



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

**Pharmakologisches Profil eines  
neu synthetisierten Resveratrol-Derivates  
(JB 24) an isolierten Präparaten  
von Meerschweinchen**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Nina Yvonne Tröscher
Matrikel-Nummer:	9847678
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, am 31.10.2008

## ***Danksagung***

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine fachliche Kompetenz, Geduld, Freundlichkeit und Unterstützung.

Pakiza Rawnduzi für ihre technische Hilfestellung und in allen Belangen der praktischen Durchführung der Versuche und ihre kompetente Betreuung.

Peter Höflich für seine praktischen Tipps und den Vorbereitungen im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Söhnen, Heinz-Werner und Lothar, die mir jeden Tag ihr Vertrauen und ihre Liebe schenken.

Meinen Eltern, Evelyn und Michael Tröscher, und meiner ganzen Familie, die mir mit ihrer moralischen und materiellen Unterstützung immer tatkräftig zur Seite waren und dieses Studium ermöglicht und wesentlich erleichtert haben.

Meinem Bruder Jürgen danke ich für seine Geduld in Sachen der Datenverarbeitung aller Art.

Danken möchte ich auch meinen Freundinnen und Freunden, die mir geholfen haben, mich zu verwirklichen und durchzuhalten. Erwähnt seien im speziellen Sanja, Jelena, Jasna, Emma und Margrit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Vorkommen von Resveratrol .....	1
1.2. Geschichte des Resveratrols .....	2
1.3. Biosynthese .....	3
1.4. Synergismus .....	3
1.5. Wirkung von Resveratrol .....	4
1.6. Bioverfügbarkeit .....	6
<b>2 ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>7</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>8</b>
3.1. Versuchstiere .....	8
3.2. Isolierung u. Präparation der Versuchsorgane .....	8
3.2.1. Isolierung u. Präparation d. rechten Vorhofs .....	9
3.2.2. Isolierung u. Präparation d. Arteria pulmonalis .....	9
3.2.3. Isolierung u. Präparation d. Papillarmuskels .....	10
3.2.4. Isolierung u. Präparation der Aorta .....	10
3.2.5. Isolierung u. Präparation d. terminalen Ileums .....	11
3.2.6. Isolierung u. Präparation des Uterus' .....	12
3.3. Physiologische Nährlösungen .....	13
3.3.1. Nährlösung für den rechten Vorhof, den Darm, den Papillar- Muskel und die Pulmonalarterie .....	13
3.3.2. Nährlösung für die Aorta .....	14
3.3.3. Nährlösung für den Uterus .....	15
3.4. Versuchsanordnung .....	16
3.4.1. Verwendete Versuchsaapparaturen .....	17
3.4.2. Kraftwandler .....	20
3.5. Verwendete Substanz JB 24 .....	21
3.6. Verwendete Agonisten .....	23
3.6.1. Histamin .....	23
3.6.2. Acetylcholin .....	24
3.6.3. Phenylephrin .....	25

3.7. Versuchsablauf .....	26
3.7.1. Untersuchung der Testsubstanz JB 24 .....	26
3.7.1.1. Versuchspräparat rechter Vorhof .....	26
3.7.1.2. Versuchspräparat Papillarmuskel .....	26
3.7.1.3. Versuchspräparat terminales Ileum .....	27
3.7.1.4. Versuchspräparat Aorta .....	28
3.7.1.5. Versuchspräparat Arteria pulmonalis .....	29
3.7.2. Untersuchung von Agonisten in Kombination mit JB 24 .....	29
3.7.2.1. Untersuchungen am terminalen Ileum .....	29
3.7.2.2. Untersuchungen am Uterus .....	30
3.7.3. Ablauf der Lösungsmittelversuche .....	31
3.8. Messgrößen und Statistik .....	32
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
4.1. Wirkung von JB 24 auf verschiedene isolierte Organe des Meerschweinchens .....	34
4.1.1. Wirkung von JB 24 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs .....	34
4.1.2. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels .....	38
4.1.3. Wirkung von JB 24 auf d. Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums .....	42
4.1.4. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta .....	46
4.1.5. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis .....	50
4.2. Wirkung von diversen Agonisten bei gleichzeitiger Exposition von JB 24 am terminalen Ileum .....	54
4.2.1. Wirkung v. JB 24 in Kombination mit Histamin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums .....	54
4.2.2. Wirkung v. JB 24 in Kombination mit Acetylcholin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums .....	60
4.2.3. Wirkung v. JB 24 in Kombination mit Phenylephrin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums .....	66

4.3. Wirkung des Agonisten Histami bei gleichzeitiger Exposition von JB 24 am Uterus .....	72
4.3.1. Versuchsreihe am Uterus mit 10 µmol/l JB 24 .....	72
4.3.2. Versuchsreihe am Uterus mit 30 µmol/l JB 24 .....	75
4.4. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Organe Aorta, Arteria pulmonalis, Papillarmuskel, rechter Vorhof und termin. Ileum .....	78
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
5.1. Struktur – Wirkungsbeziehung .....	81
5.2. Untersuchungsergebnisse von JB 24 an glatter Muskulatur .....	83
5.3. Untersuchungsergebnisse von JB 24 in Kombination mit den Agonisten .....	86
5.4. Interpretation .....	87
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>8 CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>93</b>

# 1 EINLEITUNG

## *1.1. Vorkommen Resveratrol*

Resveratrol (3,4,5,-trihydroxystilben) ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der in natürlicher Weise in Nahrungsmitteln wie Rotwein, Grapefruitsaft, Maulbeeren, Himbeeren, Preiselbeeren und Erdnüssen sowie in einigen medizinischen Pflanzen, wie z.B. Eukalyptus und Vertreter der Vitaceae (z.B. *Vitis vinifera*) vorkommt (Celotti et al 1997, Jang et al 1997).

Der Weinstock, *Vitis Vinifera*, ist jene Kulturpflanze, die seit tausenden von Jahren zur Weinherstellung herangezogen wird. Hier findet sich Resveratrol vor allem in den Stielen, Reben und Wurzeln, sowie in den Kernen und zu großen Teilen auch in den Schalen der Weintrauben.

Bei der Herstellung von Rotwein sind die Traubenschalen deutlich länger dem Fermentationsprozess ausgesetzt, beim Weißwein hingegen werden die Schalen nicht mitverarbeitet, deshalb enthält der Rotwein im Gegensatz zu Weißwein auch die 15-fache Menge an Polyphenolen. Um einen Vergleich zu erstellen: Man müsste zirka 9 kg Weintrauben oder 1kg Erdnüsse verzehren, um auf den selben Gehalt an Resveratrol zu gelangen, der in einem halben Liter Rotwein steckt, wobei man aber weiters berücksichtigen sollte, dass sich beim Rösten von Erdnüssen deren Resveratrolgehalt etwa um die Hälfte verringert (Metz 2000).

Weiters haben spanische Wissenschaftler nachgewiesen, dass der Gehalt an Resveratrol in den Trauben um das 2-3fache steigt, wenn diese vor der Gärung zusätzlich noch mit UV-Strahlung behandelt werden. Auch durch Kühlung vor der Gärung wird der heilende Effekt, und damit der Resveratrolgehalt, weiter gesteigert (Cantos et al 2000).

In der Natur kommt Resveratrol in verschiedenen Formen vor. Man unterscheidet das cis- und trans-Resveratrol, sowie ihre Glucoside, die als Piceide bezeichnet werden. Das häufigste in der Natur vorkommende Derivat ist jedoch das trans-Resveratrol (Hung et al 1997).

## ***1.2. Geschichte des Resveratrol***

Resveratrol wurde erstmals im Jahre 1963 aus den Wurzeln der Knöterichpflanze *Polygonum cuspidatum* isoliert und identifiziert.

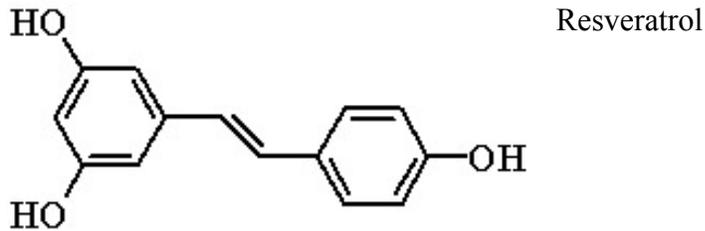
In der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin wird diese Pflanze schon lange Zeit verwendet, um zum Beispiel Hautentzündungen, Erkrankungen des Herzens, der Lunge oder Pilzkrankungen zu behandeln.

Erst 1976 wurde erstmals Resveratrol in Weintrauben nachgewiesen (Biba 2004).

Resveratrol gehört in die Klasse der Flavonoide und ist ein natürlich vorkommendes Phytoalexin. Der Begriff Alexin stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie sich schützen oder von sich weisen.

Von den Pflanzen wird Resveratrol gleichsam als Stressmetabolit gebildet, um sich vor schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, zu hoher Ozonbelastung oder Infektionen durch Insekten oder Pilze zu schützen (Urena et al 2003).

Chemisch gesehen handelt es sich bei Resveratrol um ein Stilbenderivat, genauer um ein 3, 4', 5 – Trihydroxy-trans-stilben. Die Substanz ist verwandt mit dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol (Gehm et al 1997).



### ***1.3. Biosynthese***

Die Aminosäure Phenylalanin ist das Edukt der Resveratrol-Biosynthese. Zuerst kommt es durch Oxidation und Desaminierung zur Bildung von Zimtsäure. Diese wird durch Hydroxylierung in die para-Cumarinsäure übergeführt. Diese Cumarinsäure wird darauf hin durch eine spezifische CoA-Ligase zum Ester umgesetzt. Im letzten Schritt erfolgt mit drei Malonyl-CoA und der Resveratrol-Synthetase die Kondensation zum Stilbenderivat aus dem 4-Cumaroyl-CoA (Wu et al 2001).

### ***1.4. Synergismus***

In Kombination mit anderen antioxidativ, antiphlogistisch, krebspräventiv wirksamen Substanzen, wie zum Beispiel Ascorbinsäure, Tocopherole, Quercetin, Selen und so weiter, könnte der Effekt von Resveratrol verstärkt werden.

## ***1.5. Wirkung von Resveratrol***

Seit Resveratrol im Rotwein nachgewiesen wurde, wurden auch zahlreiche Studien über dessen positive biologische Effekte publiziert.

In der Zwischenzeit wird das Stilbenderivat in Nahrungsergänzungsmitteln im Handel zum freien Verkauf angeboten.

Nachfolgend die wichtigsten Wirkungen, die auch vielfach wissenschaftlich untersucht wurden:

### *\*Die antioxidative Aktivität*

Studien haben ergeben, dass Resveratrol ein stark wirksames Antioxidans ist und fungiert damit als Radikalfänger, weiters wird auch die Thrombozytenaggregation gehemmt.

Dabei war Resveratrol, was die Thrombozytenaggregationshemmung betrifft, beispielsweise den Substanzen Catechin, Epicatechin,  $\alpha$ -Tocopherol oder Hydrochinon überlegen (Hung et al 2000 et Kirk et al 2000).

Auf die antioxidative Wirkung lässt sich auch die kardioprotektive Wirkung und somit ein gewisser Schutz vor koronaren Herzkrankheiten zurückführen. Es hat einen positiven Einfluss auf die Eicosanoidsynthese und den Lipidmetabolismus. Zum einen hemmt es die Oxidation des low density lipoproteins, kurz LDL genannt, zum anderen steigert es die des high density lipoproteins (HDL), also des „guten“ Cholesterins.

Eine Studie mit hyperlipämischen Hamstern ergab, dass Rotweinxtrakt die Lipidablagerung an der Aorta durch seine relaxierende Wirkung auf die Aortaringe hemmt (Metz 2000).

Mit der positiven Auswirkung auf das Cholesterin lässt sich wohl auch ein weiteres Phänomen erklären, nämlich:

### *\*Das französische Paradoxon*

Obwohl sich die Franzosen generell eher fettreich ernähren, neigen sie dennoch weniger zu koronaren Herzkrankheiten als andere Völker, was Forscher auf den höheren Rotweinkonsum der Franzosen zurückführen. Untersuchungen haben ergeben, dass Rotwein die LDL-Oxidation selbst in 1000facher Verdünnung noch signifikant stärker hemmt, als zum Beispiel Vitamin E (Metz 2000).

Weiters diskutiert wird ein gewisser

*\* Schutz vor Arteriosklerose*

Durch die Hemmung der Cyclooxygenase (COX) und die Hydroperoxidaseaktivität von COX-1 ist eine gewisse antiphlogistische Wirkung und somit auch Schutz vor Arteriosklerose gegeben.

Am meisten diskutiert wird jedoch zurzeit der Einfluss von Resveratrol auf die

*\* Zellproliferation*

Und damit eine mögliche antimutagene, bzw. anticancerogene Wirkung.

So konnte nachgewiesen werden, dass Resveratrol, die DNA-Polymerase, die Ribonukleotidreduktase, sowie die Tätigkeit der Ornithindecaboxylase hemmt. Die Ornithindecaboxylase ist ein Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese, welche beim Tumorwachstum erhöht wird (Fontecave et al. 1998).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Vermögen von Resveratrol, das Wachstum einiger Krebszellen zu hemmen, in dem es den NF-kB inhibitiert. Der NF-kB (= nuclear factor kappa B) findet sich als Schlüsselprotein in allen Zellkernen, wo er für die Aktivierung jener Gene zuständig ist, die den Zellen ein Überleben ermöglichen. Durch die Wirkung des Resveratrols kann der NF-kB seine überlebensfördernde Wirkung nicht mehr entfalten und in den Krebszellen wird folglich die Apoptose induziert (Yeung et al. 2004).

In China wurden Versuchsreihen an Mäusen durchgeführt, bei denen die Wirkung von Resveratrol in Kombination mit 5-Fluoruracil (=5FU) bei Leberkrebs getestet wurde. Die Untersuchung ergab, dass Resveratrol eine Metastierung der Krebszellen verhindern konnte (Wu et al. 2004).

Doch durch die Verwandtschaft des Resveratrols zum synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol erhoffen sich die Forscher vor allem vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Brustkrebs. Diese Verwandtschaft erklärt auch, warum Östrogenrezeptorenblocker wie z.B. Tamoxifen, die Resveratrol-Wirkung inhibieren. Bisher hat sich die anticancerogene Wirkung bei Mammatumoren zwar an Zellkulturen von Mäusen bestätigt, bei menschlichen Mammatumoren konnte sie aber bislang noch nicht bewiesen werden (Gehm et al. 1997).

Eine eventuelle Schutzfunktion bei Darm-, Haut-, Lungen-, und Prostatakrebs, sowie bei Leukämie wird ebenfalls diskutiert.

## ***1.6. Bioverfügbarkeit***

Die Bioverfügbarkeit von Resveratrol beträgt etwa 90 % (Goldberg et al. 2003). Die Verweildauer im Blutkreislauf ist aufgrund der raschen Clearance kurz (Soleas et al. 2001). Aufgrund der Resultate von Langzeitstudien bei Raten wurde eine Akkumulation des Stilbens in sämtlichen Organen vermutet (Bertelli et al. 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Konjugation in die Glucuronid-Form, wahrscheinlich in der Mukosa des Darmgewebes ablaufend, stattfindet (Yu et al. 1998).

Abschließend bleibt zu sagen, dass wohl trotz der vorliegenden zum Teil sehr vielversprechenden Ergebnisse von zu großem Optimismus abgesehen werden muss. Denn die Forschung beschränkt sich bisher auf invitro-Studien und Untersuchungen am Tiermodell. Studien am Menschen jedoch stehen noch aus.

Auch der Rotwein ist, als Hauptquelle des Resveratrol, momentan ein brisantes Thema, der von zahlreichen Wissenschaftlern genau unter die Lupe genommen wird. Doch auch hier gilt, dass eindeutige Beweise der positiven Wirkung noch ausstehen. Die negativen Auswirkungen von chronischem Alkoholgenuss hingegen sind zweifelsfrei bewiesen. Leberzirrhose und körperliche Abhängigkeit sind nur zwei der Folgen des Alkoholabusus'.

Unbestritten bleibt jedoch, dass es sich bei Resveratrol um eine hochinteressante Substanz mit vielfältigem Potential handelt, von der man noch einiges hören wird. Es bleibt also abzuwarten, welche Ergebnisse weitere Studien mit dieser beachtlichen Substanz bringen werden.

## 2 ZIEL DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ein neu synthetisiertes Resveratrol-Derivat, bezeichnet mit der Abkürzung JB 24, untersucht.

Dabei handelt es sich, ebenso wie bei der Substanz Resveratrol, um ein Stilbenderivat, wobei der strukturelle Unterschied in der Einführung einer Amidgruppe, einer Trifluormethoxy-Gruppe und zusätzlichen Methoxygruppen liegt.

Zielsetzung war, den Effekt von JB 24 in Bezug zu der Wirkung von dem bereits gut erforschten Resveratrol zu setzen.

Die zu untersuchende Substanz wurde an der Universität Wien synthetisiert.

Primär war die Stärke des relaxierenden Effekts von JB 24 auf den Tonus der glatten Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalen Ileum zu ermitteln. Zu diagnostizieren war auch der Einfluss der Testsubstanz auf die Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs und die eventuelle positive oder negative inotrope Wirkung des Papillarmuskels.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Versuchsreihen an Darm und Uterus, bei gleichzeitiger Exposition der Testsubstanz und diverser Agonisten, durchgeführt. Am terminalen Ileus wurden die cholinerge bzw. anticholinerge, histaminerge bzw. antihistaminerge Wirkung und der agonistischen bzw. antagonistischen Einfluss des Phenylephrins untersucht. Der agonistische bzw. antagonistische Effekt von Histamin auf die Wirkung von JB 24 wurde am Uterus getestet.

Diese Tests sollten zeigen, ob das neu synthetisierte Resveratrol-Derivat eventuell ein ähnliches Wirkungsprofil zeigt, wie der Pflanzeninhaltsstoff Resveratrol selbst.

## **3 MATERIAL UND METHODIK**

### ***3.1. Versuchstiere***

Die Versuche wurden an verschiedenen isolierten Organen weiblicher und männlicher Meerschweinchen durchgeführt. Diese wiesen alle ein durchschnittliches Körpergewicht von 300-600 g auf, waren wenige Wochen alt und stammten aus dem Forschungsinstitut für Versuchstierzucht in Himberg in Niederösterreich.

Die verwendeten Tiere wurden alle am Tag vor der Versuchsdurchführung nüchtern gestellt, um einen konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des Dünndarms gewährleisten zu können.

### ***3.2. Isolierung und Präparation der Versuchsorgane***

Nachdem die Tiere durch einen gezielten Genickschlag getötet wurden, um einen schnellen, schmerzlosen Tod zu gewährleisten, musste das Herz möglichst rasch entnommen werden, um einen Sauerstoffmangel des Herzens zu vermeiden.

Um im weiteren Verlauf bis zur fertigen Präparation eine ausreichende Sauerstoffversorgung sicher zu stellen, wurden die Organe in einer Nährlösung (genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 3.3.) aufbewahrt, die zusätzlich noch mit Oxymix (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) durchperlt wurde.

Nach Thoraxöffnung wurden zuerst Herz und thorakale Gefäße rasch explantiert, nach Laparotomie Darm und Uterus.

Danach erfolgte die Präparation unter einem Lichtmikroskop der Marke Nikon SMZ-10 A, Japan.

### ***3.2.1. Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs***

Die Präparation des Herzens erfolgte in einer Petrischale mit Korkboden, die mit Nährlösung gefüllt war und mit Oxymix durchperlt wurde. Da das Meerschweinchenherz sehr klein ist, erfolgte die Trennung der Herzteile unter dem Mikroskop. Zunächst wurden mit einer Mikropräparierschere alle Fettreste, Teile des Perikards und Reste der Lunge entfernt, damit dann das Organ mit Fixiernadeln an Basis und Spitze befestigt werden konnte.

Die Vorhöfe wurden abgetrennt und an den beiden Herzohren mit Präpariernadeln fixiert. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof und kann unter dem Mikroskop nicht exakt lokalisiert werden. Deshalb musste die Präparation mit größter Vorsicht erfolgen, damit der Sinusknoten bei der Trennung und beim Binden nicht beschädigt wurde.

Nach Abtrennung des linken Vorhofs vom rechten, wurde unter Verwendung eines Zwirnfadens ein Silberhäkchen angebracht, damit das Organ in die Apparatur eingespannt werden konnte. Bis zu Versuchsbeginn kam der rechte Vorhof wieder in begaste Nährlösung.

### ***3.2.2. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis***

Um die Arteria pulmonalis entnehmen zu können, musste das Herz rasch herausgenommen und in eine mit entsprechender Nährlösung gefüllte Petrischale, die mit Oxymix begast wurde, übergeführt werden. Die Präparation erfolgte unter dem Mikroskop. Das Herz wurde wieder mit Präpariernadeln fixiert.

Die Pulmonalarterie wurde so nahe wie möglich am Herzen abgetrennt, wobei nur das direkt vom Herzen verwendete Stückchen ist zirka 5 - 10 mm lang und reicht bis zur Aufteilung in rechte und linke Arteria.

Anschließend wurde davon ein 3 - 4 mm langes, ringförmiges Stück abgeschnitten und dieses bis zum Einspannen in die Apparatur mit Oxymix behandelt in Nährlösung aufbewahrt.

### ***3.2.3. Isolierung und Präparation des Papillarmuskels***

Die Präparation der Papillarmuskeln erfolgte gleich im Anschluss, also auch in einer Petrischale mit begaster Nährlösung und unter dem Mikroskop. Nach Abtrennung der Vorhöfe und der Pulmonalarterie konnte das Herz mit Präpariernadeln auf dem Korkboden fixiert werden.

Zunächst wurde der rechte Ventrikel über die Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet, aufgeklappt und dann wieder mit Präpariernadeln befestigt werden. Während des Präparierens musste eine Überdehnung der Muskeln vermieden werden, damit ihre Kontraktionskraft nicht verändert wurde.

Um den Papillarmuskel zu entfernen, wurde am Ansatz der Sehne, mit der der Muskel mit der Herzwand verbunden war, mittels Zwirnfaden ein Silberhäkchen befestigt. Dann wurde die Sehne durchtrennt und der Muskel vorsichtig herausgeschnitten.

Dabei wurden sichtbare Purkinje-Fasern, die selbst eine Schrittmacherfunktion besitzen, mit der Federschere entfernt, damit es später nicht zu Spontanreaktionen des Muskels und damit zu einer Störung des Versuchs kam.

Bis zu Versuchsbeginn wurde der Papillarmuskel in begaster Nährlösung aufbewahrt.

### ***3.2.4. Isolierung und Präparation der Aorta***

Um die Aorta isolieren zu können, wurde der Thorax an der Stelle, wo schon das Herz entnommen wurde, mit einer Schere weiter geöffnet. Der herzseitige Anfang der Aorta wurde bereits so nah wie möglich am Herzen durchtrennt, als dieses entfernt wurde.

Dann wurde mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere entlang des Rückenmarks, ein möglichst langes Stück der thorakalen Aorta herausgeschnitten, ohne sie zu dehnen oder die Außenwand zu verletzen.

Die weitere Präparation erfolgte wieder unter dem Mikroskop. Die Aorta wurde in die mit entsprechender physiologischer Nährlösung gefüllte und mit Kork ausgelegte Petrischale transferiert. Hier wieder mit Präpariernadeln fixiert.

Als nächstes wurde, ohne sie zu verletzen, das außen an der Aorta anhaftende Fett- und Muskelgewebe mit einer Federschere sorgfältig entfernt. Dann wurden Ringe von ca. 2 - 3 mm Breite abgeschnitten und in Oxymix durchperlter Nährlösung aufbewahrt. Diese konnten jeweils in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

### ***3.2.5. Isolierung und Präparation des terminalen Ileums***

Der Bauchraum des Versuchstieres wurde geöffnet und der Dickdarm zur Seite geklappt. Nach Auffinden und Identifizieren des Zäkums wurden die davor liegenden Peyer'schen Plaques entfernt. Um das jejunale vom terminalen Ende des Ileums zu unterscheiden, wurde das jejunale Ende mit einem Faden abgebunden. Unter Schonung des Gewebes, ohne Traktion und Kompression, wurde ein etwa 20 cm langes Darmstück entnommen und unverzüglich in die physiologische Elektrolytlösung transferiert.

Danach erfolgte die Präparation unter dem Lichtmikroskop. Etwa 0,5 cm lange, caecal gelegene Darmstückchen wurden mittels Schere durch einen Schrägschnitt, der die nachträgliche Einführung des Präparats in die vorgesehene Halterung erleichterte, abgetrennt und in eine mit Korkboden ausgelegte und mit Nährlösung gefüllte Petrieschale übergeführt.

Jedes Stückchen wurde mit Präpariernadeln von der Innenseite nach außen, jeweils an den beiden Enden, durchstoßen und somit fixiert. Eine zu starke Dehnung musste vermieden werden, da unerwünschte Kontraktionen die Folge sein konnten. Anschließend wurde das an der Außenseite anhaftende Mesenterium mittels Schere entfernt, der teilweise noch vorhandene Chymus wurde vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Darm geputzt, ohne dabei die Darmschleimhaut zu verletzen. Mit Hilfe eines Fadens wurden an beiden Enden je ein Silberhäkchen durch einen Doppelknoten befestigt.

Wichtig dabei war, dass die Darmröhre nicht zugebunden wurde, um das Einwirken der Testsubstanz von allen Seiten zu ermöglichen. Außerdem war darauf zu achten, dass eine Verwechslung von jejunaler und terminaler Seite ausgeschlossen werden konnte.

Danach wurde das präparierte Darmstückchen bis zur Versuchsdurchführung in einem Becherglas, befüllt mit Oxymix durchperlter Nährlösung, aufbewahrt.

### ***3.2.6. Isolierung und Präparation des Uterus***

Nach Öffnung der Bauchhöhle wurde der Darm beiseite geschoben, um den darunter befindlichen Uterus freizulegen. Die Gebärmutter besteht aus zwei getrennten Uterushörnern und wird durch einer einheitlichen Zervix verbunden. Somit schaut dieser Komplex Y-förmig aus. Für diese Versuchsreihe wurden beide, etwa 3 - 4 cm lange, Uterushörner entnommen und in die entsprechende Nährlösung transferiert.

Danach erfolgte die Präparation unter dem Mikroskop. Zuerst wurde das außen anhaftende Gewebe mit der Federschere entfernt, danach 0,5 cm große Stücke durch einen Schrägschnitt abgetrennt. Jedes Stückchen wurde mit zwei Präpariernadeln von der Innenseite nach außen durchstochen und somit am Korkboden fixiert.

Dann wurden die Enden des Gewebes, jeweils direkt, mit einem Silberhaken durchstochen und mit einem Zwirnfaden durch mindestens 2 Knoten befestigt.

Wichtig war es, die Uterusröhre nicht zuzubinden, damit ein gleichmäßiges Einwirken der Testlösung während des Versuchs gegeben war. Die Differenzierung zwischen ovariellem und cervikalem Ende war zu vernachlässigen.

Der fertig präparierte Uterus wurde bis zu Versuchsbeginn in begaster Nährlösung aufbewahrt.

### ***3.3. Physiologische Nährlösungen***

Die Tyrode wurde jeden Tag frisch vorbereitet. Zu diesem Zweck wurde die Stocklösung in der entsprechenden Menge in einen Messkolben gefüllt (siehe Tab. 1). Anschließend wurde mit Aqua bidestillata auf ungefähr 3/4 des gewünschten Volumens ergänzt. Nachdem im Anschluss die Glukose zugefügt worden war, folgte zirka zehn Minuten lang eine Begasung mit Oxymix (einer Mischung aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>), bevor zuletzt die Calciumchloridlösung zugegeben wurde und das restliche Wasser ergänzt wurde. Um die Bildung schwerlöslicher Calciumsalze und in Folge eine Trübung zu vermeiden, wurde die CaCl<sub>2</sub>-Lösung langsam dazu pipettiert.

Die Organbäder wurden mit destilliertem Wasser gereinigt und mit Tyrode gefüllt. Eine Wärmepumpe sorgte für eine konstante Temperatur während der gesamten Versuchsdurchführung.

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe zu garantieren und den pH-Wert im physiologischen Bereich zwischen 7,2 - 7,4 konstant zu halten, wurde die Nährlösung während des ganzen Versuchs mit Oxymix begast.

#### ***3.3.1. Nährlösung für den rechten Vorhof, den Darm, den Papillarmuskel und die Pulmonalarterie***

Die physiologische Nährlösung wurde nach der Vorschrift von Reiter (1967) zubereitet und entsprach somit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung. Diese werden auch Tyroden genannt.

*Tab. 1: Tyrode für den rechten Vorhof, Papillarmuskel, Darm und Pulmonalarterie*

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

*Legende zu Tabelle 1:*

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der Tyrode, die bei allen Versuchen, die am Darm, dem Vorhof, dem Papillarmuskel oder der Pulmonalarterie durchgeführt wurde, verwendet wurde.

### ***3.3.2. Nährlösung für die Aorta***

Es wurde für die Aorta eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, deren Herstellung, wie bereits zuvor in Kapitel 3.3.1. erklärt wurde, erfolgte.

*Tab. 2: Tyrode für die Aorta*

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

*Legende zu Tabelle 2:*

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Tyrode, die bei allen Versuchen, welche die Aorta betroffen haben, verwendet wurde.

### ***3.3.3. Nährlösung für den Uterus***

Es wurde eine De Jalon's-Lösung verwendet, die wie bereits beschrieben hergestellt wurde, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall, vor der Zugabe der Calciumchloridlösung, eine kürzere Begasung mit Oxymix ausreichend war.

*Tab. 3: Tyrode für den Uterus*

<b>Stocklösung</b>	<b>mmol/l</b>
NaCl	154,00
KCl	5,60
NaHCO <sub>3</sub>	5,95
CaCl <sub>2</sub>	2,50
Glucose	0,40

*Legende zu Tabelle 3:*

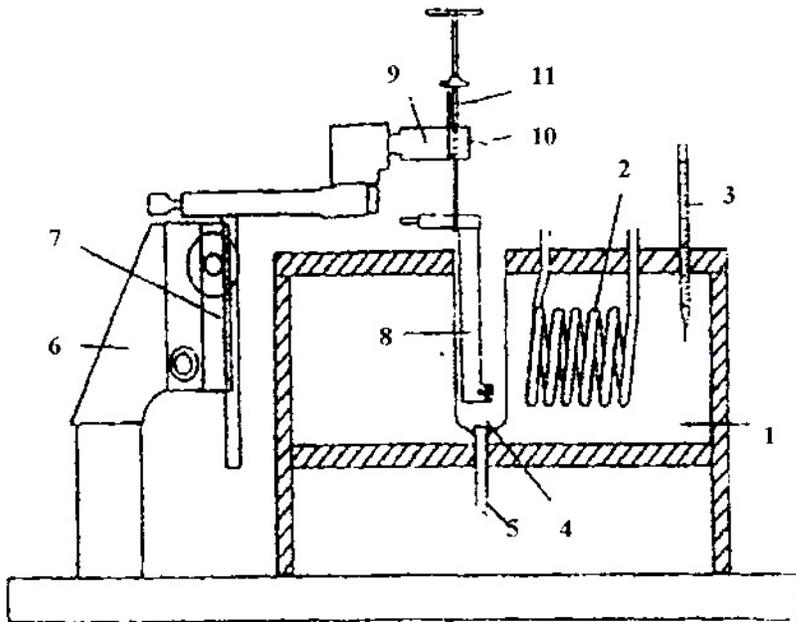
Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der De Jalon's-Tyrode, die bei allen Versuchen mit dem Uterus verwendet wurde.

### ***3.4. Versuchsanordnung***

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden zuerst die alleinigen Effekte der Testsubstanz an sechs verschiedenen Organen des Meerschweinchens, danach die kombinierte Wirkung von SM-1 mit unterschiedlichen Agonisten untersucht. Weiters wurden DMSO-Versuche durchgeführt, um bei den Berechnungen der Ergebnisse den Einfluss des Lösungsmittels auf die einzelnen Organe herauszufiltern.

### 3.4.1. Verwendete Versuchsaapparaturen

Abbildung 1: Versuchsaapparatur für Papillarmuskel und rechten Vorhof

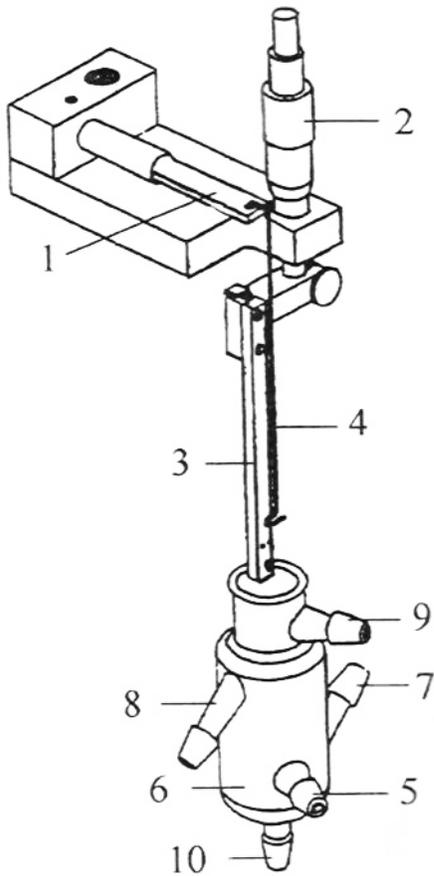


- |                |                        |                        |
|----------------|------------------------|------------------------|
| 1 Wasserbad    | 5 Gaszufuhr mit Fritte | 9 Kraftwandler         |
| 2 Heizspirale  | 6 Stativ               | 10 Aufhängevorrichtung |
| 3 Thermostat   | 7 Stativschlitten      | 11 Feintrieb           |
| 4 Muskelkammer | 8 Muskelhalterung      |                        |

Legende zu Abbildung 1:

Die Abbildung 2 zeigt den Aufbau der Apparatur, die für alle Versuche von Papillarmuskel und rechten Vorhof verwendet wurde.

Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Versuchsapparatur



Legende zu Abbildung 2:

1. Kraftwandler, 2. Mikrometer, 3. Organhalterung, 4. Aufhängevorrichtung, 5. Gaszufuhr, 6. Organbad, 7. Zulauf Wasserbad, 8. Ablauf Wasserbad, 9. Zulauf Nährlösung, 10. Ablauf Nährlösung

Die Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsapparatur zur Messung der Änderung der Kontraktion von den Versuchspräparaten Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Uterus.

Das Organbad (6) bestand aus 2 Glasschichten, in deren Zwischenraum befand sich ein mittels Wasserbad gewärmtes Aqua bidestillata. Somit konnte während des gesamten Versuches eine konstante Temperatur erzielt werden. Die optimale Temperatur für die Versuchsdurchführung an Darm, Aorta, Uterus und Arteria pulmonalis war  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , für Papillarmuskel und Vorhof  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Temperatur des Wasserbads wurde mit Hilfe eines Thermostates mit einer Heizspirale konstant gehalten. die physiologische Nährlösung wurde über eine Gaszufuhr (5) durch eine Fritte mit einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid kontinuierlich und gleichmäßig durchperlt.

Das nach oben hin offene Organbad wurde manuell mit dem entsprechenden Volumen an Elektrolytlösung befüllt. Die maximale Nährlösungsmenge entsprach bei der Versuchsanordnung mit der größeren Kammer des Organbads 28 ml, bei der mit der kleineren 8 ml. Das Entleeren des Bads erfolgte durch das Entfernen der Metallklappen an dem Abflussschlauch, der an der Unterseite der Kammer fixiert war (Organbadauslass).

Die Versuchspräparate Ileum, Aorta, Arteria pulmonalis und Uterus wurden an dem Kraftwandler (1) vertikal so befestigt, dass sie zwischen zwei Silberdrähten, die je in eine Öffnung des ringförmigen Stückes eingefädelt wurden (Aufhängevorrichtung (4)), eingespannt waren. Die Präparate Vorhof und Papillarmuskel wurden an der Oberseite durch einen Draht fixiert und an der Unterseite mit einem Plexiglasstück so eingeklemmt, dass der Muskel auf der Kathode, einem Silberchloriddraht, auflag.

Das Einspannen der präparierten Organe musste möglichst rasch vor sich gehen, um eine Mangelversorgung des Muskels zu suprimieren. Wichtig dabei war auch, dass der Muskel nicht überdehnt wurde.

Die gesamte Apparatur war an einem Stativ verankert und mittels Stativschlittens konnte die Organhalterung (3) auf und ab bewegt werden und somit in das Organbad eingetaucht werden. Mit Hilfe des Mikrometers (2) wurde die Vorspannung, die zum Erreichen der maximalen Kontraktionskraft nötig war, an das Präparat präzise angelegt.

Zur Messung der isometrischen Kontraktion dienten ein Kraftwandler und ein Verstärker

(Transbridge TM, 4-Chanel Transducer Amplifier) der Firma World Precision Instruments (WPI), Inc., Sarosta, Fl.,USA.

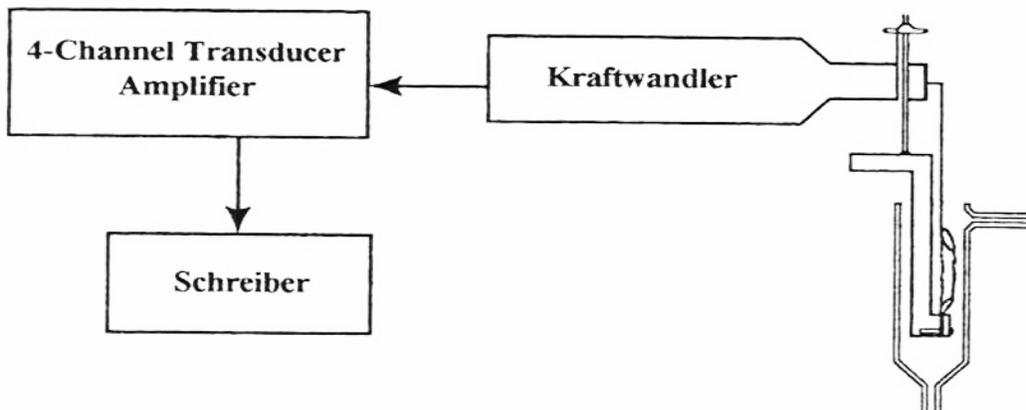
Die Aufzeichnung der Versuchsergebnisse erfolgt durch einen Schreiber der Marke Flatbed Recorder BD 112, Firma Kipp & Zonen, Holland.

### 3.4.2. Kraftwandler

Die Kontraktionskraft wurde nach folgendem Prinzip gemessen:

Die Kontraktionskraft, ein rein mechanischer und nicht elektrischer Vorgang, wurde von einem Koppelglied erfasst und von einem Wandler ("transducer") in eine elektrische Größe umgewandelt. Verwendet wurde ein Widerstanswandler mit Dehnungsmeßstreifen in Wheatstonescher Brückenschaltung. Der elektrische Widerstand des Messstreifens wurde durch Dehnung verändert, sodass bei einer Krafteinwirkung ein Strom proportional den Dehnungskräften fließt. die durch eine Muskelkontraktion ausgelösten Signale wurden von einem "4-Channel Transducer Amplifier" (World Precision Instruments, Fl.,USA) verstärkt. Die Registrierung erfolgte mit einem Schreiber (Singel Channel Model BD 112 Flatbed Recorder, Kipp & Zonen, NL-2600 Delft, Holland).

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kraftmessung und Registrierung

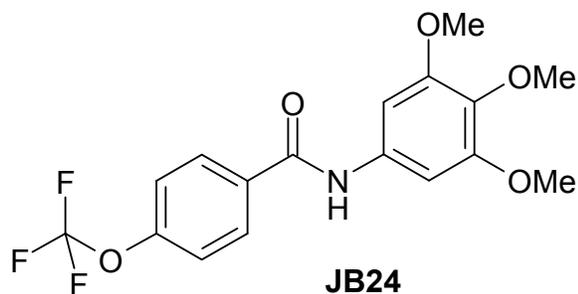


### 3.5. *Verwendete Substanz JB 24*

Die Versuche in dieser Arbeit an den verschiedenen isolierten Organen des Meerschweinchens wurden mit der Substanz JB 24 durchgeführt.

Die Substanz wurde am Institut für Organische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und von Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt.

#### Chemische und physikalische Angaben zu JB 24:



N-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-(4-trifluormethoxy)benzamid

Molecular Weight =371,32

Löslichkeit: DMSO

Kristallform: Plättchen

Farbe: weiß

Die Festsubstanz JB 24 musste in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst werden, um die Voraussetzung für die Entfaltung der Wirkung an den zu untersuchenden Organen zu schaffen. Die benötigte Stammlösung der Substanz wurde jeden Tag frisch zubereitet.

Die Versuche wurden in Organbädern mit teilweise unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Damit der Gehalt an JB 24 im Verhältnis gleich blieb, mussten die Substanzeinwaagen und Lösungsmittelmengen adäquat berechnet werden. Durch eingeschränkte Löslichkeit von JB 24 in DMSO, wurde bis zur Konzentration von 100 mol/l gearbeitet. Dadurch durfte die kumulative Substanzzugabe eine Badkonzentration von 100 mol/l nicht übersteigen.

Die Konzentrationsstufen reichten von 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 bis 100 mol/l. Durch kumulative Injektion der Stammlösung von 0,1; 0,2; 0,7; 2; 7; 20 und 70 l mittels Eppendorf- und Finnpipetten wurden die gewünschten Konzentrationsstufen im Organbad erreicht.

Das Intervall zwischen zwei Substanzzugaben war mit 45 Minuten limitiert. Diese Einwirkdauer reichte aus um eine vollständige Wirkung von JB 24 zu erzielen, die durch eine Ausbildung eines Plateaus ("stady state") erkennbar war.

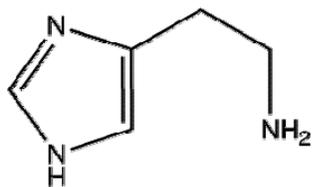
### 3.6. *Verwendete Agonisten*

Der Einfluss von JB 24 in Kombination mit den Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin wurde an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums untersucht.

Am Uterus wurde allerdings nur die Wirkung zusammen mit Histamin getestet.

#### 3.6.1. *Histamin*

*Abbildung 4: Strukturformel Histamin*



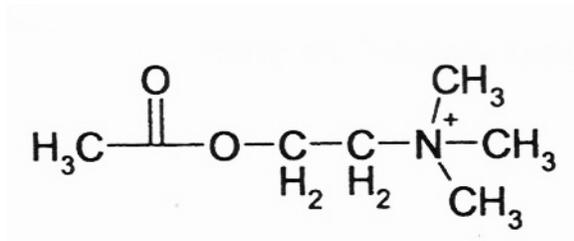
Histamin ist ein Gewebshormon, das beim Menschen in allen Organen vorkommt. Es entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Histidin. Die höchste Konzentration findet man in Lunge, Haut und im Magen-Darm-Trakt.

Histamin ist ein Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Gespeichert wird es in den Mastzellen, den basophilen Granulozyten oder gebunden an Heparin oder basische Proteine. Histamin greift an drei verschiedenen Rezeptoren (H1-H3, diese sind alle G-Protein gekoppelt) an, die Freisetzung aus den Speichern erfolgt beispielsweise bei Überempfindlichkeitsreaktionen, bei der Zerstörung von Zellen, z.B. in Folge von Verletzungen oder Verbrennungen, oder durch Entzündungsreaktionen (Thews et al. 1999).

Das heißt dieses Protein wirkt vasodilatierend und permabilitätssteigernd auf Kapillargefäße, kontrahierend auf glatte Muskulatur des Darms und der Bronchien und stimuliert die HCl-Produktion. Weiters spielt es eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale und Urtikaria.

### 3.6.2. Acetylcholin

Abbildung 5: Strukturformel Acetylcholin

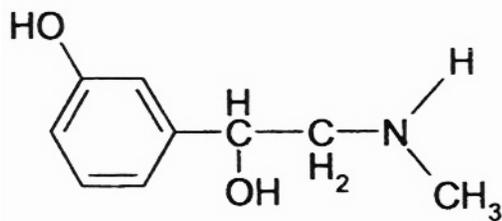


Acetylcholin ist ein biogenes Amin. Es wird im Endköpfchen bestimmter Axone durch die Cholinacetyltransferase aus den Komponenten Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert und in Vesikel im Zytoplasma des Neurons gespeichert. Dieser Neurotransmitter wird im synaptischen Spalt durch die Acetylcholinesterase in Cholin und Essigsäure gespalten.

Acetylcholin wirkt kontrahierend auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts, der ableitenden Harnwege und der Bronchialmuskulatur, negativ chronotrop und stimulierend auf die Drüsensekretion.

### 3.6.3. Phenylephrin

Abbildung 6: Strukturformel Phenylephrin



Phenylephrin zählt zu den alpha-1-Adrenozeptorenagonisten.

Die alpha-1-Adrenozeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch Adrenalin und Noradrenalin aktiviert werden. Sie sind in hoher Dichte im Zentralnervensystem, im sympathisch innervierten Gewebe, insbesondere im kardiovaskulären System, im Urogenitaltrakt und in den Blutgefäßen vorzufinden.

Die Stimulierung dieser Rezeptoren führt zur Tonuserhöhung der Organe des Gastrointestinal- und des Urogenitaltrakts, zu Vasokonstriktion der Blutgefäße und somit zur Blutdrucksteigerung.

Phenylephrin wird therapeutisch zur Schleimhautabschwellung und zur Behandlung hypotoner Zustände topisch und systemisch eingesetzt.

## ***3.7. Versuchsablauf***

### ***3.7.1. Untersuchung der Testsubstanz JB 24***

#### ***3.7.1.1. Versuchspräparat rechter Vorhof***

Der Vorhof wurde, wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben, präpariert und in die Versuchsapparatur eingespannt und in die bereits temperierte Tyrode eingesenkt. Dann wurde eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt, um die maximale Kontraktion zu erzielen. Diese Kraft wurde konstant gehalten und so lange kontinuierlich mit dem Feintrieb nachjustiert, bis der Vorhof eine Schlagzahl von etwa 160 Schlägen / min aufwies. Dies stellte sich nach zirka 50 - 60 Minuten ein.

Danach wurden im Abstand von 5 Minuten die Amplituden der Schlagfrequenz für eine Dauer von 12 Sekunden durch den Schreiber (mit einem Papiervorschub von 5 mm/sek) registriert und die Anzahl der Impulse sofort ausgewertet. Sobald die berechneten Werte nach etwa weiteren 30 Minuten eine Konstanz aufwiesen und sich daraus der Kontrollwert ergab, wurde mit der Substanzzugabe begonnen.

Die Konzentrationen wurden kumulativ alle 45 min. mit einer Finnpipette zugegeben, wobei zu beachten war, die Substanz möglichst nahe am Organ und möglichst immer an der gleichen Stelle zuzugeben, ohne das Organ oder den Kraftwandler zu berühren.

Die Messung der Schlagfrequenz erfolgte bis zum Ende des Versuchs alle 5 Minuten.

#### ***3.7.1.2. Versuchspräparat Papillarmuskel***

Der präparierte Papillarmuskel wurde an der Oberseite durch einen Draht fixiert, an der Unterseite zwischen zwei Plexiglasscheibchen eingeklemmt, ins Organbad übergeführt und in die physiologische Nährlösung eingetaucht. Dann wurde eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt.

Diese Spannung wurde auch während des Versuchsverlaufes immer wieder nachgestellt, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Im Gegensatz zum Sinusknoten, der eine Spontanaktivität aufweist, war beim Papillarmuskel eine elektrische Reizung erforderlich. Die Reizquelle stammte vom Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Isolator A360 (World Precision Instruments, Hamden, Fl., USA) über Silberchloridelektroden.

Nach einer zirka einer 10minütigen Anpassungszeit wurde mit Rechteckimpulsen von 3 ms gereizt, wobei die Frequenz bei 1 Hz lag. Sobald die Reizschwelle erreicht wurde, folgte eine Erhöhung der Stromstärke um 10 %, um sicherzustellen, dass auch jede Sekunde eine Kontraktion ausgelöst wurde. Eine zu hohe Stromstärke hätte eventuell zu einer Entleerung der Katecholaminspeicher zur Folge gehabt, dadurch wären die Ergebnisse verfälscht worden (Furchgott et al. 1959).

Nach einer Kontrollphase von zirka 45 Minuten, während dieser die Kontraktion alle 10 Minuten aufgezeichnet wurde, und die Amplituden am mm-Papier abgemessen wurden, wurde mit der kumulativen Zugabe der Substanz begonnen. Die Amplituden wurden alle 5 min. aufgezeichnet, von jeweils 3 Kontraktionen.

### ***3.7.1.3. Versuchspräparat terminales Ileum***

Das präparierte Darmstück wurde in die Aufhängevorrichtung eingebracht und in das mit gewärmter Tyrode gefüllte Organbad abgesenkt. Hier wurde mit einer Vorspannung von 4,9 mN gearbeitet. Während der etwa 25 min. dauernden Anpassungszeit wurde mit dem Feintrieb des Mikrometers auf die definierte Nulllinie nachjustiert.

War ein konstanter Ruhetonus der glatten Muskulatur erreicht, wurde mit einer 60 mM KCl-Lösung vorkontrahiert. Diese wurde zuvor mit Tyrode hergestellt. 60 mM entsprechen einer Menge von 0,44 g KCl gelöst in Tyrode, gearbeitet wird mit einem 100 ml Messkolben.

Die Nährlösung im Organbad wurde, über einen Schlauchanschluss an der Unterseite, mit Hilfe einer Klammer abgelassen und die KCl-Lösung eingefüllt. Es erwies sich als vorteilhaft, diese vorher kurz im Wasserbad anzuwärmen und so die Temperatur auf 37°C anzugleichen.

Dadurch erfolgte augenblicklich eine Kontraktion des Darmstückes. Unmittelbar vor dem Wechsel der beiden Flüssigkeiten wurde der Schreiber zur Registrierung der Kontraktion eingeschaltet. Nach ca. 45 Minuten war ein Plateau erreicht, das einer maximalen Kontraktion entsprach, das heißt, die Wirkung von KCl hatte sich voll entfaltet. Bezogen auf diese Ausgangskontraktion, festgesetzt mit 100 %, wurden die Folgewerte berechnet.

Anschließend konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden. Alle 45 Minuten wurde die nächst höhere Konzentration zugesetzt. Der gesamte Versuch wurde mit dem Schreiber aufgezeichnet.

#### ***3.7.1.4. Versuchspräparat Aorta***

Der etwa 2 mm dicke Aortaring wurde zwischen zwei Silberdrahthäkchen so eingehängt, ohne ihn zu stark zu dehnen und dadurch möglicherweise zu verletzen. Dann wurde das Präparat in die mit vorgewärmter Aortatyrode versetzte Muskelkammer eingesenkt und mit 19,6 mN vorgespannt.

Auch hier war eine Anpassungszeit von mindestens 45 Minuten einzuhalten. Während dieser wurde, wieder über den Feintrieb der Stellschraube, eine eventuelle Abweichung von der definierten Nulllinie ausgeglichen.

Wie schon im Kapitel 3.7.1.3. beschrieben, erfolgte nun die Aktivierung des Schreibers und der Austausch der Tyrode durch eine 90 nM (=0,67 g) KCl-Lösung. Die ebenfalls mit Tyrode aufgefüllt und danach 100 ml im Messkolben abgemessen wurde.

Nach 60 - 90 min. Wartezeit wurde der Plateauwert erreicht. Dann konnte mit der Substanzinjektion begonnen werden. Im Intervall von wieder 45 min. wurde der Gehalt der Testsubstanz solange erhöht, bis die Endkonzentration von 100 mol/l erreicht war.

Der Schreiber zeichnete permanent die Kontraktionsänderungen auf.

### **3.7.1.5. *Versuchspräparat Arteria pulmonalis***

Die Versuche an der Pulmunalarterie wurden analog zur Aorta durchgeführt, wie in Kapitel 3.7.1.4. beschrieben.

Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine Vorspannung von 9,81 mN angelegt wurde.

### **3.7.2. *Untersuchung von Agonisten in Kombination mit JB 24***

Der Einfluss der Testsubstanz JB 24 auf die Kontraktilität des terminalen Ileums in Gegenwart der Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin wurde untersucht.

Weiters wurde auch der Effekt von JB 24 auf den Uterus bei gleichzeitiger Exposition von Histamin ermittelt.

#### **3.7.2.1. *Untersuchungen am terminalen Ileum***

Das Darmstück wurde wie im Kapitel 3.7. beschrieben, präpariert und in die Versuchsapparatur eingespannt und in das Organbad mit Tyrode eingesenkt. Für die Vorspannung war ein Kraftaufwand von 4,9 mN nötig, nach einer Anpassungszeit von etwa 20 min. konnte mit der Kontrolle begonnen werden.

Zu diesem Zweck wurden mit den Agonisten entsprechende Verdünnungsreihen hergestellt.

So wurden bei Histamindihydrochlorid, Phenylephrinhydrochlorid und Acetylcholinhydrochlorid die Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  verwendet.

In Abständen von 10 min. wurden die unterschiedlichen Konzentrationsstufen, des in Tyrode gelösten, Agonisten per Injektionsnadel zugesetzt und unmittelbar nach Zugabe für 30 Sekunden die Kontraktionen mittels Schreiber erfasst.

Dann wurde die Tyrode abgelassen, das Organbad einmal mit der Elektrolytlösung durchgespült und wieder auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

Nach einer 10minütigen Ruhepause wurde dieser Vorgang so oft wiederholt, bis für jede Konzentration des Agonisten ein Kontrollwert aufgezeichnet war, um danach die Ergebnisse berechnen zu können.

Für den Versuch selber wurde der Tyrode die bestimmte Konzentration von JB 24 zugesetzt, nach einer Einwirkzeit von 45 Minuten wurde, wie oben beschrieben, wieder mit der Zugabe der Agonisten begonnen.

Wichtig dabei war, den Injektionsvorgang immer gleich zu gestalten, d.h. gleiche Einspritzstelle im Organbad und gleiche Einspritzgeschwindigkeit. Um das Badevolumen durch Zugabe des Agonisten nicht zu stark zu verändern und um größere Temperaturdifferenzen zu vermeiden, wurden die Konzentrationen der Agonisten so gewählt, dass eine Zugabe von 0,5 ml eine ausreichende Kontraktion des Präparats verursacht hatte.

Entscheidend für aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse, war die exakte Einhaltung der vorgegebenen Einwirkzeit und der Messintervalle.

### ***3.7.2.2. Untersuchungen am Uterus***

Das Uteruspräparat wurde eingespannt, in die Nährlösung abgesenkt und eine Vorspannung von 19,62 mN (2 g) angelegt. Es folgte eine 15minütige Anpassungszeit. Danach der Austausch der Uterustyrode gegen eine 30 mmolare KCl-Lösung (0,225 g KCl / 100 ml Tyrode). Nach 30minütiger Einwirkzeit, wurde das Organbad mit der Elektrolytlösung zweimal ausgewaschen und schließlich mit derselben auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

Auch für diese Untersuchung wurde eine Verdünnungsreihe des Agonisten Histamindihydrochlorid gemacht, allerdings nur in den Konzentrationen 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Dann wurde der Agonist mittels Injektionsspritze zugesetzt, nach 7 Minuten die Kontraktion für 3 Minuten mit Hilfe des Schreibers zu Papier gebracht.

Darauf folgte wieder die Auswaschphase. Dieser Vorgang wurde für jede Agonistenkonzentration dreimal wiederholt. Durch diese Methode wurden die Kontrollwerte erzielt.

Danach wurde dem Organbad die Testsubstanz zugesetzt. Nach der Einwirkphase von 45 Minuten wurde die Versuchsdurchführung, wie eben erläutert, fortgesetzt.

Der Einspritzvorgang, Einwirkzeiten, Messintervalle mussten ebenfalls, wie bei dem zuvor beschriebenen Versuchspräparat terminals Ileum, sorgfältig vollzogen werden.

### ***3.7.3. Ablauf der Lösungsmittelversuche***

Als Lösungsmittel für JB 24 wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. DMSO hatte eine Eigenwirkung auf die isolierten Organe und musste daher bei den Berechnungen der Endergebnisse berücksichtigt werden.

Es wurden Lösungsmittelversuche durchgeführt um den Einfluss von DMSO zu bestimmen und von der Wirkung von JB 24 zu differenzieren.

Der Ablauf dieser Versuche verlief analog den Testsubstanzversuchen, mit dem Unterschied, dass DMSO allein, ohne JB 24 Zusatz, als Stammlösung herangezogen wurde.

Pro Präparat wurden mindestens 3 reproduzierbare Resultate erhoben und ausgewertet.

### ***3.8. Messgrößen und Statistik***

Die Auswertung der Versuchsreihe mit den rechten Vorhöfen ergab sich aus der Änderung der Spontanfrequenz. Der Schreiber registrierte jeweils die Schlagfrequenz innerhalb von 12 Sekunden. Dieses Intervall entsprach bei einem Papiervorschub von 5 mm/s einer Aufzeichnungsstrecke von 6 cm auf dem Millimeterpapier. Die Impulse wurden abgezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert. Diese Endergebnisse gaben somit die Anzahl der Schläge pro Minute wieder.

Die Kontraktionskraft der Papillarmuskeln wurde in mN berechnet. Die mit dem Schreiber zu Papier gebrachten Amplituden wurden mit dem Lineal abgemessen und mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert. (bei 5 mV galt: 1 cm entspricht 0,98 mN)

Die Tonusänderung der Präparate Aorta, terminales Ileum und Arteria pulmonalis wurde durch die vom Schreiber erfasste Kurve ausgewertet. Die Abstände zwischen der Nulllinie und jenen Punkten auf der Kurve, die bei der Substanzinjektion der jeweiligen Konzentration markiert worden waren, wurden vermessen. Um den entsprechenden Wert in mN zu erhalten, wurden die cm mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert.

Bei den Kombinationsversuchen Agonist und JB 24 wurden die Länge der registrierten Peaks abgemessen und ebenfalls unter Berücksichtigung des Eichfaktors die mN-Werte ermittelt.

Aus den Messdaten wurden die prozentuellen Ab- und Zunahmen der Schlagfrequenz bzw. der Kontraktionskraft gegenüber einem Kontrollwert berechnet. Der Kontrollwert kristallisierte sich durch steady-state-Bedingungen heraus. Er entsprach der Konstanz der Schläge des Sinusknotens, der Konstanz der Höhe der Amplituden des Papillarmuskels bzw. dem Plateauwert der Kontraktionskurven vor Beginn der Substanzzugabe. Dieser Bezugspunkt wurde mit 100 % definiert.

Die Messdaten aus n Versuchen wurden als arithmetische Mittelwerte inklusive der jeweiligen Standardfehler dieser Mittelwerte (SEM) dargestellt. Die  $EC_{50}$ , also jene Konzentration an zugesetzter Substanzmenge in  $\mu\text{mol/l}$ , bei der die Schlagfrequenz bzw. die Kontraktionskraft auf die Hälfte des Ausgangswertes (Kontrollwertes) absank, wurde auf graphischem Wege aus den Konzentrations – Wirkungskurven ermittelt.

Die Messergebnisse wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz nach dem ungepaarten Student- t-Test beurteilt. Zu dieser Berechnung wurden die Messwerte in mN herangezogen, da bei den in Prozent ausgedrückten Werten der Vergleichswert keine Streuung aufweist und dadurch eine höhere Signifikanz vorgetäuscht worden wäre.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  ( $P < 0,05$ ) bzw.  $< 1\%$  ( $P < 0,01$ ) wurden die Werte als signifikant eingestuft, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 0,1\%$  ( $P < 0,001$ ) als hochsignifikant.

## 4 ERGEBNISSE

### *4.1. Wirkung von JB 24 auf verschiedene isolierte Organe des Meerschweinchens*

#### *4.1.1. Wirkung von JB 24 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs*

Am rechten Vorhof wurde der Einfluss von JB 24 auf die spontane Schlagfrequenz an 5 Präparaten getestet. Wie in Kapitel 3.7.1.1. erläutert, musste nach dem Vorspannen die Schlagzahl des Sinusknotens annähernd konstant sein, um mit dem Versuch zu beginnen. Es wurden die üblichen Konzentrationsstufen 1; 3; 10; 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  zur Erhebung der Daten herangezogen werden.

Der Kontrollwert wurde aus den 5 Versuchen mit  $224 \pm 4,85$  definiert. Es konnte eine geringfügige, kontinuierliche Abnahme der Schlagfrequenz beobachtet werden. Die  $EC_{50}$  wurde nicht erreicht. Die Reduktion vom Ausgangswert betrug am Ende des Versuchs  $183 \pm 5,39$ . Das heißt eine Verminderung um 18,27.

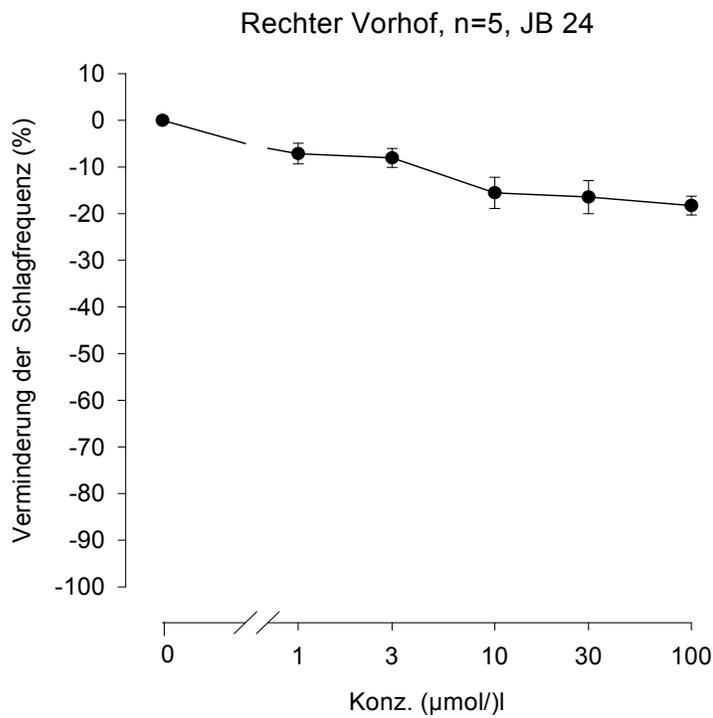
*Tabelle 4: Wirkung von JB 24 auf den rechten Vorhof*

<b>JB 24 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>f <math>\pm</math> SEM (nM)</b>	<b>f <math>\pm</math> SEM ( % )</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrschein- lichkeit P</b>
<b>Kontrolle</b>	224 $\pm$ 4,85	0 $\pm$ 0	5	---
<b>1</b>	208 $\pm$ 6,63	-7,13 $\pm$ 2,21	5	n.s.
<b>3</b>	206 $\pm$ 6,96	-8,07 $\pm$ 2,04	5	n.s.
<b>10</b>	189 $\pm$ 7,81	-15,55 $\pm$ 3,36	5	n.s.
<b>30</b>	187 $\pm$ 8,46	-16,46 $\pm$ 3,54	5	n.s.
<b>100</b>	183 $\pm$ 5,39	-18,27 $\pm$ 2,00	5	n.s.

Legende zu Tabelle 4:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des Sinusknotens pro Minute und die entsprechenden Standardfehler (SEM) aus 5 Versuchsergebnissen.

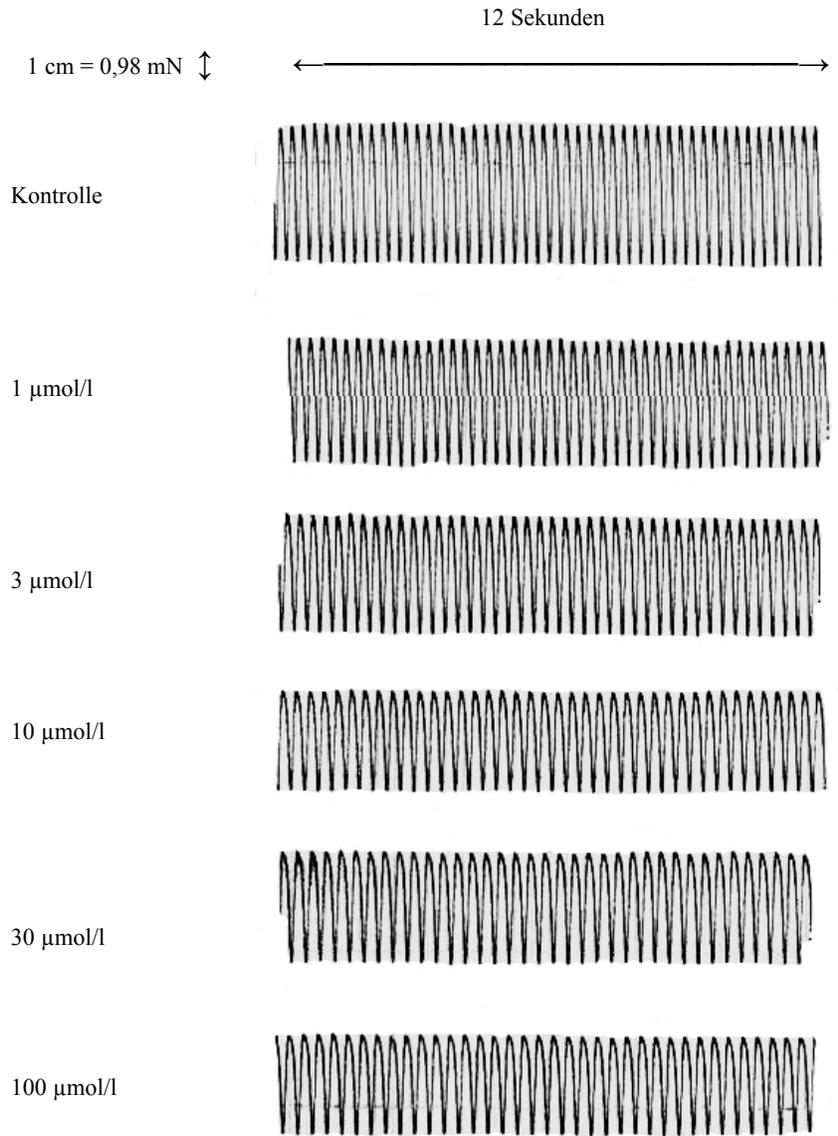
Abbildung 7: Konzentrations – Wirkungskurve von JB 24 an rechten Vorhöfen



Legende zu Abbildung 7:

Der Graph veranschaulicht den Effekt von JB 24 auf isolierte rechte Vorhöfe. Auf die Abszisse wurde linear die Abnahme der Schlagfrequenz in % aufgetragen, auf der Ordinate wurden die Konzentrationen der Testsubstanz als logarithmische Funktion aufgetragen. Die Punkte entlang der Kurve symbolisieren die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz aus 5 Versuchen, die Balken deren Standardfehler.

*Abbildung 8: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 24 auf die Schlagfrequenz von rechten Vorhöfen*



*Legende zu Abbildung 8:*

Die Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers. JB 24 wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  in 45-minuten-Abstand zugesetzt. Daraus ist eine leichte Abnahme der Impulse erkennbar, die mit zunehmender Konzentrationszunahme korreliert.

#### ***4.1.2. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels***

Wie unter Kapitel 3.7.1.2. beschrieben, wurde die Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln an 5 Versuchspräparaten getestet. Nach Erreichen der Konstanz der Kontraktionskraft durch die Ausgangswert von 100 % bestimmt wurde, wurde die Substanz im Intervall von 45 Minuten in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  in das Organbad injiziert.

JB 24 zeigte eine leicht negativ inotrope Wirkung, die sich jedoch als statistisch nicht signifikant erwies. Es konnte auch keine  $EC_{50}$  erreicht werden. Der Mittelwert der Kontrollwerte aus 5 Versuchen wurde mit  $1,62 \pm 0,30$  ermittelt und als 100 % - Wert definiert.

Die Kontraktionskraft stieg bei der Zugabe von der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  leicht an auf einen Wert von  $1,69 \pm 0,33$ . Aber ab der Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  begannen der Tonus des Papillarmuskels leicht zu sinken, beinahe linear weiter verlaufend bis zum Ende der Versuchsreihe bei 100  $\mu\text{mol/l}$  mit dem Wert von  $1,50 \pm 0,33$ . Das entspricht einem Prozentsatz von  $90,12 \pm 5,98$  %.

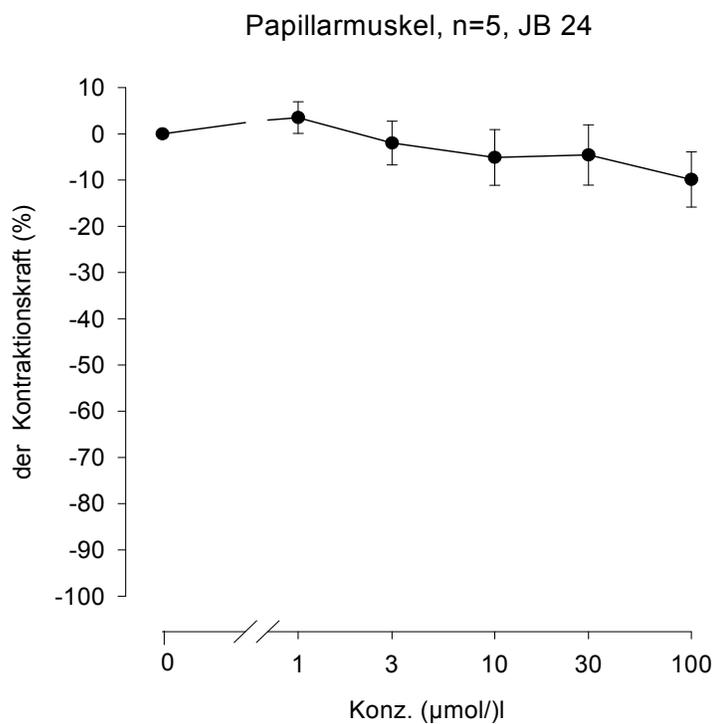
*Tabelle 5: Wirkung von JB 24 auf den Papillarmuskel*

<b>JB 24 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrschein- lichkeit P</b>
<b>Kontrolle</b>	1,62 $\pm$ 0,30	0 $\pm$ 0	5	--
<b>1</b>	1,69 $\pm$ 0,33	+3,51 $\pm$ 3,43	5	n.s.
<b>3</b>	1,60 $\pm$ 0,31	-2,00 $\pm$ 4,75	5	n.s.
<b>10</b>	1,56 $\pm$ 0,33	-5,11 $\pm$ 6,04	5	n.s.
<b>30</b>	1,60 $\pm$ 0,36	-4,58 $\pm$ 6,52	5	n.s.
<b>100</b>	1,50 $\pm$ 0,33	-9,88 $\pm$ 5,98	5	n.s.

*Legende zu Tabelle 5:*

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ), sowie deren Standardfehler (SEM) in mN und in %. Die Werte wurden aus 5 Versuchen errechnet.

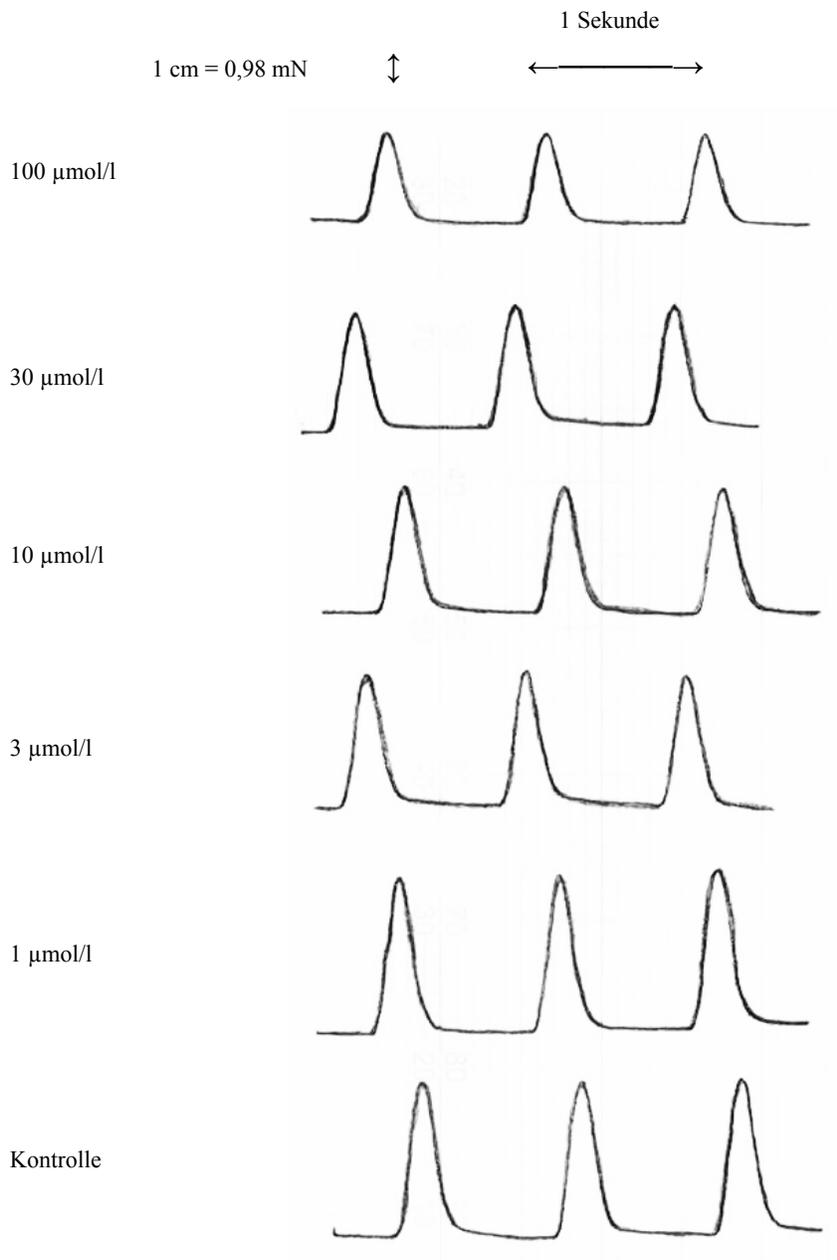
**Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve von JB 24 an isolierten Papillarmuskeln**



*Legende zu Abbildung 9:*

Die Kurve veranschaulicht die Wirkung von JB 24 auf isolierte Papillarmuskelpräparate durch kumulative Einwirkung der Testsubstanz. Die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent auf der Abszisse, die Konzentration von JB 24 in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Ordinate aufgetragen. Die dargestellten Punkte auf dem Graph kennzeichnen die arithmetischen Mittelwerte, die Balken ihre Standardabweichung.

**Abbildung 10: Originalaufzeichnung des Einflusses von JB 24 auf die Kontraktionskraft von isolierten Papillarmuskeln**



*Legende zu Abbildung 10:*

Die Abbildung zeigt eine Originalregistrierung des Schreibers, aus der die Wirkung von JB 24 aus der Größe der Amplitude ersichtlich wird. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Substanzzugaben wurde mit 45 Minuten begrenzt.

### ***4.1.3. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums***

Gemäß Kapitel 3.7.2.3. wurde die Wirkung von JB 24 auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums an 5 Präparaten untersucht. Der Darm wurde mit einer 60 mmol/l KCl-Lösung vorkontrahiert und anschließend wurde JB 24 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  in einem Abstand von 45 Minuten zugesetzt.

Die Testsubstanz führte zu Beginn nur zu einer leichten Relaxation der Muskulatur des terminalen Ileums. Nach der Kontrolle wurde der Mittelwert aus den 5 Versuchen mit  $14,80 \pm 1,50$  mN definiert und als 100 % festgelegt.

Mit der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  war eine deutliche Abnahme erkennbar. Es wurde die EC50 bei 25  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Die Kontraktionskraft fiel auch mit den weiteren Konzentrationszugaben noch weiter, aber bei weitem nicht so radikal, wie bei der Zugabe von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf einen Wert von  $5,95 \pm 1,61$  mN. Nach Erreichen von 100  $\mu\text{mol/l}$  nahm der Tonus der Muskulatur auf  $31,47 \pm 4,22$  % ab.

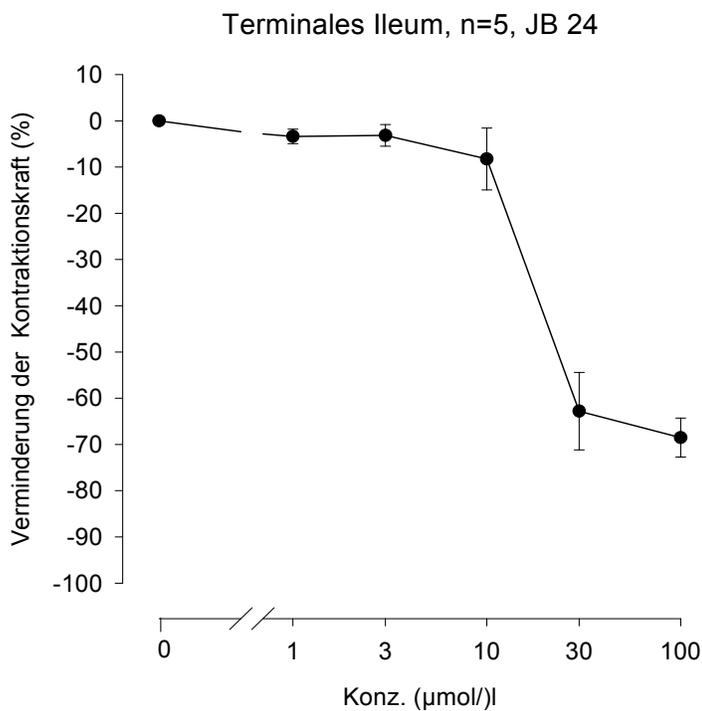
*Tabelle 6: Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrschein- lichkeit P</b>
<b>Kontrolle</b>	14,80 $\pm$ 1,50	0 $\pm$ 0	5	--
<b>1</b>	14,35 $\pm$ 1,58	-3,37 $\pm$ 1,56	5	n.s.
<b>3</b>	14,43 $\pm$ 1,70	-3,14 $\pm$ 2,35	5	n.s.
<b>10</b>	12,35 $\pm$ 1,85	-18,24 $\pm$ 6,70	5	n.s.
<b>30</b>	5,95 $\pm$ 1,61	-62,79 $\pm$ 8,37	5	0,01
<b>100</b>	5,26 $\pm$ 0,89	-68,53 $\pm$ 4,22	3	0,01

*Legende zu Tabelle 6:*

Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) sowie deren Standardfehler (SEM) aus 3-5 Versuchen wieder. Durch den Student-t-Test wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten berechnet.

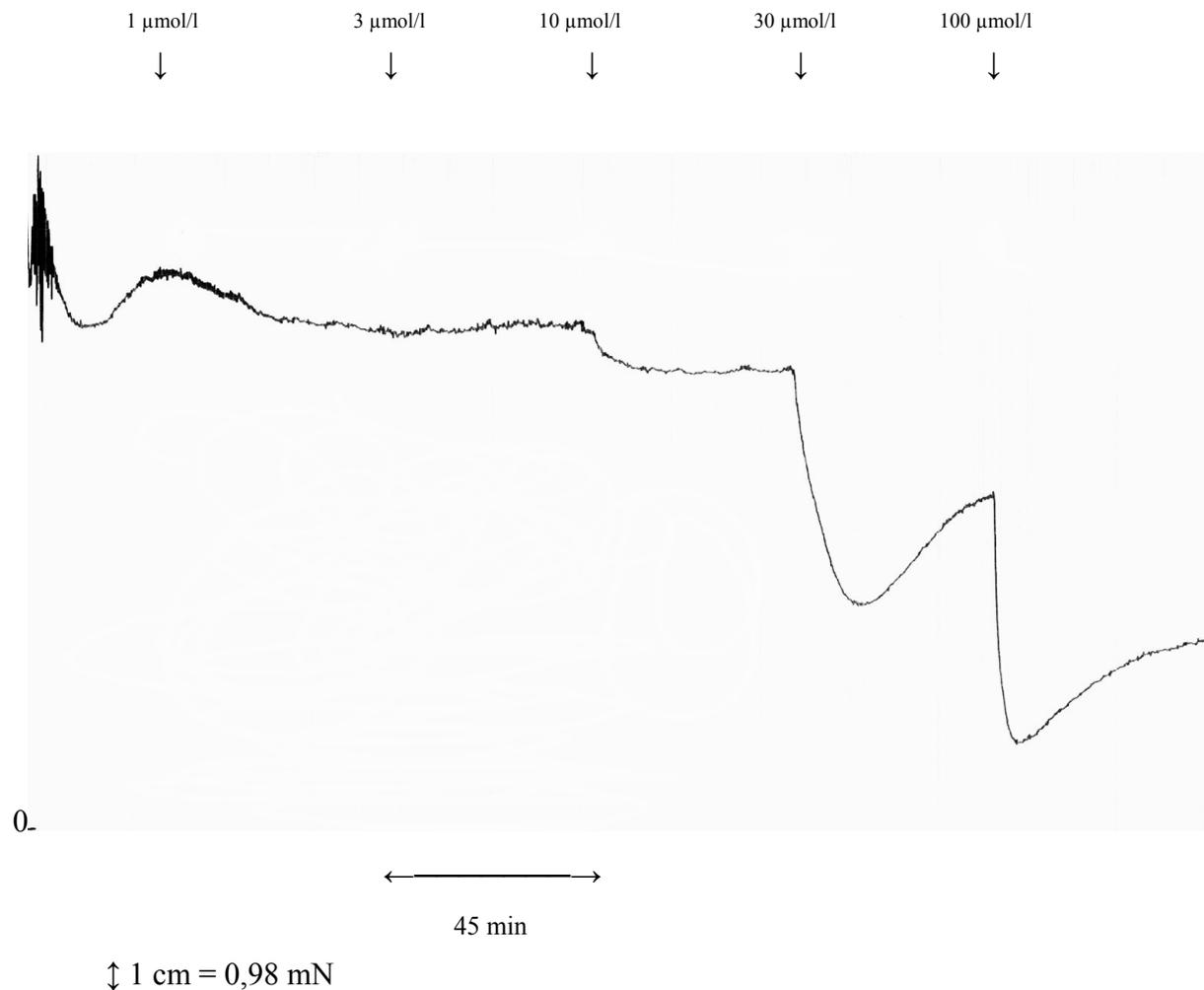
**Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve von JB 24 am terminalen Ileum**



*Legende zu Abbildung 11:*

Diese Abbildung stellt die Kontraktionskraft des terminalen Ileums nach der kumulativen Zugabe von JB 24 dar. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme in %. Die Kreise zeigen die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler in Form von Balken.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums



*Legende zu Abbildung 12:*

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums, hervorgerufen durch JB 24, in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l. Die dargestellten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzinjektionen. Die Einwirkzeit zwischen den Zugaben betrug jeweils 45 Minuten.

Die  $EC_{50}$  wird bei einem Wert von 25 µmol/l erreicht.

#### ***4.1.4. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta***

Wie in Kapitel 3.7.1.4. beschrieben, wurde die Wirkung der Testsubstanz JB 24 auf die Kontraktionskraft der Aorta an 5 Präparaten getestet. Das Organ wurde mit einer 90 mmol/l KCl-Lösung vorkontrahiert und anschließend wurde die Probesubstanz JB 24 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  in 45 Minutenabständen kumulativ zugegeben.

Während der Kontrollphase wurde als Mittelwert von 5 Versuchen eine Kontraktionskraft von  $5,73 \pm 0,37$  mN gemessen. Ab der ersten Substanzzugabe konnte eine kontinuierliche Steigerung der Kontraktion der Aorta ermittelt werden. Sie erreichte ihre Spitze bei der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  bei einem Wert von  $122,42 \pm 8,21$  %.

Ab der Konzentrationserhöhung auf 30  $\mu\text{mol/l}$  begann der Tonus der Aorta wieder zu sinken. Bei der letzten Substanzinjektion (100  $\mu\text{mol/l}$ ) wurde ein Wert von  $6,12 \pm 0,38$  mN erreicht.

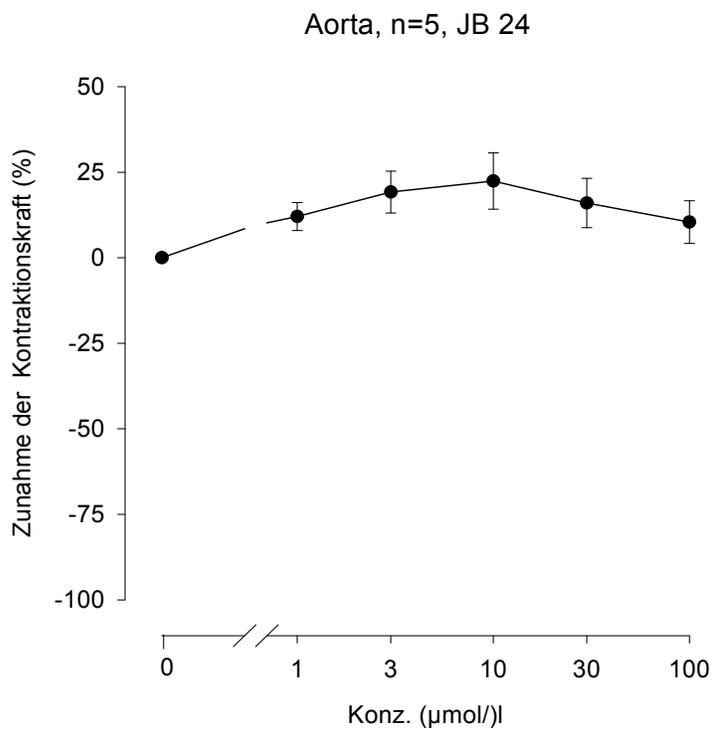
*Tabelle 7: Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der Aorta*

<b>JB 24 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrschein- lichkeit P</b>
<b>Kontrolle</b>	5,73 $\pm$ 0,37	0 $\pm$ 0	5	--
<b>1</b>	6,23 $\pm$ 0,38	12,06 $\pm$ 4,10	5	n.s.
<b>3</b>	6,59 $\pm$ 0,36	19,20 $\pm$ 6,10	5	n.s.
<b>10</b>	6,74 $\pm$ 0,28	22,42 $\pm$ 8,21	5	n.s.
<b>30</b>	6,41 $\pm$ 0,35	16,01 $\pm$ 7,20	5	n.s.
<b>100</b>	6,12 $\pm$ 0,38	10,42 $\pm$ 6,22	5	n.s.

*Legende zu Tabelle 7:*

Die Tabelle stellt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) inklusive der Standardfehler (SEM) aus 5 Versuchen dar. Die Werte sind in mN und in % angegeben und beziehen sich auf den Kontrollwert. Die Signifikanz wird durch die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ausgedrückt, wobei die Abkürzung n.s. für nicht signifikant steht.

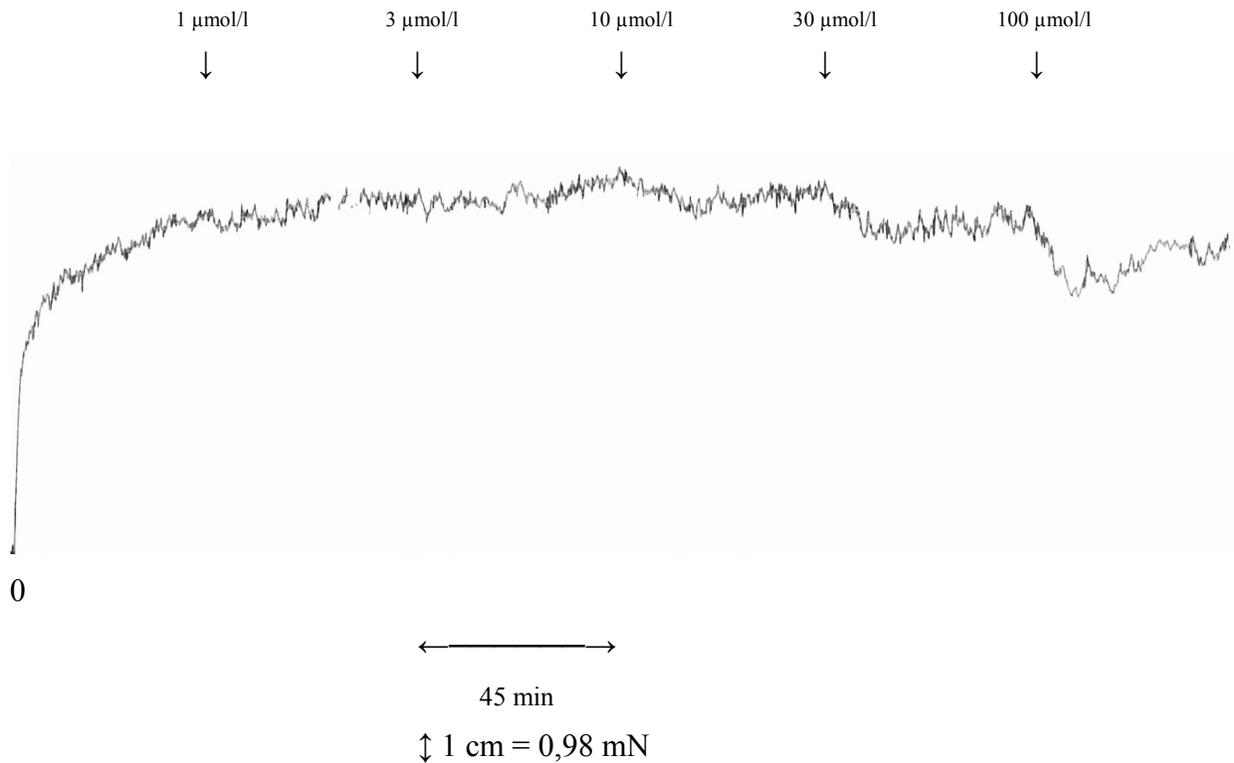
**Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von JB 24 an der Aorta**



*Legende zu Abbildung 13:*

Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der isolierten Aorta nach der kumulativen Substanzerhöhung. Auf der Abszisse wurden die unterschiedlichen Konzentrationen von JB 24 in µmol/l aufgetragen, auf die Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Vollkreise entlang der Kurve stellen die arithmetischen Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern in Balkenform dar.

Abbildung 14: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta



*Legende zu Abbildung 14:*

Die Kurve gibt die Kontraktionsänderung der glatten Muskulatur nach Konzentrationserhöhung von JB 24 wieder und wurde mittels eines Schreibers dokumentiert. Die dargestellten Pfeile markieren die unterschiedlichen Konzentrationsstufen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l und die Länge der Kurve zwischen zwei benachbarten Pfeilen ist mit einem Intervall von 45 Minuten begrenzt.

#### ***4.1.5. Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis***

An der Arteria pulmonalis wurde die Wirkung von JB 24 wiederum an 5 Präparaten untersucht, wie in Kapitel 3.7.1.5. erklärt. Zuerst wurde eine maximale Vorkontraktion durch eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung angestrebt. Die einzelnen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  wurden alle 45 Minuten kumulativ in das Organbad zugespritzt.

Der Kontrollwert wurde nach der Anpassungszeit mit einem Wert von  $7,21 \pm 0,60$  mN aus 5 Versuchen errechnet und mit 100 % fixiert. Es konnte ab der ersten Zugabe ein Anstieg der Kontraktion ermittelt werden. Der Prozentsatz stieg auf  $103,91 \pm 1,42$  %. Die Werte stiegen weiter kontinuierlich mit jeder Substanzzugabe bis auf  $106,10 \pm 2,07$  % oder  $7,62 \pm 0,55$  mN, bei der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Ab 30  $\mu\text{mol/l}$  setzte eine leichte Relaxation ein, die sich auch bei der Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  fortsetzte. Trotzdem lag der Endwert der Versuche immer noch bei  $100,36 \pm 1,05$  % und damit über dem Ausgangswert der Versuchsreihe.

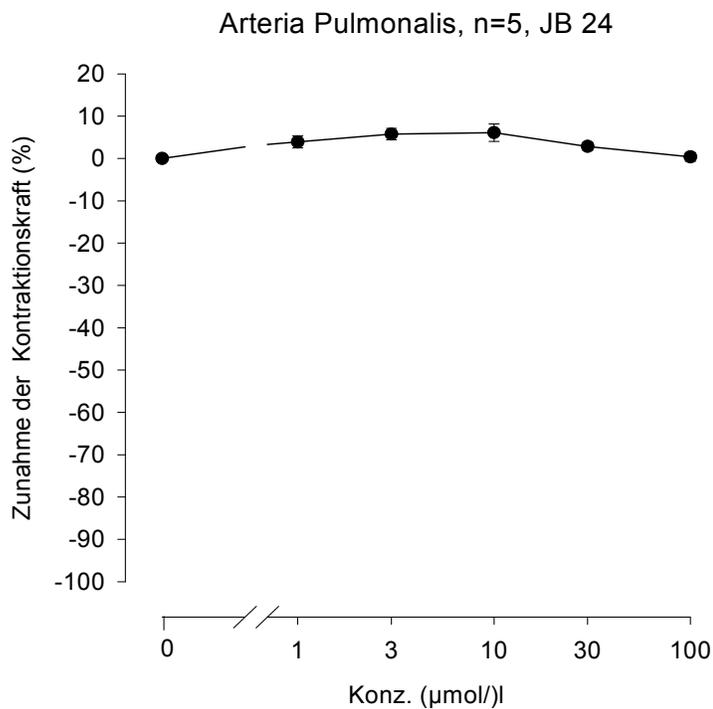
*Tabelle 8: Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft ( $f_c$ ) der Arteria pulmonalis*

<b>JB 24 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahrschein- lichkeit P</b>
<b>Kontrolle</b>	7,21 $\pm$ 0,60	0 $\pm$ 0	5	--
<b>1</b>	7,49 $\pm$ 0,60	3,91 $\pm$ 1,42	5	n.s.
<b>3</b>	7,61 $\pm$ 0,59	5,75 $\pm$ 1,34	5	n.s.
<b>10</b>	7,62 $\pm$ 0,55	6,10 $\pm$ 2,07	5	n.s.
<b>30</b>	7,41 $\pm$ 0,61	2,85 $\pm$ 0,94	5	n.s.
<b>100</b>	7,26 $\pm$ 0,65	0,36 $\pm$ 1,05	5	n.s.

*Legende zu Tabelle 8:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraftänderung in mN und in Prozent, berechnet aus 5 Versuchen.

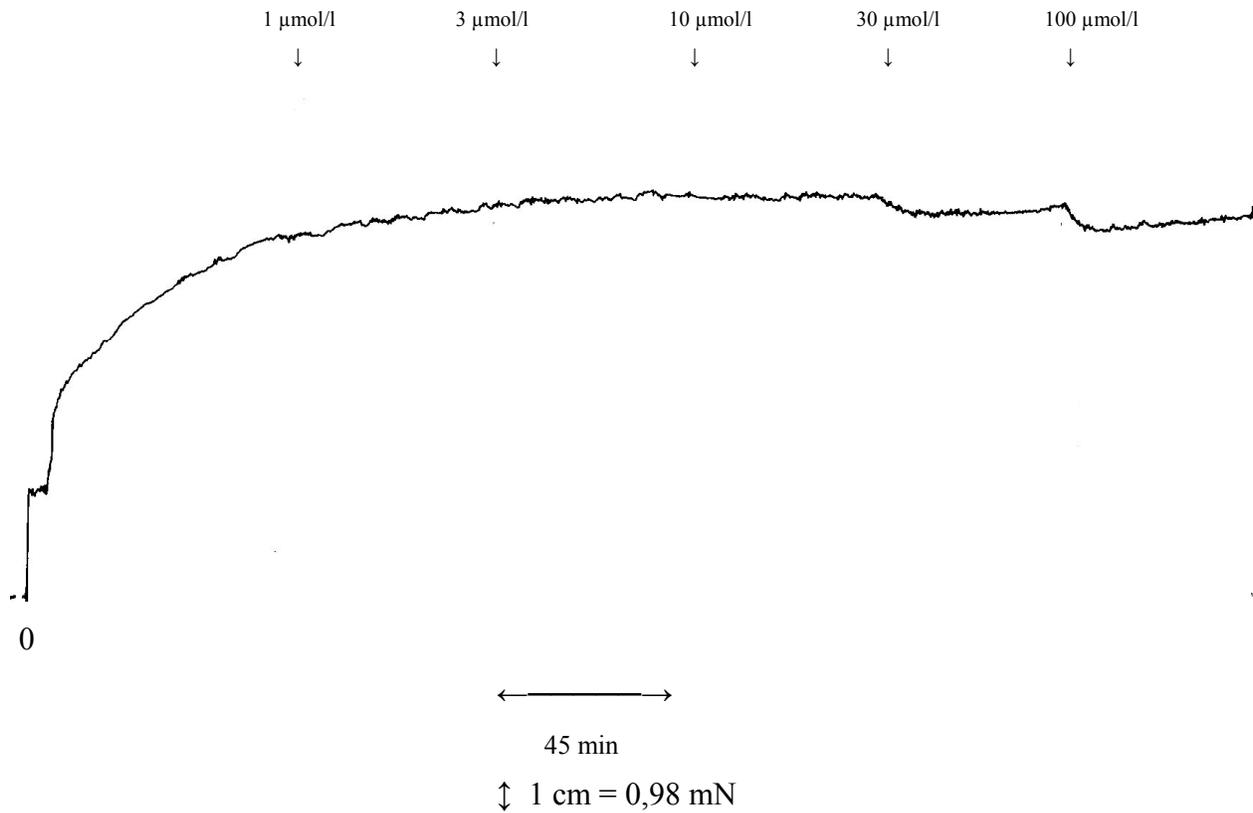
**Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von JB 24 an der isolierten Arteria Pulmonalis**



*Legende zur Abbildung 15:*

Der Graph zeigt die Zunahme der Kontraktionskraft der isolierten Arteria Pulmonalis durch kumulative Erhöhung der Testsubstanz. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen von JB 24 aufgetragen, auf die Ordinate die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die gemessenen Mittelwerte, die Balken deren Standardfehler dar, vor der jeweils nächsten Erhöhung der Konzentrationsstufe. Der temporäre Abstand zwischen zwei Substanzgaben betrug 45 Minuten.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 24 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis



*Legende zu Abbildung 16:*

Die Originalaufzeichnung des Schreibers zeigt die Zunahme der Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis bei Exposition von JB 24 in den Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l. Die Pfeile markieren die Substanzinjektion, die zeitlichen Abstände der Substanzzugabe betragen 45 Minuten.

## ***4.2. Wirkung von diversen Agonisten bei gleichzeitiger Exposition von JB 24 am terminalen Ileum***

### ***4.2.1. Wirkung von JB 24 in Kombination mit Histamin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums***

Die Versuchsvorbereitungen wurden wie in Kapitel 3.7.2.1. getroffen. JB 24 wurde am terminalen Ileum in den Konzentrationen 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  getestet. Mit Histamindihydrochlorid wurde eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  hergestellt und jeweils mit einer Injektionspritze dem Organbad zugesetzt. Die Ergebnisse wurden aus 3-9 Versuchen berechnet.

Der Kontrollwert des Versuchs mit 1  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 wurde mit  $23,26 \pm 3,75$  mN definiert. Unter der Einwirkung von JB 24 sank der Tonus der Muskulatur nur unwesentlich ab auf  $22,67 \pm 2,91$  mN. Auch mit der Zugabe von 10  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 konnte nur eine geringe Reduzierung der Kontraktionskraft festgestellt werden. Ebenso verhält es sich auch mit dem Versuch von 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 mit Histamindihydrochlorid, die Werte sanken von  $15,48 \pm 1,18$  mN auf  $13,95 \pm 0,51$  mN.

Der Effekt der Versuchssubstanz auf den Einfluss von Histamin war nicht prägnant genug und somit statistisch nicht signifikant.

*Tabelle 9: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 1 µmol/l Testsubstanz*

<b>Histamin- Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	3,36 ± 1,75	3
<b>0,03</b>	5,75 ± 2,92	3
<b>0,1</b>	9,34 ± 4,74	3
<b>0,3</b>	13,88 ± 4,95	3
<b>1</b>	16,67 ± 4,98	3
<b>3</b>	23,26 ± 3,57	3

*Legende zu Tabelle 9:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von JB 24 (1 µmol/l) und Histamin.

*Tabelle 10: Wirkung von Histamindihydrochlorid in Kombination mit 1 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (1µmol/l) &amp; Histamin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	5,52 ± 2,10	3	n.s.
<b>0,03</b>	7,77 ± 2,53	3	n.s.
<b>0,1</b>	10,26 ± 3,01	3	n.s.
<b>0,3</b>	14,93 ± 2,64	3	n.s.
<b>1</b>	16,26 ± 2,16	3	n.s.
<b>3</b>	22,67 ± 2,91	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 10:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Histamindihydrochlorid gemeinsam mit JB 24 in der Stärke von 1 µmol/l.

*Tabelle 11: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 10 µmol/l Testsubstanz*

<b>Histamin- Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	5,75 ± 2,03	3
<b>0,03</b>	7,48 ± 2,53	3
<b>0,1</b>	10,65 ± 2,89	3
<b>0,3</b>	19,01 ± 5,04	3
<b>1</b>	23,91 ± 5,74	3
<b>3</b>	28,68 ± 7,05	3

*Legende zu Tabelle 11:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte (f<sub>c</sub>) und deren Standardfehler aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von 10 µmol/l JB 24 und Histamin.

*Tabelle 11: Wirkung von Histamindihydrochlorid in Kombination mit 10µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (10 µmol/l) &amp; Histamin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	6,34 ± 1,60	3	n.s.
<b>0,03</b>	8,17 ± 2,69	3	n.s.
<b>0,1</b>	11,21 ± 1,93	3	n.s.
<b>0,3</b>	18,06 ± 3,61	3	n.s.
<b>1</b>	22,97 ± 4,89	3	n.s.
<b>3</b>	27,18 ± 5,95	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 12:*

Aus 3 Versuchen mit JB 24 in der Konzentration von 3 µmol/l mit Histamin in verschiedenen Konzentrationen, wurden die Mittelwerte und die Standardfehler ermittelt.

*Tabelle 13: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für die Testreihe mit der Konzentration von 30 µmol/l JB 24*

<b>Histamin- Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	2,55 ± 0,69	3
<b>0,03</b>	4,15 ± 0,38	3
<b>0,1</b>	6,89 ± 1,26	3
<b>0,3</b>	9,56 ± 1,49	3
<b>1</b>	12,71 ± 1,54	3
<b>3</b>	15,48 ± 1,18	3

*Legende zu Tabelle 13:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Testreihe von Histamin und JB 24 in der Stärke von 30 µmol/l.

*Tabelle 14: Wirkung von Histamindihydrochlorid in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

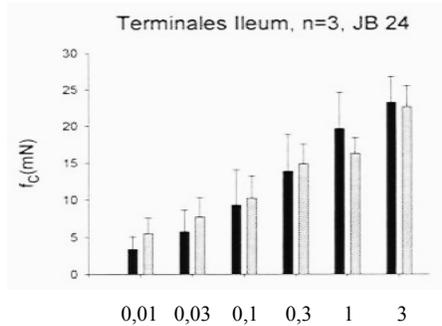
<b>JB 24 (30 µmol/l) &amp; Histamin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	4,51 ± 1,06	3	n.s.
<b>0,03</b>	6,66 ± 0,76	3	n.s.
<b>0,1</b>	8,98 ± 1,42	3	n.s.
<b>0,3</b>	10,45 ± 1,19	3	n.s.
<b>1</b>	12,38 ± 0,87	3	n.s.
<b>3</b>	13,95 ± 0,51	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 14:*

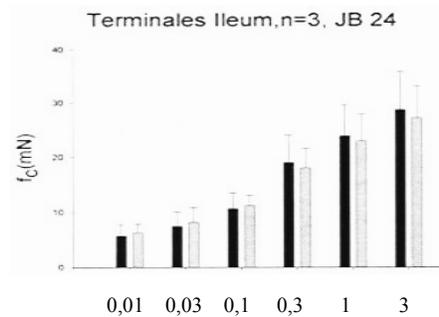
Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontraktionskraft mit Histamindihydrochlorid in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 wieder.

**Abbildung 17: Graphische Darstellung der Wirkung von Histamin (in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$ ) jeweils mit JB 24 in den Konzentrationen 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä**

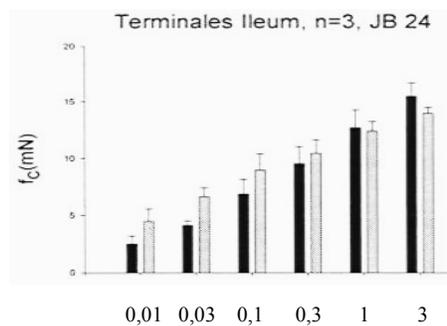
Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ :

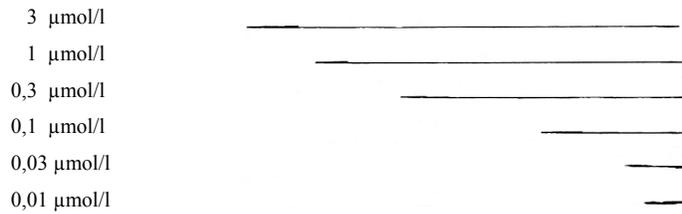


*Legende zu Abbildung 17:*

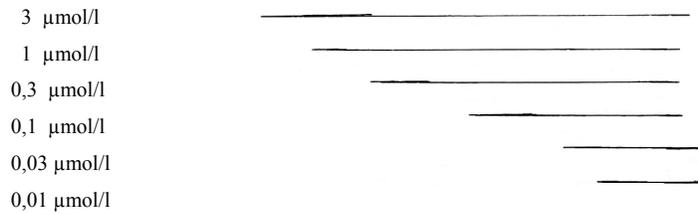
Die Kontraktionskraft mN wurde auf die Ordinate, die Konzentration Histamin in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Kontraktionen wurden als Balken, deren Standardfehler, als strichförmige Verlängerungen derselben, dargestellt.

**Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histamin in Kombination mit JB 24 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea**

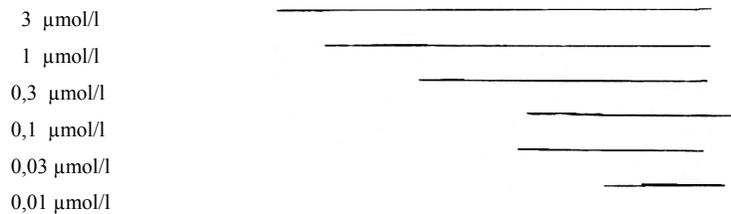
*Kontrolle:*



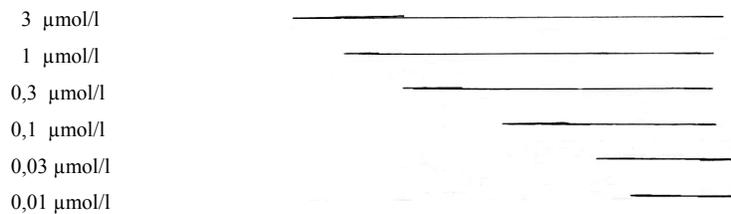
*1 µmol/l:*



*10 µmol/l:*



*30 µmol/l:*



↔ entspricht 0,98 mN

*Legende zu Abbildung 18:*

Diese Graphik veranschaulicht die Originalaufzeichnung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN. Die 6 verschiedenen Konzentrationen von Histamin wurden nach einer Einwirkzeit von je 30 Minuten erhöht.

#### ***4.2.2. Wirkung von JB 24 in Kombination mit Acetylcholin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums***

Die terminalen Ilea wurden mit JB 24 Bädern der Konzentrationsstufen 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  in Kontakt gebracht. Acetylcholin wurde in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  hergestellt und mittels einer Spritze dem Organbad zugesetzt. Die Werte wurden aus jeweils 3 Versuchen errechnet.

Bei allen drei Konzentrationen von JB 24 war festzustellen, dass mit den ersten beiden Konzentrationen von Acetylcholinhydrochlorid (0,01 und 0,03  $\mu\text{mol/l}$ ) die Kontraktionskraft der terminalen Ilea stieg – nicht signifikant, aber um folgende Prozentwerte:

Bei 1  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 von  $15,27 \pm 2,66\%$  auf  $21,59 \pm 3,59\%$ , mit Zusatz von 0,01  $\mu\text{mol/l}$  Acetylcholin. In der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 von  $15,46 \pm 6,22\%$  auf  $22,24 \pm 5,60\%$ . Und zu letzt mit 30  $\mu\text{mol/l}$  von  $20,16 \pm 2,25\%$  auf  $29,38 \pm 5,62\%$ .

Bei der Erhöhung der Konzentrationen von Acetylcholin glichen sich die Werte nahezu aus.

Am Ende der Versuche konnte man dann ein rückläufiges Ergebnis ablesen. Der Tonus der Muskulatur reduzierte sich. Die Endwerte ergaben folgende Prozentwerte:

Mit der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  sank der Tonus von 100 % auf  $91,41 \pm 2,65\%$ . Unter Zusatz von 10  $\mu\text{mol/l}$  ergab sich eine Reduzierung auf  $92,90 \pm 3,81\%$ . Im Versuch mit gleichzeitiger Exposition von 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 ein Wert von  $94,44 \pm 2,46\%$ .

Die Wirkung von JB 24 auf Acetylcholin war nicht signifikant.

*Tabelle 15: Wirkung von Acetylcholin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 1 µmol/l Testsubstanz*

<b>Acetylcholin - Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	2,61 ± 0,65	3
<b>0,03</b>	4,83 ± 1,52	3
<b>0,1</b>	9,28 ± 1,54	3
<b>0,3</b>	11,76 ± 0,82	3
<b>1</b>	15,42 ± 1,88	3
<b>3</b>	16,79 ± 1,48	3

*Legende zu Tabelle 15:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von JB 24 (1 µmol/l) und Acetylcholin.

*Tabelle 16: Wirkung von Acetylcholin in Kombination mit 1 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (1µmol/l) &amp; Acetylcholin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	3,72 ± 0,93	3	n.s.
<b>0,03</b>	5,95 ± 1,62	3	n.s.
<b>0,1</b>	9,67 ± 1,64	3	n.s.
<b>0,3</b>	11,76 ± 1,19	3	n.s.
<b>1</b>	14,31 ± 1,78	3	n.s.
<b>3</b>	15,42 ± 1,73	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 16:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Acetylcholin gemeinsam mit JB 24 in der Stärke von 1 µmol/l.

*Tabelle 17: Wirkung von Acetylcholin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 10 µmol/l Testsubstanz*

<b>Acetylcholin - Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	3,33 ± 1,67	3
<b>0,03</b>	5,75 ± 1,95	3
<b>0,1</b>	12,02 ± 2,65	3
<b>0,3</b>	15,09 ± 2,25	3
<b>1</b>	18,23 ± 1,71	3
<b>3</b>	19,99 ± 1,99	3

*Legende zu Tabelle 17:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte (f<sub>c</sub>) und deren Standardfehler aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von 10 µmol/l JB 24 und Acetylcholin.

*Tabelle 18: Wirkung von Acetylcholin in Kombination mit 10µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (10 µmol/l) &amp; Acetylcholin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	4,64 ± 1,62	3	n.s.
<b>0,03</b>	7,45 ± 2,64	3	n.s.
<b>0,1</b>	12,68 ± 3,61	3	n.s.
<b>0,3</b>	14,64 ± 3,10	3	n.s.
<b>1</b>	17,25 ± 2,17	3	n.s.
<b>3</b>	18,62 ± 2,27	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 18:*

Aus 3 Versuchen mit JB 24 in der Konzentration von 3 µmol/l mit Acetylcholin in verschiedenen Konzentrationen, wurden die Mittelwerte und die Standardfehler ermittelt.

*Tabelle 19: Wirkung von Acetylcholin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für die Testreihe mit der Konzentration von 30 µmol/l JB 24*

<b>Acetylcholin - Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	3,33 ± 0,29	3
<b>0,03</b>	5,75 ± 0,58	3
<b>0,1</b>	11,27 ± 0,36	3
<b>0,3</b>	12,77 ± 0,79	3
<b>1</b>	15,55 ± 1,83	3
<b>3</b>	16,86 ± 1,93	3

*Legende zu Tabelle 19:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Testreihe von Acetylcholin und JB 24 in der Stärke von 30 µmol/l.

*Tabelle 20: Wirkung von Acetylcholin in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

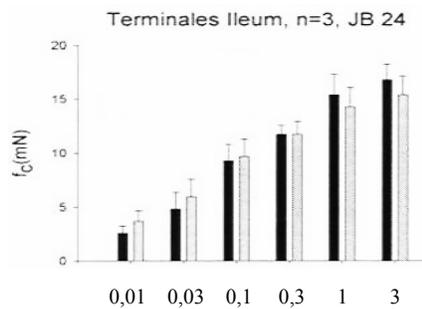
<b>JB 24 (30 µmol/l) &amp; Acetylcholin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	4,77 ± 0,46	3	n.s.
<b>0,03</b>	7,77 ± 0,95	3	n.s.
<b>0,1</b>	10,78 ± 0,52	3	n.s.
<b>0,3</b>	12,15 ± 0,85	3	n.s.
<b>1</b>	14,31 ± 1,18	3	n.s.
<b>3</b>	15,88 ± 1,63	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 20:*

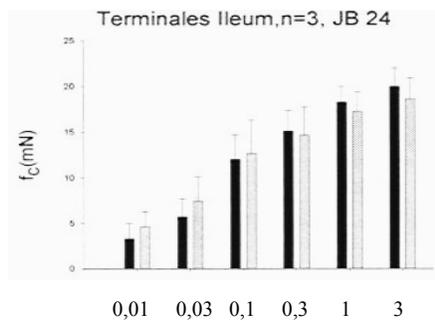
Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontraktionskraft mit Acetylcholin in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 wieder.

**Abbildung 19: Graphische Darstellung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid (in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$ ) jeweils mit JB 24 in den Konzentrationen 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea**

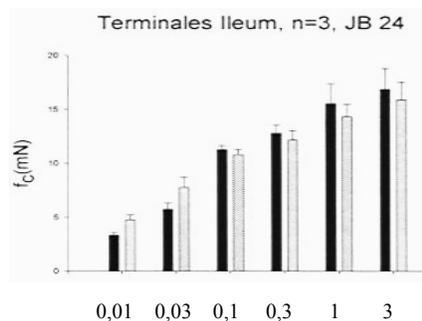
Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ :

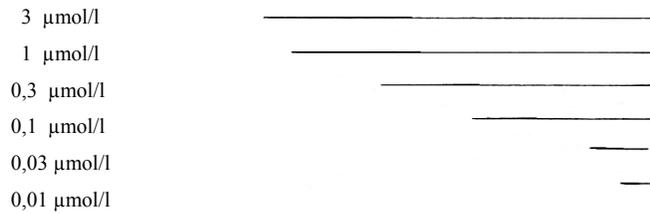


*Legende zu Abbildung 19:*

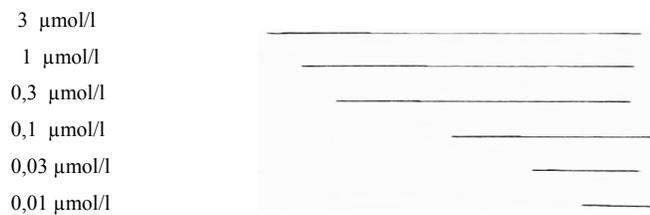
Die Kontraktionskraft wurde in mN auf der Ordinate, die Konzentration Acetylcholin in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Kontraktionen wurden durch Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerung symbolisiert.

**Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid in Kombination mit JB 24 auf terminale Ilea**

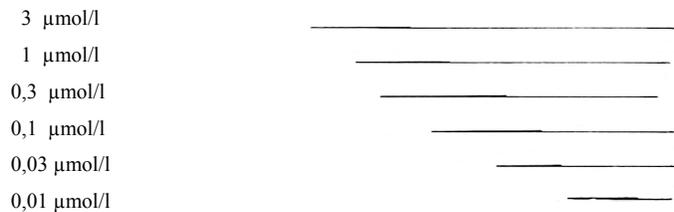
*Kontrolle:*



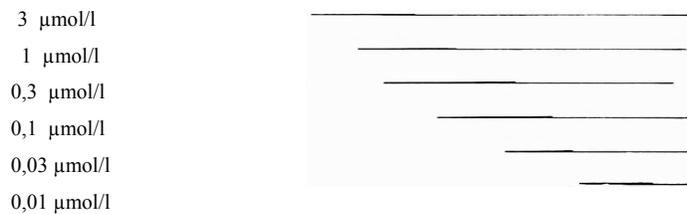
*1  $\mu\text{mol/l}$ :*



*10  $\mu\text{mol/l}$ :*



*30  $\mu\text{mol/l}$ :*



↔ entspricht 0,98 mN

*Legende zu Abbildung 20:*

Diese Graphik veranschaulicht die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN. Die 6 verschiedenen Konzentrationen von Acetylcholin wurden nach einer Einwirkzeit von je 30 Minuten erhöht.

### ***4.2.3. Wirkung von JB 24 in Kombination mit Phenylephrin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums***

Die Versuchsvorbereitungen wurden gemäß Kapitel 3.7.2.1. getroffen. JB 24 wurde in den Konzentrationen von 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  dem Organbad zugesetzt. Der Zusatz von Phenylephrin erfolgt in den Konzentrationsstufen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$ . Die Auswertung wurde durch jeweils 3 Versuche vorgenommen.

Phenylephrinhydrochlorid in der Konzentration von 0,01  $\mu\text{mol/l}$  löste bei allen drei Konzentrationen von JB 24 zu Beginn der Versuche eine leichte Steigerung der Muskelkontraktion aus. Bei einem Kontrollwert (1  $\mu\text{mol/l}$  JB 24) von  $1,70 \pm 0,26$  mN auf  $2,22 \pm 0,33$  mN. Ähnlich auch bei 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24.

Zu Ende der Testreihen sank die Kontraktionskraft der terminalen Ilea unter Einfluss von Phenylephrin unter die Ausgangswerte. In allen Konzentrationen von JB 24 aber nur geringfügig zwischen ca. 2,5 und 4 %.

Abschließend konnte keine signifikante Wirkung von JB 24 auf Phenylephrin erreicht werden.

*Tabelle 21: Wirkung von Phenylephrin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 1 µmol/l Testsubstanz*

<b>Phenylephrin - Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	1,70 ± 0,26	3
<b>0,03</b>	2,48 ± 0,07	3
<b>0,1</b>	3,72 ± 0,19	3
<b>0,3</b>	4,43 ± 0,26	3
<b>1</b>	5,29 ± 0,23	3
<b>3</b>	6,66 ± 0	3

*Legende zu Tabelle 21:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von JB 24 (1 µmol/l) und Phenylephrin.

*Tabelle 22: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid in Kombination mit 1 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (1µmol/l) &amp; Phenylephrin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	2,22 ± 0,33	3	n.s.
<b>0,03</b>	2,94 ± 0,12	3	n.s.
<b>0,1</b>	4,38 ± 0,23	3	n.s.
<b>0,3</b>	4,97 ± 0,43	3	n.s.
<b>1</b>	5,62 ± 0,28	3	n.s.
<b>3</b>	6,47 ± 0	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 22:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Phenylephrin gemeinsam mit JB 24 in der Stärke von 1 µmol/l.

*Tabelle 23: Wirkung von Phenylephrin auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für den Versuch mit 10 µmol/l Testsubstanz*

<b>Phenylephrin- Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	0,95 ± 0,09	3
<b>0,03</b>	1,31 ± 0,18	3
<b>0,1</b>	1,73 ± 0,18	3
<b>0,3</b>	2,15 ± 0,20	3
<b>1</b>	2,71 ± 0,23	3
<b>3</b>	4,35 ± 0,22	3

*Legende zu Tabelle 23:*

Die Tabelle veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte (f<sub>c</sub>) und deren Standardfehler aus 3 Kontrollversuchen für die Versuchsreihe von 10 µmol/l JB 24 und Phenylephrinhydrochlorid.

*Tabelle 24: Wirkung von Phenylephrin in Kombination mit 10µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>JB 24 (10 µmol/l) &amp; Phenylephrin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	1,83 ± 0,03	3	n.s.
<b>0,03</b>	2,25 ± 0,10	3	n.s.
<b>0,1</b>	2,52 ± 0,03	3	n.s.
<b>0,3</b>	2,88 ± 0,12	3	n.s.
<b>1</b>	3,43 ± 0,17	3	n.s.
<b>3</b>	4,25 ± 0,27	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 24:*

Aus 3 Versuchen mit JB 24 in der Konzentration von 3 µmol/l mit Phenylephrinhydrochlorid in verschiedenen Konzentrationen, wurden die Mittelwerte und die Standardfehler ermittelt.

*Tabelle 25: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums, Kontrollwerte für die Testreihe mit der Konzentration von 30 µmol/l JB 24*

<b>Phenylephrin - Kontrolle (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>0,01</b>	0,91 ± 0,28	3
<b>0,03</b>	1,66 ± 0,50	3
<b>0,1</b>	2,22 ± 0,62	3
<b>0,3</b>	2,91 ± 0,72	3
<b>1</b>	3,69 ± 0,92	3
<b>3</b>	5,26 ± 1,32	3

*Legende zu Tabelle 25:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) aus 3 Kontrollversuchen für die Testreihe von Phenylephrin und JB 24 in der Stärke von 30 µmol/l.

*Tabelle 26: Wirkung von Phenylephrin in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

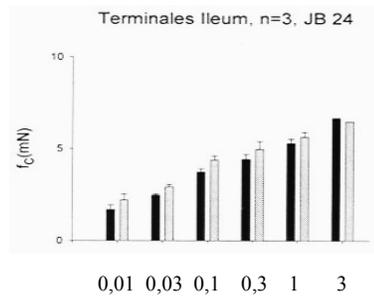
<b>JB 24 (30 µmol/l) &amp; Phenylephrin</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtumswahr- scheinlichkeit P</b>
<b>0,01</b>	2,71 ± 0,93	3	n.s.
<b>0,03</b>	3,37 ± 1,17	3	n.s.
<b>0,1</b>	3,89 ± 1,11	3	n.s.
<b>0,3</b>	4,18 ± 1,21	3	n.s.
<b>1</b>	4,57 ± 1,11	3	n.s.
<b>3</b>	5,00 ± 1,19	3	n.s.

*Legende zu Tabelle 26:*

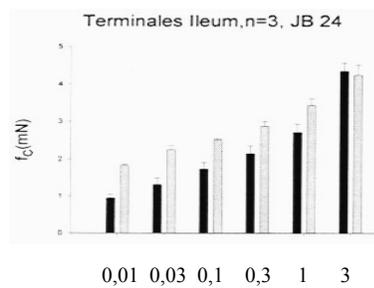
Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontraktionskraft mit Phenylephrinhydrochlorid in Kombination mit 30 µmol/l JB 24 wieder.

**Abbildung 21: Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid (in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$ ) jeweils mit JB 24 in den Konzentrationen 1, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea**

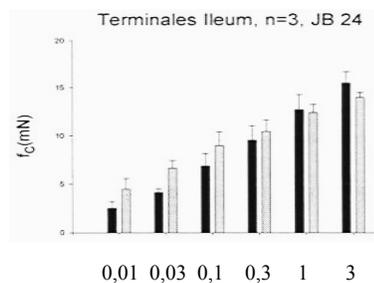
Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ :



Versuch mit JB 24 in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ :



*Legende zu Abbildung 21:*

Die Kontraktionskraft in mN wurde auf die Ordinate aufgetragen, die Konzentration von Phenylephrinhydrochlorid in  $\mu\text{mol/l}$  auf die Abszisse. Die arithmetischen Mittelwerte der vermessenen Konzentrationen wurden als Balken dargestellt, ihre Standardabweichungen als strichförmige Verlängerungen.

## Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid in Kombination mit JB 24 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea

### Kontrolle:



### 1 $\mu\text{mol/l}$ :



### 10 $\mu\text{mol/l}$ :



### 30 $\mu\text{mol/l}$ :



↔ entspricht 0,98 mN

### Legende zu Abbildung 22:

Die Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers. Die Konzentrationen geben die jeweilige Zugabe des Agonisten Phenylephrin in den 6 verschiedenen Konzentrationen an. Die Intervalle der Substanzzugabe betragen 30 Minuten, die Einwirkzeit dieser jeweils 30 Sekunden.

### ***4.3. Wirkung des Agonisten Histamin bei gleichzeitiger Exposition von JB 24 am Uterus***

#### ***4.3.1. Versuchsreihe am Uterus mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB 24***

Die Versuchsvorbereitungen wurden, wie in Kapitel 3.7.2.2. beschrieben, getroffen. Um die Wirkung auf die Kontraktionskraft des Uterus zu testen, wurde JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  verwendet. Der Agonist Histamindihydrochlorid wurde in den Konzentrationen 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$  injiziert, wobei mit jeder einzelnen Konzentration dreimal vermessen wurde.

Als Kontrolle und damit 100 % - Wert wurde ein Wert von  $26,88 \pm 4,23$  mN errechnet.

Unter Einwirkung von 10  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 sank die Kontraktionskraft auf  $22,12 \pm 1,56$ , das entspricht  $84,43 \pm 6,93$  % vom Ausgangswert und zeigte keine Signifikanz.

*Tabelle 27: Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft des Uterus*

<b>Histamin – Kontrolle (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>1</b>	$9,61 \pm 1,86$	3
<b>3</b>	$17,14 \pm 2,39$	3
<b>10</b>	$26,88 \pm 4,23$	3

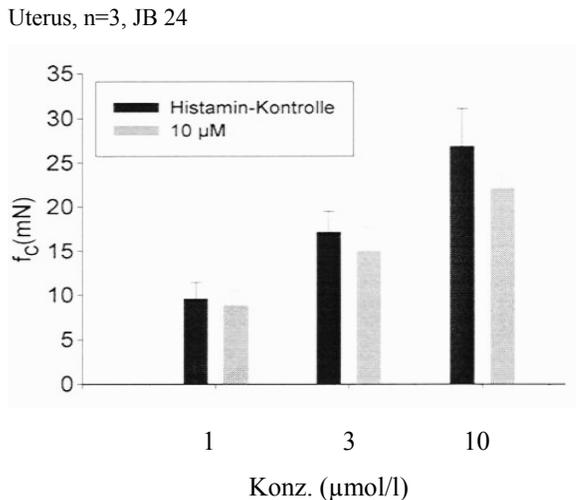
Tabelle 28: Wirkung von Histamin in Kombination mit 10  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 auf die Kontraktionskraft des Uterus

Histamin + 10 $\mu\text{mol/l}$ JB 24	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
1	$8,83 \pm 1,70$	3	n.s.
3	$14,99 \pm 2,69$	3	n.s.
10	$22,12 \pm 1,56$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 27 und 28:

Die Tabellen stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionsänderungen und deren Standardfehler dar. Die Werte wurden aus je 3 Versuchen mit Histamin und auch in Kombination von 10  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 eruiert.

Abbildung 23: Graphische Darstellung der Wirkung von Histamin (in den Konzentrationen 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ ) allein und in Kombination mit JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ , auf die Kontraktionskraft des Uterus



Legende zu Abbildung 23:

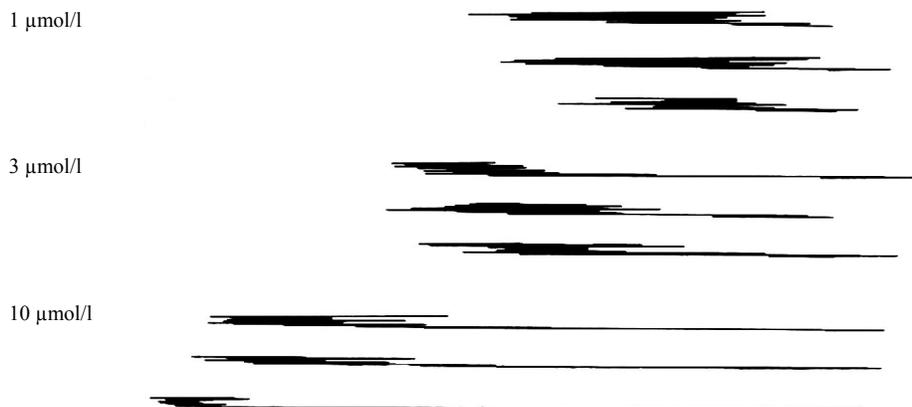
Dieses Diagramm zeigt die Kontraktionskraft des Uterus in mN auf der Ordinate und die Konzentration von Histamin in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Kontraktionen wurden als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen derselben dargestellt.

**Abbildung 24: Die Originalregistrierung der Wirkung von Histamin und in Kombination mit JB 24 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Kontraktion des Uterus**

*Kontrolle:*



*10  $\mu\text{mol/l}$ :*



$\leftrightarrow 1 \text{ cm} = 0,98 \text{ mN}$

*Legende zu Abbildung 24:*

Die Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers. Histamindihydrochlorid wurde allein und in der Kombination mit JB 24 in der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  zugespritzt. Die Einwirkdauer betrug ca. 3 bis maximal 4 Minuten. Nach weiteren 7 Minuten wurde der Vorgang noch zweimal wiederholt.

### 4.3.2. Versuchsreihe am Uterus mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB 24

Die Testreihe wurde, wie in Kapitel 3.7.2.2. beschrieben, vorbereitet. JB 24 wurde in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  verwendet, um die Wirkung auf die Kontraktionskraft des Uterus zu untersuchen. Der Agonist Histamindihydrochlorid wurde in den Konzentrationen 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt, und mit jeder einzelnen Konzentration dreimal vermessen wurde.

Als 100 % - Wert (Kontrolle) wurde ein Wert von  $49,34 \pm 22,08$  mN errechnet.

Unter Einwirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 sank die Kontraktionskraft auf  $42,22 \pm 19,22$ , das entspricht  $87,04 \pm 3,42$  % vom Ausgangswert und zeigte damit keine Signifikanz.

Tabelle 29: Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft des Uterus

<b>Histamin – Kontrolle (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>
<b>1</b>	$18,32 \pm 8,64$	3
<b>3</b>	$33,33 \pm 14,69$	3
<b>10</b>	$49,34 \pm 22,08$	3

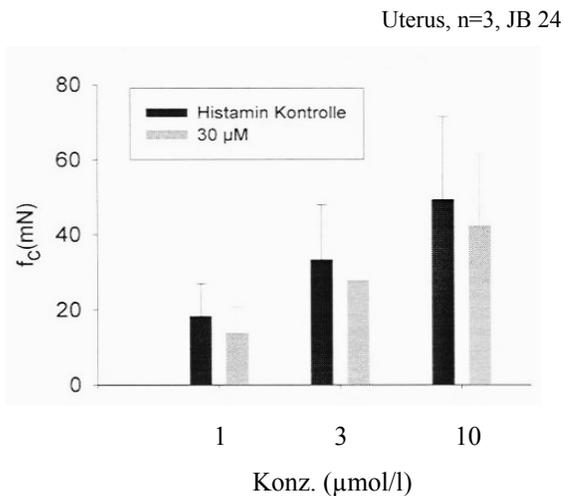
Tabelle 30: Wirkung von Histamin in Kombination mit 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 auf die Kontraktionskraft des Uterus

Histamin + 30 $\mu\text{mol/l}$ JB 24	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit P
1	13,89 $\pm$ 6,89	3	n.s.
3	27,78 $\pm$ 12,39	3	n.s.
10	42,22 $\pm$ 19,22	3	n.s.

Legende zu Tabelle 29 und 30:

Die Tabellen stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionsänderungen inklusive deren Standardfehler dar. Die Werte wurden aus je 3 Versuchen mit Histamin und auch in Kombination von 30  $\mu\text{mol/l}$  JB 24 errechnet.

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Wirkung von Histamin (in den Konzentrationen 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ ) allein und in Kombination mit JB 24 in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ , auf die Kontraktionskraft des Uterus

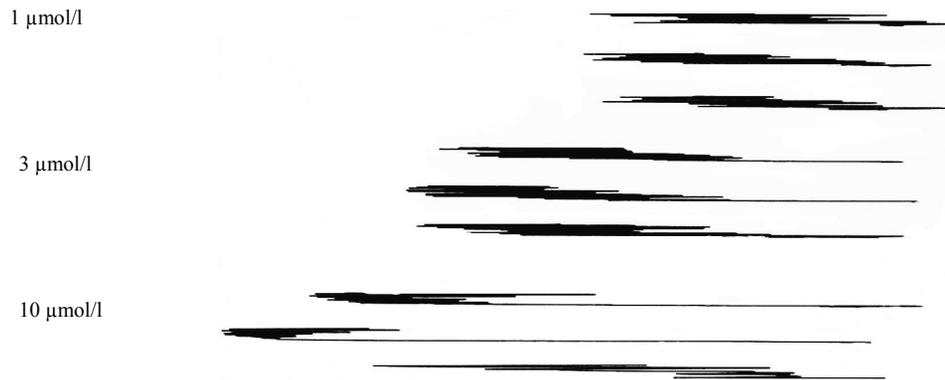


Legende zu Abbildung 25:

Dieses Diagramm zeigt die Kontraktionskraft des Uterus in mN auf der Ordinate und die Konzentration von Histamin in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Abszisse. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Kontraktionen wurden als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen derselben dargestellt.

**Abbildung 26: Die Originalregistrierung der Wirkung von Histamin und in Kombination mit JB 24 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Kontraktion des Uterus**

*Kontrolle:*



*30  $\mu\text{mol/l}$ :*



$\leftrightarrow 1 \text{ cm} = 0,98 \text{ mN}$

*Legende zu Abbildung 26:*

Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. Histamindihydrochlorid wurde allein und in der Kombination mit JB 24 in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  zugespritzt. Die Einwirkdauer betrug ca. 3 bis maximal 4 Minuten. Nach weiteren 7 Minuten wurde der Vorgang noch zweimal wiederholt.

#### ***4.4. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Organe Aorta, Arteria pulmonalis, Papillarmuskel, rechter Vorhof und terminales Ileum***

Als Lösungsmittel wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Um dessen Einfluss auf die Kontraktilität der Organe festzustellen, wurde DMSO in den entsprechenden Konzentrationen, analog zu den Konzentrationen die im jeweiligen Versuch verwendet wurden, alle 30 Minuten zugesetzt. Pro Versuchsreihe wurden 3 Blindversuche mit DMSO durchgeführt.

Für die Berechnung der Ergebnisse wurden die DMSO-Werte von den Werten mit JB 24 subtrahiert.

*Tabelle 31: Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs*

<b>DMSO-Konzentration</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0 (Kontrolle)</b>	221,67 ± 4,41	0 ± 0	---
<b>1</b>	235,00 ± 4,43	5,24 ± 0,64	n.s.
<b>3</b>	228,33 ± 10,93	2,90 ± 2,90	n.s.
<b>10</b>	235,61 ± 14,43	5,84 ± 4,46	n.s.
<b>30</b>	238,33 ± 10,14	7,43 ± 2,60	n.s.
<b>100</b>	243,33 ± 9,28	9,72 ± 2,66	n.s.
<b>300</b>	246,67 ± 10,93	11,32 ± 3,41	n.s.

*Legende zu Tabelle 31:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus den Lösungsmittelversuchen an den rechten Vorhöfen dar.

*Tabelle 32: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels*

<b>DMSO-Konzentration</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0 (Kontrolle)</b>	0,47 ± 0,06	0 ± 0	---
<b>1</b>	0,46 ± 0,08	-3,70 ± 3,70	n.s.
<b>3</b>	0,43 ± 0,07	-10,42 ± 3,84	n.s.
<b>10</b>	0,36 ± 0,05	-23,79 ± 0,82	0,05
<b>30</b>	0,29 ± 0,03	-37,40 ± 2,32	0,05
<b>100</b>	0,25 ± 0,03	-45,95 ± 2,99	0,01
<b>300</b>	0,21 ± 0,03	-54,69 ± 2,52	0,01

*Legende zu Tabelle 32:*

Die Tabelle stellt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardabweichungen in mN und % dar.

*Tabelle 33: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums*

<b>DMSO-Konzentration</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0 (Kontrolle)</b>	9,76 ± 0,95	0 ± 0	---
<b>3</b>	9,07 ± 0,62	-7,02 ± 2,56	n.s.
<b>10</b>	8,63 ± 0,70	-12,17 ± 2,69	n.s.
<b>30</b>	8,15 ± 0,65	-16,89 ± 5,04	n.s.
<b>100</b>	6,82 ± 0,47	-30,55 ± 1,95	0,05

*Legende zu Tabelle 33:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus den DMSO- Versuchen am terminalen Ileum.

*Tabelle 34: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta*

<b>DMSO-Konzentration</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0 (Kontrolle)</b>	5,36 ± 0,49	0 ± 0	---
<b>1</b>	4,88 ± 0,19	-7,91 ± 5,41	n.s.
<b>3</b>	5,00 ± 0,37	-6,47 ± 1,52	n.s.
<b>10</b>	5,03 ± 0,38	-5,79 ± 3,15	n.s.
<b>30</b>	5,03 ± 0,46	-6,22 ± 0,25	n.s.
<b>100</b>	4,60 ± 0,20	-13,32 ± 4,27	n.s.
<b>300</b>	4,51 ± 0,30	-15,42 ± 3,59	n.s.

*Legende zu Tabelle 34:*

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus den Lösungsmittelversuchen an der Aorta.

*Tabelle 35: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria Pulmonalis*

<b>DMSO-Konzentration</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit P</b>
<b>0 (Kontrolle)</b>	10,53 ± 0,61	0 ± 0	---
<b>3</b>	10,93 ± 0,71	-1,44 ± 1,92	n.s.
<b>10</b>	10,20 ± 0,27	-2,73 ± 5,03	n.s.
<b>30</b>	9,64 ± 0,42	-7,18 ± 9,11	n.s.
<b>100</b>	8,64 ± 0,18	-19,55 ± 4,84	n.s.
<b>300</b>	6,82 ± 0,42	-35,12 ± 5,40	0,05

*Legende zu Tabelle 35:*

Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler wieder.

## 5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung des neu synthetisierten, und noch nicht untersuchten Resveratrol-Derivates, JB 24, getestet.

Die Untersuchungen wurden an isolierten Organen von Meerschweinchen erforscht: am rechten Vorhof, am Papillarmuskel, am terminalen Ileum, an der Aorta und der Arteria pulmonalis.

Der erste Teil der Testreihen galt der Eigenwirkung von JB 24 an den angeführten Organen. In weiterer Folge wurde der Einfluss von JB 24 auf die Wirkung der Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin am terminalen Ileum bzw. von Histamin am Uterus getestet.

### 5.1. Struktur – Wirkungsbeziehung

Resveratrol ist ein Stilben-Derivat mit drei Hydroxylgruppen in den Positionen 3, 5 und 4' und einer transständigen Doppelbindung in einer Ethylenbrücke. Durch die OH-Gruppen wird eine intermolekulare Wasserstoffbrücke – Assoziation möglich, dadurch wird das Löslichkeitsprodukt größer sein als bei dem entsprechenden hydroxyfreien Aromaten.

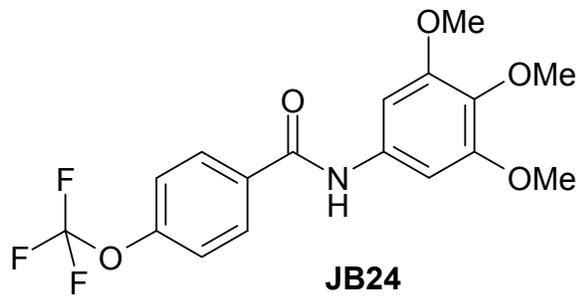
JB 24 zeigt im Vergleich dazu eine Abwandlung dieser Struktur dar. Die beiden aromatischen Ringe wurden durch eine Amidgruppe verknüpft.

Weiters wurde der Stickstoff (N)-ständige Ring mit drei Methoxygruppen synthetisiert und im zweiten Ring wurde anstatt der Hydroxygruppe in der Position 4' eine Trifluormethoxygruppe eingeführt.

Im Strukturvergleich zu Resveratrol weist JB 24 durch die Einführung der Trifluorgruppe, der Amidbrücke und der Methoxygruppen eine erhöhte Lipophilie auf.

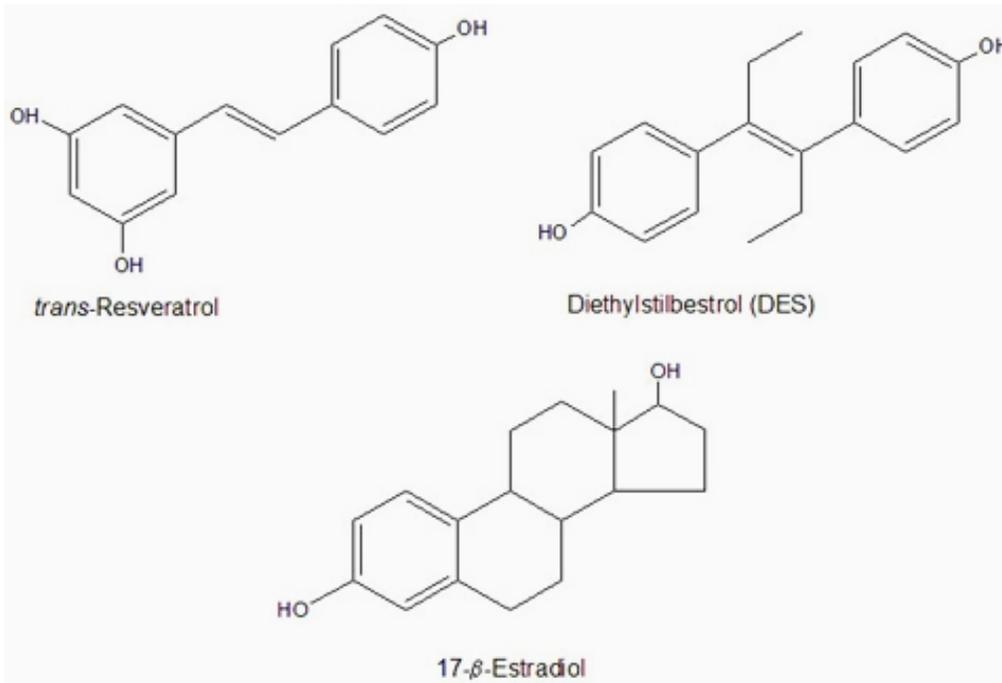
Daraus würde resultieren, dass JB 24 schneller und besser in die Zellen resorbiert würde als das hydrophilere Resveratrol.

Abbildung 27: Strukturenformeln zum Veranschaulichen von Resveratrol, JB 24 und Derivaten bzw. chemisch verwandten Strukturen



N-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-(4-trifluormethoxy)benzamid

Molecular Weight =371,32



## 5.2. Untersuchungsergebnisse von JB 24 an glatter Muskulatur

Die Testergebnisse der Versuchsreihe an der isolierten Aorta zeigte im Gegensatz zu Resveratrol bis zur Zugabe von 10  $\mu\text{mol/l}$  eine tonussteigernde Wirkung. Die Werte stiegen um 22,42 % über den Ausgangswert. Bei 100  $\mu\text{mol/l}$  setzte ein relaxierender Effekt ein und die Werte kehrten annähernd auf den Kontrollwert zurück.

Im Vergleich dazu trat bei Resveratrol die  $\text{EC}_{50}$  bei 145  $\mu\text{mol/l}$  auf (Lötsch 2004).

Haider et al. (2004) stellten bei Versuchen an isolierten Aorten hypertensiver Ratten fest, dass Resveratrol die Hypertrophie der vaskulären glatten Muskelzellen hemmt. Sie erkannten, dass die Wirkung offensichtlich zum größten Teil auf der Hemmung der Phosphatidyl-inositol-3-kinase beruht.

Auch Wu et al. (2001) kamen bei ihren Untersuchungen von Resveratrol zu dem Ergebnis, dass Resveratrol, mit Arteriosklerose und koronaren Herzkrankheiten, im Zusammenhang steht und einen positiven Effekt zeigt.

JB 24 wurde an isolierten terminalen Ilea getestet und bewirkte eine Relaxation der glatten Muskulatur auf 31,47 %. In den Konzentrationen von 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  ist die Wirkung nur unwesentlich, aber ab der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  stellte sich eine drastische Relaxation ein.

Damit ist JB 24 im Vergleich zu Resveratrol bereits mit 10  $\mu\text{mol/l}$  stark relaxierend und die  $\text{EC}_{50}$  stellte sich schon wesentlich früher ein, und zwar bei 25  $\mu\text{mol/l}$ .

Resveratrol zeigte eine statistische Signifikanz der Wirkung bei dem Gehalt von 30  $\mu\text{mol/l}$ . Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei 46,4  $\mu\text{mol/l}$  erreicht (Lötsch 2004).

Zou et al. (2000) testeten in einem Modell die Wirkung von Resveratrol auf die Darmmuskulatur von Kaninchen. Sie verabreichten den Kaninchen 2-4 mg Resveratrol pro kg Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von fünf Wochen. Auch in diesem Fall bestätigte sich wiederum die proliferationshemmende Wirkung.

An der Arteria pulmonalis zeigte JBV 24 kaum eine Änderung der Kontraktion. Es kam unwesentlich zu einer Steigerung bei 10 µmol/l. Bei 100 µmol/l glichen sich die Werte wieder dem Ausgangswert an.

Im Gegensatz dazu bewirkte Resveratrol in den Konzentrationen 100 und 300 µmol/l eine starke Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur und war somit statistisch signifikant. Bei 126 µmol/l sank die Kontraktionskraft auf 58 % des Ausgangswertes (Lötsch 2004).

*Tabelle 36: Vergleichende Darstellung der Wirkung von Resveratrol und JB 24 auf die glatte Muskulatur*

<b>Präparat</b>	<b>RESVERATROL</b> <b>f<sub>c</sub> ± SEM (%) bei</b> <b>100 µmol/l</b> <b>bezogen auf den</b> <b>Kontrollwert</b>	<b>EC<sub>50</sub></b> <b>(µmol/l)</b>	<b>JB 24</b> <b>f<sub>c</sub> ± SEM (%) bei</b> <b>100 µmol/l</b> <b>Bezogen auf den</b> <b>Konrollwert</b>	<b>EC<sub>50</sub></b> <b>(µmol/l)</b>
<i>Aorta</i>	64,85 ± 6,96	145	110,42 ± 6,22	--
<i>Terminales</i> <i>Ileum</i>	30,23 ± 2,62	46,4	31,47 ± 4,22	25
<i>Arteria</i> <i>pulmonalis</i>	56,44 ± 7,10	126	100,36 ± 1,05	--

Die Untersuchung am Papillarmuskel mit JB 24 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  ergab eine geringe negativ inotrope Wirkung.

Im Verhältnis dazu zeigte Resveratrol eine schwach positiv inotrope Wirkung (Lötsch 2004). Eine Signifikanz und die  $\text{EC}_{50}$  konnte jedoch bei keiner der beiden Substanzen erreicht werden.

Die Testung der Wirkung von JB 24 am rechten Vorhof zeigte sich nur ein geringer, aber kontinuierlicher, negativer chronotroper Einfluss ab. Die  $\text{EC}_{50}$  wurde nicht erreicht.

Bei Resveratrol begann die Schlagfrequenz ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kontinuierlich zu sinken. Bei einem Gehalt von 100  $\mu\text{mol/l}$  war der negative chronotrope Einfluss stark signifikant.

*Tabelle 37: Vergleichende Darstellung der Wirkung von Resveratrol und JB 24 auf die Herzmuskulatur*

<b>Präparat</b>	<b>RESVERATROL fc <math>\pm</math> SEM (%) bei 30 und 100 <math>\mu\text{mol/l}</math> bezogen auf den Kontrollwert</b>	<b><math>\text{EC}_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>JB 24 fc <math>\pm</math> SEM (%) bei 30 und 100 <math>\mu\text{mol/l}</math> bezogen auf den Kontrollwert</b>	<b><math>\text{EC}_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>
<i>Papillar- muskel</i>	109,81 $\pm$ 3,54 103,45 $\pm$ 5,35	--	95,42 $\pm$ 6,52 90,12 $\pm$ 5,98	--
<i>Rechter Vorhof</i>	96,23 $\pm$ 3,01 81,55 $\pm$ 7,52	--	83,54 $\pm$ 3,54 81,73 $\pm$ 2,00	--

### **5.3. Untersuchungsergebnisse von JB 24 in Kombination mit den Agonisten**

Die Kombinationsversuche von JB 24 mit den unterschiedlichen Agonisten Histamin, Phenylephrin und Acetylcholin lassen auf folgendes schließen:

Die Versuchssubstanz zeigte bei der Testreihe an terminalen Ilea unter gleichzeitiger Exposition von Acetylcholin keinen erwähnenswerten Einfluss auf den Agonisten aus.

Es wurde also weder eine cholinerge noch eine anticholinerge Wirkung von JB 24 festgestellt.

JB 24 in Kombination mit Phenylephrin zeigte bei keiner der getesteten Konzentrationen von 1 bis 30  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Wirkung.

Auch ein eventueller Einfluss von JB 24 unter Exposition von Histamindihydrochlorid auf die isolierten Organe Uterus und terminales Ileum wurde untersucht.

Auch hier konnten keine signifikanten Werte abgelesen werden.

Abschließend kann für alle Testreihen in Kombination von JB 24 mit den oben genannten Agonisten gesagt werden, dass in den niedrigen Konzentrationen der Agonisten (0,01 und 0,03  $\mu\text{mol/l}$ ) eine leichte Tonussteigerung abzulesen war.

Ab den Konzentrationszugaben von 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  der Agonisten stellte sich ein leichter Rückgang der Muskelkontraktion an den Präparaten ein.

Beide Reaktionen, Tonussteigerung und Relaxation, zeigten sich aber statistisch nicht signifikant.

## 5.4. Interpretation

Abschließend ergibt die Interpretation der Ergebnisse, dass es sich bei dem Derivat JB 24 um eine Substanz handelt, die am terminalen Ileum eine stark relaxierende Wirkung auslöst.

JB 24 erreicht dabei die  $EC_{50}$  bei einer Konzentration von  $25 \mu\text{mol/l}$ , im Gegensatz zu Resveratrol erst bei einer Konzentration von  $46,4 \mu\text{mol/l}$ .

Weiters zu bemerken ist, dass JB 24 bei den Präparaten Aorta und Arteria pulmonalis eine Tonussteigerung auslöst. Die größte Tonussteigerung konnte jeweils bei  $10 \mu\text{mol/l}$  JB 24 erreicht werden.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Resveratrol, da dieses eine Relaxation an diesen Organen zeigt. Konform geht aber, dass die Wirkung von Resveratrol bzw. JB 24, auf Aorta und Arteria pulmonalis sehr eng im Zusammenhang stehen.

Auf die Herzmuskulatur wirkt sich JB 24 etwas negativ inotrop und chronotrop aus. Bei den Ergebnissen des rechten Vorhofs konnten annähernd dieselben Werte wie bei Resveratrol abgelesen werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war primär die Eigenwirkung des neu synthetisierten Resveratrol-Derivates JB 24 an isolierten Organen von Meerschweinchen zu untersuchen und sekundär einen verstärkenden bzw. abschwächenden Effekt auf die Agonisten Histamin, Phenylephrin und Acetylcholin zu testen.

Diese Versuchsreihen wurden an den Präparaten rechter Vorhof, Papillarmuskel, Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Uterus durchgeführt.

JB 24 und die Agonisten wurden dabei in unterschiedlichen Konzentrationen den Untersuchungsabläufen zugesetzt.

Nach Auswertung der Zahlen des Stilben-Derivates JB 24, wurden diese mit den Werten des schon gut erforschten Resveratrols, in Vergleich gestellt.

Dabei zeigte sich ein Unterschied in der Relaxation des terminalen Ileums, die bei JB 24 in wesentlich niedrigerer Konzentration die  $EC_{50}$  erreichte als Resveratrol selbst.

Und weiters, dass es bei Aorta und Arteria pulmonalis, im Gegensatz zu Resveratrol, eine Tonussteigerung ausgelöst wurde.

Es wird angenommen, dass sich diese Eigenschaften, durch Einführung der Amidgruppe und der erhöhten Lipophilie von JB 24 im Vergleich mit Resveratrol ergeben.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass durch die Synthese von JB 24 ein durchaus interessanter Wirkstoff hergestellt wurde.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Bertelli R; Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandins E(2) synthesis. *Gut* 46 (2000) 191-199

Biba F; (2004) Heidelbeeren und Preiselbeeren, *ÖAZ Jahrgang 58/ Sept. 2004*: 887

Cantos E, Garcia-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomas-Barberan FA; (2000) Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem* 48: 4406-4612

Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS; (1996) Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes Rescioto and Amarone. *Journal Chromatography A* 730: 47-52

Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E; (1998) Resveratrol, A remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 421: 277-279

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

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

Goldberg DM, Yan J, Soeas GJ; (2003) Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 36: 79-87

Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM; (2002) Resveratrol suppresses angiotensin-2-induced Akt/protein kinase B and p70S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 62: 772-777

Hung L-M, Chen J-K, Hung S-S; (1997) Cardioprotective effect of Resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Science* 275: 218-220

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Metha RG, Moon RC and Pezzuto JM; (1997) Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol a Natural Product Derived From Grapes. *Science* 275: 218-220

Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM; (2000) Resveratrol decreases early signalling events in washed platelets but has little effect on platelet aggregation in whole blood. *Blood Cells Mol Dis* 26: 144-150

Metz G; (2000) Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivates (STPAR29A) auf verschiedene isolierte Präparate von Meerschweinchen. Diplomarbeit 47; 51; 55; 58; 62

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

Soleas GJ, Diamandis E P and Goldberg D M; (1997) Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clin Biochem* 30: 91-113

Thews G, Mutschler E, Vaupel P; (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart: pp 286-303

Urena G; (2003) Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. *J of Agricul Food Chem* 51; 82-89

Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ; (2001) Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int J Mol Med* 8:3-17

Wu S, Liang Yu, Ke-Wei Meng, Xing-Lei Qin, Cheng-En Pan; (2004) Effect of resveratrol and in combination with 5 FU on murine liver cancer. *World J Gastroenterol* 10: 3048-3052

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye FA, Mayo MW; (2004) Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT 1 deacetylase. *EMBO J* 23: 2369-2380

Yu C, Shin YG, Chow A Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB; (1998) Human Rat and Mouse Metabolism of Resveratrol. *Pharm Res* 19: 1907-1914

Zou J, Huang Y, Cao K, Yang G, Yin H, Len J, Hsieh TC, Wu JM; (2000) Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci* 1; 68: 153-163

## 8 CURRICULUM VITAE

<i>Name</i>	Nina Yvonne Tröscher
<i>Geburtsdatum</i>	17. Juli 1978
<i>Geburtsort</i>	Wien – Landstraße
<i>Wohnort</i>	1040 Wien
<i>Staatsbürgerschaft</i>	Österreich
<i>Kinder</i>	Heinz-Werner Tröscher, 30.07.1994 Lothar Tröscher, 2.11.1997
<i>Eltern</i>	Michael Tröscher, Werkmeister in Pension Evelyn Tröscher, Pensionistin
<i>Geschwister</i>	Jürgen Tröscher, Ing., geb. 1976
<i>Ausbildung:</i>	
1984 – 1988	Volksschule, 1100 Wien
1988 – 1992	Realgymnasium, 1100 Wien
1992 – 1997	HBLA für wirtschaftliche Berufe, 1040 Wien In dieser Zeit Praktika in Apotheke, Kinderspital, Kindergarten und im Gastgewerbe
28. 6. 1996	Vorprüfung zur Reifeprüfung in Betriebsführung, -organisation und Ernährungslehre
13. 6. 1997	Reifeprüfung in den Fächern Deutsch, Französisch, Biologie, Rechnungswesen, Ernährungslehre, Chemie, Religion und Psychologie mit gutem Erfolg
März 1999	Immatrikulation an der Universität Wien und Inskription an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät – Studienrichtung Pharmazie
seit Juli 2001	Angestellt in der Allerheiligen Apotheke, 1200 Wien
WS 2005	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien
<i>Sprachkenntnisse</i>	Englisch, Spanisch, Französisch und etwas Serbisch