronidazol Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Metronidazol Delta Select (Medikament),Deutschland

Natrium EDTA Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Natriummetabisulfit Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Neomycin Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Phenol

(Dimethylaminomethylphenol) Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Phenylephrin

(Phenylephrinhydrochlorid) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tobramycin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tobramycin (Medikament) Gernebcin, Infectopharm, Deutschland

Trapanal Altana Pharma, Deutschland

Vancomycin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Vancomycin (Medikament) Abbott GmbH, Deutschland

4.7 Pufferlösung

Krebs-Henseleit-Lösung (hergestellt aus den entsprechenden Substanzen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim und destilliertem Wasser)

	mM
NaCl	113,0
KCl	4,8
MgCl₂x6 H₂O	1,3
KH₂PO₄	1,2
NaHCO₃	25,0
CaCl₂	2,5
Glucose	5,7

Tab. 2.7-1 Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung

4.8 Geräte und Zubehör

Transducer	TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg
Verstärker	TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg
Multikanalschreiber	Rikadenki, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Einmalkanülen	Braun, Melsungen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Glasmaterialien	Schott, Mainz
Kunststoff-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich

4.9 Software

Excel 98 und XP	Microsoft Corporation, USA
Origin 3.5 und 5.0	Microcal, Northhampton, USA
Power-Point XP	Microsoft Corporation, USA
SPSS 10	SPSS Inc. Chicago, USA
Word 98 und XP	Microsoft Corporation, USA

5. Ergebnisse

Die untersuchten Stoffe werden im weiteren Verlauf einzeln dargestellt:

Medikamente:

- Tobramycin
- Vancomycin
- Metronidazol
- Imipenem/Cilastatin

Reinsubstanzen:

- Tobramycin
- Vancomycin
- Metronidazol
- Neomycin

Zusatzstoffe

(des Medikamentes Tobramycin):

- NaEDTA
- Natriummetabisulfit
- Phenol

5.1. Medikamente

5.1.1 Tobramycin

Das Medikament Tobramycin führt bei allen zur Präkontraktion verwendeten Substanzen zu einer signifikanten Relaxation. Wird mit Phenylephrin (5×10^{-8}) präkontrahiert erfolgt eine $38,3 \pm 24,5$ % Relaxation ($p=0,001$). Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung kommt es zu einer Relaxation um $18,3 \pm 5,9$ %. Diese ist nicht signifikant. Wird eine 40 mM KCl-Lösung zur Präkontraktion eingesetzt kommt es zu einer Relaxation von $35,6 \pm 38,4$ % ($p=0,05$).

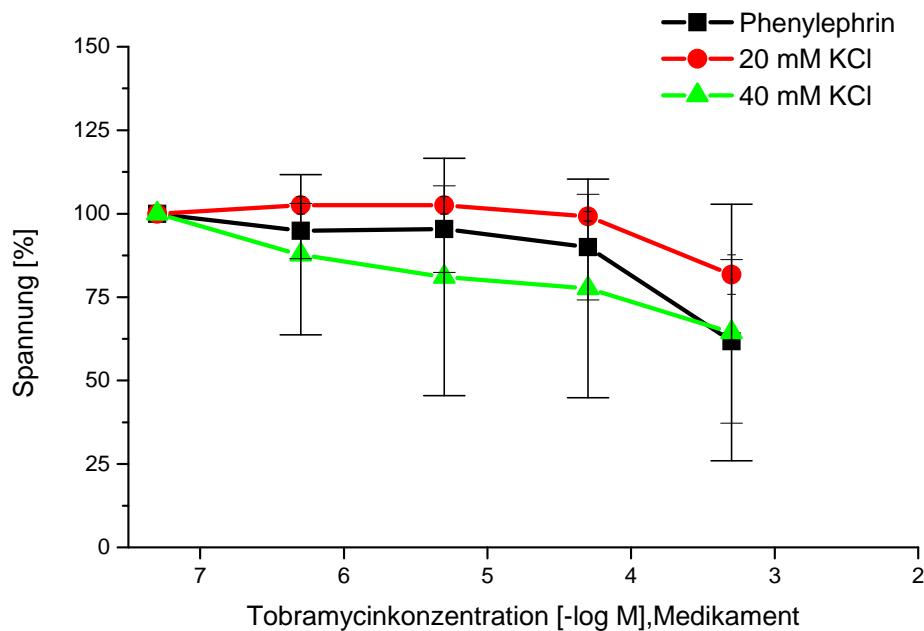


Abb. 5.1-1 Dosis-Wirkungskurve von Tobramycin (Medikament) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.1.2 Vancomycin

Das Medikament Vancomycin führt unter Verwendung von Phenylephrin (5×10^{-8}) zur Präkontraktion zu einer signifikanten Relaxation von $15,1 \pm 18,6 \%$ ($p=0,001$). Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung kommt es zu einer $19,7 \pm 26,2 \%$ Relaxation. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht. Eine Änderung des Gefäßtonus bei Verwendung einer 40 mM KCl-Lösung zur Präkontraktion konnte nicht nachgewiesen werden.

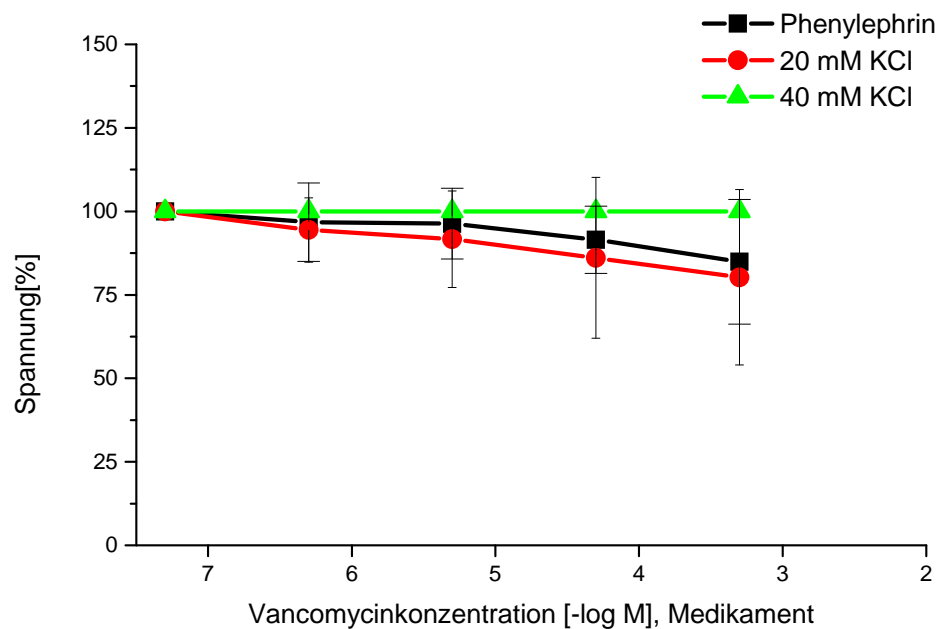


Abb. 5.1-2 Dosis-Wirkungskurve von Vancomycin (Medikament) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.1.3 Metronidazol

Wird Phenylephrin (5×10^{-8}) zur Präkontraktion eingesetzt, führt das Medikament Metronidazol zu einer signifikanten Relaxation von $11,09 \pm 27,59$ % ($p=0,001$). Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung erfolgt eine $16,7 \pm 18$ % Relaxation und bei einer 40 mM KCl-Lösung eine Relaxation von $7,9 \pm 10,6$ %. Der veränderte Gefäßtonus durch Metronidazol unter Verwendung der Kaliumchloridlösungen ist nicht signifikant.

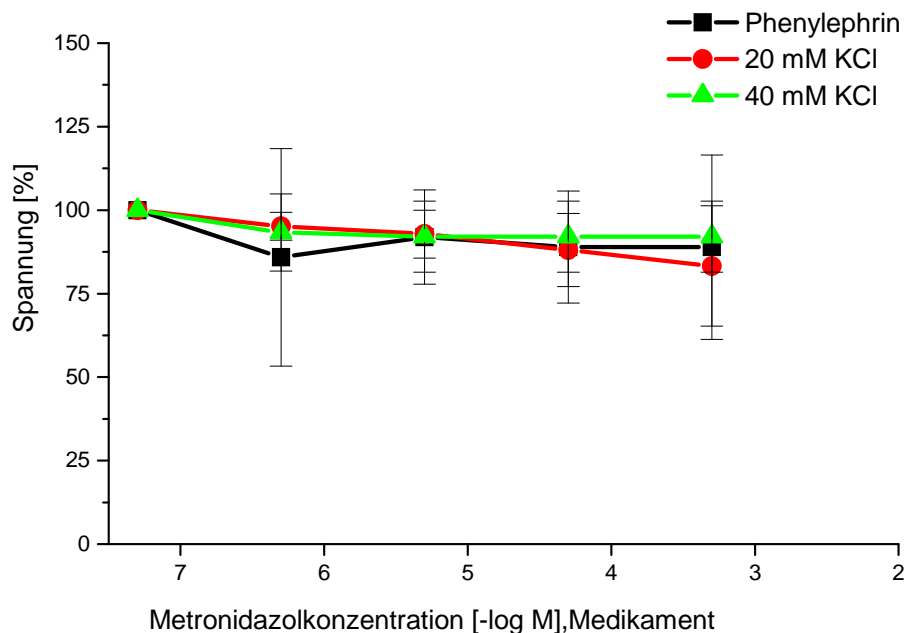


Abb. 5.1-3 Dosis-Wirkungskurve von Metronidazol (Medikament) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.1.4 Imipenem/Cilastatin

Wird mit Phenylephrin (5×10^{-8}) präkontrahiert erfolgt eine signifikante Relaxation des Gefäßtonus von $17,4 \pm 18,3 \%$ ($p=0,05$). Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung kommt es zu einer $3,03 \pm 8,5\%$ Relaxation und bei einer 40 mM KCl-Lösung zu einer Relaxation von $5,7 \pm 17,9 \%$. Diese nachgewiesenen Unterschiede des Gefäßtonus bei Verwendung der Kaliumchloridlösungen sind nicht signifikant.

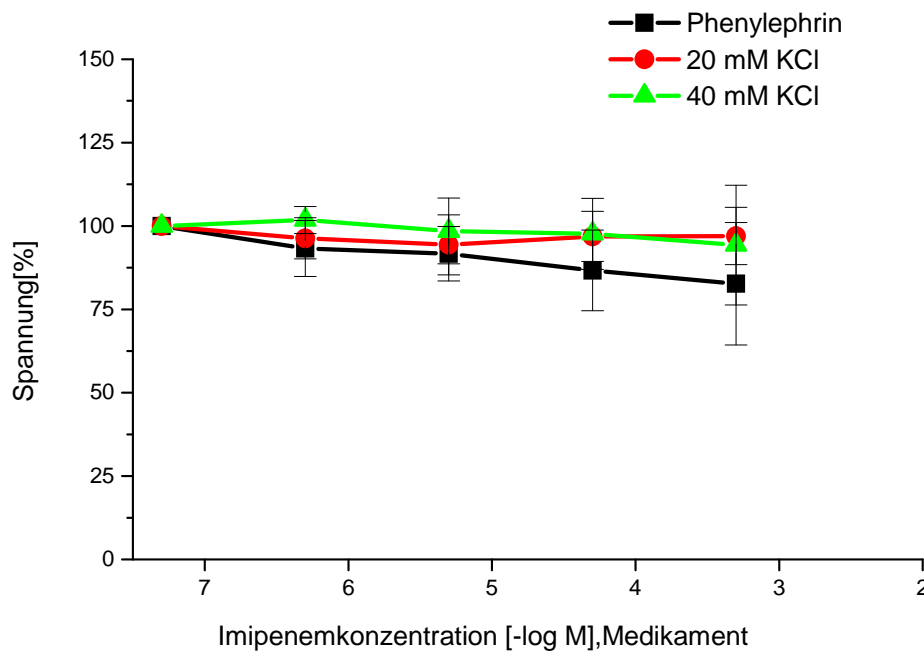


Abb. 5.1-4 Dosis-Wirkungskurve von Imipenem (Medikament) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.2 Reinsubstanzen

5.2.1 Tobramycin

Wird mit Phenylephrin (5×10^{-8}) präkontrahiert erfolgt durch die Reinsubstanz Tobramycin eine Relaxation um $33 \pm 23,2\%$ ($p=0,001$). Bei einer Präkontraktion mit den Kaliumchloridlösungen kann keine Veränderung im Gefäßtonus durch die Reinsubstanz von Tobramycin nachgewiesen werden.

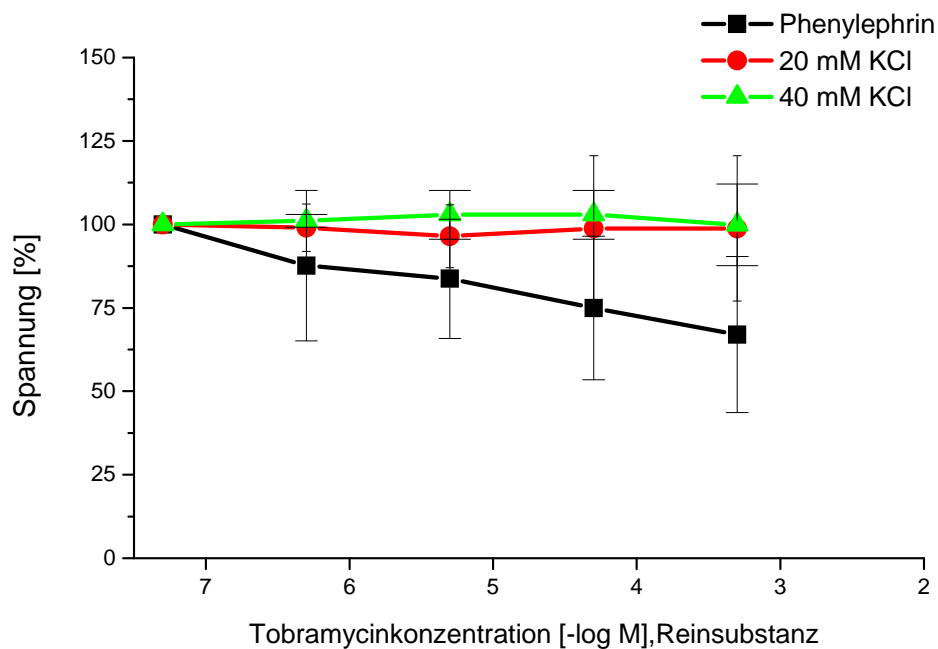


Abb. 5.2-1 Dosis-Wirkungskurve von Tobramycin (Reinsubstanz) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.2.2 Vancomycin

Die Reinsubstanz von Vancomycin führt bei Verwendung von Phenylephrin (5×10^{-8}) zur Präkontraktion zu einer signifikanten Relaxation von $28,7 \pm 22,6 \%$ ($p=0,01$). Bei Verwendungen der Kaliumchloridlösungen können keine Veränderungen im Gefäßtonus durch Vancomycin nachgewiesen werden.

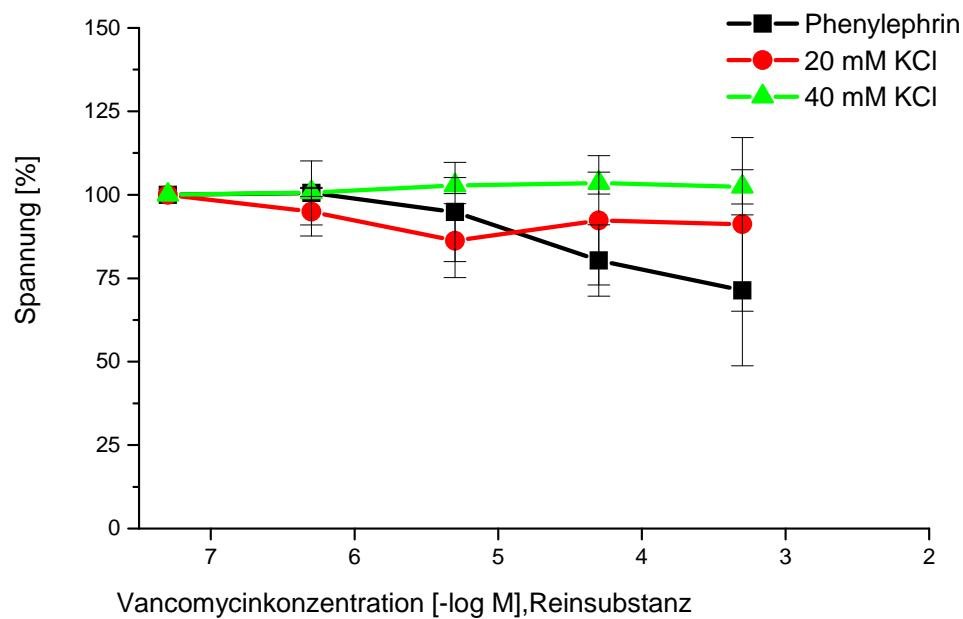


Abb. 5.2-2 Dosis-Wirkungskurve von Vancomycin (Reinsubstanz) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.2.3 Metronidazol

Wird mit Phenylephrin (5×10^{-8}) präkontrahiert erfolgt durch die Reinsubstanz Metronidazol eine Relaxation um $14,8 \pm 16,6\%$ ($p=0,05$). Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung kommt es zu einer Relaxation um $28,2 \pm 23,45\%$. Die Gefäßdilatation ist nicht signifikant. Bei einer Präkontraktion mit einer 40 mM KCl-Lösung konnten keine Veränderungen im Gefäßtonus durch Metronidazol nachgewiesen werden.

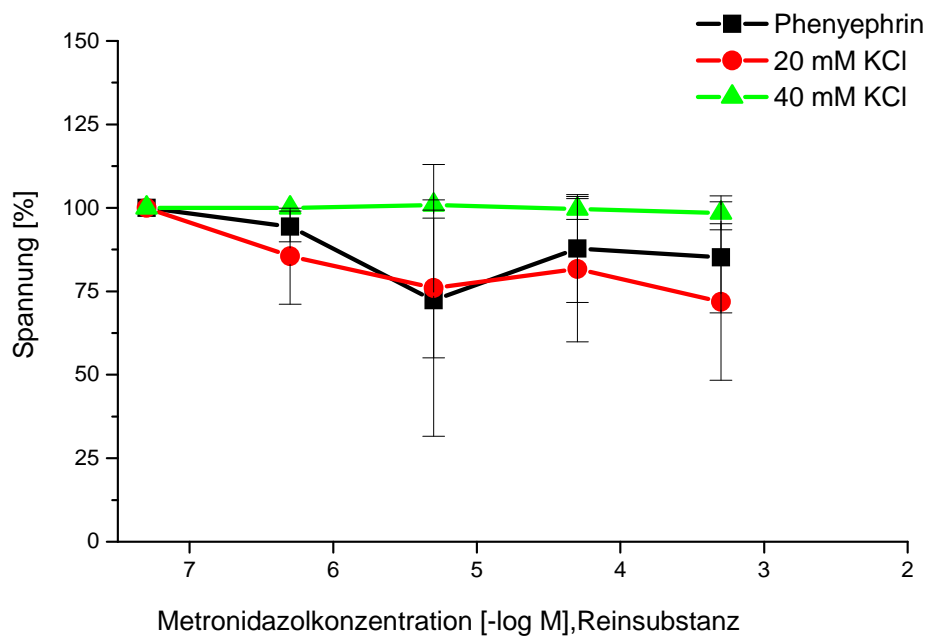


Abb. 5.2-3 Dosis-Wirkungskurve von Metronidazol (Reinsubstanz) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.2.4 Neomycin

Hierbei handelt es sich um einen Zusatzversuch, welcher die Frage beantworten sollte, wie verhält sich das Vergleichmedikament Neomycin.

Bei der Reinsubstanz von Neomycin diente Phenylephrin (5×10^{-8}) als Präkontraktor. Dabei kam es zu einer signifikanten Relaxation von $25,7 \pm 19,23 \%$ ($p=0,05$). KCL wurde nicht verwendet, da Neomycin nicht zu den 4 zu untersuchenden Antibiotika dieser Studie gehört.

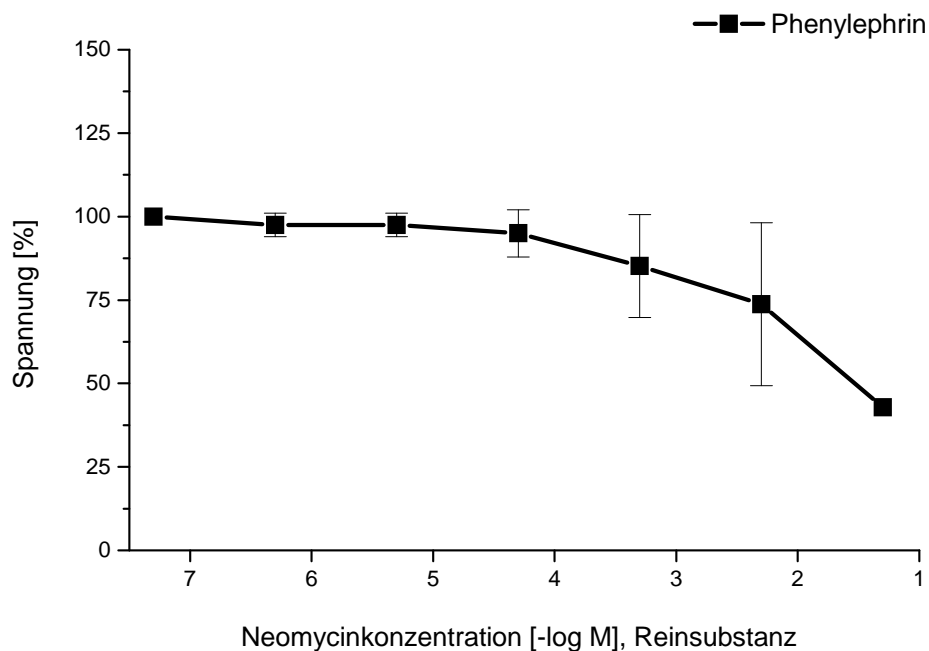


Abb. 5.2-4 Dosis-Wirkungskurve von Neomycin (Reinsubstanz) bis zur Konzentration $-\log M$ 1,3 mit dem Präkontraktor Phenylephrin (5×10^{-8}) (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.3 Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin

5.3.1 Natrium-EDTA

Die Testung des Zusatzstoffes Natrium-EDTA wurde mit Phenylephrin (5×10^{-8}) als Präkontraktor durchgeführt. Dieser Zusatzstoff führte zu einer $12,1 \pm 11,06$ % Relaxation ($p=0,01$) des Gefäßtonus. Natrium-EDTA ist ein Kalziumchelator, der Kalzium bindet. Hieraus resultiert eine Verschiebung des Kalziums von intrazellulär nach extrazellulär mit anschließender möglicher Relaxation. In diesem Experiment wurde gezeigt, dass Na-EDTA in der eingesetzten Konzentration und über den Zeitraum einem gering relaxierenden Effekt hat. In diesem Fall wurde auf die Vorgabe der niedrigen Stoffkonzentrationen verzichtet und direkt mit den beiden hohen Konzentrationen begonnen.

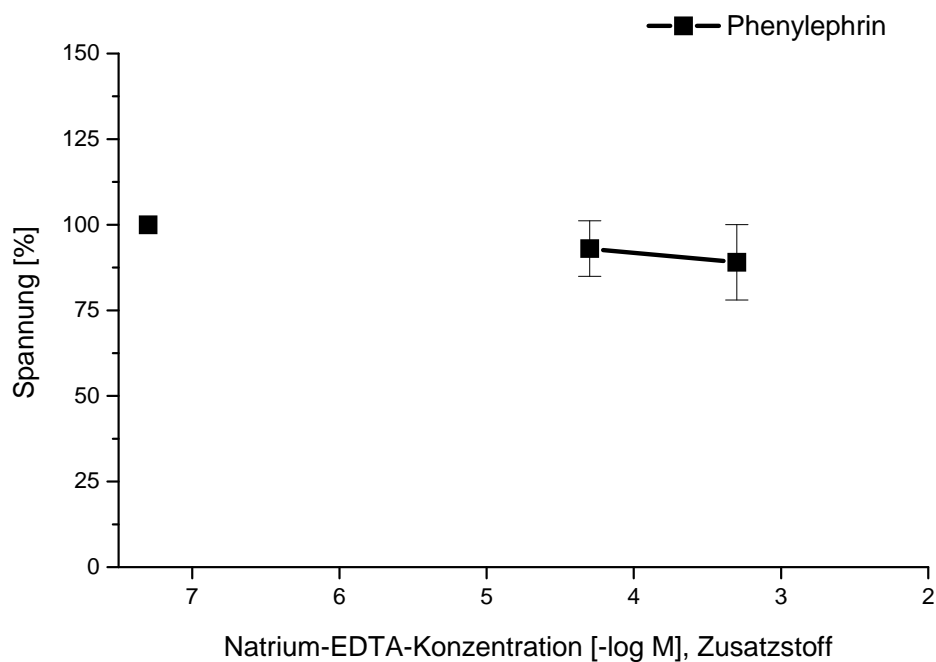


Abb. 5.3-1 Dosis-Wirkungskurve von Na-EDTA (Zusatzstoff des Tobramycins) bei den Konzentrationen von $-\log M$ 4,3 und 3,3 mit dem Präkontraktor Phenylephrin (5×10^{-8}) (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.3.2 Natriummetabisulfit

Zur Testung des Zusatzstoffes Natriummetabisulfit wurde mit Phenylephrin (5×10^{-8}) und 40 mM KCl präkontrahiert. Wurde mit Phenylephrin präkontrahiert erfolgte durch den Zusatzstoff keine Gefäßdilataion. Bei einer Präkontraktion mit 40 mM KCl-Lösung kommt es zu einer Relaxation von $8,55 \pm 6,78 \%$ ($p=0,01$).

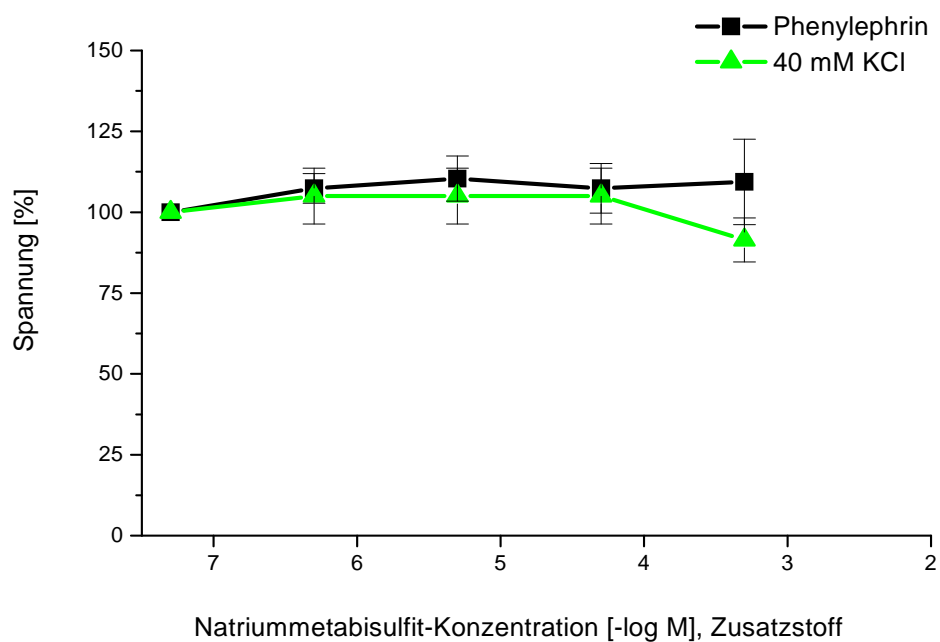


Abb. 5.3-2 Dosis-Wirkungskurve von Natriummetabisulfit (Zusatzstoff des Tobramycins) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}) und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.3.3 Phenol

Der Zusatzstoff Phenol führte zu einer signifikanten Relaxation von $22,7 \pm 26,9$ % bei einer Präkontraktion mit Phenylephrin (5×10^{-8}) ($p=0,001$). Wurde mit 40 mM KCL präkontrahiert zeigten sich keine signifikanten Gefäßtonusveränderungen.

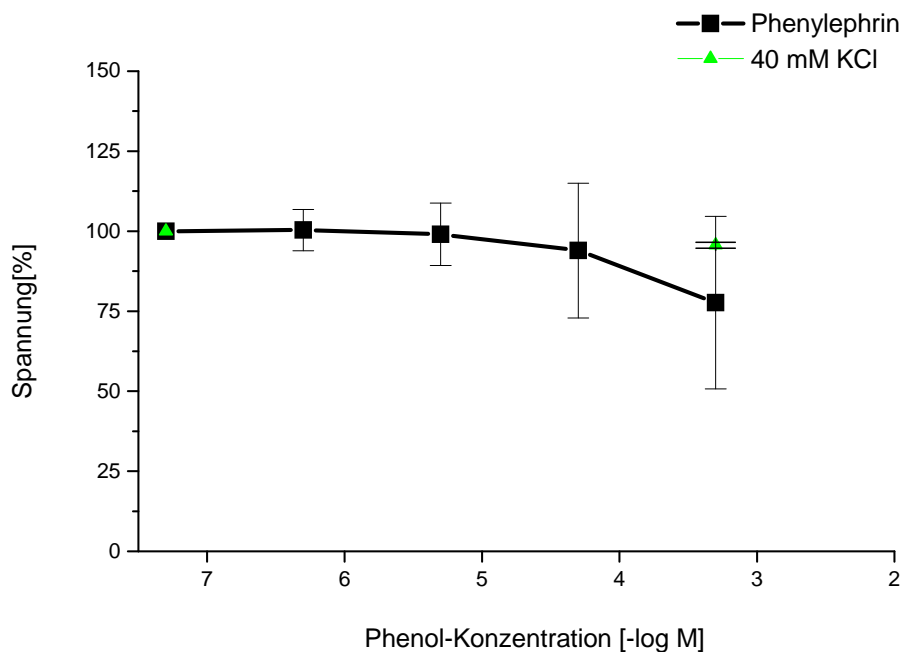


Abb. 5.3-3 Dosis-Wirkungskurve von Phenol (Zusatzstoff des Tobramycins) mit den Präkontraktoren Phenylephrin (5×10^{-8}) und 40 mM KCl (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5.4 Medikamente und Reinsubstanzen ohne Vorkontraktion

Wurde auf die Präkontraktion, entweder mit Phenylephrin (5×10^{-8}), 20 mM KCl oder 40 mM KCl, verzichtet so war weder bei den Medikamenten noch bei den Reinsubstanzen ein Effekt zu verzeichnen. Die Präkontraktion diente in den anderen Versuchen dazu Effekte besser zu sehen.

5.5 Vergleich Medikamente – Reinsubstanz – Zusatzstoffe

Relaxation in % bei Stoffkonzentration von 3,3 (-log M)						
	Tobramycin (Medikament) (Mittelwert± Standardabweichung)	Signifikanz	Tobramycin (Reinsubstanz)	Signifikanz	Signifikanz Vergleich-Medikament- Reinsubstanz	
Phenylephrin	38,3±24,4	0,0001	33±23,3	0,00005	0,05	
20mM KCl	18,3±5,9	-	1,2±21,8	-	-	
40mM KCl	35,6±38,46	0,018	0,14±12,21	-	-	
	Na-EDTA (Zusatzstoff Tobramycin)	Signifikanz	Na-metabi sulfid	Signifikanz	Phenol (Zus.Tobr.)	Signifikanz
Phenylephrin	12,1±11,06	0,0011	(-9,4±13,2)	-	22,7±26,9	0,00002
20mM KCl	-	-	-	-	-	-
40mM KCl	-	-	8,55±6,78	0,007	4,4±0,9	-
	Vancomycin (Medikament)	Signifikanz	Vancomycin (Reinsubstanz)	Signifikanz	Signifikanz Vergleich Medikament- Reinsubstanz	
Phenylephrin	15,1±18,6	0,0009	28,7±22,6	0,0006	-	
20mM KCl	19,7±26,2	-	8,9±26,0	0,018	-	
40mM KCl	0,0±0,0	-	(-2,4±5,1)	-	-	
	Metronidazol (Medikament)	Signifikanz	Metronidazol (Reinsubstanz)	Signifikanz	Signifikanz Vergleich Medikament- Reinsubstanz	
Phenyle.	11,1±27,6	0,0009	14,8±16,6	0,05	-	
20mM KCl	16,7±18,0	-	28,17±23,5	-	-	
40mM KCl	7,9±10,6	-	1,5±5,07	-	0,05	

Tab. 5.5-1 Vergleich der Ergebnisse zwischen den Medikamenten, ihren Reinsubstanzen und Zusatzstoffen mit Angabe der Signifikanzen. (Mittelwert ± Standardabweichung)

Wurde Phenylephrin zur Präkontraktion der Aorta eingesetzt, kam es bei allen Medikamenten und Reinsubstanzen sowie bei den Zusatzstoffen von Tobramycin (Natrium-EDTA und Phenol) zu einer nachweisbaren, signifikanten Dilatation der Aorta. Bei Verwendung der Kaliumchloridlösungen konnten ebenfalls Veränderungen im Gefäßtonus durch die verschiedenen Stoffe nachgewiesen werden. Ein signifikanter Nachweis gelang aber nur bei dem Medikament Tobramycin sowie bei Natriummetabisulfit. Der Vergleich der Relaxation durch das Medikament und der Reinsubstanz Tobramycin zeigte signifikante Unterschiede. Ebenso führen die untersuchten Zusatzstoffe selbst zu einer signifikanten Dilatation der präkontrahierten Gefäße. Auch wenn bei dem Medikament und der Reinsubstanz von Metronidazol keine signifikanten Gefäßdilatationen nachgewiesen werden konnten, so zeigt sich doch ein signifikanter Unterschied der Gefäßweitstellung im Vergleich.

6. Diskussion

Bisher wurde der Einfluss von Antibiotika auf die Muskulatur überwiegend an der Skelettmuskulatur und weniger an der glatten Muskulatur untersucht. So weisen mehrere Studien eine relaxierende Wirkung der Aminoglykosid-Antibiotika auf die Skelettmuskulatur nach [Ahdal et al., Sokoll et al., Dupuis et al.]. Weiterhin zeigte sich, dass Stoffe, die die Kontraktion der Skelettmuskulatur beeinflussen, auch einen Effekt auf die glatte Muskulatur ausüben. Ein Beispiel hierfür sind die Muskelrelaxanzien. Sie beeinflussen nicotinerge und muscarinerge Rezeptoren der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur [Hou et al., Hashimoto et al., Shibata et al., Zappi et al., Nagtegaal et al.]. Goodman et al. untersuchte den Einfluss von Neomycin, Kanamycin und Gentamycin auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur von Blutgefäßen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen dass diese Antibiotika die kontraktile Antwort der Gefäße hemmen. Der Einfluss der Aminoglykoside auf die glatte Muskulatur wurde auch im Zusammenhang mit Gefäßspasmen der Arterien des Gehirnes von Hunden erforscht [Gergawy et al.].

Die Studie zeigte das Aminoglycoside (Gentamycin, Neomycin, Kanamycin) die durch ET-1 induzierte verlängerte Vasokonstriktion unterdrücken können. Dieser Effekt ist teilweise zu erklären durch die Hemmung der Proteinkinase C [Wickman et al.]. Streptomycin wurde auch bezüglich seiner Wirkung auf cerebrale Gefäße der Ratte untersucht. Es hemmt den Muskeltonus und die isometrische Kraft durch Blockade der L-Typ-Kalziumkanäle [Miller et al.].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von verschiedenen Antibiotika: Tobramycin, Vancomycin, Imipenem, Metronidazol und Neomycin, unter Berücksichtigung verschiedener Präkontraktoren (Phenylephrin, Kaliumchloridlösungen), auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur untersucht. Neomycin diente als Referenzsubstanz, weil es als einziges Antibiotikum bereits untersucht worden ist. Zusätzlich wurde eine differenzierte Betrachtung zwischen den Medikamenten, den Reinsubstanzen sowie einigen Zusatzstoffen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass alle getesteten Medikamente, Reinsubstanzen und Zusatzstoffe Einfluss auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) aufweisen und über diesen Weg zu einer Vasodilatation führen können. Hervorzuheben ist das Imipenem und die Reinsubstanz von Tobramycin, welche ausschließlich über die Phosphatidylinositolkaskade den Gefäßtonus beeinflussen. Alle anderen Substanzen zeigen auch einen vasodilatativen Effekt auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle). Dies spricht dafür dass diese Substanzen in den intrazellulären Kalziumhaushalt oder den eigentlichen intrazellulären

Kontraktionsmechanismus eingreifen. Bei dem Medikament Tobramycin scheinen auch die Zusatzstoffe vasodilatative Eigenschaften aufzuweisen. Bei keiner der getesteten Substanzen kam es zu einer Vollrelaxation obwohl hohe Stoffkonzentrationen eingesetzt wurden.

6.1. Diskussion der Methoden

Von der Auswahl und Präparation der Gefäße bis zum eigentlichen Studienergebnis wurde eine Vielzahl von Arbeitsschritten durchlaufen. Jeder Arbeitsschritt kann mögliche Störfaktoren oder Probleme beinhalten, die im weiteren Verlauf angesprochen werden sollen.

Präparat: In der vorliegenden Arbeit wurde die Aorta von Ratten verwendet. Bei diesem Präparat handelt es sich um ein großes Gefäß, welches ideal dazu geeignet ist Kontraktionen oder Gefäßdilatationen messtechnisch exakt zu erfassen. Die Aorta gehört jedoch nicht in die Gruppe der Widerstandsgefäße (terminale Arterienäste und Arteriolen). Es sind die Widerstandsgefäße, die eine wichtige Rolle im septischen Geschehen spielen. Der Verlust des Gefäßtonus der Widerstandsgefäße ist ein relevanter Faktor für das Schockgeschehen im Zuge einer Sepsis. Wünschenswert wäre es, Aussagen nicht über das Verhalten der Aorta, sondern über das der Widerstandsgefäße treffen zu können. Ein weiterer möglicher relevanter Einflussfaktor ist das unterschiedliche Verhalten der Gefäße aus unterschiedlichen Gebieten. So reagieren die kardialen Gefäße nur in sehr geringem Ausmaß auf α -adrenerge Stimulation, wohingegen Gefäße aus dem Darm sehr stark auf α -Stimulation reagieren. Die verschiedenen Rezeptortypen wie z.B. α_1 - und β_2 -Rezeptoren sind in unterschiedlicher Dichte an den verschiedenen Gefäßsystemen verteilt [Klinke/Silbernagel]. Aus experimentellen Gründen ist es nicht möglich eine Untersuchung des Systems der Widerstandsgefäße durchzuführen. Möglicherweise könnten neue Versuchsanordnungen wie z.B. die Intravitalmikroskopie in Zukunft hierüber Aufschluss geben.

Präkontraktoren: Die Präkontraktion der Aorta erfolgte entweder mit Phenylephrin oder mit Kaliumchlorid. Kaliumchlorid wurde in der vorliegenden Versuchsreihe verwendet um einen eventuellen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle) zu untersuchen. Phenylephrin wurde als ideales α -Sympathomimetikum eingesetzt, welches Einfluss auf das Rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) nimmt. Durch den Einsatz von Kaliumchlorid oder Phenylephrin kann spezifisch der Einfluss der Testsubstanzen auf die verschiedenen Systeme nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Antibiotika keinen

Einfluss auf den Gefäßtonus ausüben, wenn die Präkontraktion nicht durchgeführt wurde. Somit ist der Gefäßtonus für die Wirkung der verschiedenen Substanzen ein wichtiger Einflussfaktor. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Antibiotikagabe zeitgleich über einen Schreiber erfasst. Nach dem für einige Minuten keine weitere Veränderung messbar war, wurde die Dosis gesteigert.

Beim Menschen werden Antibiotika während einer Infektion über mehrere Tage ggf. über Wochen appliziert. Somit wäre es wichtig zu untersuchen, ob ein Einfluss auf den Gefäßtonus vorliegt, wenn die Aortenpräparationen über mehrere Stunden (6-24 h ggf. länger) mit Antibiotika inkubiert werden. Berücksichtigt werden sollte die ursprüngliche Vitalität der einzelnen Muskelzellen der Aorta. Möglicherweise könnte diese in der Ersatzlösung über einen längeren Zeitraum nicht zu 100% gewährleistet werden. Es käme auch ohne Zugabe weiterer Substanzen zu einem Verlust der Gefäßspannung. Um Aussagen hierfür treffen zu können, wäre eine neue Studienreihe erforderlich.

6.2. Antibiotika

6.2.1. Tobramycin (Aminoglykosid-Antibiotikum)

Tobramycin zählt zu den Aminoglykosiden. Für Aminoglykoside wurde bereits in mehreren Studien ein relaxierender Effekt auf die Skelettmuskulatur beschrieben. [Ahdal et al., Sokoll et al., Dupuis et al.]. Die Mechanismen blieben unklar. Der Einfluss von Aminoglykosiden (Neomycin, Kanamycin, Gentamycin) auf die glatte Gefäßmuskulatur von nicht menschlichen Primaten war Gegenstand der Forschung von Goodman et al. Es zeigte sich, dass die genannten Aminoglykoside die kontraktile Muskelantwort hemmen. Der Einfluss der Aminoglykoside auf die glatte Muskulatur wurde auch im Zusammenhang mit Gefäßspasmen der Arterien des Gehirnes von Hunden untersucht. Gergawy et al. schlussfolgerte, dass die Effekte der Aminoglykoside möglicherweise über verschiedene Mechanismen ablaufen. Dazu gehören die Hemmung der Phospholipase C, das Verhindern des intrazellulären Kalziumausstoßes und der Einfluss auf den Prozess der Kalziumansammlung.

In der vorliegenden Arbeit zeigte das Medikament Tobramycin eine signifikante Relaxation unter Verwendung von Phenylephrin oder 40 mM KCl zur Präkontraktion. Bei einer Präkontraktion mit einer 20 mM KCl-Lösung kommt es zu einer Relaxation um $18,3 \pm 5,9$ %. Diese ist nicht signifikant. Die Reinsubstanz von Tobramycin erzeugte eine signifikante Relaxation, wenn mit Phenylephrin präkontrahiert wurde, wohingegen bei Präkontraktion mit

Kaliumchlorid kein signifikanter Effekt nachweisbar war. Da sich unterschiedliche Ergebnisse des Medikamentes und der Reinsubstanz ergaben, wurden die Zusatzstoffe, die sich in der Injektionslösung des Medikamentes Tobramycin befanden, untersucht. Getestet wurden die Zusatzstoffe Phenol, Natriummetabisulfit und Natrium-EDTA, Sowohl das Medikament als auch die Reinsubstanz selbst zeigten statistisch signifikante vasodilatierende Eigenschaften wenn als Präkontraktor Phenylephrin verwendet wurde. Hierbei ist der vasodilatative Effekt des Medikamentes signifikant größer als der der Reinsubstanz ($p=0,05$).

Dementsprechend wurde eine eigenständige Vasodilatation durch die Zusatzstoffe NaEDTA ($p=0,01$) und Phenol ($p=0,001$) bei Verwendung von Phenylephrin als Präkontraktor nachgewiesen. Es zeigte sich aber kein Einfluß dieser Zusatzstoffe auf die mit Kaliumchlorid kontrahierten Arterien. Wurde Kaliumchlorid als Präkontraktor eingesetzt, konnte nur bei dem Medikament Tobramycin eine signifikante Vasodilatation nachgewiesen werden ($p=0,05$), während dieser Effekt bei der Reinsubstanz nicht beobachtet werden konnte. Der Zusatzstoff Natriummetabisulfit zeigt unter Verwendung von 40 mM KCl als Präkontraktor eine signifikante Vasodilatation ($p=0,01$). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Summationseffekt vorliegt und die Zusatzstoffe selbst eine Verstärkung der vasodilatativen Eigenschaften des Medikamentes durch unterschiedliche Mechanismen hervorrufen. Zusammenfassend ergibt sich, dass das Medikament Tobramycin einen signifikanten Einfluss sowohl auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade), als auch auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle) ausübt. Möglicherweise spielen auch andere Mechanismen eine Rolle. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der Reinsubstanz von Tobramycin, welches nur über das Rezeptorvermittelte System zu einer Relaxierung der Gefäße führt. Dies zeigt die Bedeutung der Zusatzstoffe des Medikamentes, die selbständig eine Veränderung des Gefäßtonus hervorrufen.

6.2.2. Vancomycin (Glykopeptidantibiotikum)

Zurzeit liegen noch keine Studien vor, die den Einfluß von Vancomycin oder Substanzen aus der gleichen Stoffgruppe auf den Tonus der Gefäßmuskulatur untersucht haben. Bei Testung des Medikamentes Vancomycin zeigte sich nur bei Präkontraktion mit Phenylephrin eine signifikante Vasodilatation. Wurde Kaliumchlorid als Präkontraktor eingesetzt, unabhängig seiner Konzentration, konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Testung der Reinsubstanz beobachtet werden. Werden die Ergebnisse der Reinsubstanz mit denen des Medikamentes verglichen, so zeigen sich weder Unterschiede bei Verwendung der verschiedenen Präkontraktoren, noch zeigen sich

Unterschiede im Grad der Relaxation. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Reinsubstanz Vancomycin selbst einen vasodilatativen Effekt über das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) aufweist. Die Zusatzstoffe scheinen keinen Einfluss auf den Gefäßtonus auszuüben.

6.2.3. Metronidazol (Nitroimidazol-Derivat)

Bisher liegen noch keine Studien vor, die sich mit dem Einfluß von Metronidazol oder Substanzen aus der gleichen Stoffgruppe auf den Tonus der Gefäßmuskulatur beschäftigt haben. Metronidazol wurde als Medikament und als Reinsubstanz getestet. Sowohl das Medikament Metronidazol als auch seine Reinsubstanz zeigte bei der Präkontraktion mit Phenylephrin eine signifikante Vasodilatation der Aorta.

Beim Vergleich zwischen der Reinsubstanz und dem Medikament zeigen sich bei der Präkontraktion durch Phenylephrin keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man aber die relaxierende Eigenschaft der Stoffe bzw. Stoffgemische bei der Präkontraktion durch die 40 mM KCl-Lösung, so lässt sich bei dem Medikament eine signifikant stärkere Vasodilatation nachweisen, als bei der Reinsubstanz ($p = 0,05$). Dies zeigt, dass die Zusatzstoffe die im Medikament Metronidazol enthalten sind ebenfalls einen relaxierenden Einfluss auf die Aorta ausüben. Hier scheint der Einfluss auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle) vorzuliegen. Werden die Ergebnisse zusammengefasst, zeigt es sich, dass der Einfluss von Metronidazol nicht ausschließlich auf die Signalübertragung des rezeptorvermittelten System (Phosphatidylinositolkaskade) beschränkt ist, sondern auch auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle).

6.2.4. Imipenem (β -Lactam-Antibiotikum)

Zum momentanen Zeitpunkt liegen noch keine Studien vor, die den Einfluß von Imipenem oder Substanzen aus der gleichen Stoffgruppe auf den Tonus der Gefäßmuskulatur untersucht haben. Bei Imipenem konnte nur das Medikament untersucht werden. Die Reinsubstanz war zum Zeitpunkt der laufenden Versuche nicht erhältlich. Mit Phenylephrin als Präkontraktor kam es zu einer signifikanten Vasodilatation ($p=0,05$) in einem Größenbereich von $17,4 \pm 18,3$ %. Wurde als Präkontraktor eine Kaliumchloridlösung eingesetzt, wurden keine Veränderungen im Gefäßtonus beobachtet. Bei der 20 mM KCl-Lösung lagen die Messergebnisse um $3,3 \pm 8,8$ %, bei 40 mM KCl um $5,7 \pm 8,8$ %. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Imipenem ausschließlich das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) beeinflusst. Dies könnte die Schritte von der Rezeptorbindung

bis zur Freisetzung des intrazellulären Kalziums aus dem sarkoplasmatischen Retikulum betreffen. Würde Imipenem den eigentlichen Kontraktions- oder Relaxationsmechanismus intrazellulär beeinflussen, die Schritte von der Bindung von Kalzium an Calmodulin bis zur Dephosphorylierung des Myosins durch die Myosinleichtkettenphosphatase, müssten Tendenzen zur Relaxation auch bei einer Präkontraktion von Kaliumchlorid nachweisbar sein. Denn auch bei der elektromechanischen Kopplung (Kaliumkanäle) läuft die Kontraktion über die Bindung von Kalzium an Calmodulin und die Relaxation über die Dephosphorylierung des Myosins.

6.2.5. Neomycin (Aminoglykosid-Antibiotikum)

Neomycin gehört wie Tobramycin zu der Gruppe der Aminoglykoside. Goodman et al. wies die relaxierende Eigenschaft dieses Antibiotikums auf Gefäße von Primaten nach, während Gergawy einen vasodilatativen Effekt auf Hirnarterien von Hunden nachwies. In dieser Arbeit wurde Neomycin als Reinsubstanz an der Rattenaorta getestet. Es zeigte sich unter einer Präkontraktion mit Phenylephrin eine signifikante Relaxation von $25,7 \pm 19,23 \%$ ($p=0,05$). Dieser Befund entspricht den Ergebnissen aus der vorliegenden Literatur und zeigt den Einfluss dieser Substanz auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade).

6.3. Mögliche Mechanismen der Relaxation

6.3.1. Rezeptorvermitteltes System (Phosphatidylinositolkaskade)

Phenylephrin gehört zu der Gruppe der $\alpha 1$ - Sympathomimetika. Die $\alpha 1$ -Rezeptoren sind an der Oberfläche der glatten Muskelzellen ubiquitär vorhanden und werden durch Phenylephrin stimuliert. Neuronale Reizung oder pharmakologische Beeinflussung der glatten Muskulatur wird über die Phosphatidylinositolkaskade vermittelt. Die Aktivierung eines $\alpha 1$ -Rezeptors der glatten Gefäßmuskelzelle durch Phenylephrin bewirkt eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C, die das Arachidonsäurederivat Phosphatidylinositol-4,5.bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ öffnet Kalziumkanäle in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Dieses Kalzium bildet mit Calmodulin einen Komplex, welcher die Myosinleichtkettenkinase aktiviert und somit über weitere Zwischenschritte eine Kontraktion durch die Interaktionen zwischen Aktin und Myosin hervorruft. Hierbei stellt das intrazelluläre Kalzium aus dem sakoplasmatischem Retikulum für die Zelle einen „begrenzten“ Vorrat dar [Rembold et al.].

6.3.2. Antibiotika und das Rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade)

Diese Studie zeigt, dass sowohl alle Medikamente, also auch ihre Reinsubstanzen sowie die Zusatzstoffe Na-EDTA und Phenol zu einer signifikanten Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen, wenn als Präkontraktor Phenylephrin eingesetzt wurde. Diese Effekte könnten durch die Einflussnahme der verschiedenen Substanzen auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) auf verschiedenen Ebenen, von der Stimulation bis zur eigentlichen Kontraktion, hervorgerufen werden. Der genaue Mechanismus der Vasodilatation durch die Antibiotika ist zurzeit noch unklar. In Betracht käme, dass die hier eingesetzten Substanzen einen kompetitiven Antagonisten des Phenylephrins am α 1-Rezeptor darstellen und somit zur Dilatation führen. Prinzipiell kann jedoch jeder Reaktionsschritt, von der Rezeptoraktivierung bis zur Interaktion zwischen Aktin und Myosin beeinflusst werden. Gergawy et al. vermuten eine Hemmung der Phospholipase C. Es wäre auch möglich, dass die verschiedenen Stoffe, die Freisetzung des Kalziums aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, durch Blockade der Rezeptoren oder durch die Blockade der Kalziumkanäle selbst, beeinflussen.

6.3.3. Die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle)

Diskutiert werden muss, ob der Präkontraktor Kaliumchlorid einen Einfluss auf die Wirkung der danach gegebenen Antibiotika hat. Deshalb wurden unterschiedliche Kaliumchloridkonzentrationen als Präkontraktor verwendet. Die normale Ionenkonzentration von Kalium beträgt in vivo extrazellulär ca. 4 mM und intrazellulär ca. 160 mM. Das Membranpotential der arteriellen glatten Muskelzellen, welches durch die Kaliumkanäle reguliert wird, ist ein wichtiger Modulator des arteriellen Tonus und damit des Durchmessers von Arterien. Werden Kaliumkanäle in der Zellmembran der arteriellen Muskelzelle geöffnet kommt es entlang des Konzentrationsgefälles zum Ausstrom von Kalium von intrazellulär nach extrazellulär. Eine Hyperpolarisation des Membranpotentials ist die Folge. Durch diese Hyperpolarisation schließen sich die spannungsabhängigen Kalziumkanäle, es kommt zur Vasodilatation durch eine Verminderung des Kalziumeinstroms [Nelson et al.]. Wenn nun von außen Kaliumchlorid hinzu gegeben wird, steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration. Darüber ändert sich das Ionengleichgewicht, was nun zum Einstrom von Kalium in die Zelle führt um das Gleichgewicht wiederherzustellen. Dies geschieht durch einen aktiven Carriertransport gegen den Konzentrationsgradienten. Das Membranpotential wird innen weniger negativ, also positiver. Wenn ein kritischer Wert überschritten wird, werden die spannungsabhängigen

Kalziumkanäle geöffnet. Es folgt, zusätzlich zur Freisetzung des Kalziums aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, ein Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle, dies führt wiederum zur Kontraktion. Bei diesem Mechanismus liegt während der Kontraktion eine deutlich höhere Kalziumkonzentration intrazellulär vor als bei der rezeptorvermittelten Kontraktion. Das Kalzium aus dem extrazellulären Raum kann als „unbegrenzter“ Vorrat betrachtet werden.

6.3.4. Der Einfluss von Antibiotika auf Kaliumkanäle

Es zeigte sich, dass Aortenringe, welche mit einer hochkonzentrierten Kaliumchloridlösung präkontrahiert wurden, schlechter relaxierten, als Aortenringe, welche mit einer niedrig konzentrierten Kaliumchloridlösung präkontrahiert wurden. Nelson et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Höhe der Kaliumkonzentration und somit der transmembranale Konzentrationsgradient des Kaliums zwischen intra- und extrazellulär, ein wichtiger Einflussfaktor für die Kontraktion der glatten Muskelzelle ist. Wird extrazelluläre die Kaliumkonzentration erhöht kommt es durch den Versuch der Muskelzelle, mittels eines aktiven Carriertransportes den Ausgangsgradienten zwischen intra- und extrazellulär wieder herzustellen, zur Kontraktion der Zelle. Werden Metronidazol oder Vancomycin hinzu gegeben, beobachtet man eine Vasodilatation bei der Präkontraktion mit der niedrigeren 20mM Kaliumchloridlösung. Bei einer Präkontraktion mit 40mM Kaliumchlorid kann keine Vasodilatation nachgewiesen werden. Erklärbar wäre dieser Effekt in der Annahme dass die getesteten Antibiotika zu einer Öffnung der schnellen Kaliumkanäle führen. Kalium würde sich passiv in Richtung des Konzentrationsgradienten bewegen. Wird die Aorta durch eine 20 mM Kaliumchloridlösung präkontrahiert, so wird durch das Öffnen der Kanäle das Kalium von intrazellulär (Ort der hohen Kaliumkonzentration) nach extrazellulär (Ort der niedrigen Kaliumkonzentration) fließen. Es kommt zur Hyperpolarisation und somit zur Vasodilatation. Erhöht man die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf 40 mM so ändert sich der Flussgradient. Kalium fließt von extrazellulär nach intrazellulär, die Muskelzelle bleibt depolarisiert, die Muskelkontraktion bleibt bestehen.

Effekte von K^+ -Kanalöffnern (Beispiel Pinacidil)

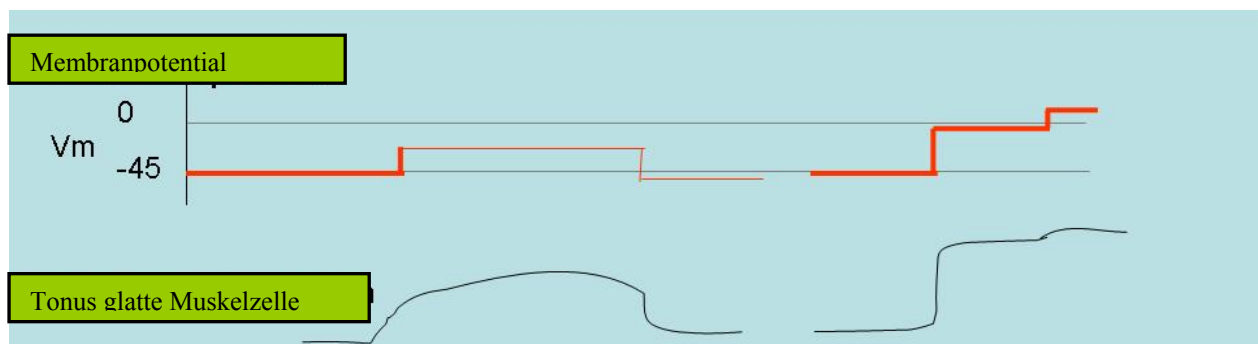
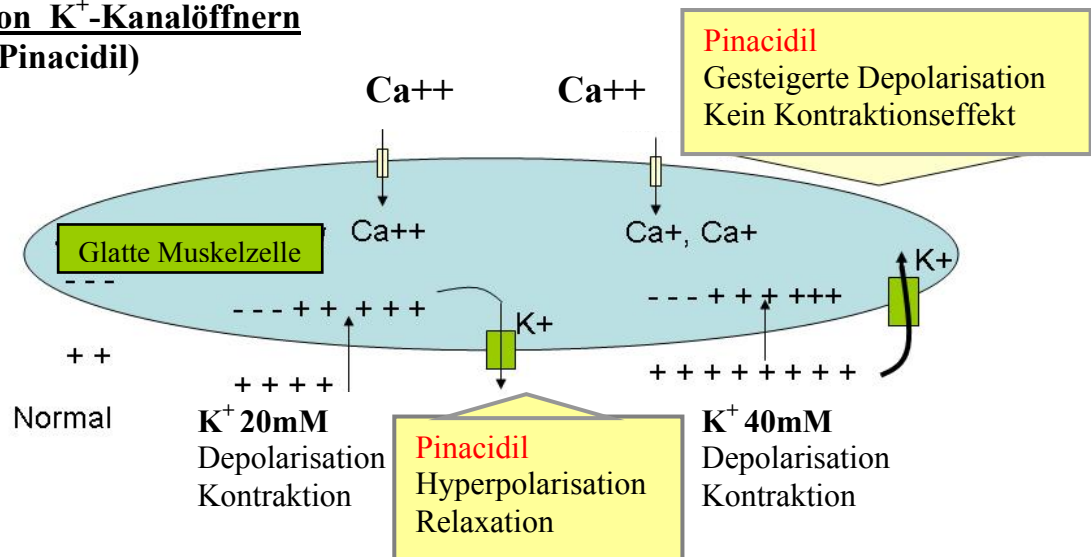


Abb. 6.1. Darstellung der Effekte eines Kaliumkanalöffners (am Beispiel von Pinacidil) auf den Kaliumgradienten, das Membranpotential und die Muskelspannung unter Verwendung von 20 mM und 40 mM Kaliumchlorid zur Präkontraktion (Modifiziert nach Pavlovic).

Die Möglichkeit der Existenz von Kaliumkanalöffnern würde das Relaxationsverhalten von Vancomycin und Metronidazol erklären, jedoch kann es keine Erklärung für das Relaxationsverhalten von Tobramycin und seinem Zusatzstoff Natriummetabisulfit geben. Diese beiden Substanzen führen zu einer stärkeren Vasodilatation bei einer Präkontraktion mit 40 mM Kaliumchlorid im Vergleich zu 20 mM Kaliumchlorid. Ob diese Substanzen möglicherweise zu einer Blockierung der Kaliumkanäle führen und somit es durch die Unterbrechung der Depolarisation zur Vasodilatation kommt, bleibt unklar. Es wäre denkbar, dass bei einer stärkeren Präkontraktion mit 40 mM Kaliumchlorid der vasodilatative Effekt deutlicher ist, als bei einer Präkontraktion mit 20 mM Kaliumchlorid.

6.3.5. Weitere Mechanismen

Eine Vielzahl von Mechanismen und intrazellulären Systemen üben einen Einfluss auf den Tonus der Gefäße aus. Im Folgenden werden diese beschrieben, da sie ebenfalls durch die verschiedenen Substanzen beeinflusst werden können. Es bedarf aber weiterer Studien, um differenzierte Aussagen über den möglichen Einfluss der Antibiotika auf diese zellulären Mechanismen machen zu können.

6.3.5.1. Kalzium und der intrazelluläre Kontraktionsmechanismus

Unabhängig von dem Weg der Signalübertragung, über den rezeptorvermittelten Weg oder über die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle), ist die Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration beiden gemeinsam. Kalzium selbst spielt eine entscheidende Rolle nicht nur für die Kontraktion, sondern auch für die Stärke der Kontraktion. Es unterliegt mehreren fein abgestimmten Regulationsmechanismen, wie z.B. der kalziumtransportierenden ATPase der Plasmamembran (PMCA) [Hao et al.], [Carafoli et al.], der kalziumtransportierenden ATPase des sarko-plasmatischen Retikulums (SERCA) [Wu et al., Levin et al., Cohen et al.], dem Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) [Blaustein et al., Miura et al., Hilgemann] und der mitochondrialen Kalziumpumpe [Kikuchi et al., Jy et al.]. Auch hier ist es denkbar, dass die verschiedenen Stoffe an diesen verschiedenen Systemen ansetzen und so die intrazelluläre Kalziumkonzentration und somit die Gefäßweitstellung beeinflussen [Gergawy et al.].

Kalzium aktiviert als Komplex mit Calmodulin die Myosinleichtkettenkinase, welcher wiederum die Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht, es kommt zur Kontraktion. Ein Absinken des Kalziums und eine Dephosphorylierung des Myosins durch die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) beendet die Kontraktion, es kommt zum Erschlaffen des glatten Gefäßmuskels [Lincoln et al.]. Es besteht die Möglichkeit, dass die verschiedenen Stoffe erst an dieser Endstrecke des Kontraktionsablaufes eingreifen. So könnte eine Hemmung der Myosinleichtkettenkinase oder eine Aktivierung der Myosinleichtkettenphosphatase zur Dilatation des Gefäßes führen. Auch eine direkte Störung der Interaktion zwischen Aktin und Myosin wäre denkbar.

Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum bis auf Imipenem/Cilastatin und die Reinsubstanz von Tobramycin, alle weiteren getesteten Substanzen vasodilatative Eigenschaften sowohl bei Präkontraktion mit Phenylephrin als auch bei Präkontraktion mit Kaliumchlorid aufweisen. Somit wäre auch erklärbar, warum der vasodilatative Effekt z.B. bei Tobramycin oder Vancomycin unter einer Präkontraktion von Phenylephrin ausgeprägter ist, als unter der

Präkontraktion mit Kaliumchlorid. Berücksichtigt man die Kalzium-Konzentration für die Komplexbildung von Kalzium-Calmodulin, so steht bei der elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle) mehr Kalzium von extrazellulär zur Verfügung als bei dem Rezeptorvermittelten System, was „nur“ den begrenzten Vorrat aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aktiviert. Folglich stehen bei der elektromechanischen Kopplung (Kaliumkanäle) wesentlich mehr Komplexe zur Verfügung und somit kann eine höhere Aktivität der Myosinleichtkettenkinase für die Kontraktion erzeugt werden, als beim rezeptorvermittelten Weg. Es wäre möglich, dass die Antibiotikakonzentration einen gewissen Anteil z.B. der Komplexe oder der Kinase blockiert. Bei der Präkontraktion mit Phenylephrin können die verschiedenen Substanzen zu einer Relaxation der Gefäße führen. Bei der Präkontraktion durch Kaliumchlorid (elektromechanische Kopplung) wären durch die höhere Kalziumkonzentration und somit deutlich höheren Aktivität der eigentlichen Kontraktionskaskade die Antibiotika nicht mehr in der Lage eine solch ausgeprägte signifikante Relaxation der Gefäße herbeizuführen.

6.3.5.2. Stickstoffmonoxid (NO)-Mechanismus

Einen weiteren wesentlichen Faktor könnte der NO-Mechanismus darstellen. Aus den Endothelzellen der Intima werden verschiedene Moleküle freigesetzt, die zu Vasokonstriktion oder -dilatation führen können [Arnal et al.]. Furchgott und Zawadzki entdeckten, dass die durch Acetylcholin (ACh) ausgelöste Relaxation kontrahierter Gefäßmuskulatur abhängig von der Endothelzellschicht ist. Der für die Relaxation verantwortliche Faktor wurde damals EDRF (endothelium derived relaxing factor) genannt später stellte sich heraus, dass es sich hierbei um das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) handelt [Ignarro, Palmer et al.]. Durch die NO-Freisetzung kommt es unter Beteiligung des Cofactors Magnesium zur Umwandlung von GMP zu cGMP, welches wiederum als Second Messenger über intrazelluläre Mechanismen reagiert. Der wichtigste Transmitter für cGMP in glatten Muskelzellen ist die cGMP-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinase (PKG). Diese Kinase greift über weitere Zwischenschritte in die Regulation der Aktivität kontraktile Filamente in glatten Muskelzellen ein, und hemmt die Aktin-Myosin-Wechselwirkung. Dies führt zusammen mit einer Absenkung des intrazellulären Kalziumspiegels und einer Desensibilisierung der Muskelzellen für Kalzium zu einer Relaxation der glatten Muskulatur [Lincoln et al.]. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise auf verschiedenen Ebenen durch die Gabe von Antibiotika beeinflusst werden. Vorstellbar wäre es, dass eine entsprechende Antibiotikakonzentration in den Endothelzellen der Intima die NO-Synthese aktiviert und über den beschriebenen Kaskadenablauf zu einer

Vasodilatation des Gefäßes führt. Durch eine mögliche direkte Aktivierung oder Erhöhung des cGMP würde ebenfalls dieser Prozess in Gang gesetzt werden.

6.3.5.3. Unspezifische Mechanismen

Für die vasodilatativen Eigenschaften könnten möglicherweise auch andere unspezifische Mechanismen in Frage kommen. Durch eine Einlagerung von Stoffen in die Zellmembran könnte die Atmungskette der Zelle gestört werden. Hierdurch wäre die Zelle nicht mehr in der Lage, genügend Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung zu stellen. Die Kontraktion ist ein energieabhängiger Vorgang der durch ATP angetrieben wird. Kommt die Zelle in einen Mangelzustand an ATP, würde dies zu einer Vasodilatation führen. Denkbar wäre auch, dass die verschiedenen Stoffe die Zelle zerstören z.B. durch die Einlagerung in Zellmembranen die somit ihre Integrität verlieren. Der Untergang der Myozyten in der Aorta würde ebenfalls zu einer Vasodilatation führen.

Die hier genannten unspezifischen Mechanismen müssen aber als unwahrscheinlich eingestuft werden. Denn würde die Funktion der Zellen so grundlegend gestört werden, wären die Vitalitätsprüfungen der Aortenringe im Anschluss an die Versuchsreihe durch Waschen, erneuter Präkontraktion und Relaxation durch Zugabe von Acetylcholin negativ ausgefallen. Dennoch bleibt die Frage ob dieser Test tatsächlich die Vitalität aller Zellverbände nachweist.

6.4. Diskussion Antibiotika – Relaxationsmechanismus

Der Tonus einer Gefäßmuskelzelle wird durch eine Vielzahl an Mechanismen beeinflusst. Einige sind gut erforscht, andere wiederum sind bis heute noch nicht vollständig erklärbar. Die vorliegende Studie beweist, dass verschiedene Antibiotika in dieses multifaktorielle Geschehen der Kontraktion eingreifen und zu einer schwachen Vasodilatation führen können. Neben diesem Nachweis war es Ziel der Studie, mögliche Erklärungen für den Mechanismus geben zu können. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Substanzen zur Präkontraktion eingesetzt, um einen Hinweis auf den Mechanismus zu erlangen. Auch wenn es nicht möglich ist für jede in dieser Studie getestete Substanz den genauen Mechanismus darzustellen, so lassen sich dennoch folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Es muss zwischen dem Medikament und der Reinsubstanz differenziert werden, da sowohl die Reinsubstanz als auch die Zusatzstoffe des Medikamentes unterschiedliche Eigenschaften zur Relaxation aufweisen können.
2. Alle getesteten Medikamente, Reinsubstanzen und Zusatzstoffe führen nach einer Präkontraktion des Gefäßes durch Phenylephrin zu einer statistisch signifikanten aber biologisch gesehen geringgradigen Relaxation.
3. Imipenem/Cilastatin und die Reinsubstanz von Tobramycin führen nur dann zur Vasodilatation wenn mit Phenylephrin präkontrahiert wurde, nicht jedoch wenn Kaliumchlorid als Präkontraktor eingesetzt wurde. Dies spricht dafür, dass diese beiden Stoffe ausschließlich in das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) eingreifen.
4. Das Relaxationsverhalten von Vancomycin und Metronidazol zeigt, dass diese Antibiotika möglicherweise über eine Kaliumkanalöffnung zu einer Relaxation der Gefäße führen
5. Bis auf Imipenem/Cilastatin und die Reinsubstanz von Tobramycin weisen alle weiteren getesteten Substanzen vasodilatative Eigenschaften sowohl bei Präkontraktion mit Phenylephrin als auch bei Präkontraktion mit Kaliumchlorid auf. Möglicherweise beeinflussen diese Substanzen die zytoplasmatische Kalziumkonzentration oder die weiteren Reaktionsschritte von der Komplexbildung des Kalzium-Calmodulin bis zur Interaktion von Aktin und Myosin.
6. Eine Sonderstellung nimmt das Medikament Tobramycin ein, das sowohl bei der Präkontraktion durch Phenylephrin als auch bei den verschiedenen Kaliumchloridlösungen zu vergleichbaren signifikanten Relaxationen der Gefäße führt. Denkbar wäre auch hier ein Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration oder den Kontraktionsmechanismus selbst, möglich wäre jedoch auch, dass hier der NO-Mechanismus oder ein unspezifische Mechanismen eine Rolle spielt. Es gilt jedoch zu bedenken, dass das Medikament Tobramycin ein Stoffgemisch aus der Reinsubstanz, welches überwiegend auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) Einfluss nimmt, und den Zusatzstoffen ist, welche eigene vasodilatative Eigenschaften aufweisen.

6.5. Klinische Relevanz

Ein grundlegendes Problem bei Tierexperimenten in einem medizinischen Kontext ist die Frage der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse vom Tier auf den Menschen.

Um Aussagen über den Einfluss von Antibiotika auf menschliche Gefäße treffen zu können, müssen die Untersuchungen an humanen Gefäßen vorgenommen werden. In der vorliegenden Studie an Gefäßpräparationen kommen lokal stark begrenzte Interaktionen zum tragen. Dies

ermöglicht die Interpretation der Ergebnisse auf zelluläre Rezeptormechanismen zu spezifizieren. Diese Isolierung der einzelnen Signalwege und die anschließende Zusammenführung der Ergebnisse schafft langfristig, im Sinne der Grundlagenforschung, ein detailliertes Bild. Eine direkte medizinische Übertragung ist nicht möglich, da alle endokrinen und vegetativen Mechanismen des Gesamtorganismus vernachlässigt werden. Darüber hinaus müssen die Unterschiede zwischen Experimenten *in vitro* und *in vivo* berücksichtigt werden. Pharmakologische Mechanismen können sich *in vivo* auf andere Weise ausprägen als *in vitro*. In dieser Studie wurden 10-1000 Mal höhere Stoffkonzentrationen verwendet, als sie beim Menschen zum Einsatz kommen. Im klinischen Alltag werden Antibiotika jedoch über mehrere Tage ggf. auch über Wochen verabreicht. Während der Therapie der Sepsis werden so schnell mehrere Gramm (z.B. Meropenem 3g/d, Levofloxacin 1g/d) Antibiotika als Tagesdosis erreicht. Darüber hinaus erfordert die Therapie der Sepsis häufig die gleichzeitige Gabe von mehreren Antibiotika. Auch wenn das einzelne Antibiotikum keine relevanten Effekte aufweist so besteht doch die Möglichkeit, dass sich die Effekte einzelner Antibiotika summieren. Ein Beispiel für die Summation der vasodilatierenden Effekte zweier verschiedener Stoffe war das Medikament Tobramycin bestehend aus der Reinsubstanz und der Zusatzstoffe. Ein relevanter Effekt bei der Anwendung von Tobramycin im klinischen Alltag kann somit nicht ausgeschlossen werden. Die Konsequenz aus den Ergebnissen wäre, wenn ein Alternativpräparat zu Tobramycin zur Verfügung steht wäre, dies zu bevorzugen. Die Ergebnisse von Vancomycin, Imipenem und Metronidazol zeigen in dieser Studie scheinbar „keine“ klinische Relevanz, da die gefundenen Effekte, trotz wesentlich höherer Dosen als sie beim Menschen zum Einsatz kommen, zu gering erscheinen. Dennoch lassen sich auch bei diesen Medikamenten ein möglicher Langzeiteffekt und ein möglicher Summationseffekt bei Kumulation nicht ausschließen. Es sollte bedacht werden, dass bei allen getesteten Antibiotika eine signifikante Vasodilatation *in vitro* nachgewiesen wurde, wenn Phenylephrin als α 1-Sympathomimetikum zur Präkontraktion eingesetzt wurde. Eine entscheidende Säule der Sepsistherapie zur Tonisierung der Gefäße ist der Einsatz von Arterenol, einem α 1-Sympathomimetikum, was den gleichen Mechanismus aktiviert, wie Phenylephrin. Unabhängig von Größe des vasodilatativen Effektes sollten diese Medikamente in weiteren Studien untersucht werden um mögliche Effekte und ihre klinische Relevanz oder fehlende Relevanz nachzuweisen. Die Sepsis ist ein multifaktorielles Geschehen.

7. Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine generalisierte Entzündungsreaktion des gesamten Organismus auf eine Infektion. Sie zeichnet sich auch heute noch durch eine hohe Letalität von bis zu 50 % aus. Ein Leitsymptom ist die vasomotorische Regulationsstörung bis hin zum septischen Schock. Aufgabe der vorliegenden Studie war es herauszufinden, ob Antibiotika, die einen wesentlichen Eckpfeiler der Sepsistherapie darstellen, einen vasodilatitiven Effekt auf Gefäße ausüben. Untersucht wurden Tobramycin, Vancomycin, Imipenem, Metronidazol und Neomycin an der glatten Gefäßmuskulatur der Rattenaorta. Medikamente stellen Stoffgemische aus der Wirksubstanz und einer Vielzahl an Zusatzstoffen dar. Um einen möglichen Einfluß der Zusatzstoffe dieser Medikamente nachzuweisen, wurden einerseits die Zusatzstoffe des Medikamentes Tobramycin (Phenol, Natriummetabisulfit und Natrium-EDTA), andererseits die Reinsubstanzen Tobramycin, Vancomycin und Imipenem selbst auf mögliche Effekte auf den Tonus der Gefäßmuskulatur untersucht. Um einen Vasodilatation der verschiedenen Substanzen nachzuweisen, wurden die Gefäße zuvor präkontrahiert. Hierfür wurden zum einem Phenylephrin als α 1-Sympatomimetikum eingesetzt, zum anderen wurde über eine Verschiebung des Membranpotentials durch Kaliumchloridlösungen in verschiedenen Konzentrationen von 20 mM und 40 mM eine Präkontraktion der Gefäße erzeugt. Der Einsatz dieser verschiedenen Präkontraktoren ermöglichte es, Aussagen über den Einfluss auf die verschiedenen physiologischen Signalübertragungen zur Kontraktion zu treffen. Es zeigte sich, dass alle getesteten Medikamente, Reinsubstanzen und Zusatzstoffe Einfluss auf das rezeptorvermittelte System (Phosphatidylinositolkaskade) aufweisen und über diesen Weg zu einer Vasodilatation führen können. Hervorzuheben ist das Imipenem und die Reinsubstanz von Tobramycin, welches ausschließlich über diesen Weg den Gefäßtonus beeinflusst. Alle anderen Substanzen zeigen auch einen gewissen vasodilatativen Effekt auf die elektromechanische Kopplung (Kaliumkanäle). Dies spricht dafür dass diese Substanzen in den intrazellulären Kalziumhaushalt oder den eigentlichen intrazellulären Kontraktionsmechanismus eingreifen.

Hervorzuheben ist Tobramycin, bei welchem nicht nur die Reinsubstanz, sondern auch die Zusatzstoffe einen signifikanten vasodilatatorischen Effekt aufweisen. Hier wären unspezifische Effekte oder eine Beeinflussung des NO-Systems denkbar. Möglich wäre aber auch eine Summation verschiedener Mechanismen. Aus dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass der Faktor „Vasodilatation durch Antibiotika“ durch die entsprechende Wahl eines ebenso potenten Alternativantibiotikums ausgeschaltet werden könnte und somit möglicher Weise ein weiterer Baustein in der Therapie der Sepsis vorliegt.

8. Literaturverzeichnis

- 1) Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J
Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology.
Cell Moll Life Sci. 55: 1078-1087, (1999)

- 2) Archer SL, Huang JMC, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK
Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K
channel by cGMP-dependent protein kinase.
Proc Natl Acad Sci USA 91: 7583-7587, (1994)

- 3) Ahdal, O. and Bevan, DR
Clindamycin-induced neuromuscular blockade.
Can. J. Anaesth. 42: 614, (1995)

- 4) Baldwin G, Alpert G, Caputo GL, Baskin M
Effect of polymyxin B on experimental shock from meningococcal and Escherichia coli
endotoxins.
J Infect Dis; 164:542-9 (1991)

- 5) Bennett, B.M., Waldman S.A
Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation, in
Physiology and Pathophysiology of the Heart (Sperelakis N, ed)
pp 975-998, Kluwer Academic Publishers, Boston MA. (1995)

- 6) Blaustein MP, Santiago EM
Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium
exchange in squid axons.
Biophys J. 20: 79-111, (1977)

- 7) Brayden JE, Nelson MT
Regulation of arterial tone by activation of calciumdependent potassium channels.
Science 256: 532-535, (1992)

8) Cohen J, Aslam M, Pusey CD, Ryan CJ

Protection from endotoxemia: a rat model of plasmapheresis and specific adsorption with polymyxin B.

J Infect Dis;155:690-5 (1987)

9) Carafoli E

Biogenesis: plasmamembrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme.

FASEB J. 8: 993-1002, (1994)

10) Clapp LH, Gurney AM

ATP-sensitive K⁺channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells.

Am J Physiol. 262: H916-920, (1992)

11) Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM

Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx.

Circ Res. 84: 210-219, (1999)

12) Cooperstock MS

Inactivation of endotoxin by polymyxin B.

Antimicrob Agents Chemother 6:422-5 (1974)

13) Dupuis, JY, Martin, R., and Tetraudt, JP

Atracurium and vecuronium interaction with gentamicin and tobramycin.

Can. J. Anesth. 36: 407, (1989)

14) Endo M

Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.

Physiol Rev. 57: 71-108, (1979)

Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.

Adv Exp Med Biol. 592:275-85. (2007)

15) Furchgott RF, Zawadzki JV

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature 288 (5789); 373-376, (1980)

16) Goodman FR, Adams HR

Contractile function and ^{45}Ca movements in vascular smooth muscle of nonhuman primates: effects of aminoglycoside antibiotics.

Gen Pharmacol. 7: 227-32 (1976)

17) Gergawy M, Vollrath B, Cook D

The mechanism by which aminoglycoside antibiotics cause vasodilation of canine cerebral arteries. Br J Pharmacol. Nov;125(6):1150-7 (1998)

18) Ganame J, Claus P, Eyskens B, Uyttebroeck A, Renard M, D'hooge J, Gewillig M,

Bijnens B, Sutherland GR, Mertens L

Acute cardiac functional and morphological changes after Anthracycline infusions in children.

Am J Cardiol. 1;99(7):974-7. Apr (2007)

19) Guimaraes-Filho F, Tan D, Braga J, Rodrigues A, Waib P, Matsubara B

Ventricular systolic reserve in asymptomatic children previously treated with low doses of anthracyclines.

Am J Cardiol. Oct 15;100(8):1303-6. (2007)

20) Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G

Mechanism of smooth muscle contraction.

Physiological Reviews 76, 967-1003 (1996)

21) Hilgemann DW

Regulation and deregulation of cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches.

Nature 344: 242, (1990)

22) Hao L, Rigaud JL, Inesi G

Ca²⁺/H⁺-countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasmamembrane Ca-ATPase and exogenous lipids.

J Biol Chem 269: 14268-14275, (1994)

23) Hou VY, Hirshman CA, Emala CW

Neuromuscular relaxants as antagonists for M2 and M3 muscarinic receptors.

Anesthesiology 88:744-50, (1998)

24) Hashimoto S, Shibata O, Tsuda A, Iwanaga S, Makita T, Sumikawa K

Steroidal muscle relaxants attenuate the contractile and phosphatidylinositol responses of rat trachea.

Res Commun Mol Pathol Pharmacol 100: 255-63, (1998)

25) Ignarro LJ

Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties.

FASEB J. 3: 31-36 (1989)

26) Junqueira LC, Carneiro J

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Histophysiologie. Springer (2004)

27) Jy W, Haynes DH

Intracellular calcium storage and release in human platelet. Chlorotetracycline as a continuous monitor.

Circ Res 55: 595-608 (1984)

28) Kikuchi T, Kikuchi K, Arab N, Ghishan FK

Intestinal maturation: characterization of mitochondrial calcium transport in the rat.

Pediatr Res 25: 107-113 (1989)

29) Karow/Lang-Roth, Phamakologie u. Toxikologie (2008)

30) Klinke/Silbernagel, Lehrbuch der Physiologie (2003)

31) Lincoln TM, Dey N, Sellak H

Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression.

J Appl Physiol. 91: 1421-1430 (2001)

32) Levin RM, Nicholas TJ, Snitkoff GG, Mandell J, Russell D, Wilbur HJ, Mogavero LJ

Subcellular distribution of SERCA and calcium-activated ATPase in rabbit and human urinary bladder smooth muscle.

Pharmacology 55: 309-316 (1997)

33) Maskow J

Die Wirkung von Dehydroepiandrosteron auf die glatte Muskulatur und Trachea der Ratte
Promotionsarbeit Universität Greifswald (2005)

34) Miller AL, Langton PD

Streptomycin inhibition of myogenic tone, K⁺-induced force and block of L-type calcium current in rat cerebral arteries.

J Physiol. 1 (508) (Pt 3):793-800 (1998)

35) Miller JD, Carsten ME

Calcium homeostasis in smooth muscles. In: Kao CY, Carsten ME (editors): Cellular Aspects of Smooth Muscle Function. Cambridge

Cambridge University Press. 48-97 (1996)

36) Morales AI, Rodríguez-Barbero A, Vicente-Sánchez C, Mayoral P, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F

Resveratrol inhibits gentamicin-induced mesangial cell contraction.

Life Sci.;78(20):2373-7. Apr 11 (2006)

37) Murphy RA

Signal transduction and regulation in smooth muscle: problems and progress.

Rev Physiol Biochem Pharmacol. 134: 1-6 (1999)

38) Miura Y, Kimura J

Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca.

J Gen Physiol. 93: 1129-1145 (1989)

39) Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H

Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use.

Intensive Care Med. 28 (10): 1440-1446, (2002)

40) Nagtegaal JE, Siero HL, Dirksen R, Lammers JW, Rodrigues de Miranda JF, Russel FG
Pancuronium masks the prejunctional muscarinic autoreceptor in guinea pig tracheal smooth muscle.

Life Sci 57: 2325-33, (1995)

41) Natanson C, Danner RL, Reilly JM

Antibiotics versus cardiovascular support in a canine model of human septic shock.

Am J Physiol 259:H14 40-H1447 (1990)

42) Nelson MT, Quayle JM

Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle.

Am J Physiol 268: C799-822 (1995)

43) Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature Vol.327, (1987)

44) Peng W, Karwande, SV, Hoidal JR, Farrukh IS

Potassium currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells.

J Appl Physiol 80: 1187-1196 (1996)

45) Rembold CM

Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány M (editor): Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. San Diego
Academic Press 227-239 (1996)

46) Said AA, Matsuki N, Kasuya Y

Effects of aminoglycoside antibiotics on cholinergic autonomic nervous transmission.
Pharmacol Toxicol. Feb; 76(2):128-32 (1995)

47) Somlyo AP, Somlyo AV

Signal transduction and regulation in smooth muscle.
Nature 372:231-236 (1994)

48) Somlyo AP, Himpens B

Cell calcium and its regulation in smooth muscle.
FASEB J 3:2266-2276 (1989)

49) Shenep JL, Morgan KA

Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis.
J Infect Dis 150:380-388 (1984)

50) Smirnov SV, Robertson TP, Ward JP, Aaronson PI

Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺current in rat pulmonary artery muscle cells.
Am J Physiol. 266: H365-370 (1994)

51) Sokoll, MD and Georgis, SD

Antibiotics and neuromuscular function.
Anaesthesiology 55: 148, (1981)

52) Sterba M, Simůnek T, Popelová O, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Holecková M, Gersl V

Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination.

Physiol Res. 56(5):535-45. (2007)

53) Shibata O, Kanairo M, Zhang S, Hasuo H, Morooka H, Fujie T, Sumikawa K
Anticholinesterase drugs stimulate phosphatidylinositol response in rat tracheal slices.

Anesth Analg 82:1211-4, (1996)

54) Smith JB

Calcium haemostasis in smooth muscle cells.

New Horiz 4(1):2-18 (1996)

55) Wu KD, Bungard D, Lytton J

Regulation of SERCA Ca²⁺ pump expression by cytoplasmatic Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells.

Am J Physiol Cell Physiol. 280: C843-851 (2001)

56) Wickman G, Nessim MA, Cook DA, Vollrath B

The polycationic aminoglycosides modulate the vasoconstrictive effects of endothelin: relevance to cerebral vasospasm.

Br J Pharmacol. May 133(1):5-12. (2001)

57) Wakabayashi I, Groschner K

Vascular actions of anthracycline antibiotics.

Curr Med Chem.;10(5):427-36. Mar (2003)

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cl ⁻	Chlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
EC ₅₀	halb-maximale Konzentration
ED ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der halb-maximalen Konzentration
End	Endothel
ET 1	Endothelin 1
ERDF	endothelium derived relaxing factor
IP3	Inositoltrisphosphat
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLCK	Myosin-Leichtkettenkinase
MLCP	Myosin-Leichtkettenkinasephosphatase
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF	platelet derived growth factor
PLC	Phospholipase C
PIP2	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PMCA	kalziumtransportierende ATPase der Plasmamembran
SERCA	kalziumtransportierende ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

Dimensionen:

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Centimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
mol / M =mM	Molar
mV	milli Volt
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})
sec	Sekunde
t	Zeit
V	Volumen
Abb.	Abbildung
mean	Mittelwert
Mittelw.	Mittelwert
sd	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

9.2. Veröffentlichungen

Abstracts:

- Bac V, Pavlovic D, Hellmuth J, Lustig M K, Gründling M, Usichenko T, Wendt M, Lehmann CH. Antibiotics modulate rat vascular reactivity in vitro and intestinal microcirculation as well as cytokine release in murine colon ascendens stent peritonitis. *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung* 2006, 13(2):70-71
- Lehmann CH, Pavlovic D, Bac V, Hellmuth J, Lustig M K, Gründling M. Effects of antibiotics on intestinal microcirculation, cytokine release and vitro vascular reactivity in septic rats. *ISICEM-CD* 2006, 58

9.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Johanna Hellmuth

9.4. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Johanna Hellmuth

Wohnort: Holzteichstr.9-10
17489 Greifswald

geboren am: 01.01.1977

in: Heidelberg

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1983-1996 Freie Waldorfschule Karlsruhe

Studium

1999-2002 Vorklinisches Studium an der Universität Greifswald

2002-2005 Klinisches Studium an der Universität Greifswald

2006 Approbation als Ärztin

Ab 2007 Assistenzärztin Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

9.5 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die durch ihre fachliche Hilfe, ihre konstruktive Kritik und ihre hilfreiche Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Wendt danke ich für die Überlassung des Themas.

Prof. Dr. Lehmann sage ich Dank für die Einweisung in die Grundlagen einer Doktorarbeit und in inhaltliche Aspekte bei unseren regelmäßigen Doktorandenseminaren und seine konstruktive Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Pavlovic, der für mich stets erreichbar war, mich in die Durchführung der Experimente einwies und mir bei allen Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand, vom Beginn der Untersuchungen im Labor bis zur Fertigstellung der Dissertation.

Meinen Eltern danke ich herzlich dafür, dass sie mir das Medizinstudium und damit diese Arbeit ermöglicht haben.