universität wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchung der biologischen Aktivität zweier neu synthetisierter Benzothioamide an isolierten Organen von Meerschweinchen

Verfasserin

Elisabeth Maria Födermayr

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

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

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für die Realisierung der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie bedanken und vor allem auch für die stets engagierte, freundliche und kompetente Betreuung.

Ebenso möchte ich mich beim Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie für die Synthese und die Bereitstellung der Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT bedanken.

Danke auch an meine lieben Studienkollegen, die mich in die praktische Arbeit eingeführt haben, und auch an Bernadette und Amir für die schöne gemeinsame Laborzeit.

Ein herzliches Dankeschön an meine Familie für ihre nicht enden wollende Geduld und für ihre, sowohl liebevolle als auch finanzielle, Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Dani, der mir in jeder Hinsicht eine große Stütze ist und der geduldig alle meine Launen vor großen Prüfungen ertragen hat.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 5

1.1. Das Meerschweinchenherz 5

1.2. Die Erregungsprozesse im Herzen 6

1.3. Ruhepotential, Aktionspotential, Refraktärperiode 7

1.4. Ionenströme während des Aktionspotentials 9

1.5. Ionenkanäle 9

2. AUFGABENSTELLUNG 11

3. MATERIAL UND METHODIK 12

3.1. Versuchstiere 12

3.2. Isolierung und Präparation der Organe 13

3.2.1. Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum 15

3.2.2. Isolierung und Präparation des Musculus papillaris 16

3.2.3. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis 17

3.2.4. Isolierung und Präparation des terminalen Ileum 18

3.2.5. Isolierung und Präparation der Aorta 19

3.3. Physiologische Nährstofflösung (Tyrode) 20

3.4. Aufbau der Versuchsapparaturen 22

3.4.1. Versuchsapparatur 1 24

3.4.2. Versuchsapparatur 2 26

3.4.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber 28

3.5.Testsubstanzen 29

3.5.1. Testsubstanz WHG 65T 29

3.5.2. Testsubstanz WHG 63MT 30

3.5.3. Lösen der Testsubstanz 30

3.5.4. Einwaage der Testsubstanz 31

3.6. Durchführung der Versuche 32

3.6.1. Herstellung der Kaliumchloridlösung 32

3.6.2. Durchführung der Versuche am Atrium cordis dextrum 33

3.6.3. Durchführung der Versuche am Musculus papillaris 34

3.6.4. Durchführung der Versuche an der Aorta 35

3.6.5. Durchführung der Versuche an der Arteria pulmonalis 35
3.6.6. Durchführung der Versuche am terminalen Ileum..... 36
3.7. Wirkmechanismus 36
3.7.1. Antagonisten 37
3.7.1.1. Glibenclamid 37
3.7.1.2. Nitro-L-Arginin 38
3.7.2. Agonisten 39
3.7.2.1. Histamin 39
3.7.3. Durchführung der Versuche mit Antagonisten..... 40
3.7.4. Durchführung der Versuche mit Agonisten 41
3.8. Messgrößen und Statistik 42
3.8.1. Messgrößen Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum..... 42
3.8.2. Messgröße Musculus Papillaris 43
3.8.3. Messgröße Atrium cordis dextrum..... 43
3.8.4. Statistik..... 44

4. ERGEBNISSE 45
4.1. Resultate der Testsubstanz WHG 65T 46
4.1.1. Wirkung WHG 65T auf das Atrium cordis dextrum..... 46
4.1.2. Wirkung WHG 65T auf den Musculus papillaris..... 49
4.1.3. Wirkung WHG 65T auf die Aorta 52
4.1.4. Wirkung WHG 65T auf die Arteria pulmonalis..... 55
4.1.5. Wirkung WHG 65T auf das terminale Ileum..... 58
4.2. Resultate der Testsubstanz WHG 63 MT 61
4.2.1. Wirkung WHG 63MT auf das Atrium cordis dextrum..... 61
4.2.2. Wirkung WHG 63MT auf den Musculus papillaris..... 64
4.2.3. Wirkung WHG 63MT auf die Aorta..... 67
4.2.4. Wirkung WHG 63MT auf die Arteria pulmonalis..... 70
4.2.5. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum 73
4.3. Resultate der Testsubstanz WHG 63MT unter Einfluss von Antagonisten..... 76
4.3.1. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum unter Einfluss von Glibenclamid..... 76

4.3.2. Wirkung WHG 63MT auf das terminalen Iluem unter Einfluss von Nitro-L-Arginin ... *81*

4.4. Resultate der Testsubstanz WHG 63MT unter Einfluss von Agonisten .. 84

4.4.1. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum unter Einfluss von Histamin ... *84*

5. DISKUSSION ... 88

5.1. Versuchreihen an isolierten Organen von Meerschweinchen ... 89

5.1.1. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel ... *89*

5.1.2. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen ... *91*

5.2. Versuchsreihen von WHG 63MT am terminalen Ileum in Kombination mit Antagonisten und Agonisten ... 93

5.2.1. Versuchsreihen mit dem Antagonist Glibenclamid ... *93*

5.2.2. Versuchsreihen mit dem Antagonist Nitro-L-Arginin ... *94*

5.2.3. Versuchsreihen mit dem Agonist Histamin ... *95*

6. ZUSAMMENFASSUNG ... 96

7. LITERATURVERZEICHNIS ... 98

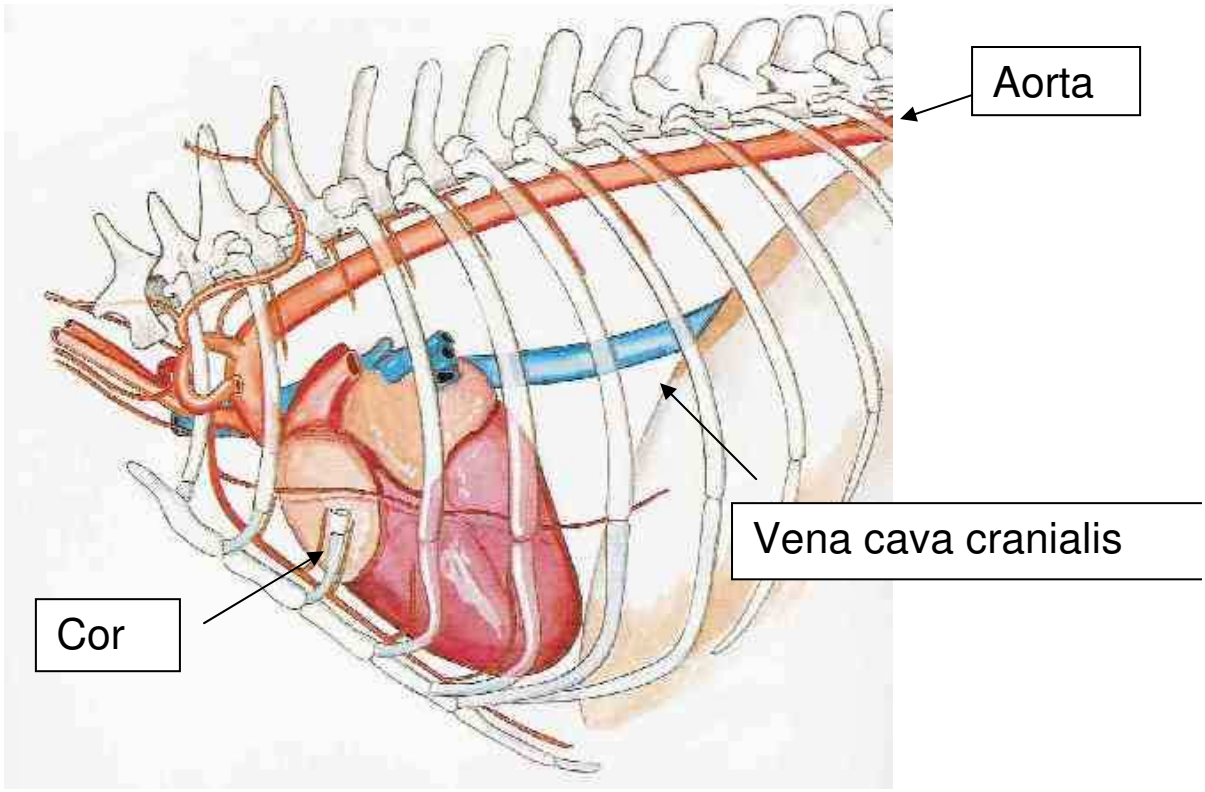
8. CURRICULUM VITAE ... 100

1. EINLEITUNG

1.1. Das Meerschweinchenherz

Das Herz des Meerschweinchens liegt ungefähr in der Mitte der Cavitas thoracis. Die Form ist leicht oval. Die Herzbasis tendiert leicht nach vorne, wobei die Spitze eher nach hinten neigt. Seine Größe reicht auf der rechten Seite vom zweiten bis dritten Interkostalraum und auf der linken Seite vom zweiten bis zum vierten/fünften Zwischenrippenbereich (Popesko et al. 2003).

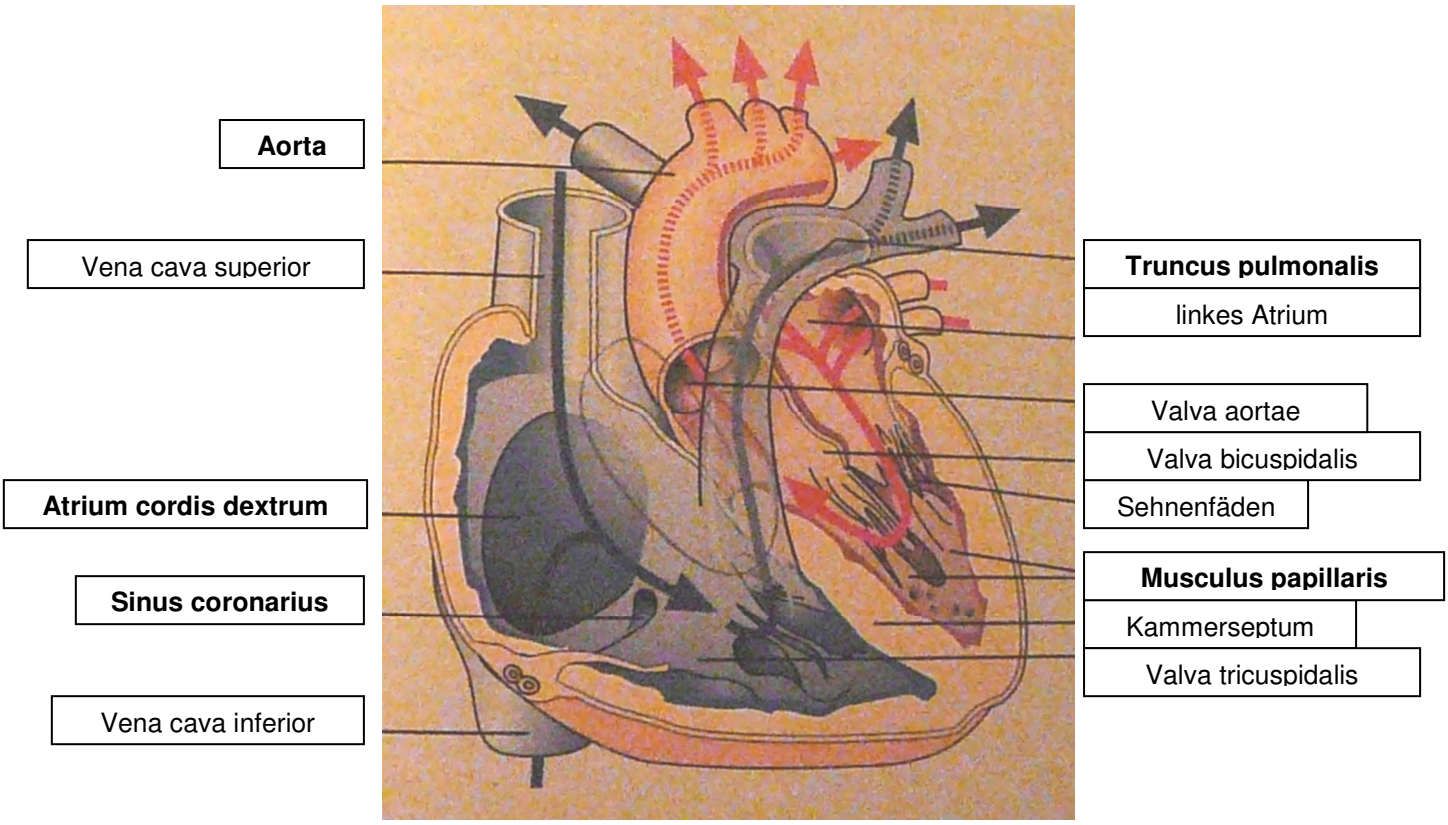
Abbildung 1: Meerschweinchenherz



Legende zu Abbildung 1:

Lage des Meerschweinchenherzens im Brustkorb und Lage der großen Gefäße (Popesko et al. 2003)

Abbildung 2: Anatomie des Herzens



Legende Abbildung 2:

Frontalschnitt durch das Herz, nach Leonardt

Die Pfeile zeigen die Richtung des Blutstroms an (Thews et al. 1999)

1.2. Die Erregungsprozesse im Herzen

Das Herz hat die Aufgabe das Blut aus den Körper- und Lungenvenen in das arterielle System des kleinen und großen Kreislaufs auszutreiben. Dies erfolgt mithilfe rhythmischer Kontraktion und Erschlaffung der Kammern, die den rhythmischen Veränderungen der Vorhöfe vorausgehen. Die Erschlaffungsphase wird als Diastole bezeichnet, die Kontraktionsphase als Systole.

Die Herzmuskelfasern besitzen, genauso wie die Nervenzellen und die Skelettmuskelfasern, die Eigenschaft der Erregbarkeit. Sie besitzen ein

Ruhepotential und sind in der Lage Erregungen in Form von Aktionspotentialen weiterzuleiten.

Das Herz hat die Fähigkeit zur Autorhythmie, das heißt es ist befähigt spontan Erregungen zu bilden und diese weiterzuleiten. In der Regel erfolgt die Erregungsbildung im Sinusknoten. Dieser ist die Grundlage der autonomen Herzschlagfolge. Danbeben greifen auch Sympathikus und Parasympathikus modulierend ein, ohne diese primär auszulösen.

Der Sinusknoten ist ein 1-2 cm langer Zug spezialisierter Muskelfasern. Er befindet sich im rechten Vorhof an der Einmündung der Vena cava superior. Von ihm werden die Erregungen auf den Atrioventrikularknoten übertragen. Vom AV Knoten läuft die Erregung weiter über die His-Bündel, Kammerschenkel und Purkinje-Fasern, bis hin zum Arbeitsmyokard.

Wie bereits vorhin beschrieben ist der Sinusknoten das primäre Erregungsbildungszentrum (Sinusrhythmus 60-80 Impulse pro Minute). Jedoch sind auch andere spezialisierte Teile des Erregungsleitungssystems zur rhythmischen Erregungsbildung befähigt. Durch dieses System ist das Herz mehrfach vor Stillstand geschützt. Kommt es zu einem Ausfall des Sinusknotens, kann der AV-Knoten ersatzweise die Schrittmacherfunktion übernehmen (AV-Rhythmus 40-60 Impulse pro Minute). Bei einem totalen Herzblock übernimmt das tertiäre Erregungsbildungszentrum die Schrittmacherfunktion (Kammerrhythmus 25-40 Impulse pro Minute) (Thews et al. 1999).

1.3. Ruhepotential, Aktionspotential, Refraktärperiode

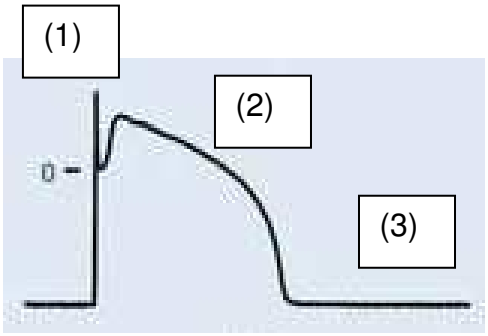
Wie jede erregbare Zelle, weisen auch die Myokardfasern ein Ruhepotential zwischen dem negativen Intrazellulärraum und dem positiven Extrazellulärraum auf. Beim Herzen beträgt dieses Ruhemembranpotential -90 mV, welches bei einem Erregungsprozess kurzfristig positiviert wird.

Ein Aktionspotential wird durch eine lokale Depolarisation ausgelöst, die im Falle der Herzmuskelfasern mindestens 15 mV betragen muss. Die Schrittmacherzellen des Herzens sind zu dieser spontanen Depolarisation befähigt. In den Fasern des Arbeitsmyokards kann ein Aktionspotential nur durch eine Depolarisation der benachbarten Zellen ausgelöst werden. Dabei spielt die Änderung der Membran-Ionenleitfähigkeit für Na^+, Ca^{++} und K^+ eine große Rolle.

Wird nun die Schwelle von ca. -70 bis -75 mV überschritten, läuft die weitere Änderung des Membranpotentials selbstständig ab. Zunächst kommt es zu einem raschen Potentialanstieg, bis zu einer initialen Spitze von +30 mV. Diese Phase nennt man Aufstrichphase (1). Dieser folgt die so genannte Repolarisationsphase (2) mit dem, für die Herzmuskelfasern typischen, länger andauernden Plateau. Nach der Repolarisation kommt es wieder zur Rückkehr zum Ruhepotential (3). Die Dauer des Aktionspotentials in den Myokardfasern hängt von der Herzfrequenz ab und beträgt zwischen 180 – 400 ms. Somit ist der Erregungsvorgang am Herzen fast 100mal langsamer als der bei Nervenfasern.

Damit das Herz vor Extrareizen geschützt ist, gibt es die so genannte Refraktärperiode. Diese dauert von der Depolarisation, über das Plateau, bis hin zur Repolarisaion von -40 mV an. Auch durch stärkste Extrareize kann keine Depolarisation ausgelöst werden. Diese Phase nennt man absolute Refraktärzeit. In der anschließenden relativen Refraktärzeit kann zwar ein neues Aktionspotential ausgelöst werden, aber dafür ist eine stärkere Depolarisation als unter normalen Umständen erforderlich. Die absolute und die relative Refraktärperiode entsprechen der Dauer eines Aktionspotentials (Thews et al 1999).

Abbildung 3: Phasen des Aktionspotentials am Herzen



1.4. Ionenströme während des Aktionspotentials

Der anfängliche Potentialanstieg kommt durch eine vorübergehende Öffnung schneller Na^+-Kanäle zustande, die jedoch rasch inaktiviert werden. Werden Na^+-Kanäle gehemmt, durch zB Lokalanästhetika, wird die Depolarisationsphase verlängert.

Die für Herzmuskelfasern charakteristische Plateauphase kommt durch eine länger andauernde Öffnung von so genannten langsamen Ca^{++}-Kanälen vom L-Typ zustande. In dieser Phase ist auch die Leitfähigkeit für K^+-Ionen verringert. Somit sind der Ca^{++}-Einstrom und der K^+-Ausstrom in etwa ausgeglichen.

Die Repolarisation wird erst eingeleitet, wenn es zu einem Nettoaustrom von Ionen kommt. Dies passiert, wenn die Ca^{++}-Leitfähigkeit abnimmt und die K^+-Leitfähigkeit unterschritten wird. Zusätzlich wird durch die Negativierung des Membranpotentials die K^+-Leitfähigkeit noch mehr erhöht. Dies führt schließlich zu einer vollständigen Repolarisation. Werden die K^+-Kanäle gehemmt, zB mit so genannten Kaliumkanalblockern, wird die Repolarisation und somit die Dauer des Aktionspotential verlängert (Thews et al 1999).

1.5. Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Signaltransduktionsproteine an deren Bildung mehr als 150 Gene beteiligt sind. Mutationen an diesen Genen sind für Krankheiten wie Migräne, gewisse Epilepsieformen oder das „Long-QT –Syndrom“ verantwortlich.

Ionenkanäle haben eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Aktionspotentialen und somit bei der Kontraktion der Herz- und Skelettmuskulatur. Weiters sind sie an der T-Zell-Aktivierung und der Insulinsekretion beteiligt.

Ionenkanäle sind Zellmembranproteine die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie bilden eine so genannte Kanalpore, die je nach Konformation in einem offenen oder geschlossenen Zustand vorliegt. Da sie extrazellulär sehr gut zugänglich sind,

sind sie ein beliebtes Target für Pharmaka. Die α-Untereinheit ist porenbildend, während die β- und die γ-Untereinheit Hilfsuntereinheiten darstellen.

Ionenkanäle sind so konstruiert, dass sie selektiv permeabel für bestimmte Arten von Ionen sind. Daher gibt es zum Beispiel die Na^+-Kanäle, die K^+-Kanäle und die Ca^{++}-Kanäle.

Die treibende Kraft für Ionenbewegungen sind Konzentrationsgefälle und Membranpotentiale. Die Intensität des Ionenflusses hängt von der Permeabilität, der Öffnungswahrscheinlichkeit und der Anzahl der geöffneten Kanäle ab. Mittels so genanntem „gate-Mechanismus“ wird die Ionenpassage überwacht.

Man unterscheidet 2 Arten von Ionenkanälen. Werden die Kanäle durch Bindung eines Liganden an der extrazellulären Domäne geöffnet oder geschlossen, spricht man von liganden-gesteuerten-Ionenkanälen (zB der K^+-Kanal). Ist die Öffnungswahrscheinlichkeit abhängig vom Membranpotential, spricht man von spannungsabhängigen Ionenkanälen (zB Ca^{++}-Kanal, Na^+-Kanal) (Mutschler et al. 2008).

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie synthetisierten Substanzen WHG 65T und WHG 63MT auf ihre Wirkung und ihren möglichen Wirkmechanismus zu testen.
Die beiden Verbindungen weisen eine ähnliche Struktur auf. Beide sind Benzothioamide, wobei der Unterschied zwischen den beiden darin besteht, dass WHG 65T mit 6 Methoxygruppen und WHG 63MT mit 6 Fluoratomen substituiert ist.
Weiters ist WHG 63MT an den beiden Stickstoffen zusätzlich methyliert.

Zur Untersuchung einer eventuellen Wirkung bediente man sich verschiedener Organe von Meerschweinchen. Genauer gesagt handelte es sich dabei um die glattmuskulären Organe der Aorta, Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums, sowie den quergestreiften Muskelorganen Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris.

An den glatten Muskeln sollte der Einfluss der beiden Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft getestet werden. Am Atrium cordis dextrum und am Musculus papillaris sollte auf eine eventuelle Änderung der Chronotropie bzw. Änderung der Inototropie, in Anwesenheit der beiden Verbindungen, geprüft werden.

Sollte eine deutliche Wirkung von WHG 65T und/oder WHG 63MT auf ein oder auf mehrere Organ(e) festgestellt werden, hatte im Anschluss daran eine Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus zu erfolgen. Dazu konnte man sich so genannten Hilfssubstanzen bedienen, deren Wirkungen bereits bekannt waren. Dies waren die Antagonisten Glibenclamid und Nitro-L-Arginin sowie der Agonist Histamindihydrochlorid. Bei einer Veränderung der Kontraktilität des Organs, in Anwesenheit der Testsubstanz(en) gemeinsam mit dem Antagonisten/Agonisten, konnte indirekt auf einen möglichen Wirkmechanismus geschlossen werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Versuchstiere

Um die beiden Testsubstanzen WHG 65 T und WHG 63 MT auf ihre Wirkung und ihren möglichen Wirkmechanismus zu testen, wurden ausgewählte isolierte Organe des Cavia porcellus (Meerscheinchen) verwendet.

Dabei handelte es sich um die Aorta, die Arteria pulmonalis, das terminale Ileum und Teile des Herzens, genauer gesagt um den rechten Vorhof (Atrium cordis dextrum) und den Papillarmuskel (Musculus papillaris). Diese 5 Organe wurden jeden Morgen aus einem Tier isoliert, präpariert und in eine entsprechende Versuchsapparatur eingespannt. Die ermittelten Ergebnisse wurden anschließend ausgewertet.

Das Meerschweinchen eignet sich deshalb als Versuchstier, weil die Organe sehr ähnliche Ionenkanäle besitzen wie der Mensch

Abbildung 4: Versuchstier

Die verwendeten weiblichen und männlichen Meerschweinchen der Gattungen „TRIK“ bzw. „DH“ stammten aus dem Department für Labortierzucht und Toxikologie der Universität Bratislava. Um einen möglichst reibungslosen Ablauf der Versuche zu gewährleisten, mussten die Tiere relativ jung sein und durften ein Maximalgewicht von 600 g nicht überschreiten. Zur Ruhigstellung des glatten Muskeltonus im

terminalen Ileum, wurde das verwendete Tier am Vortag der Versuche nicht mehr gefüttert. Die aktive Tötung der Versuchstiere erfolgte durch einen gezielten Genickschlag mit anschließender Öffnung des Thorax.

3.2. Isolierung und Präparation der Organe

Nach dem Öffnen des Bauchraums mittels einer Schere wurden möglichst rasch die jeweiligen Organe entnommen. Zuerst wurde das Herz samt Arteria pulmonalis isoliert, dann ein ca. 20 cm langer Abschnitt des terminalen Ileums, und am Schluss die Aorta.

Um das Überleben der frisch entnommenen Organe, besonders das des Herzens, zu sichern, wurden diese umgehend in eine , mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid begasten frisch hergestellten Elektrolytlösung, überführt. Darin wurden die Organe bis zur Präparation aufbewahrt. Auch während der Präparation bzw. im gesamten Versuchsablauf ist auf eine laufende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu achten, damit das biologische Material nicht geschädigt wird oder gar abstirbt.

Abbildung 5: Sezierbesteck

Für eine exakte Aufbereitung musste, wegen der geringen Organgröße, der gesamte Präparationsvorgang unter einem Lichtmikroskop erfolgen. Als Werkzeuge wurden

Pinzetten, Präpariernadeln, Spitzscheren, Federscheren und Pasteurpipetten verwendet.

Während der Präparation befanden sich die Organe in einer mit Kork ausgelegten Petrischale. Der Kork diente einerseits als guter Hintergrund beim Mikroskopieren, und andererseits ermöglichte er eine gute Fixierung des Organs mit Hilfe von Präpariernadeln.

Während des gesamten Vorgangs musste man kontinuierlich, wie anfangs bereits erwähnt, auf eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung achten. Weiters war es notwendig, stets vorsichtig mit den Präparaten umzugehen, damit diese nicht beschädigt oder überdehnt wurden.

Nach dem erfolgreichen Präparieren wurden die Organe, bis zum Einspannen in die jeweilige Versuchsapparatur, in einem mit Elektrolytlösung befüllten Becherglas aufbewahrt und begast.

Abbildung 6: Präparationsbesteck

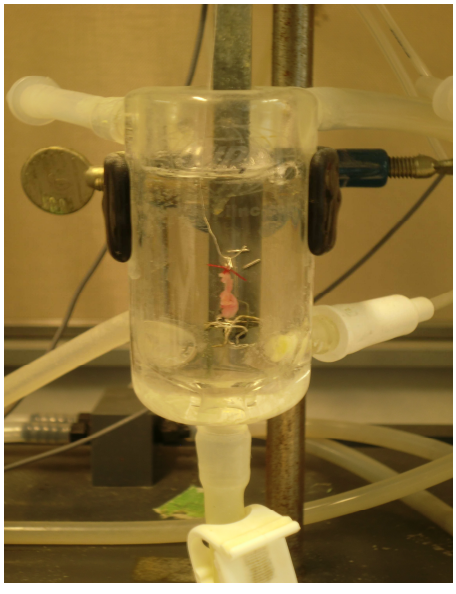
3.2.1. Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum

Wie bereits erläutert wurde dem Thorax zuerst das Herz entnommen. Damit das isolierte *Cor* von überschüssigem Blut befreit wurde, schwenkte man es einige Male in der Nährlösung.

Um den empfindlichen Herzschlag konstant zu halten, musste man den Vorhof äußerst vorsichtig präparieren. Man fixierte das Herz an der Basis oder an der Spitze mittels einer Nadel. Dies erfolgte am Korkboden einer, mit Nährlösung befüllten, Petrischale. Unter Verwendung einer Federschere wurde das Perikard und das anhaftende Fett- und Lungengewebe entfernt. Mittels eines Schnittes entlang des Sulcus coronarius erfolgte die Abtrennung des rechten Vorhofs vom rechten Ventrikel. Man musste besonders auf den Erhalt des Sinuskontens achten, der als primärer elektrischer Taktgeber, für die Chronotropie des Herzens verantwortlich ist.

Nun wurden selbstgebogene Häckchen aus Silberdraht angebracht. Damit konnte das fertig präparierte Organ in die Versuchsapparatur eingespannt werden. Zur richtigen Ausrichtung des Präparats in der Apparatur, wurde der Draht mit zwei verschiedenfärbigen Bindefäden an das Organ befestigt. Bis zum tatsächlichen Einspannen wurde der fertig präparierte Vorhof, in einem Becherglas mit begaster Nährlösung aufbewahrt.

Abbildung 7: fertig präparierter Vorhof in eingespannter Versuchsapparatur



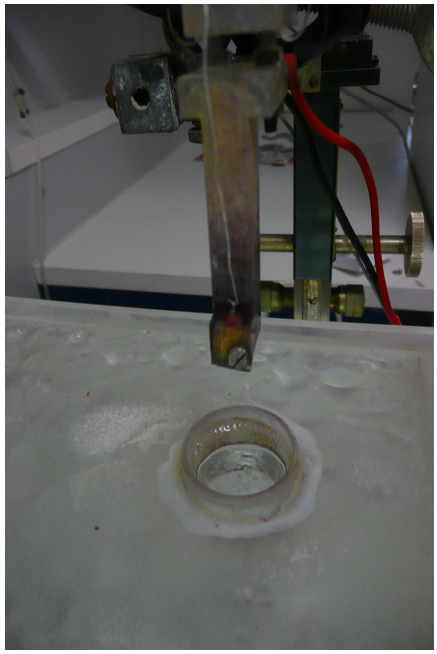
3.2.2. Isolierung und Präparation des Musculus papillaris

Nach Entfernung des rechten Vorhofs wurde der rechte Ventrikel, des in der Petrischale befindlichen Herzens, entlang des Septums geöffnet. Dies diente dazu, die Papillarmuskeln an die Oberfläche zu bringen. Nun wurden die zur Spontanaktivität neigenden Purkinjefasern gründlich entfernt. Diese würden nämlich ein Schlagen des Musculus papillaris vortäuschen und somit die Versuchsabläufe stören

Nun wurde am Fuße der Papillarmuskelsehne ein Häckchen aus Silberdraht mittels Bindefaden fixiert. Im Gegensatz zum Vorhof, wurde an dieser Stelle nur ein Häckchen verwendet. Anschließend wurde die Sehne durchtrennt und der Muskel behutsam herausgearbeitet. Auch hier wurden die gewonnenen Organe, bis zur Ausführung der Versuchsreihen, in einem mit Nährstofflösung befüllten Becherglas deponiert.

Für die Experimente wurden lediglich Papillarmuskeln mit einem Maximaldurchmesser von 0,87 mm verwendet (Koch-Weser 1963). Da die Muskeln des rechten Ventrikels generell feiner ausgebildet sind als die des linken, wurden diese auch favorisiert.

Abbildung 8: fertig präparierter Papillarmuskel alleine und in eingespannter Versuchsapparatur



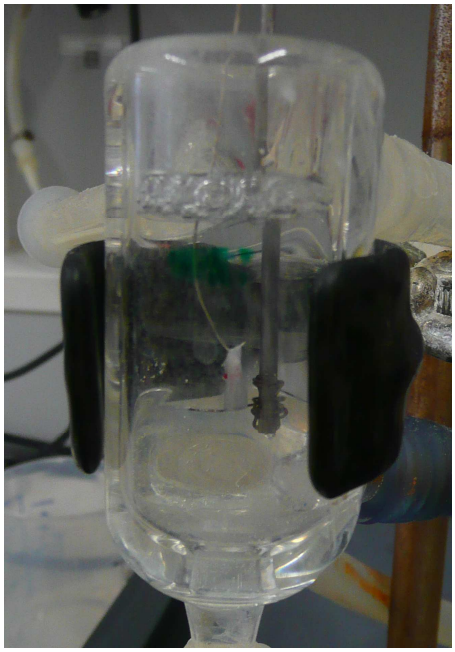
3.2.3. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis

Als letztes Stück am Herzen wurde die Arteria pulmonalis herauspräpariert. Die Abtrennung erfolgte nach Möglichkeit besonders nahe am Herzen. Der Grund lag darin, dass nur das Stück, bis zur kurz darauf folgenden Aufgabelung in rechte und linke Arterie, verwendet werden konnte.

Die isolierte Pulmonalarterie wurde nun am korkigen Boden der Petrischale festgemacht und von eventuell anhaftenden Fett- und Muskelgeweberesten befreit. Das nun gesäuberte Organstück wurde in einzelne 3-4 mm breite Ringstücke zerschnitten und bis zur weiteren Anwendung wieder in einer Elektrolytlösung aufbewahrt.

Die ringförmigen Stücke konnten direkt, ohne Zuhilfenahme von Silberdrahthäckchen, in die Versuchsapparatur eingespannt werden.

Abbildung 9: fertig präparierte Arteria pulmonalis in eingespannter Versuchsapparatur



3.2.4. Isolierung und Präparation des terminalen Ileum

Nach der Entnahme des Herzens erfolgte die Isolierung des, kurz vor dem Caecum lokalisierten, terminalen Ileums.

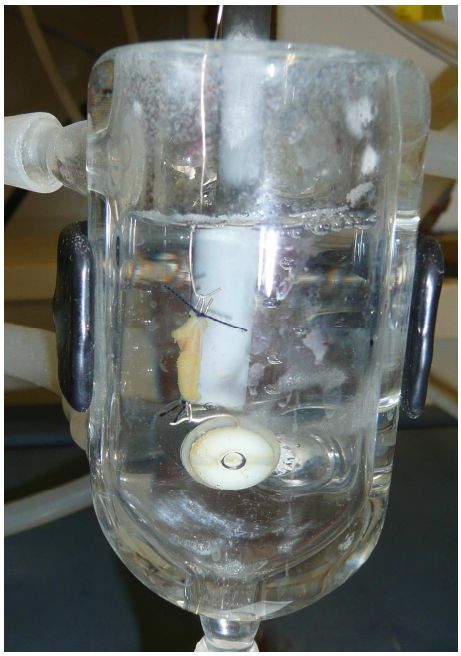
Es wurde ein ca. 20 cm langes Stück vorsichtig herausgezogen, abgebunden und anschließend abgeschnitten. Um eine Verwechslung des jejunalen zum caecalen Ende zu vermeiden, wurde um das jejunale Ende ein schwarzer Bindefaden geknotet. Vor, während, und nach der Präparation, musste der Darmabschnitt stets mit einer Nährstofflösung und mit Sauerstoff versorgt werden.

Zum Präparieren der Organe wurde ein ca. 5 cm langes Stück vom caecalen Ende her abgeschnitten. Dieses wurde in eine von Kork ausgelegten Petrischale überführt. Mittels Federschere wurde etwaiges Mesenterium entfernt. Das Darmlumen wurde unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette, die mit Nährlösung befüllt war, durchgespült und somit von noch eventuell vorhandenen Chymusresten gesäubert.

Nun wurden aus dem großen Stück mehrere 1-2 cm lange, kleinere Stücke schräg abgeschnitten und mittels Präpariernadeln am Kork fixiert. An den schrägen Enden wurden wieder Drahthäckchen mittels verschieden färbigen Bindefäden fixiert. Das obere jejunale Ende wurde mit einem schwarzen Faden markiert und das untere caecale Ende mit einem roten. Dies diente der richtigen Orientierung in der Versuchsapparatur. Beim Präparieren musste man darauf achten das Darmlumen nicht mit den Fäden zu verschließen. Für auswertbare Ergebnisse musste ein gleichmäßiges Durchströmen der Testsubstanz, auch an der Darminnenseite, gewährleistet werden.

Wurden gleich mehrere Darmpräparate auf Vorrat hergestellt, mussten diese wieder, bis zur Durchführung der Versuchsreihen, in begaster Nährlösung aufbewahrt werden.

Abbildung 10: fertig präpariertes terminales Ileum in eingespannter Versuchsapparatur



3.2.5. Isolierung und Präparation der Aorta

Die Aorta wurde als letztes Organ aus dem Meerschweinchen isoliert. Sie befindet sich hinter dem Herzen und verläuft entlang des Rückgrats. Das Separieren erforderte immer etwas an Geschick. Der Thorax musste noch weiter geöffnet werden während gleichzeitig die Aorta äußerst vorsichtig, mittels Pinzette und Spitzschere, entlang des Rückrats herausgeschnitten wurde.

Das nun abgetrennte Organ wurde, analog zur Arteria pulmonalis, in eine Petrischale überführt und mit Hilfe von Federschere und Pinzette von überschüssigen Blutgefäßen und Gewebeteilen befreit.

Anschließend wurde das ca. 2-3 cm lange Organstück in viele einzelne 2-3 mm lange Ringe geschnitten, die wiederum direkt in die Versuchsapparatur eingespannt werden konnten.

Abbildung 11: 2-3mm lange Aortenringe

3.3. Physiologische Nährstofflösung (Tyrode)

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung pro l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g/5l	33,60	114,90
KCl	50,33 g/5l	35,00	4,73
$NaHCO_3$	125,00 g/5l	83,70	24,90
$MgSO_4$	147,02 g/5l	3,20	1,18
KH_2PO_4	62 /250 ml	1,18	1,18
Glucose	Reinsubstanz	1,98	10,00
$CaCl_2$	34,00 g/250ml	1,18	3,20

Die physiologische Nährlösung diente der umfassenden Aufbewahrung aller 5 Organteile. Dies umfasste den gesamten Zeitraum ab dem Isolieren des Organs aus dem Meerschweinchen, bis über das Präparieren, bis hin zur Durchführung der Versuchsreihen in den entsprechenden Apparaturen.

Es handelte sich dabei um eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, die jeden morgen frisch, nach der Vorschrift von Reiter (1967), hergestellt wurde.

Um die physiologischen Bedingungen möglichst gut zu imitierten, mussten die einzelnen Bestandteile äußerst genau mittels Waage oder Pürette zugesetzt werden. Zuerst wurden die Feststoffe Kaliumchlorid und Glucose eingewogen und in einen 2 Liter Messkolben überführt. Dann wurden Lösungen aus Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat, Kaliumhydrogenphosphat und Natriumchlorid zugesetzt und mittels Aqua bidestillata auf ¾ des Messkolbeninhalts aufgefüllt. Um die darin enthaltene Glucose vollständig zu lösen, wurde der Messkolben mehrmals kräftig geschüttelt.

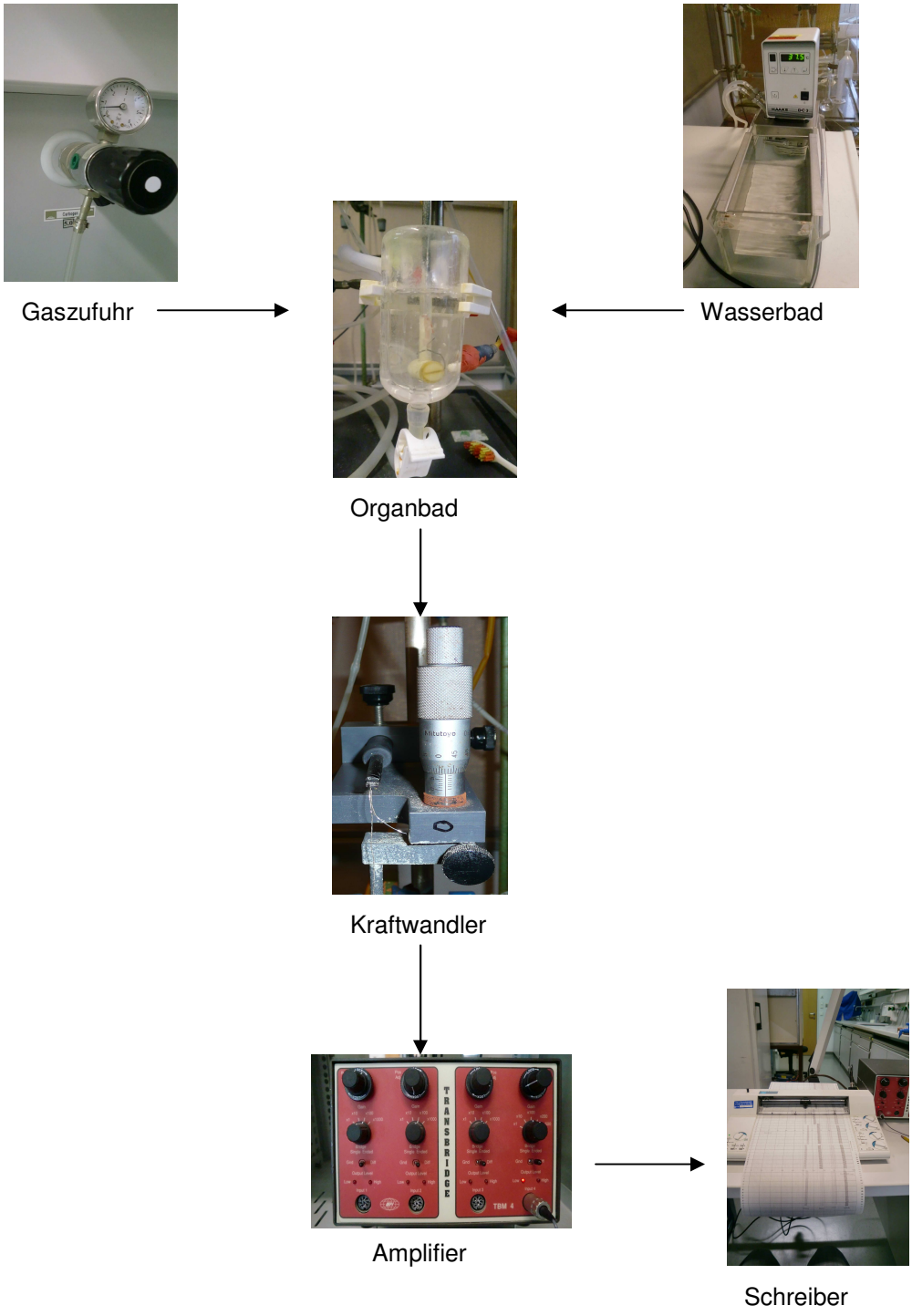
Nun wurde die fast fertige Tyrode für 20 Minuten mittels Oxymix bzw Carbogen begast. Oxymix/Carbogen ist ein Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid. Es dient einerseits dazu die Lösung maximal mit Sauerstoff zu sättigen, und andererseits einen physiologischen pH Wert von 7,2 -7,4 einzustellen. Während den Versuchsreihen konnte durch die Begasung mit Oxymix, neben den eben beschriebenen Funktionen, auch eine homogene Verteilung der Testsubstanz erreicht werden.

Nach Ablauf der 20 Minuten wurde mittels Pipette der letzte Bestandteil, das Calciumchlorid, äußerst vorsichtig und langsam zugesetzt. Die Zugabe durfte nur tropfenweise erfolgen, da es sonst zu einer Ausfällung in schwerlösliche Calciumsalze kommen konnte. Diese Ionen führten zu einer Trübung der Tyrode, die darauf hin nicht mehr verwendet werden konnte. Bei einer ordnungsgemäßen Zusetzung des Calciumchlorids, unter Erhalt einer klaren Lösung, konnte nun das restliche Volumen mit Aqua bidestillata aufgefüllt werden.

Das verwendete Aqua bidestillata wurde im Labor selbst, mithilfe einer Destillierapparatur, hergestellt.

3.4. Aufbau der Versuchsapparaturen

Abbildung 12: allgemeine Versuchsanordnung



Für die Umsetzung der Versuche wurden, je nach Art des Organs, zwei unterschiedliche Apparaturen verwendet. Diese Apparaturen unterschieden sich nur in ihrem Aufbau und in ihrem Fixierungsschema. Das Funktionsprinzip war das gleiche.

Versuchsapparatur 1 wurde für die Aorta, die Arteria pulmonalis, das terminale Ileum und das Atrium cordis dextrum verwendet.

Versuchsapparatur 2 wurde speziell für den Musculus papillaris angewandt.

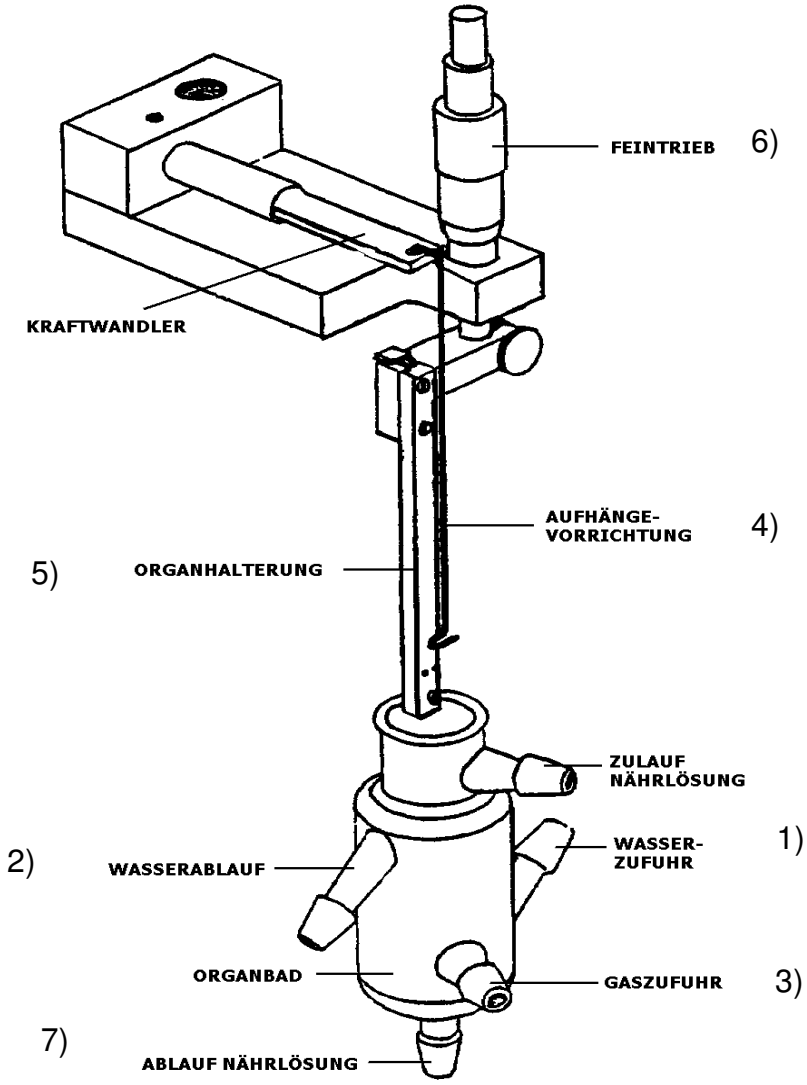
Generell wurde mit dem Wasserbad das jeweilige Organbad auf eine physiologische Temperatur von 35-37 °C erwärmt. Mit Hilfe eines Thermostats wurde diese Temperatur auf +/- 1 °C konstant gehalten. Bei dem Papillarmuskel wurden die Versuche bei 35 °C durchgeführt, bei allen anderen Organen bei 37 °C. Durch die Gaszufuhr mit Carbogen wurde eine ausreichende Sauerstoffversorgung während des gesamten Versuchablaufs gewährleistet.

Mittels Kraftwandler erfolgte die Umwandlung von mechanischer Kontraktion in ein elektrisches Signal. Dieses Signal wurde durch den Amplifier verstärkt und mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

3.4.1. Versuchsapparatur 1

Wie bereits vorhin erwähnt, wurde diese Apparatur für Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Atrium cordis dextrum angewandt.

Abbildung 13: schematische Darstellung der Versuchsapparatur 1



Bevor man mit den Versuchen beginnen konnte, wurde das Organbad mehrmals mit Aqua bidestillata und verdünnter HCl gereinigt. Damit wurde sichergestellt, dass

keinerlei Rückstände, die unsere Ergebnisse verfälschen könnten, aus vorherigen Versuchen zurückblieben.

Nun wurde das Organbad großzügig mit Nährlösung aufgefüllt. Bei dem Gefäß handelte es sich um ein doppelwandiges Glas. Somit konnte die Tyrode, durch das im Zwischenraum fließende Wasser, auf eine physiologische Körpertemperatur erwärmt werden. Das Wasser wurde, durch das bereits vor Versuchsbeginn eingeschaltete Wasserbad, auf 35 °C erhitzt und zirkulierte über einen eigenen Zulauf (1) und Ablauf (2) durch das Organbad. Weiters konnte man mit Hilfe des Gashans die kontinuierliche Sauerstoffzufuhr richtig dosieren (3).

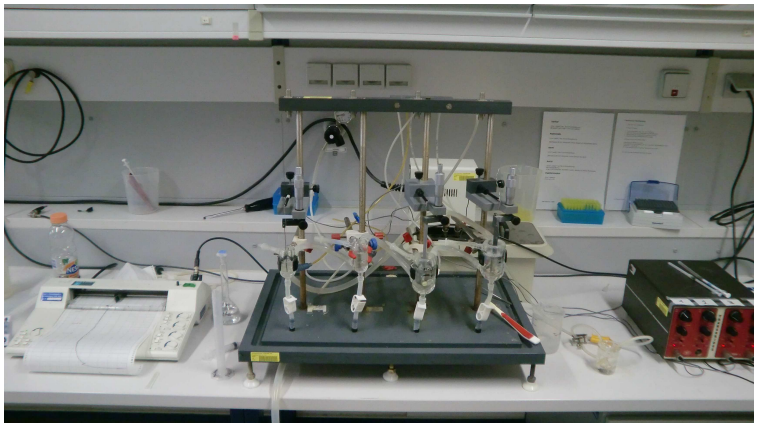
Die fertig präparierten Organe wurden nun vorsichtig an der Aufhängevorrichtung aus Draht (4) und dem, an der Unterseite des Gerätes befindlichen, Silberdraht (5) angebracht. Beim Atrium cordis dextrum und beim terminalen Ileum erfolgte das Aufhängen mittels der, vorher am Organ fixierten, Silberdrahthäckchen. Die Aorta und die Arteria pulmonalis konnten gleich direkt in die Apparatur eingespannt werden. Der ganze Vorgang sollte möglichst zügig erfolgen, damit sich das Organ nicht zu lange außerhalb der Nährlösung befand.

Wegen der unterschiedlichen Plastizität der Organe wurde mittels Feintrieb (6) das Präparat maximal vorgespannt. So wurde eine gleiche Ausgangsspannung bzw. eine Konstante geschaffen.

Nach einer 20-minütigen Gewöhnungsphase wurde die bisherige Nährlösung aus dem Organbad abgelassen (7). Nun wurde mit Hilfe eines Messzylinders eine neue Tyrode bzw. eine aus Tyrode hergestellte Kaliumchloridlösung eingefüllt. In Abhängigkeit von der Größe des Organbads wurden exakt 8 ml oder 25 ml zugeführt.

Wie bereits anfangs erläutert, wurden die mechanischen Kontraktionen mit dem Transducer in elektrische Impulse transformiert. Diese wurden dann vom zugehörigen Schreiber auf Millimeterpapier festgehalten.

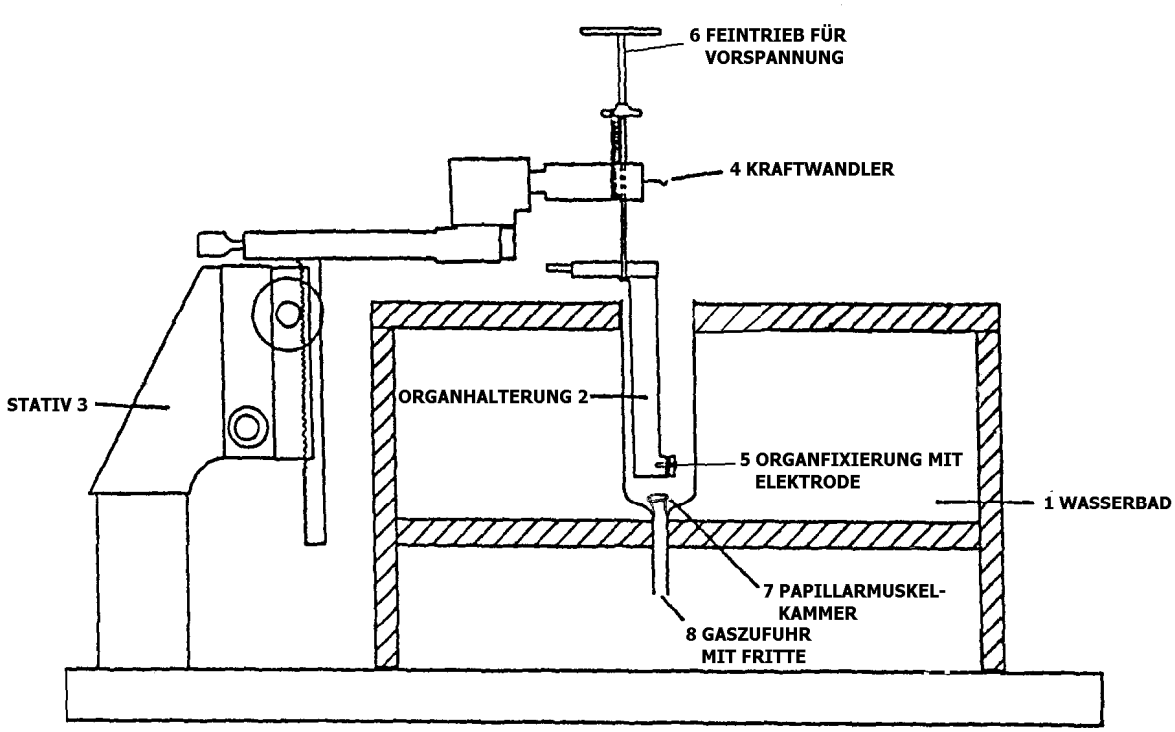
Abbildung 14: Originalabbildung der Versuchsapparatur 1



3.4.2. Versuchsapparatur 2

Diese Apparatur wurde nur für den Papillarmuskel verwendet.

Abbildung 15: schematische Darstellung der Versuchsapparatur 2



Der Grund warum der Musculus papillaris nur an dieser Apparatur angewendet werden konnte lag darin, dass dieser Muskel als einziges Organ durch eine Elektrode (5) gereizt werden musste (Im Gegensatz zum rechten Vorhof konnte der Papillarmuskel nicht von selbst schlagen). Diese Elektrode befand sich nur in der Apparatur 2.

Zuerst wurde auch hier das Organbad mit Aqua bidestillata und verdünnter HCl gereinigt. Dann wurden exakt 25 ml Tyrode eingefüllt. Bei dieser Apparatur gab es kein doppelwandiges Glasgefäß und somit tauchte man die Papillarmuskelkammer (7) direkt in das Wasserbad (1). Die Sauerstoffversorgung erfolgte von unten durch eine Glasfritte (8).

Der bereits fertig präparierte Musculus papillaris wurde mit seinem Silberdrahthäckchen an die Aufhängevorrichtung (2) befestigt. Somit wurde eine Verbindung zum Kraftwandler (4) hergestellt. Das freie Ende des Muskels wurde zwischen einem kleinen Plexiglasplättchen und einer Platinkathode eingeklemmt und durch Schrauben fixiert. Dabei musste man darauf achten, dass ein Konnex zwischen dem Präparat und der aus Silberchlorid bestehenden Elektrode bestand. Nun konnte das befestigte Organ mittels Stativschlitten vollständig in die, konstant auf Körpertemperatur temperierte, Nährlösung eingetaucht werden (3). Zur Entwicklung der maximalen Kontraktionskraft des Muskels, wurde wieder mit dem Feintrieb (6) eine Vorspannung angelegt. Die durch den Kraftwandler umgewandelten elektrischen Impulse wurden erneut mit dem Schreiber aufgezeichnet.

Ein weiterer Unterschied zur Apparatur 1 bestand darin, dass das Organbad mit der Tyrode keinen eigenen Abfluss besaß. Zum Reinigen bzw. zum Wechseln der Nährstofflösung verwendete man eine Kunststoffspritze mit einem befestigtem Gummischlauch

Abbildung 16: Originalabbildung der Versuchsapparatur 2

3.4.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Der durch Gewichten geeichte Kraftwandler oder Transducer (Transbridge™ der Firma World Precision Instruments, USA) ermöglicht die Umwandlung von mechanischer Kontraktion in elektrische Impulse. Dies war notwendig, weil die Inotropie als rein mechanische Größe nicht aufgezeichnet werden konnte. Der Transducer bestand aus einem Dehnungsmessstreifen, der bei Dehnung seinen Widerstand änderte. Laut Ohm`schen Gesetz (I = U/R) ändert sich bei gleich bleibender Spannung die Stromstärke proportional zum Widerstand.

Namensgebend wurde mit einem Verstärker bzw Amplifier (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments, USA) das elektrische Signal vergrößert.

Im letzten Schritt wurde das verstärke Signal mit einem hoch empfindlichen Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, NL) in Form von Kurven auf Millimeterpapier graphisch aufgezeichnet.

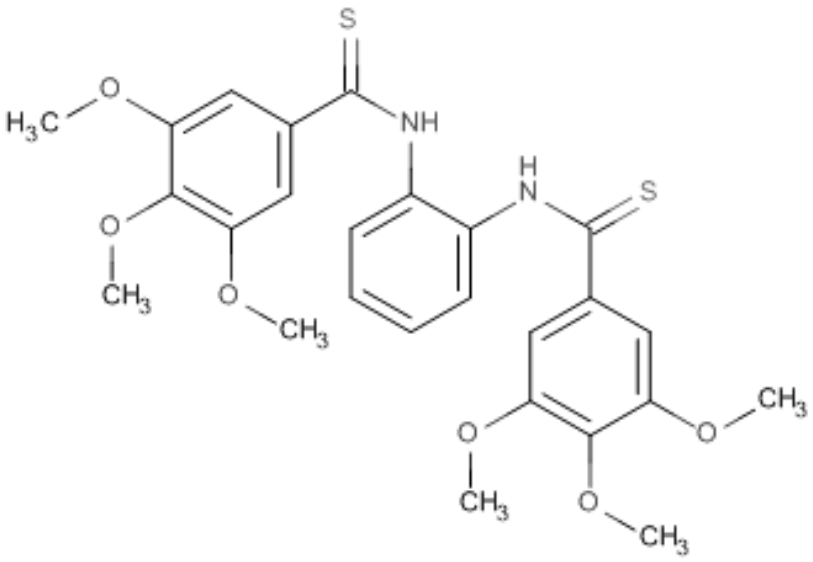
3.5.Testsubstanzen

Die zwei Testsubstanzen wurden am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert und für uns bereitgestellt.

Bei den beiden zu untersuchenden Verbindungen handelte es sich chemisch um Benzothioamide.

3.5.1. Testsubstanz WHG 65T

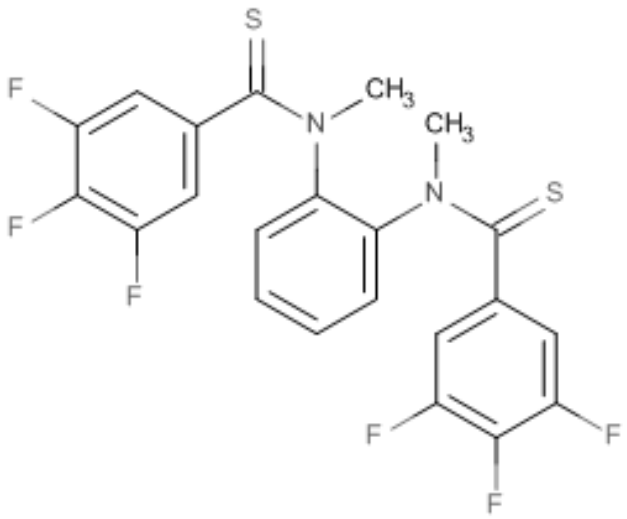
Abbildung 17: WHG 65T



Nomenklatur: N,N´-(1,4-Phenylen)bis(3,4,5-trimethoxy-benzothioamid)
Molekulargewicht: 528,65
Summenformel: $C_{26}H_{28}N_20_6S_2$

3.5.2. Testsubstanz WHG 63MT

Abbildung 18: WHG 63 MT



Nomenklatur: N,N´-(1,2-Phenylen)bis(3,4,5-trifluor-N-methylbenzothioamid)
Molekulargewicht: 484,49
Summenformel: $C_{22}H_{14}F_6N_2S_2$

3.5.3. Lösen der Testsubstanz

Da die zwei Testsubstanzen wasserunlöslich waren, wurden sie in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel, das eine gewisse Wirkung auf die isolierten Organe der Meerschweinchen besaß. Dies führte natürlich zu einer leichten Veränderung der Versuchsergebnisse und musste bei der Auswertung dieser berücksichtigt werden.

Um die Eigenwirkung des Lösungsmittels festzustellen, wurden Versuchreihen durchgeführt, die nach dem gleichen Schema abliefen wie die tatsächlichen Versuche. Die gemessenen DMSO Werte wurden als gemittelte Prozentsätze beim jeweiligen Organ entweder addiert oder subtrahiert.

Die Wirkung von DMSO auf das Atrium cordis dextrum konnte ignoriert werden, da es keinen Einfluss auf die Schlagfrequenz hatte.

3.5.4. Einwaage der Testsubstanz

Da es sich um hochaktive Wirkstoffe handelte, die an relativ kleinen Organen getestet wurden, brauchte man für die Versuche nur wenige mg bzw. µg an Substanz. Die Einwaage erfolgte daher auf Analysewaagen mit Hilfe von Wägeschiffchen in einem speziell abgedichteten Raum ohne störenden Luftzug.

Die Stammlösung aus Testsubstanz und DMSO mussten jeden Morgen frisch hergestellt werden. Um die Wirkstoffkonzentration nicht zu verfälschen, musste man beim Einwiegen darauf achten, ob der Versuch in einem 8 ml oder in einem 25 ml Organbad durchgeführt wurde.

Tabelle 2: Stammlösungen

Stammlösung	Organbad	Einwaage der Substanz
1) WHG 65T	25 ml	1,322 mg
2) WHG 65T	8 ml	0,523 mg
3) WHG 63MT	25 ml	1,211 mg
4) WHG 63MT	8 ml	0,387 mg

Das Gewicht der Einwaage wurde über die molare Masse so ermittelt, dass am Ende der Versuchsreihe eine Konzentration von 100 µmol/l im Organbad vorlag.
Die abgewogene Substanz wurde in 100 µl DMSO gelöst.
Während der Versuchsreihen wurde die Stammlösung in unterschiedlichen Konzentrationen mit Hilfe einer Kolbenhubpipette zugefügt (siehe Pipettierschema). Die kumulative Einspritzung erfolgte immer nach Erreichen des „steady states“ im Abstand von 45 Minuten. Das Injizieren sollte möglichst immer an der gleichen Stelle geschehen, wobei das Organ und der Kraftwandler aber nicht berührt werden durften.

Tabelle 3: Pipettierschema

zugeführtes Volumen	Gesamtkonzentration im Organbad
1 µl	1 µmol/l
2 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

3.6. Durchführung der Versuche

Pro Organ wurden ca. fünf bis sieben Einzelversuche durchgeführt. Bei einigen Organen, zB terminales Ileum oder Musculus papillaris mussten unter Umständen sogar mehr Versuchsreihen durchgeführt werden. Der Grund lag darin, dass diese im Laufe des Versuches oft nicht mehr funktionsfähig waren oder die ermittelten Ergebnisse in keiner Relation zu den anderen Ergebnissen standen.

3.6.1. Herstellung der Kaliumchloridlösung

Um eine eventuell dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanzen ermitteln zu können mussten die Organe, vor Injektion der Testverbindungen, maximal vorkontrahiert werden. Dies erfolgte mit einer, jeden morgen frisch hergestellten, Kaliumchloridlösung.

Bei den glatten Muskelorganen der Aorta und der Arteria pulmonalis verwendete man eine 90 mmolare Lösung. Für die glatte Muskulatur des terminalen Ileums wurde eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung angewandt.

Für die 90 mmolare Lösung wurden 0,67 g KCl eingewogen und für die 60 mmolare Lösung 0,45 g KCl. Diese wurden jeweils in einen 100 ml Messkolben überführt und mit Tyrode bis zum Meniskus aufgefüllt und anschließend geschüttelt.

Da der Papillarmuskel mit Hilfe einer Elektrode gereizt, und der Vorhof mit seinem Sinusknoten eine autonome Schlagfähigkeit besaß, wurden diese beiden Organe nicht mit KCl versetzt.

3.6.2. Durchführung der Versuche am Atrium cordis dextrum

Der fertig präparierte Vorhof (siehe Kapitel 3.2.1.) wurde mit seinen 2 Silberdrahthäckchen in die Versuchsapparatur 1 (siehe Kapitel 3.1.4.) eingehängt und in das bereits temperierte Organbad eingetaucht.

Beim Einspannen musste man darauf achten das Organ nicht allzu sehr zu dehnen, da später mittels Feintrieb das Organ nochmals gespannt wurde. Außerdem musste, wie bei allen Organen, das Aufbringen an die Apparatur möglichst rasch erfolgen, damit sich der Vorhof nicht zu lange außerhalb der Nährlösung befand.

Der Schreiber wurde eingeschaltet und sein Stift auf die Nulllinie gestellt. Anschließend aktivierte man den Amplifier, wodurch sich der Schreiber verstellte und wieder auf die Nulllinie korrigiert werden musste. Nun wurde mittels Feintrieb auf 10,4 mN vorgespannt um eine stärkere Kontraktion zu erhalten. Dies erfolgte bei einer Stromstärke von 5 mV. Durch das Vorspannen verrückte der Stift abermals und wurde mit dem Regelknopf des Amplifier wieder auf die Nulllinie korrigiert. Da die Spannung während des gesamten Versuches aufrechterhalten bleiben musste, wurde wegen der Elastizität des biologischen Materials, laufend mit dem Feintrieb nachjustiert.

Damit sich das Organ an die neue Umgebung gewöhnen konnte, wurde ca. 30 Minuten gewartet. Nun begann man mit der Kontrollphase. Dabei maß man alle 5 Minuten für 12 sec die Anzahl der Schläge. Wenn nach 3 aufeinander folgenden Messungen eine konstante Chronotropie herrschte (+/- 1 Schlag), konnte mit der

kumulativen Substanzzugabe mittels Kolbenhubpipette begonnen werden. Diese erfolgte alle 45 Minuten gemäß dem Pipettierschema nach Tabelle 3.

Die Schlagfrequenz wurde während des gesamten Versuchs alle 5 Minuten für 12 Sekunden gemessen. Die Schlagfrequenz pro Minute erhielt man durch einfache Multiplikation mit 5.

3.6.3. Durchführung der Versuche am Musculus papillaris

Der nach Kapitel 3.2.2. isolierte und fertig präparierte Papillarmuskel wurde, wie bereits in Kapitel 3.4.2. beschrieben, an die Versuchsapparatur 2 angebracht und in das Organbad getaucht. Bei einer Stromstärke von 2mV bzw. 5 mV wurde er mit 3,82 mN vorgespannt. Um eine Abnahme der Inotropie wegen Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern, wurde im gesamten Versuchsprozess immer wieder nachgespannt (Reiter 1967).

Da bei der Präparation des Musculus papillaris die spontan schlagenden Purkinjefasern entfernt wurden, musste er mit einem Reizgerät (Accupulser A310-Akkumulator Stimuls Isolator A360 von WPI, USA) über Silberelektroden elektrisch gereizt werden. Nach einer Akklimatisationsphase von 10 Minuten wurde der Muskel mit einer Frequenz von 1 Hz und mit Rechteckimpulsen, die eine Dauer von 3 Millisekunden hatten, gereizt. Die Reizstromstärke durfte nicht mehr als 10 % über der minimalen Reizschwelle liegen. Der Grund warum die Stromstärke so niedrig gehalten werden musste lag daran, dass bei zu hoher Reizung die Gefahr bestand, die Katecholaminspeicher vollständig zu leeren. Dies würde zu einem „run down“ und in weiterer Folge zu verfälschten Ergebnissen führen (Furchgott et al. 1959).

Die Kontrollphase dauerte so lange bis eine konstante Amplitude vorlag, mindestens jedoch 45 Minuten. Bei beständiger Amplitudenhöhe, die auf Millimeterpapier abgemessen werden konnte, konnte wieder mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz, im Abstand von 45 Minuten, begonnen werden. Die Aufzeichnungen über 5 Amplituden erfolgten, sowohl in der Kontrollphase als auch während des restlichen Versuches, alle 5 Minuten.

3.6.4. Durchführung der Versuche an der Aorta

Der fertig präparierte Aortenring (siehe Kapitel 3.2.5.) wurde direkt in die Versuchsapparatur A eingespannt und in die auf 37 °C temperierte und begaste Elektrolytlösung abgesenkt.

Der Schreiber und der Verstärker wurden in gleicher Weise wie bei Kapitel 3.6.2. eingeschaltet und justiert. Nun wurde bei 10 mV eine Vorspannung von 19,6 mN angelegt. Nach einer Gewöhnungsphase an das neue Milieu (20 Minuten) wurde auf eine Stromstärke von 5 mV umgestellt. Die möglicherweise auftretenden Veränderungen entlang des Nullpunktes wurden mittels Feintrieb korrigiert. Nun wurde am Schreiber mittels „Pen down“ und „Record on“ mit den Aufzeichnungen begonnen. Gleich danach ließ man durch das Öffnen einer Verschlussklammer die Nährlösung aus dem Organbad ab. Diese wurde sofort durch das Zufügen einer frisch zubereiteten, 90mmolaren Kaliumchloridösung (siehe Kapitel 3.6.1.) ersetzt.

Nachdem die Kontraktionskurve ein konstantes Plateau erreicht hatte, dies erfolgte nach ca.45-90 Minuten, konnte wieder mit der kumulativen Injektion der Testsubstanz, im Intervall von 45 Minuten, begonnen werden (siehe Pipettierschema). Durch das kontinuierliche Aufzeichnen der Kontraktionskurve konnten eventuell dilatierende Effekte der eingespritzten Testsubstanz festgehalten werden.

3.6.5. Durchführung der Versuche an der Arteria pulmonalis

Der Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis (siehe Kapitel 3.2.3) erfolgte in gleicher Weise wie bei der Aorta.

Die einzigen Unterschiede lagen darin, dass bei 5mV auf 9,81 mN vorgespannt wurde. Auch gab es keine Gewöhnungsphase, nach der die Stromstärke umgestellt wurde. Die Phase bis zur 100%igen Kontraktion des Organs, durch Zufügen der Kaliumchloridlösung, dauerte in Regel auch etwas länger als bei der Aorta.

3.6.6. Durchführung der Versuche am terminalen Ileum

Der nach Kapitel 3.2.4. präparierte Darmabschnitt wurde nun vorsichtig mit den Silberdrahthäckchen an die Versuchsapparatur 2 angebracht. Man musste darauf achten, dass das terminale Ileum richtig in der Apparatur ausgerichtet war. Das bedeutete, dass das mit rotem Bindefaden markierte jejunale Ende oben sein musste, und das mit schwarzem Faden markierte caecale Ende unten. Nun konnte der korrekt eingespannte Darm in das Organbad abgesenkt werden.

Anschließend wurden der Schreiber und der Amplifier eingeschalten und eingestellt (siehe Kapitel 3.6.2.). Beim terminalen Ileum wurde eine Vorspannung von 4,9 mN bei einer Stromstärke von 5 mV angelegt.

Nach einer 20-minütigen Gewöhnungsphase wurde, bei eventuell leichten Veränderungen der Nulllinie, wieder nachjustiert. Kurz vor dem Ablassen der Tyrode wurde mit den Aufzeichnungen begonnen. Das Organbad wurde wieder mit einer Kaliumchloridlösung befüllt. Diesmal wurde aber, im Gegensatz zur Aorta und Arteria pulmonalis, eine 60 mmolare Lösung verwendet. Es kam sofort zu einem starken Ausschlag der Kontraktionskurve, die sich jedoch nach kurzer Zeit wieder beruhigte und langsam einpendelte.

Bei Erreichen eines konstanten Plateaus an Kontraktion, nach mindestens 45 Minuten, konnte wieder mit der kumulativen Zugabe der Substanz durch die Kolbenhubpipette begonnen werden (siehe Pipettierschema).

3.7. Wirkmechanismus

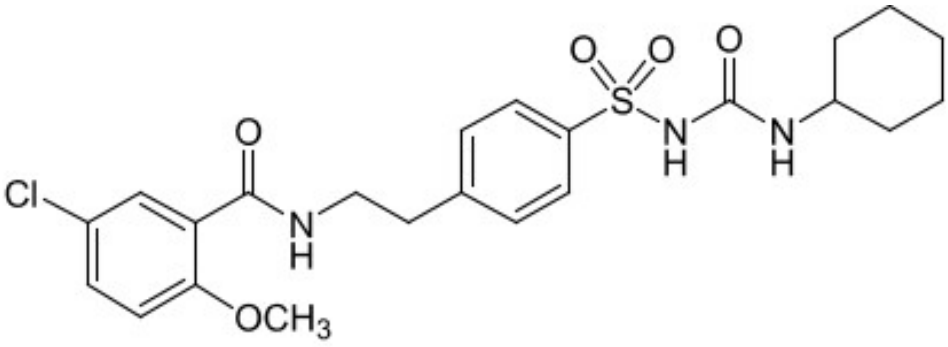
Der Wirkmechanismus wurde auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 3.6. durchgeführt. Da eine besonders starke Wirkung der Testsubstanz WHG 63MT am terminalen Ileum festgestellt werden konnte, wurden nun weitere Versuchsreihen an diesem Organ durchgeführt.

Um mehr Informationen über den möglichen Mechanismus der Wirkung von WHG 63MT zu erhalten, arbeitete man mit Antagonisten und Agonisten. Von diesen Verbindungen waren Wirkung und Wirkmechanismus bereits bekannt.

3.7.1. Antagonisten

3.7.1.1. Glibenclamid

Abbildung 19: Glibenclamid (MG = 494 g/mol)



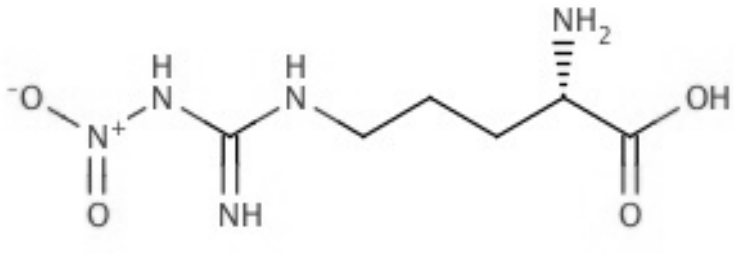
Glibenclamid ist ein insulinotropes orales Antidiabetikum, das zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe gehört. Es wird bei Diabetes Typ 2a Patienten eingesetzt. Im Spätstadium wird es auch bei Diabetes Typ 2b Patienten angewandt.

Glibenclamid blockiert die ATP-abhängige Kaliumkanäle der β-Zellen des Pankreas. Somit kommt es zu einer Senkung des Membranruhepotentials und in weiterer Folge zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Die dadurch bewirkte erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer vermehrten Exozytose von Insulin. Das bedeutet, dass Glibenclamid nur dann wirksam ist, wenn die körpereigene Insulinproduktion, zumindest teilweise, noch erhalten ist.

Bei Gabe dieses Sulfonylharnstoff-Derivats kann es unter Umständen zu gefährlichen Hypoglykämien kommen. Ebenso sind Gewichtszunahmen, gastrointestinalen Beschwerden, allergischen Reaktionen und in seltenen Fällen Leukopenie und Thrombozytopenie möglich (Mutschler et al. 2008).

3.7.1.2. Nitro-L-Arginin

Abbildung 20: Nitro-L-Arginin (MG = 219,2 g/mol)



Nitro-L-Arginin kann als NO-Antagonist eingesetzt werden.

Stickstoffmonoxid (NO) wird vom Endothel freigesetzt und wirkt relaxierend auf den Gefäßmuskeltonus. Es wird daher auch als „Endothelium derived Relaxing factor“ bezeichnet.

Stickstoffmonoxid aktiviert über die cytosolische Guanylatcyclase die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat. Dies führt zu einer Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration, die in weiterer Folge zu einer Relaxierung der Gefäße führt.

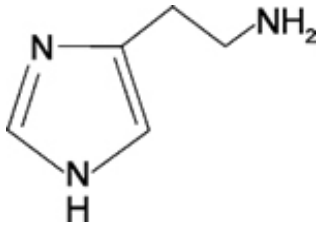
Wird nun die NO-Synthase durch Nitro-L-Arginin inhibiert, sinkt die Konzentration an Stickstoffmonoxid. Die ganze Kaskade, über die Aktivierung der Guanylatcyclase, wird gestoppt.

Mittels Versuchsreihen an Tieren konnte nachgewiesen werden, dass Nitro-L-Arginin über den vorher beschriebenen Mechanismus, die Kontraktilität des Darms signifikant steigert (Rosemann 2002).

3.7.2. Agonisten

3.7.2.1. Histamin

Abbildung 21: Histamin (MG = 111,15 g/mol)



Histamin ist ein Decarboxylierungsprodukt der Aminosäure Histidin. Es kommt in allen menschlichen Geweben vor, hauptsächlich aber in Lunge, Haut und Magen-Darm-Trakt. Dieses biogene Amin wird in basophilen Granulozyten und in Mastzellen gespeichert. Die Freisetzung von Histamin erfolgt unter anderem durch Zerstörung von Zellen (bei Verletzungen) und bei Überempfindlichkeitsreaktionen (IgE-vermittelt). Es gibt auch sogenannte chemische Histaminliberation wie zum Beispiel Morphin oder iodhaltige Röntgenkontrastmittlen, die IgE-unabhängig zu einer Histaminfreisetzung führen.

Freies Histamin wird im Körper sehr rasch mittels Histaminase und ferner mittels Monoaminooxidase abgebaut.

Das biogene Amin Histamin greift an 3 verschiedenen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren an, die als H_1-, H_2- und H_3-Rezeptoren bezeichnet werden.

Werden die H_1-Rezeptoren stimuliert, kommt es über die Aktivierung der Phospholipase C zu einem Blutdruckabfall infolge Vasodilatation der Arteriolen. Die Relaxierung kommt zustande, weil durch die Aktivierung der Phospholipase C, in weiterer folge auch die NO-Synthase (NOS) gesteigert wird. Die Synthase führt zur Bildung des diffusiblen und gefäßrelaxierenden Gases NO. Zudem erhöht Histamin die Kapillarpermeabilität. Diese Kombination, aus Vasodilatation und verstärkter Kapillarpermeabilität, trägt zur Entwicklung eines anaphylaktischen Schocks bei.

Histamin begünstigt auch die Entstehung von entzündlichen Reaktionen, indem es die Leukozytenmigration fördert. Weiters löst es, durch Stimulation afferenter Neuronen, Juckreiz aus und kontrahiert die glatten Muskeln von Darm und Bronchien. Im ZNS regulieren H_1-Rezeptoren die Nahrungsaufnahme und den Wachzustand.

Bei Erregung der H_2-Rezeptoren kommt es, mittels Aktivierung der Adenylatcyclase, zu einer Steigerung der Chronotropie und Inotropie am Herzen. Ebenfalls wird die Drüsensekretion, vor allem in der Magenschleimhaut, gesteigert.

Bei den H3-Rezeptoren handelt es sich um so genannte „Autorezeptoren". Bei Erregung hemmen sie die Histaminliberation, aber auch die Freisetzung von anderen Neurotransmittern wie Serotonin. Bis jetzt gibt es noch keine Pharmaka die selektiv an H_3-Rezeptoren binden.

Histamin hat, mit Ausnahme der Positivkontrolle bei Allergietests, keine therapeutische Bedeutung (Mutschler et al 2008).

3.7.3. Durchführung der Versuche mit Antagonisten

Der Versuchsablauf mit den Antagonisten am terminalen Ileum erfolgte anfangs in gleicher Weise wie in Kapitel 3.6.6.beschrieben.

Ab dem Zeitpunkt des Erreichens eines konstanten Kontraktionsplateaus ging man anders vor. Anstatt der üblichen kumulativen Zugabe der Testsubstanz, auf die Konzentrationen 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l (siehe Pipettierschema), wurde nun der Antagonist in der jeweiligen Konzentration eingespritzt. Nach Erreichen der „steady-state-Bedingung", also nach 45 Minuten, konnte die Testsubstanz in der Konzentration von 15 µmol/l injiziert werden (Einwaage der Substanz 0,18 mg).

Der Antagonist Glibenclamid wurde in den Konzentrationen 30 µmol/l und 100 µmol/l getestet. Hierzu wurden 0,3705 mg Glibenclamid bzw. 1,235 mg Glibenclamid in 100 µl DMSO gelöst.

Der Antagonist Nitro-L-Arginin wurde nur in der Konzentration 100 µmol/l untersucht. Dazu wurden 0,548 mg Nitro-L-Arginin in 100 µl Tyrode gelöst.

3.7.4. Durchführung der Versuche mit Agonisten

Bei den Versuchen mit dem Agonist Histamindihydrochlorid wurde, jeden morgen frisch, eine entsprechende Verdünnungsreihe erstellt. Diese bestand aus der Stammlösung mit 10 µmol/l und den daraus gebildeten Verdünnungen 3 µmol/l, 1 µmol/l, 0,3 µmol/l und 0,1 µmol/l.

Die Einwaage der Testsubstanz WHG 63MT (auf eine Konzentration von 15 µmol/l) und des reinen Agonisten Histamindihydrochlorid (auf eine Konzentration von 10 µmol/l) musste diesmal entsprechend eines 18 ml Organbads erfolgen.

Bei der Durchführung dieses Versuchs ging man anfangs auch wie in Kapitel 3.6.6. vor. Nach der 20-minütigen Gewöhnungsphase wurde jedoch nicht die Tyrode mit der Kaliumchloridlösung ersetzt, sondern mit der Kontrolluntersuchung des Agonisten begonnen.

Dies erfolgte nach dem vorher durchgeführten Verdünnungsschema, wobei mit der höchsten Konzentration, also 3 µmol/l, begonnen wurde. Gleichzeitig mit der Einspritzung wurde die Wirkung des Agonisten mittels Schreiber für 1 Minute aufgezeichnet. Hier musste wieder darauf geachtet werden, die Agonisten immer im gleichen Intervall und möglichst an der gleichen Stelle zu pipettieren. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurden, im Abstand von 10 Minuten (Ruhephasen), die nächst niedrigeren Konzentrationen des Agonisten injiziert. Während der Ruhephasen wurde das Organbad zwei Mal mit Tyrode gespült und anschließend wieder auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Dieses Auswaschen der Nährlösung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Schlauchsystems, das zuvor montiert wurde.

Die Versuchsreihen mit dem reinen Agonisten waren wichtig, um später Kontrollerwerte für die Untersuchung der Ergebnisse mit der Testsubstanz WHG 63MT zu haben.

Für die eigentlichen Versuche mit der Testsubstanz WHG 63MT wurde, nach einer 45-minütigen Eingewöhnungsphase, die Nährlösung damit versetzt. Danach wurden die Einspritzungen des reinen Agonisten analog zu vorhin durchgeführt. Der Unterschied lag allein darin, dass die Nährlösung mit einer bestimmen Konzentration an Testsubstanz getränkt war.

3.8. Messgrößen und Statistik

Nach der Auswertung der Messergebnisse, musste man die Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO berücksichtigen (siehe Kapitel 3.5.3.) und gegebenenfalls nach oben oder unten korrigieren.

3.8.1. Messgrößen Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Bei der Auswertung der Ergebnisse von Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum wurden, bei der entsprechenden Testsubstanzzugabe, die Punkte mittels Bleistift an der Kontraktionskurve markiert. Nun wurden die Abstände der jeweiligen Punkte zur Nulllinie in cm, mit einem einfachen Lineal, abgemessen. Um die Messergebnisse in mN umzurechnen, wurden die entsprechenden Abstände, mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert. Dieser betrug bei einer Stromstärke von 5 mV genau 0,98 für 1 cm. Wurden die Versuche bei 10 mV durchgeführt, musste man das Ergebnis mit dem Faktor 2 multiplizieren.

Das konstante Plateau an maximaler Kontraktion galt als 100 % Wert. In weiterer Folge wurde die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft (fc) im Bezug auf den 100 % errechnet.

3.8.2. Messgröße Musculus Papillaris

Um die Kontraktionskraft des Papillarmuskels zu erhalten, wurde die Höhe der Amplitude in cm gemessen. Die Umrechnung in mN erfolgte auch hier unter Miteinbezug des Kalibrationsfaktors des Kraftwandlers. Bei 5 mV betrug dieser 0,98. Oft wurden die Versuche auch bei einer Stromstärke von 2mV durchgeführt. Dann musste man das Ergebnis mit dem Faktor 0,4 multiplizieren.

Als 100 % Wert galt der letzte Messwert der Kontrollphase. Unter Ermittlung der Prozentwerte der jeweils letzten Amplituden (45 Minuten nach einer Substanzzugabe), konnte eine eventuelle Zunahme oder Abnahme der Inotropie festgestellt werden.

3.8.3. Messgröße Atrium cordis dextrum

Wie bereits in Kapitel 3.6.2. beschrieben wurden beim rechten Vorhof, alle 5 Minuten für die Dauer von 12 Sekunden, Aufzeichnungen geführt. Bei einem Papiervorschub von 5 mm/sec, entsprach die Aufzeichnungsstrecke 6 cm auf einem Millimeterpapier. Da uns die Schlagfrequenz pro Minute interessierte, wurde mit dem Faktor 5 multipliziert.

Der letzte Messwert der Kontrollphase war auch hier der 100 % Wert. Nach Errechung der Prozentwerte, der jeweils letzten Messergebnisse, konnte in Korrelation zum 100 % Wert eine eventuelle Zunahme oder Abnahme der Chronotropie, unter Einfluss der Testsubstanz, festgestellt werden.

3.8.4. Statistik

Mit den in Kapitel 3.8.1. – 3.8.3. ermittelten Ergebnissen in mN und in Prozent wurde nun eine statistische Auswertung durchgeführt.

Dazu wurden die arithmetischen Mittelwerte aus einer Anzahl von „n“ Versuchen und deren Standardfehler ermittelt (SEM). Diese wurde anschließend, mit Hilfe des Programms „Sigma Plot“, in einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve graphisch dargestellt. Darin zeigt die Ordinate die Kontraktionskraft- bzw. die Schlagfrequenzänderung an. Die Abszisse veranschaulicht logarithmisch die verwendeten Konzentrationen an Testsubstanz (µmol/l). Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve konnte nun eine eventuelle EC_{50} bestimmt werden. Die EC_{50} ist jene Konzentration in µmol/l, bei der die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes absinkt.

Die Signifikanz der Messergebnisse wurde mittels „gepaartem student-t-test“ bewertet. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5 % ($P < 0,05$) und < 1 % ($P < 0,01$) sah man als signifikant bzw. sehr signifikant an. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0,1 % ($P < 0,001$) wurden als hochsignifikant eingestuft.

4. ERGEBNISSE

In diesem Kapitel wird näher auf die Effekte der beiden Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT an isolierten Organen von Meerschweinchen eingegangen.

Wie bereits beschrieben, wurden die Organe Atrium cordis dextrum, Musculus papillaris, Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum verwendet.

Um ein repräsentatives Ergebnis der potentiellen Wirkung zu erhalten, mussten mindestens 4-5 Versuchsreihen pro Organ durchgeführt werden.

Um eine aussagekräftige Schlussfolgerung über den etwaigen Wirkmechanismus zu erhalten, wurden mindestens 3 Versuchsreihen in Kombination mit den einzelnen Antagonisten und Agonisten absolviert.

Die erhaltenen Daten werden in diesem Kapitel mit Hilfe von Tabellen, daraus ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sowie Originalaufzeichnungen genauer analysiert.

Natürlich musste die Eigenwirkung des Lösungsmittel DMSO berücksichtigt werden. (siehe Kapitell 3.5.3.).

4.1. Resultate der Testsubstanz WHG 65T

4.1.1. Wirkung WHG 65T auf das Atrium cordis dextrum

Die Ermittlung des Effekts der Testsubstanz WHG 65T auf den rechten Vorhof wurde in 6 Versuchsreihen durchgeführt. Dazu setzte man das Experiment genau nach Kapitel 3.6.2. um. Untersucht wurde die Änderung der Schlagfrequenz pro Minute.

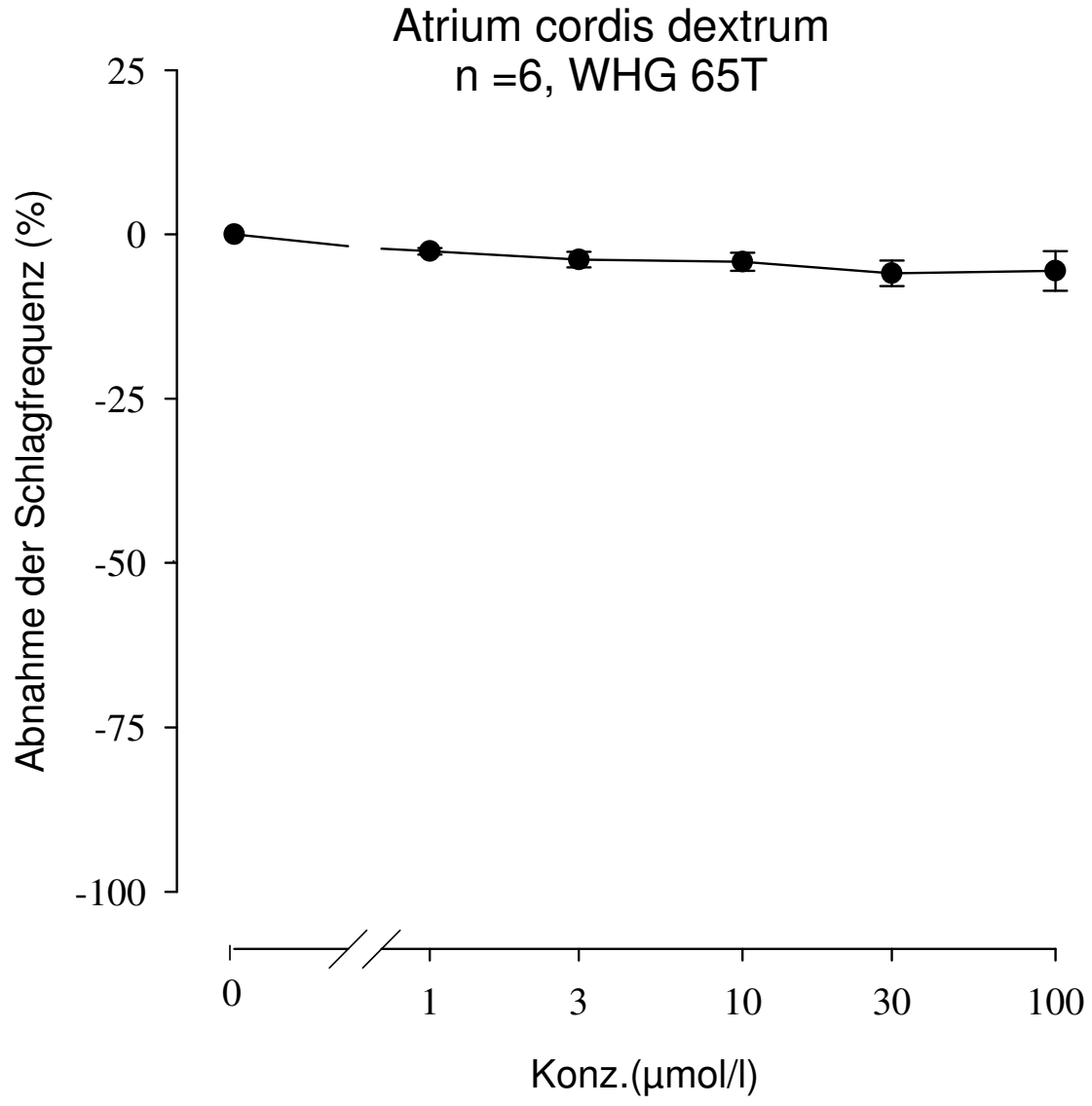
Tabelle 4: Messergebnisse von WHG 65T am Atrium cordis dextrum

WHG 65T (µmol/l)	f ± SEM Schläge/min	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**235,83 ± 14,80**	**0,00 ± 0,00**	**6**	**-**
1	**230,00 ± 15,22**	**-2,58 ± 0,50**	**6**	**n.s.**
3	**226,67 ± 14,00**	**-3,84 ± 1,18**	**6**	**n.s.**
10	**225,83 ± 14,05**	**-4,18 ± 1,36**	**6**	**n.s.**
30	**221,67 ± 13,94**	**-5,93 ± 1,95**	**6**	**n.s.**
100	**222,17 ± 13,75**	**-5,58 ± 3,00**	**6**	**n.s.**

Legende zu Tabelle 4:

Die Tabelle enthält die arithmetischen Mittelwerte (f) der Schlagfrequenz des Sinusknoten mit deren Standardfehlern (SEM) aufgerechnet auf 1 Minute. Die arithmetischen Mittelwerte der 6 Versuche (n), und die Standardfehler werden in Schläge pro Minute und in % angegeben, bezogen auf den Kontrollwert von 235,83 ± 14,80 Schläge. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) gibt Aufschluss über die Signifikanz der Ergebnisse.

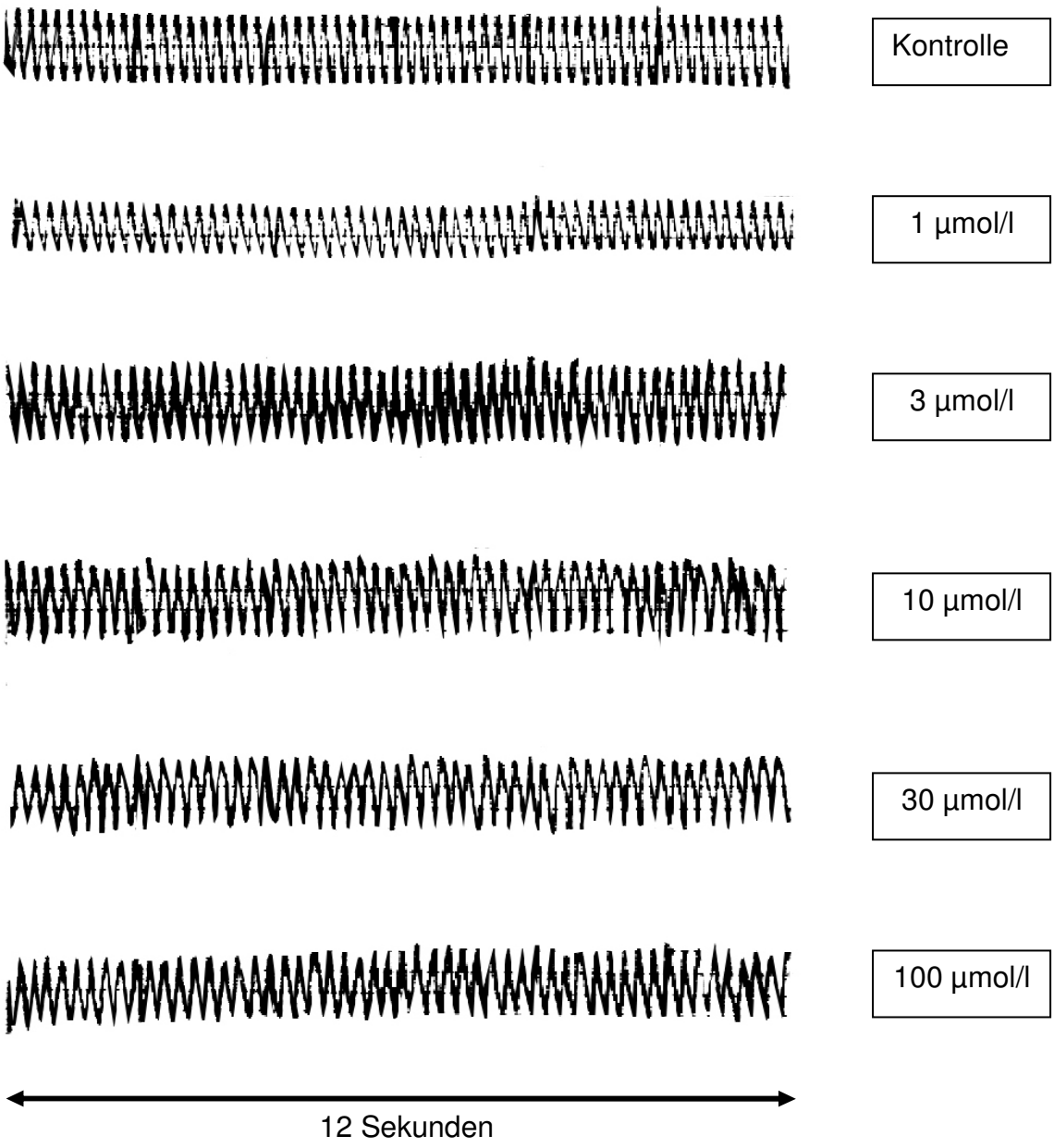
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 65T am Atrium cordis dextrum



Legende zu Abbildung 22:

Die Kurve zeigt den Einfluss der verschieden injizierten Substanzkonzentrationen auf die Schlagfrequenz am Atrium cordis dextrum an. In der senkrechten Ordinate wird die Änderung der Chronotropie in % angegeben. In der waagrechten Abszisse werden logarithmisch die kumulativ eingespritzten Konzentrationen an WHG 65T in µmol/l angezeigt. Die großen schwarzen Punkte in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve stehen für die einzelnen Mittelwerte. Die von diesen Punkten ausgehenden Balken stellen die jeweiligen Standardfehler dar. Man erkennt anhand der Kurve gut, dass WHG 65T kaum Einfluss auf die Schlagfrequenz hat.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung von WHG 65T am Atrium cordis dextrum



Legende zu Abbildung 23:

Aus dieser Abbildung sind die mittels Schreiber aufgenommen Schläge des rechten Vorhofs ersichtlich. Um die Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten, wurde für eine Dauer von 12 Sekunden aufgezeichnet und dann mit dem Faktor 5 multipliziert. Alle 45 Minuten wurde kumulativ auf eine Konzentration von 1-, 3-, 10-, 30, 100 µmol/l an WHG 65T pipettiert. Alle 5 Minuten wurden die eventuellen Auswirkungen auf die Chronotropie für 12 Sekunden aufgenommen. In der obigen Abbildung sind die jeweils letzten Aufzeichnungen, 45 Minuten nach der entsprechenden Substanzzugabe, dargestellt.

4.1.2. Wirkung WHG 65T auf den Musculus papillaris

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 65T, auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris, wurde in 5 analog durchgeführten Versuchsreihen analysiert. Dazu wurde das Experiment entsprechend Kapitel 3.6.3. absolviert.

Tabelle 5: Messergebnisse von WHG 65T am Musculus papillaris

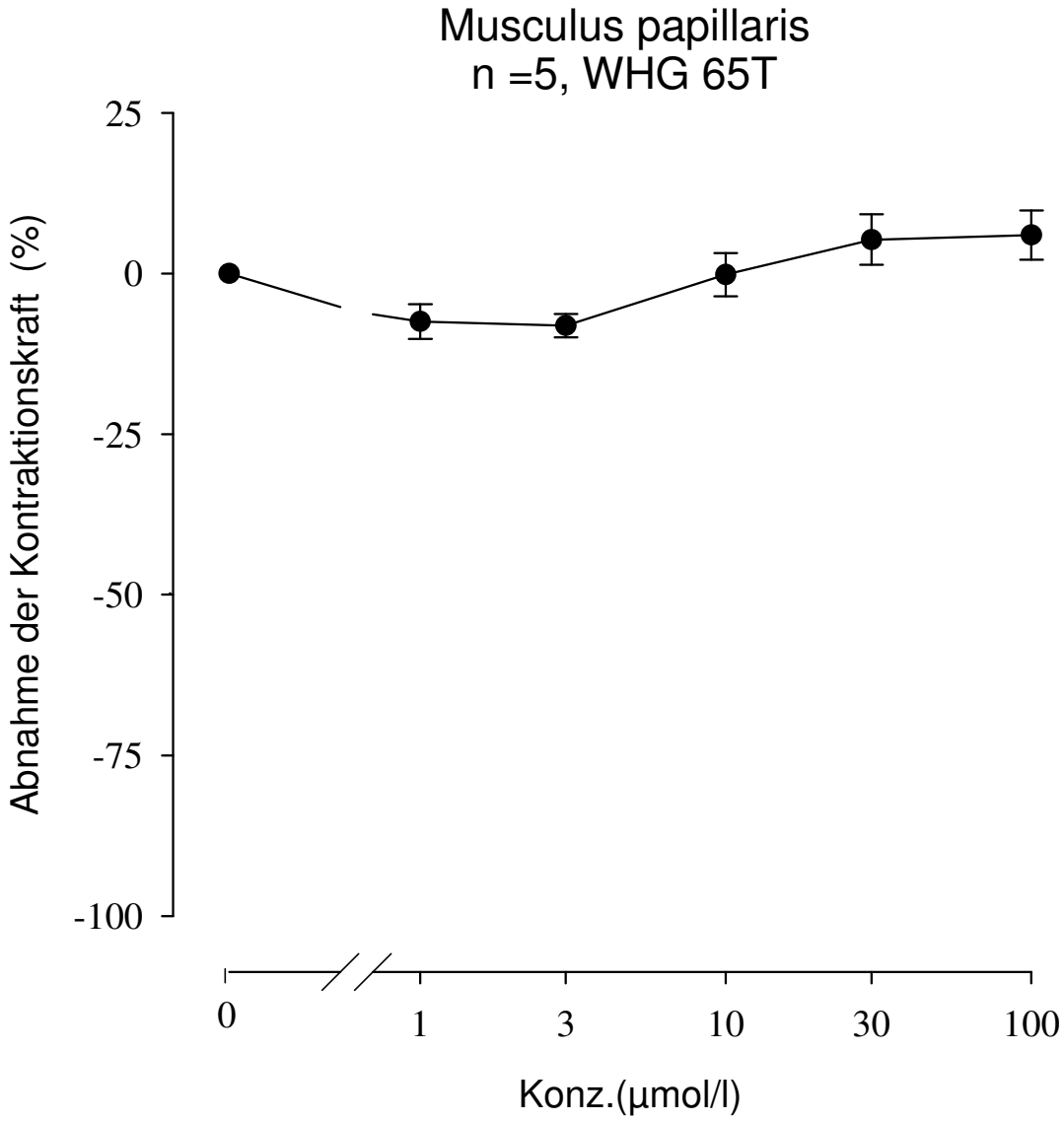
WHG 65T (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**1,70 ± 0,37**	**0,00 ± 0,00**	**5**	**-**
1	**1,57 ± 0,35**	**-7,49 ± 2,71**	**5**	**n.s.**
3	**1,55 ± 0,33**	**-8,12 ± 1,82**	**5**	**n.s.**
10	**1,74 ± 0,44**	**2,35 ± 3,37**	**5**	**n.s.**
30	**1,82 ± 0,43**	**5,27 ± 3,94**	**5**	**n.s.**
100	**1,81 ± 0,42**	**5,99 ± 3,83**	**5**	**n.s.**

Legende zu Tabelle 5:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) nach der Kontrollphase und nach der jeweiligen Substanzzugabe, im Abstand von 45 Minuten, an. Der Kontrollwert mit 1,70 ± 0,37 ist der 100 % Wert. In Abhängigkeit zu ihm werden die Mittelwerte und deren Standardfehler in % und in mN berechnet. Die Organtests wurden sowohl bei 5mV als auch bei 2mV durchgeführt. Dies musste bei der Umrechung der Amplituden von cm in mN berücksichtigt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) gibt Aufschluss über die Signifikanz der 5 Versuche.

Man sieht, dass die Inotropie, in Abhängigkeit zum Kontrollwert unter dem Einfluss von WHG 65T, stets minimal nach oben oder nach unten schwankt, aber keinen nennenswerten Effekt auf die Kontraktionskraft zeigt.

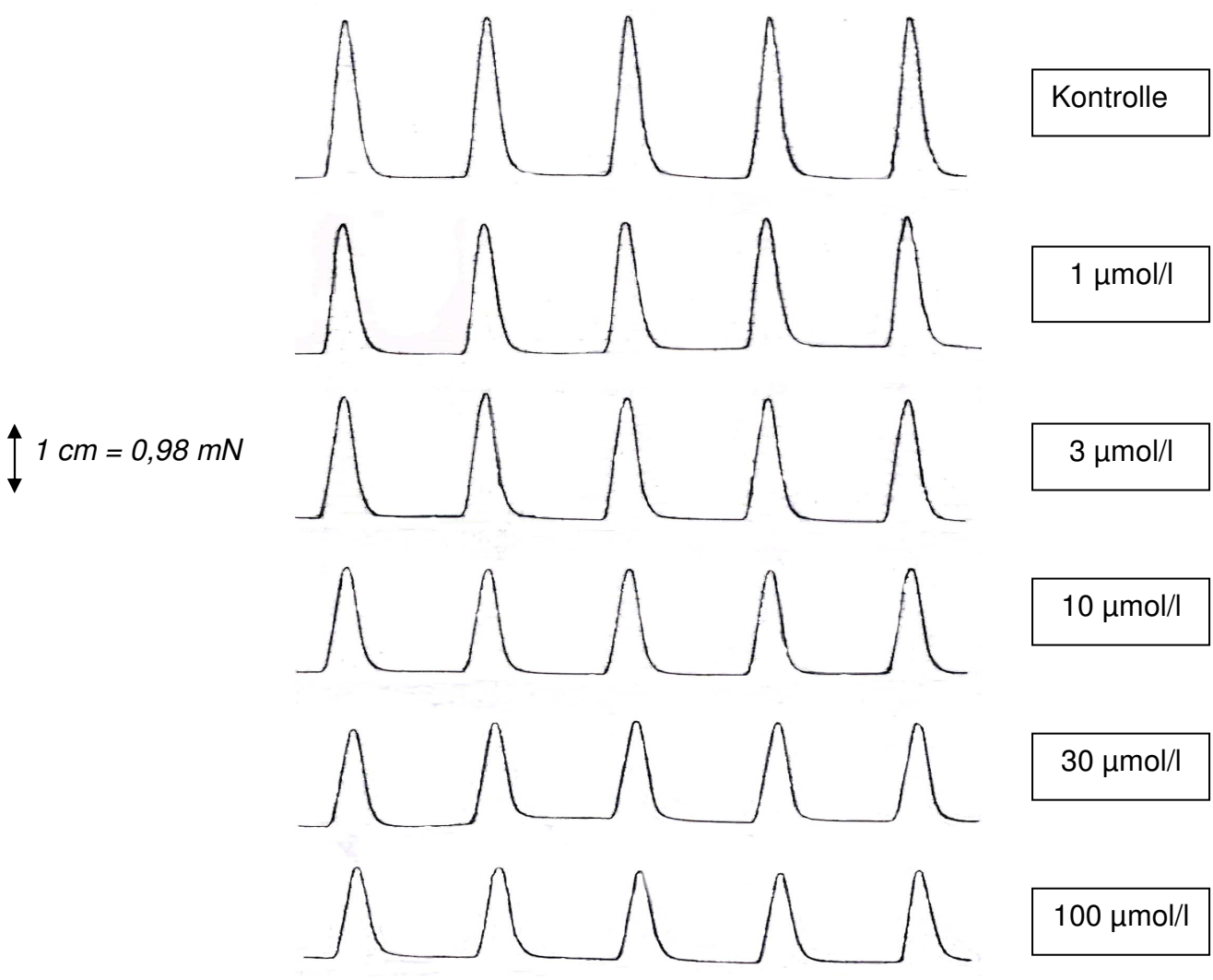
Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 65T am Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 24:

Diese Konzentrations-Wirkungs-Kurve veranschaulicht graphisch die, bei steigender Substanzinjektion, eintretenden Einflüsse auf die Inotropie des Papillarmuskels. Auf der Abszisse werden die jeweiligen Konzentrationen an WHG 65T in µmol/l angegeben. Auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft des quergestreiften Papillarmuskels angezeigt. Die einzelnen Punkte stellen die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen aus den 5 Versuchen dar. Die senkrechten Balken repräsentieren die Standardfehler.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung von WHG 65 T am Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 25:

Diese mittels hoch empfindlichen Schreibers aufgezeichneten Amplituden stellen die Kontraktionskraft des Musculus papillaris dar. Je höher bzw. je größer die Amplitude ist, desto stärker ist die Inotropie. Die Abbildung zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft an, die in Anwesenheit der jeweiligen Testsubstanzkonzentration eintrat. Die Aufnahmen erfolgten alle 5 Minuten, wobei hier nur die Amplituden nach Erreichen des „steady states“ angezeigt sind.

4.1.3. Wirkung WHG 65T auf die Aorta

Die Versuche liefen gemäß Kapitel 3.6.4. ab. Analysiert wurde der Einfluss auf die Kontraktilität der Hauptschlagader durch die Testsubstanz WHG 65T. Die Versuche wurden an 5 verschiedenen Aortenringen durchgeführt.

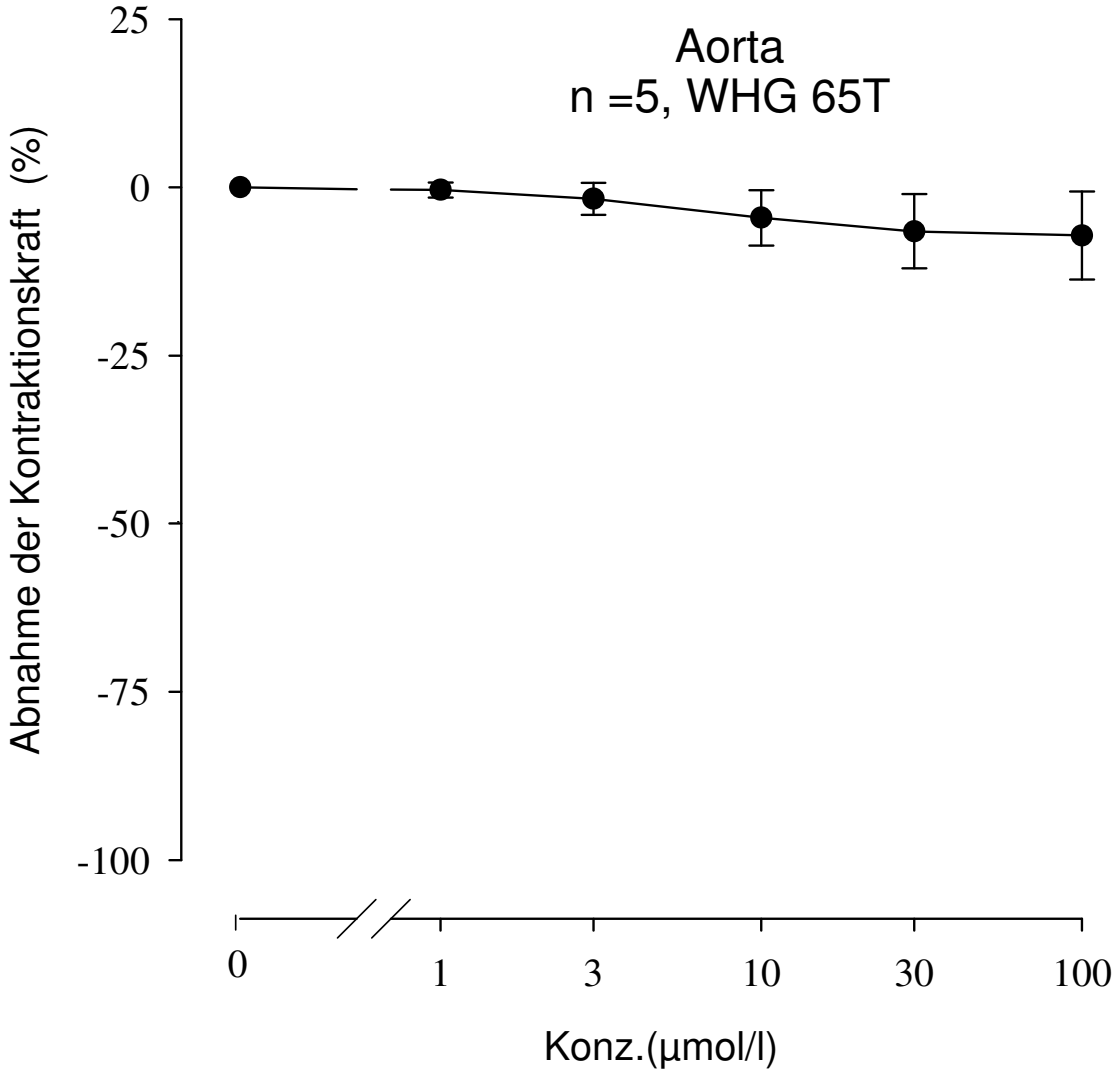
Tabelle 6: Messergebnisse von WHG 65T an der Aorta

WHG 65T (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	**7,48 ± 1,87**	**0,00 ± 0,00**	**5**	**-**
1	**7,48 ± 1,88**	**-0,40 ± 1,12**	**5**	**n.s.**
3	**7,44 ± 1,96**	**-1,70 ± 2,39**	**5**	**n.s.**
10	**7,36 ± 2,08**	**-4,53 ± 4,12**	**5**	**n.s.**
30	**7,27 ± 2,16**	**-6,55 ± 5,53**	**5**	**n.s.**
100	**7,24 ± 2,17**	**-7,17 ± 6,56**	**5**	**n.s.**

Legende zu Tabelle 6:

Die Tabelle verschafft wieder einen Überblick über die jeweiligen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) in mN und in % des Kontrollwertes. Weiters sind die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) und die Anzahl der Versuche (n) angegeben.

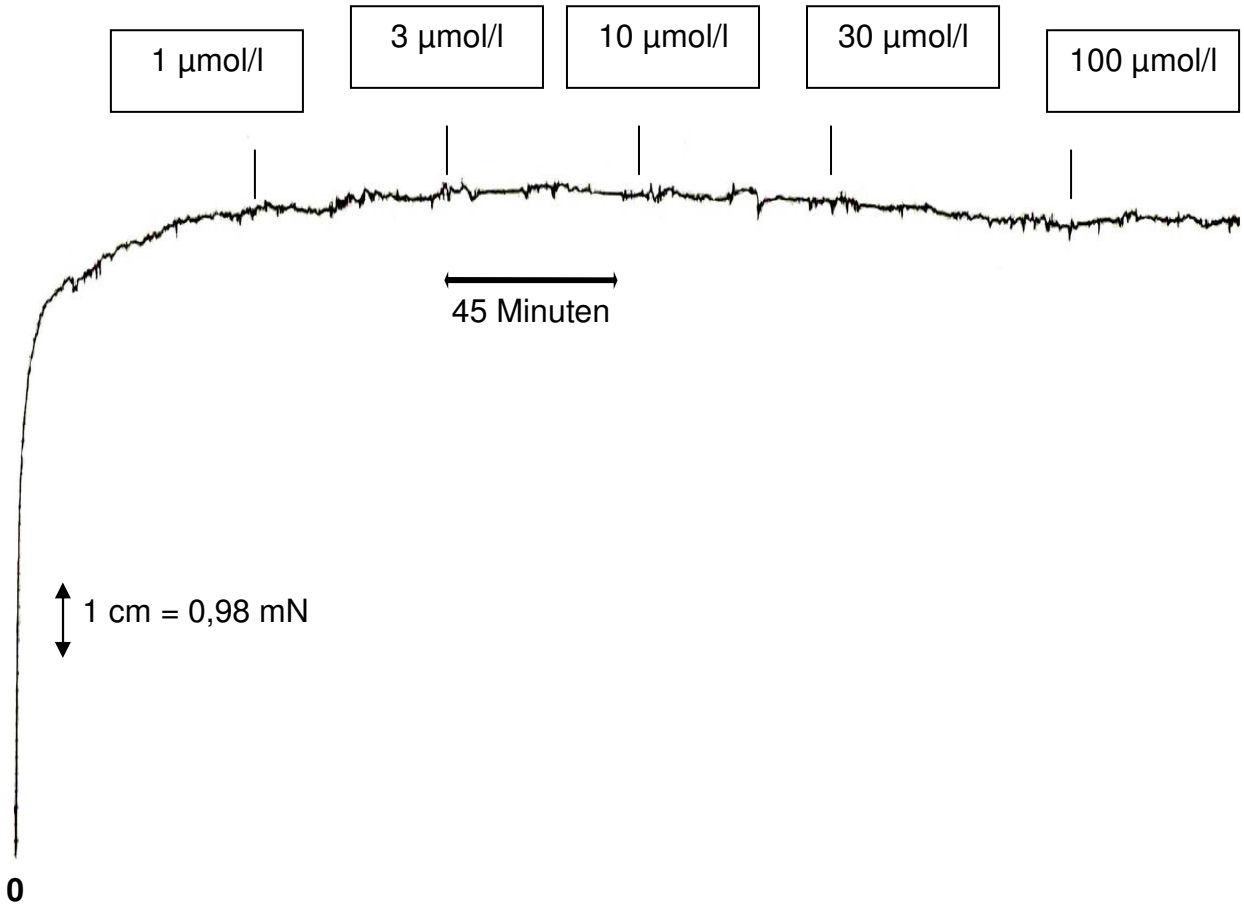
Abbildung 26: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 65T an der Aorta



Legende zu Abbildung 26:

Die durch das Programm „Sigma Plot“ entworfene Dosis-Wirkungskurve stellt den Einfluss der Testsubstanz in den unterschiedlichen Konzentrationen an der Aorta dar. Die x-Achse zeigt die kumulative Dosis von WHG 65T an. Die y-Achse veranschaulicht die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft an der Hauptschlagader. Die schwarzen Punkte stellen die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen aus den 5 Versuchen dar. Die Länge der Balken spiegelt die Größe des Standardfehlers wieder.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung von WHG 65 T an der Aorta



Legende zu Abbildung 27:

Auch dieser Graph wurde mittels Schreiber gezeichnet. Im Unterschied zum Atrium cordis dextrum und zum Musculus papillaris, erfolgte hier eine kontinuierliche Registrierung des Kurvenverlaufs. Im Abstand von 45 Minuten wurde das Organbad wieder auf die oben angegebenen Konzentrationen an Testsubstanz ergänzt. Die Abbildung lässt sehr gut erkennen, dass es durch die Testsubstanz WHG 65T zu fast keinerlei Veränderungen in der Kontraktilität an der Hauptschlagader kam.

4.1.4. Wirkung WHG 65T auf die Arteria pulmonalis

Die Versuchsreihen an der Arteria pulmonalis erfolgten gemäß Kapitel 3.6.5. Um Aufschlüsse über einen möglichen dilatierenden Effekt der Testsubstanz WHG 65T zu erhalten, wurden die Versuche an 5 verschiedenen Pulmonalarterienringen bewerkstelligt.

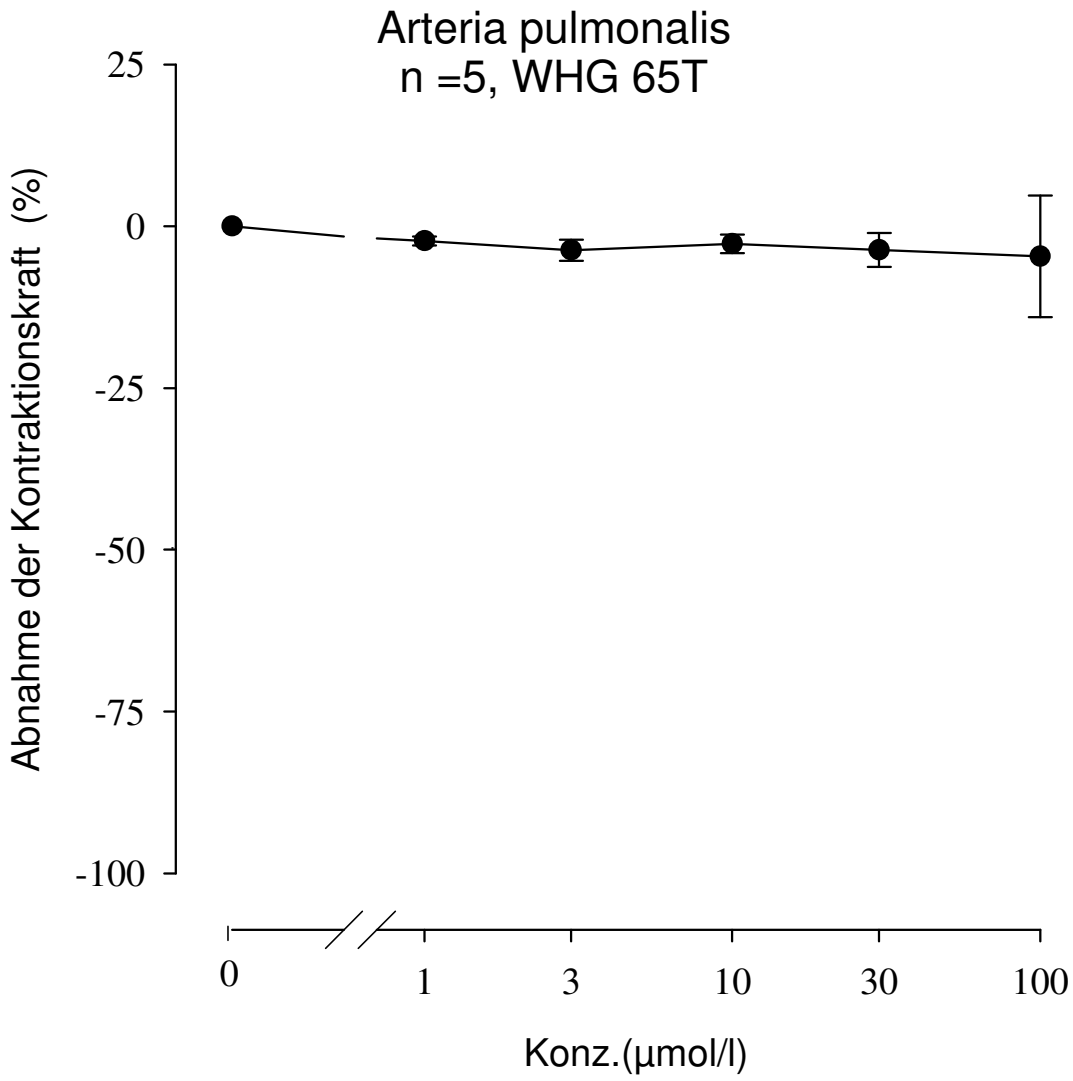
Tabelle 7: Messergebnisse WHG 65T an der Arteria pulmonalis

WHG 65T (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**12,45 ± 1,22**	**0,00 ± 0,00**	**5**	**n.s.**
1	**12,14 ± 1,14**	**-2,27 ± 0,69**	**5**	**n.s.**
3	**11,95 ± 1,10**	**-3,70 ± 1,62**	**5**	**n.s.**
10	**12,07 ± 1,11**	**-2,72 ± 1,45**	**5**	**n.s.**
30	**11,92 ± 1,03**	**-3,67 ± 2,61**	**5**	**n.s.**
100	**11,62 ± 1,17**	**-4,66 ± 2,89**	**5**	**n.s.**

Legende zu Tabelle 7:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte (f_c) inklusive der Standardfehler (SEM) der 5 Versuche, bei den jeweiligen Testsubstanzkonzentrationen an. Der Kontrollwert, als 100 % Wert, beträgt 12,45 ± 1,22 mN. Mittelwerte und Standardfehler werden in mN und in % angegeben. Ebenso sind die Versuchsanzahl und die Signifikanz der Ergebnisse aus der Tabelle ersichtlich.

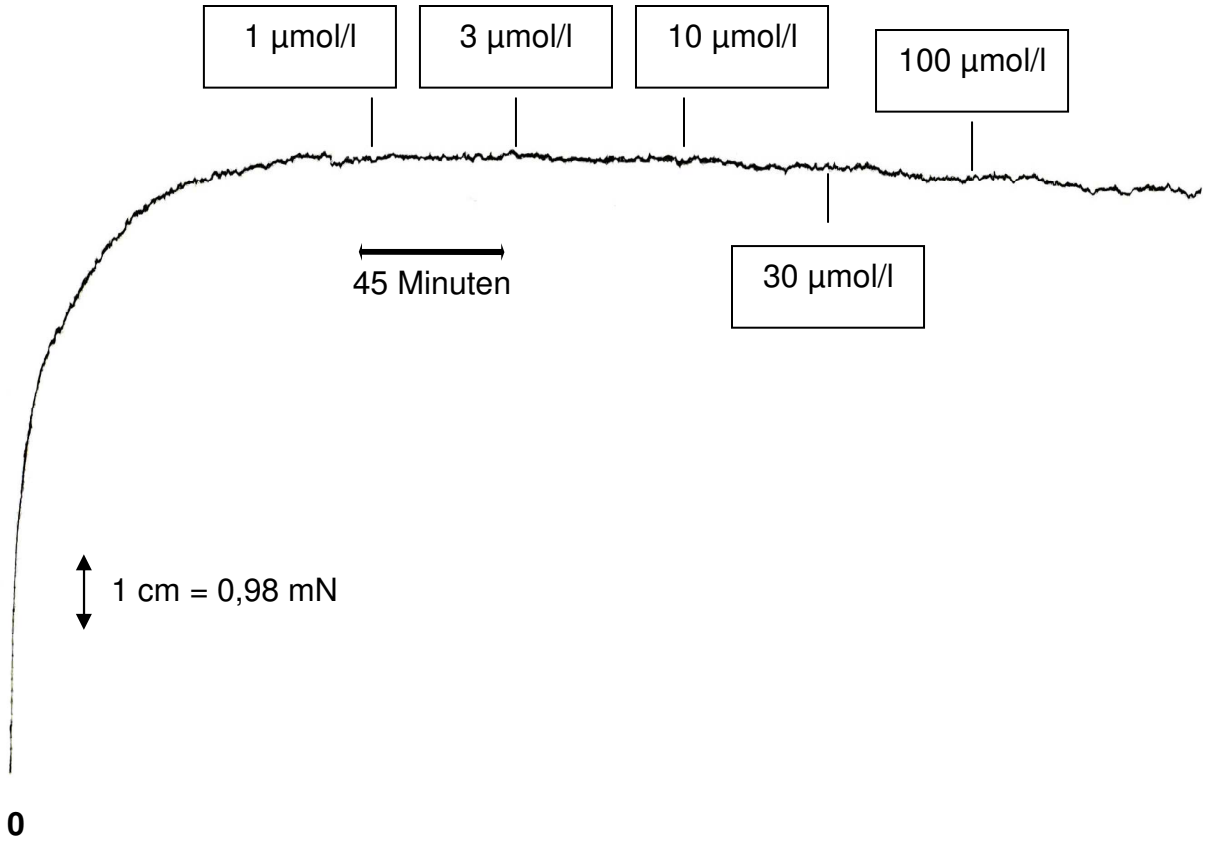
Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 65T an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 28:

Die ermittelte Konzentrations-Wirkungskurve wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Sigma Plot“ erstellt. Bisher konnte noch keine EC_{50} ermittelt werden. Das wäre jene Konzentration in µmol/l, bei der die Kontraktionskraft auf die Hälfte des Kontrollwertes absinkt. Die Abszisse gibt logarithmisch die jeweilige Konzentration an WHG 65T an. Die Ordinate veranschaulicht die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die Mittelwerte dar und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 29: Originalaufzeichnung von WHG 65 T an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 29:

Der Graph zeigt eine kaum wahrnehmbare Abnahme der Kontraktionskraft, durch die 5 Substanzinjektionen, an der Arteria pulmonalis an. Nach Erreichen einer konstanten maximalen Kontraktion, wurden im Abstand von 45 Minuten 1, 2, 7, 20 und 70 µmol/l an Testsubstanz WHG 65T injiziert. Der Graph wurde wieder mit dem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet.

4.1.5. Wirkung WHG 65T auf das terminale Ileum

Die Versuche am isolierten terminalen Ileum erfolgten nach dem in Kapitel 3.6.6. beschriebenen Schema. Zur Ermittlung des spasmolytischen Effekts am Darm, wurden 5 voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

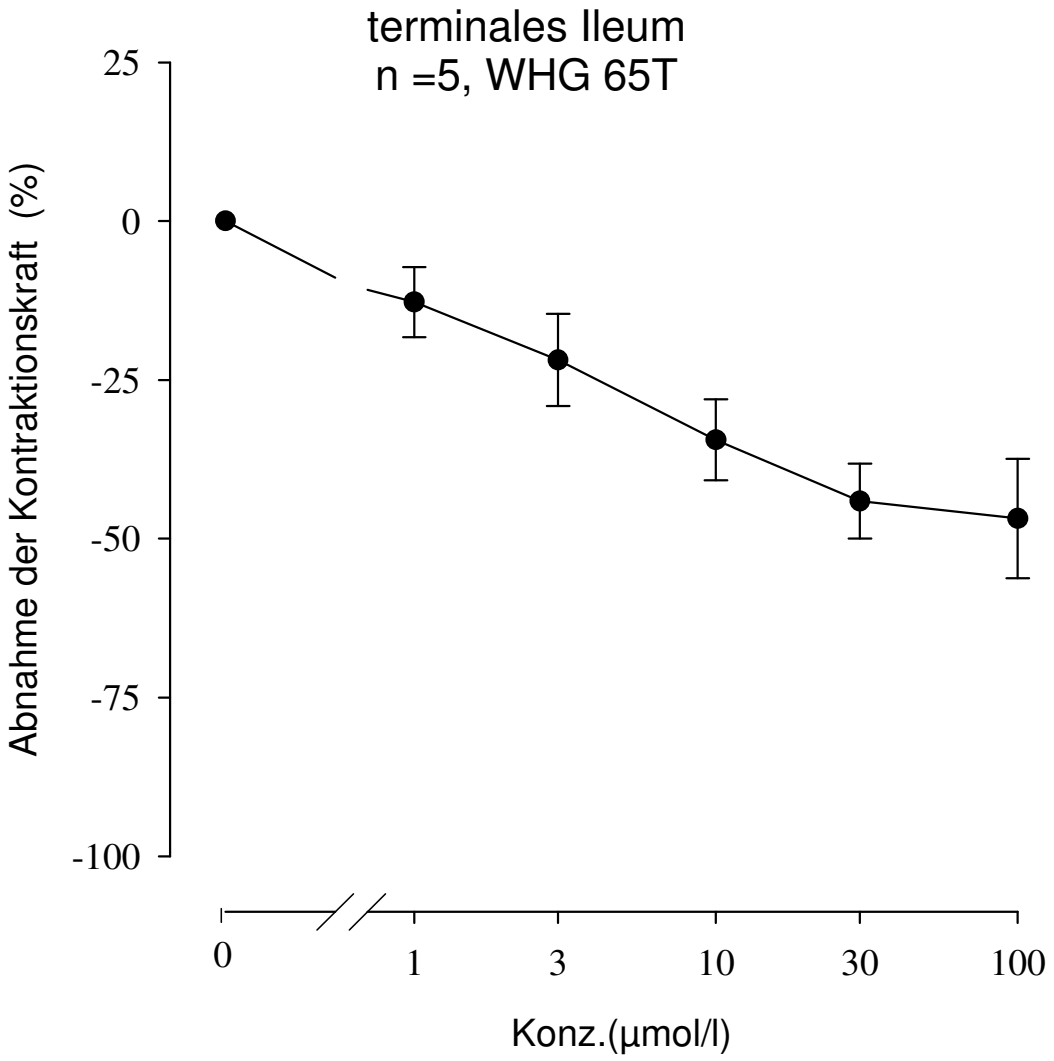
Tabelle 8: Messergebnisse von WHG 65T am terminalen Ileum

WHG 65T (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**8,38 ± 0,73**	**0,00 ± 0,00**	**5**	**-**
1	**7,17 ± 0,33**	**-12,75 ± 5,51**	**5**	**n.s.**
3	**6,39 ± 0,42**	**-21,86 ± 7,25**	**5**	**0,05**
10	**5,32 ± 0,19**	**-34,42 ± 6,37**	**5**	**0,01**
30	**4,52 ± 0,12**	**-44,05 ± 5,89**	**5**	**0,001**
100	**4,30 ± 0,35**	**-46,81 ± 7,48**	**5**	**0,001**

Legende zu Tabelle 8:

Die Tabelle zeigt wieder die arithmetischen Mittelwerte (f_c) in mN und in %. Ebenso werden deren Standardfehler (SEM) in mN und in % angegeben. Die Prozentwerte beziehen sich auf den Kontrollwert von 8,38 ± 0,73 mN. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) gibt Aufschluss über die Signifikanz der 5 Versuche (n).

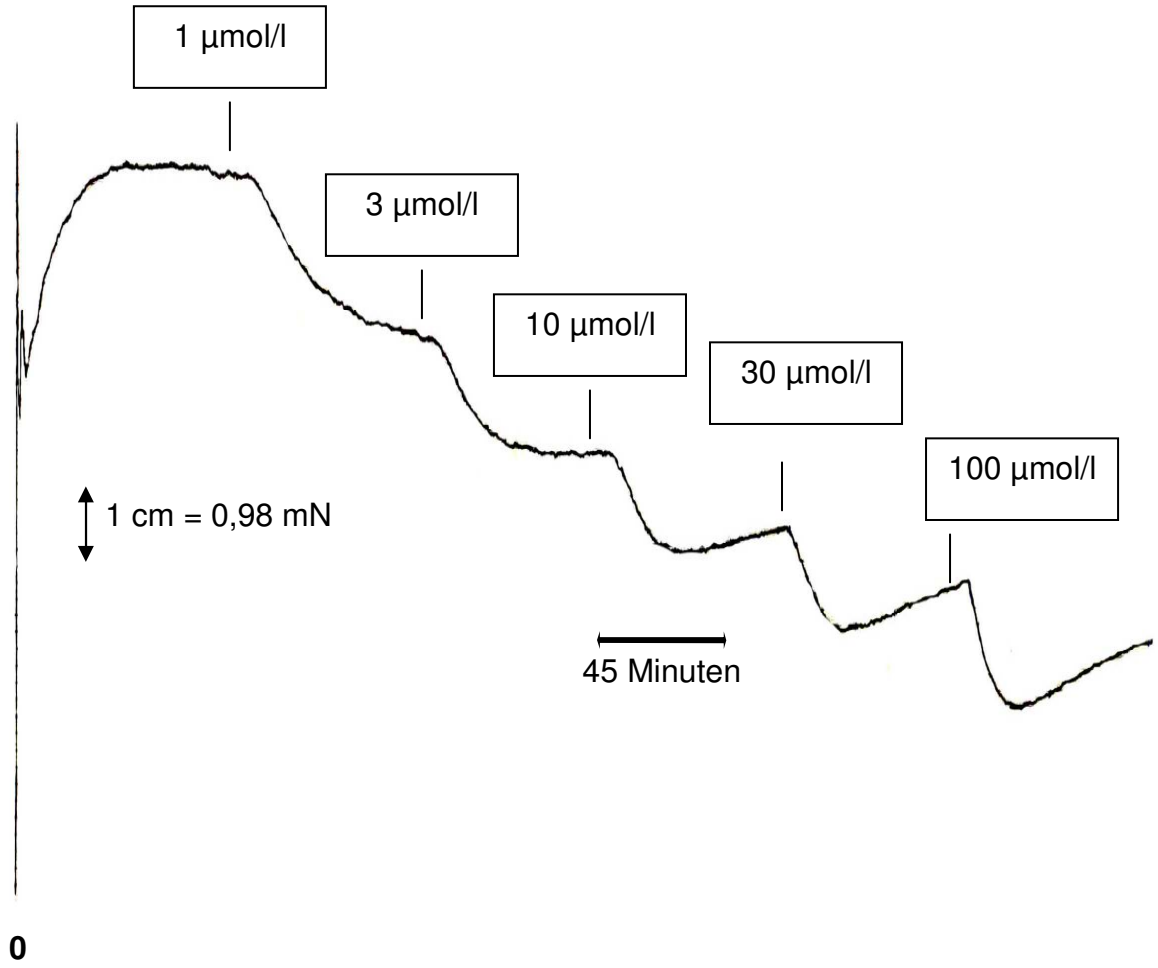
Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 65T am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 30:

Die ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft (y-Achse), im Verhältnis zur kumulativ zugeführten Substanzkonzentration in µmol/l (y-Achse). Anfänglich kommt es zu einer relativ starken Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum, die gegen Ende jedoch etwas abflacht. Eine EC50 wird nicht erreicht. Die schwarzen Punkte im Abstand von 45 Minuten stellen wieder die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen dar. Die daraus ausgehenden Balken verkörpern die Standardfehler.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung von WHG 65T am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 31:

Diese Originalaufzeichnung zeigt anfangs die maximale konstante Kontraktion (Plateau) des terminalen Ileums an. Durch die entsprechend injizierten Mengen der Testsubstanz WHG 65T (siehe Pipettierschema) im Abstand von 45 Minuten, wird der Einfluss der jeweiligen Konzentration hier sehr gut aufgezeigt. Die Darstellung erfolgt auch an dieser Stelle kontinuierlich, bei einer Stromstärke von 5 mV, mit Hilfe eines hoch sensiblen Schreibers.

4.2. Resultate der Testsubstanz WHG 63MT

Bei der 2ten Testsubstanz WHG 63MT ging man nach dem gleichen Muster vor, wie bei der Testsubstanz WHG 65T.

4.2.1. Wirkung WHG 63 MT auf das Atrium cordis dextrum

Um einen eventuellen Einfluss von WHG 63MT auf die Chronotropie des Sinusknotens am rechten Vorhof ausfindig zu machen, wurden 4 Versuchsreihen durchgeführt. Die Tests an den isolierten Organen des Atrium cordis dextrum wurden wieder nach Kapitel 3.6.2. bewerkstelligt.

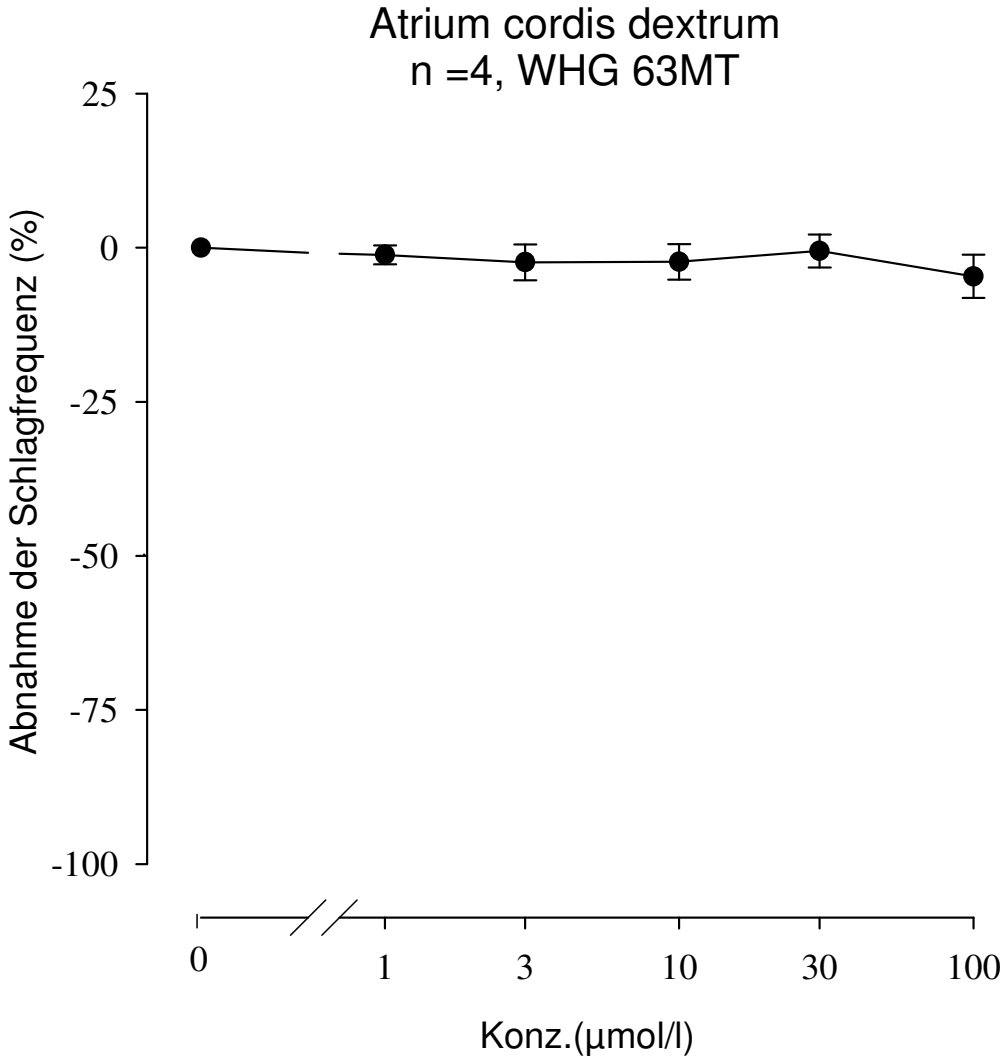
Tabelle 9: Messergebnisse WHG 63MT am Atrium cordis dextrum

WHG 63MT (µmol/l)	f± SEM Schläge/min	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**211,25 ± 3,15**	**0,00 ± 0,00**	**4**	**-**
1	**208,75 ± 3,75**	**-1,16 ± 1,53**	**4**	**n.s.**
3	**206,25 ± 6,88**	**-2,37 ± 2,92**	**4**	**n.s.**
10	**206,25 ± 5,15**	**-2,30 ± 2,87**	**4**	**n.s.**
30	**210,00 ± 5,00**	**-0,54 ± 2,65**	**4**	**n.s.**
100	**201,25 ± 6,25**	**-4,65 ± 3,51**	**4**	**n.s.**

Legende zu Tabelle 9:

Die Tabelle zeigt im Überblick die arithmetisch errechneten Mittelwerte der Schlagfrequenz pro Minute in der Kontrollphase und in der jeweils eingespritzten Konzentration an Testsubstanz an. Sowohl die Mittelwerte (f) als auch deren Standardfehler (SEM) werden in Schläge pro Minute und in Prozent angegeben. Der Prozentwert ist in Abhängigkeit zum Kontrollwert von 211,25 ± 3,15 zu sehen. Ebenso sind die Anzahl der Versuch (n) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) charakterisiert.

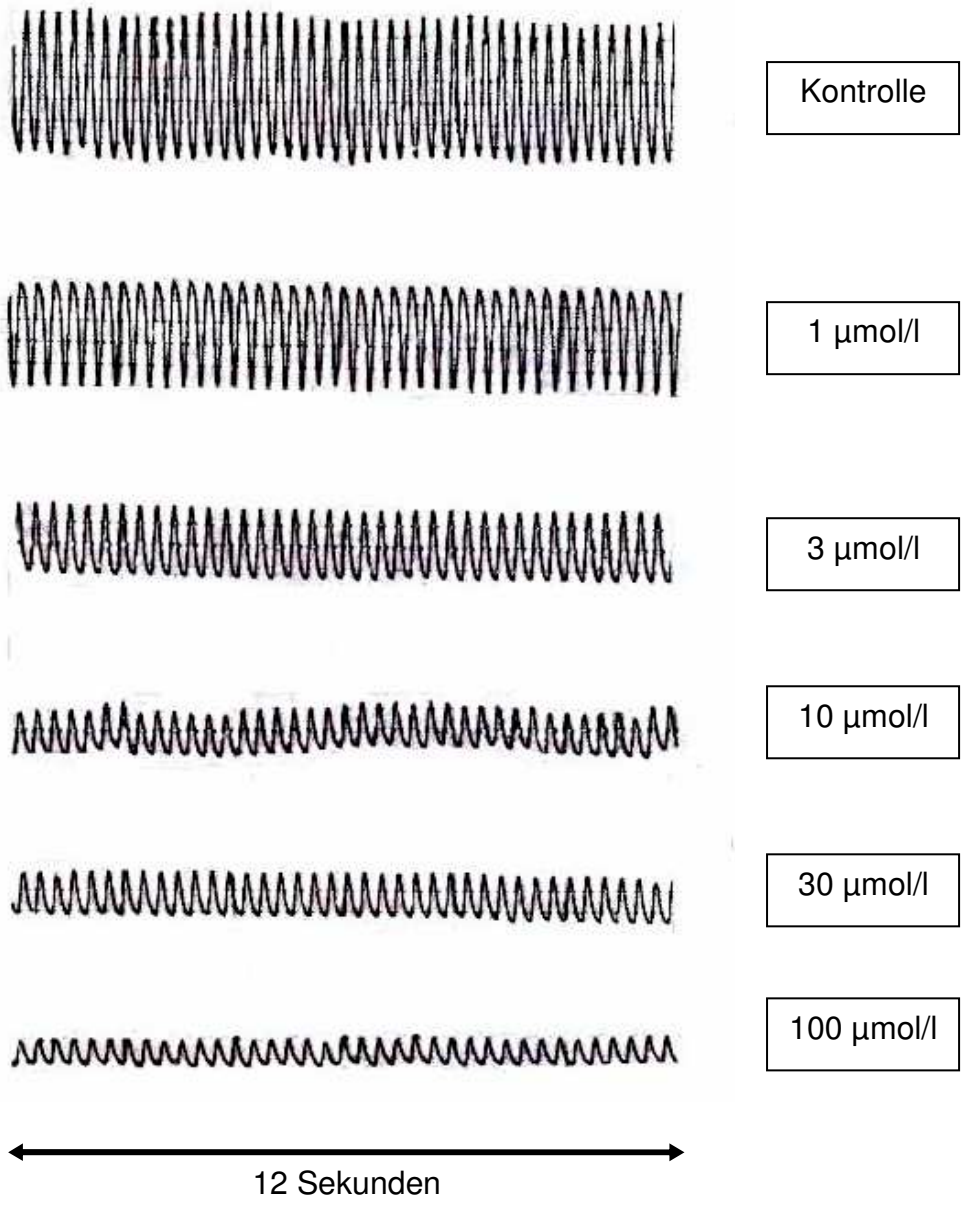
Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 63MT am Atrium cordis dextrum



Legende zu Abbildung 32:

Die graphische Darstellung der Mittelwerte (schwarze Punkte) erfolgte anhand einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve. An der Ordinate ist eine eventuelle Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent ersichtlich. Die Abszisse zeigt die steigende Konzentration an WHG 63MT in µmol/l an. Wie man sieht, hat die Testsubstanz keinen wirklichen Einfluss auf die Chronotropie des rechten Vorhofs. Die senkrechten Balken, ausgehend von den „Mittelwertpunkten“, stellen die jeweiligen Standardfehler dar.

Abbildung 33: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am Atrium cordis dextrum



Legende zu Abbildung 33:

Die 6 Originalaufzeichnungen erfolgten, mit Ausnahme der Kontrollaufzeichnung, für jeweils 12 Sekunden immer 45 Minuten nach der letzten Substanzinjektion („steady state Bedingung“). Prinzipiell wurden in den 45 Minuten aber alle 5 Minuten Aufzeichnungen über 12 Sekunden geführt. Um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten, multiplizierte man einfach mit dem Faktor 5.

4.2.2. Wirkung WHG 63MT auf den Musculus papillaris

Anhand von 7 Papillarmuskeln wurden die möglicherweise auftretenden Effekte auf die Inotropie, durch die Testsubstanz WHG 63MT, ermittelt. Die Organtests am isolierten und präparierten Musculus papillaris wurden wieder wie in Kapitel 3.6.3. durchgeführt.

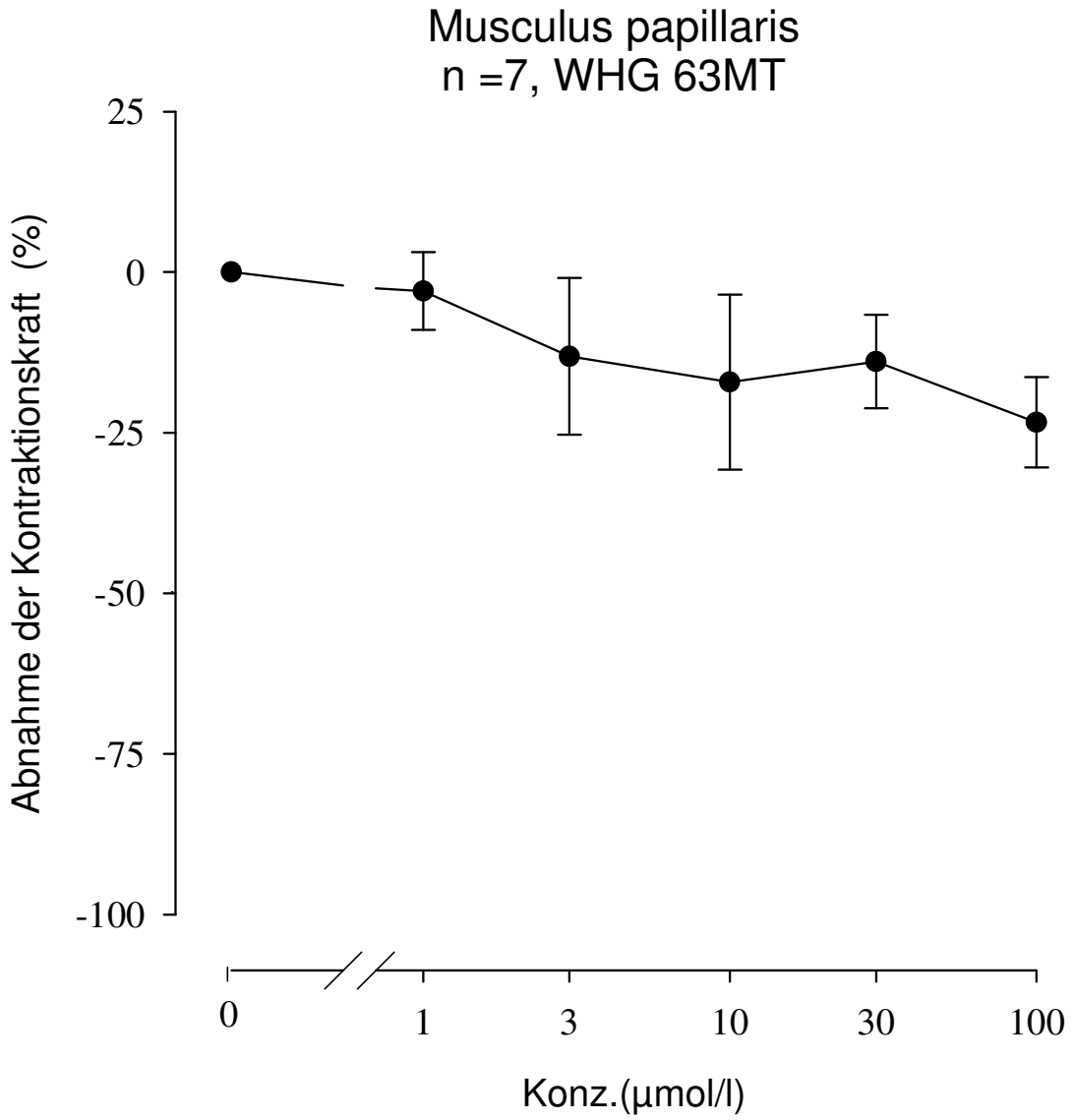
Tabelle 10: Messergebnisse von WHG 63MT am Musculus papillaris

WHG 63MT (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**1,27 ± 0,25**	**0,00 ± 0,00**	**7**	**-**
1	**1,23 ± 0,28**	**-2,95 ± 6,06**	**7**	**n.s.**
3	**1,10 ± 0,35**	**-13,11 ± 12,21**	**7**	**0,05**
10	**1,05 ± 0,39**	**-17,12 ± 13,64**	**7**	**0,05**
30	**1,09 ± 0,28**	**-13,94 ± 7,72**	**7**	**0,05**
100	**1,00 ± 0,21**	**-23,4 ± 7,02**	**7**	**0,05**

Legende zu Tabelle 10:

Die Tabelle zeigt übersichtlich die arithmetischen Mittelwerte (f_c) mit deren Standardfehler (SEM) in mN und in Prozent an. Der Kontrollwert mit 1,27 ± 0,25 mN ist jener Wert, ab dem eine konstante Kontraktion des Papillarmuskels vorlag. Dieser Wert wurde als 100 % Wert genommen. Wenn die Versuche unter einer Stromstärke von 5 mV erfolgten, wurde die Höhe der Amplitude in cm mit dem Eichfaktor 0,98 in mN umgerechnet. Bei einer Stormstärke von 2 mV musste der umgerechnete Wert nochmals mit 0,4 multipliziert werden. Weiters sind die Anzahl der Versuche (n) und die, durch die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ermittelte, Signifikanz der Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

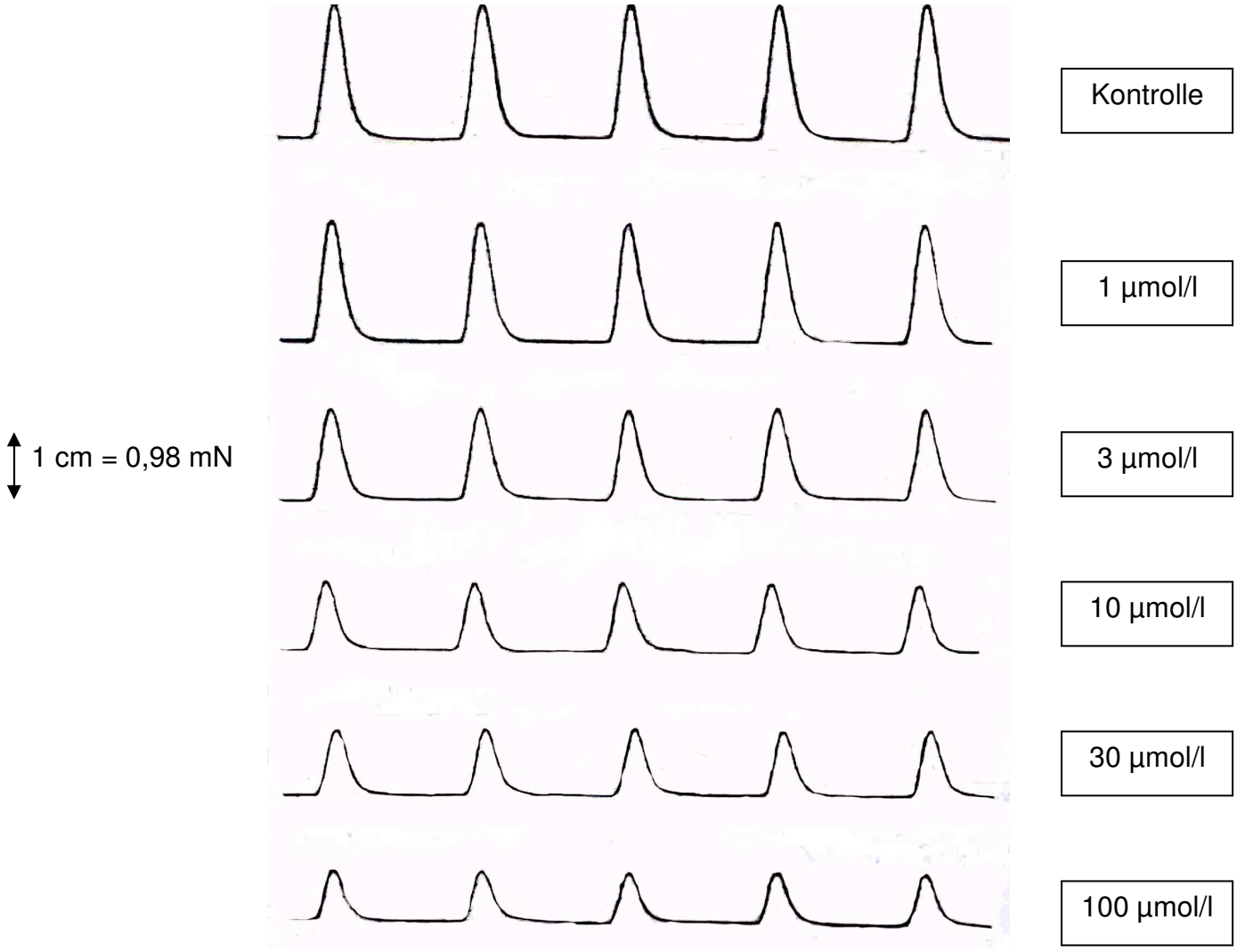
Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 63MT am Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 34:

Die mittels Sigma Plot entwickelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve stellt, in Abhängigkeit von der kumulativ zugeführten Substanzkonzentration, die Abnahme der Kontraktionskraft dar. Die einzelnen Punkte simulieren die arithmetischen Mittelwerte der 7 Versuche bei der jeweiligen Konzentration. Die durch die Punkte verlaufenden senkrechten Balken spiegeln die Standardfehler, die in diesem Fall äußerst hoch ist, wieder.

Abbildung 35: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 35:

Hier ist Abnahme der Inotropie des Papillarmuskels, durch die jeweils injizierte Konzentration an Testsubstanz WHG 63MT, sehr gut ersichtlich. Die Höhe der Amplitude steht für die Kraft der Kontraktion des quergestreiften Musculus papillaris. Im Abstand von 5 Minuten wurde mit den Knöpfen „pen down“ und „record on“ der Schreiber aktiviert und dadurch 5-6 Amplituden aufgezeichnet. Die obige Originalabbildung enthält jedoch nur die Amplituden nach Ablauf der Kontrollphase, und nach Erreichen der „steady-state-Bedingungen“ der jeweilis zugeführten Konzentrationen.

4.2.3. Wirkung WHG 63MT auf die Aorta

Um den möglichen dilatierenden Effekt von WHG 63MT auf die Aorta zu erforschen, wurden 6 Versuchsreihen an 6 verschiedenen Aortenringen absolviert. Der Versuch lief wieder gemäß Kapitel 3.6.4. ab.

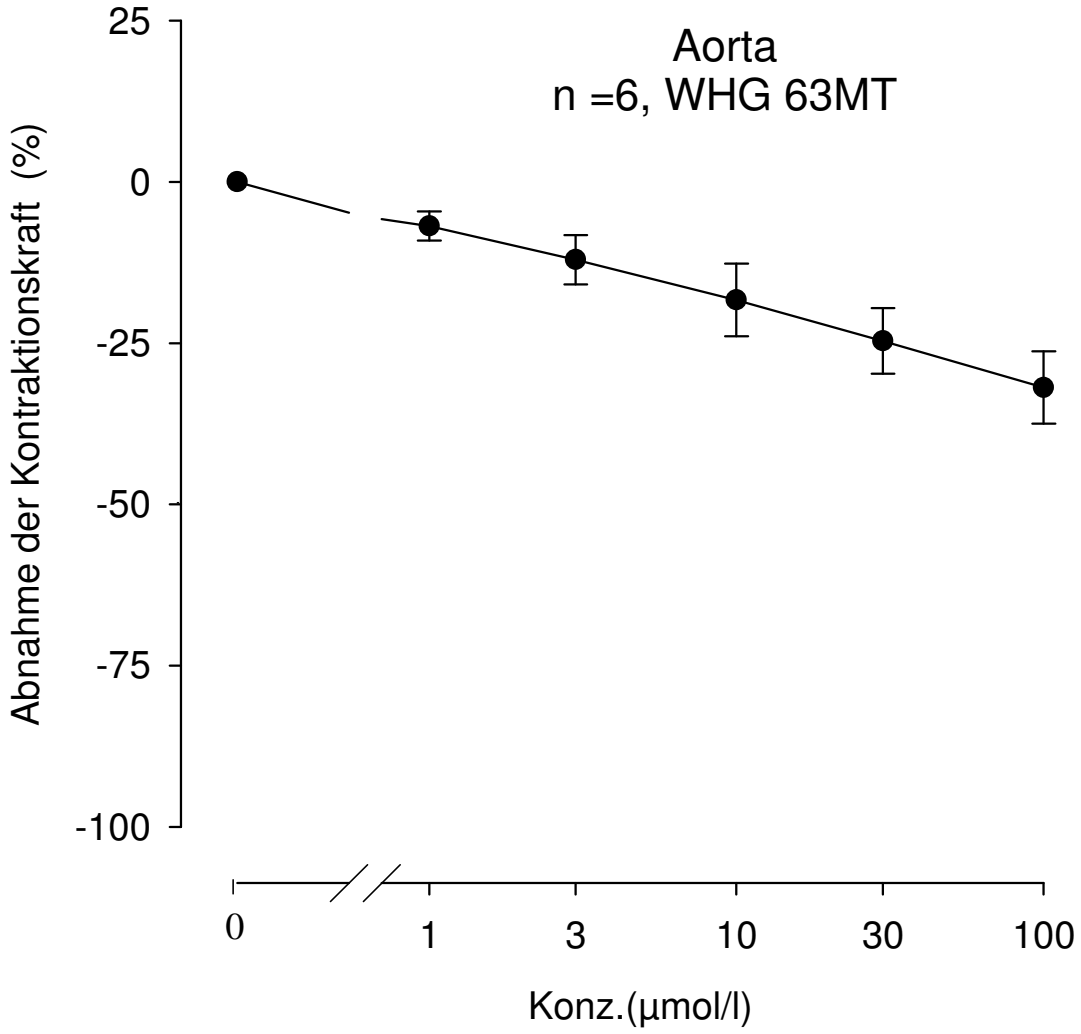
Tabelle 11: Messergebnisse WHG 63MT an der Aorta

WHG 63MT (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**9,68 ± 1,53**	**0,00 ± 0,00**	**6**	**-**
1	**9,04 ± 1,46**	**-6,84 ± 2,27**	**6**	**n.s.**
3	**8,57 ± 1,46**	**-12,08 ± 3,82**	**6**	**0,05**
10	**8,02 ± 1,49**	**-18,31 ± 5,64**	**6**	**0,05**
30	**7,46 ± 1,49**	**-24,67 ± 5,08**	**6**	**0,05**
100	**6,79 ± 1,47**	**-31,88 ± 5,62**	**6**	**0,01**

Legende zu Tabelle 11:

Von den erhaltenen Messergebnissen wurden die Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) gebildet. Da die gesamten Versuche bei 5 mV durchgeführt wurden, wurden die abgemessenen Zentimeter wieder durch den Eichfaktor 0,98 in mN umgerechnet. Ebenso sind die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angegeben. Der Kontrollwert betrug im Mittel 9,68 ± 1,53 mN.

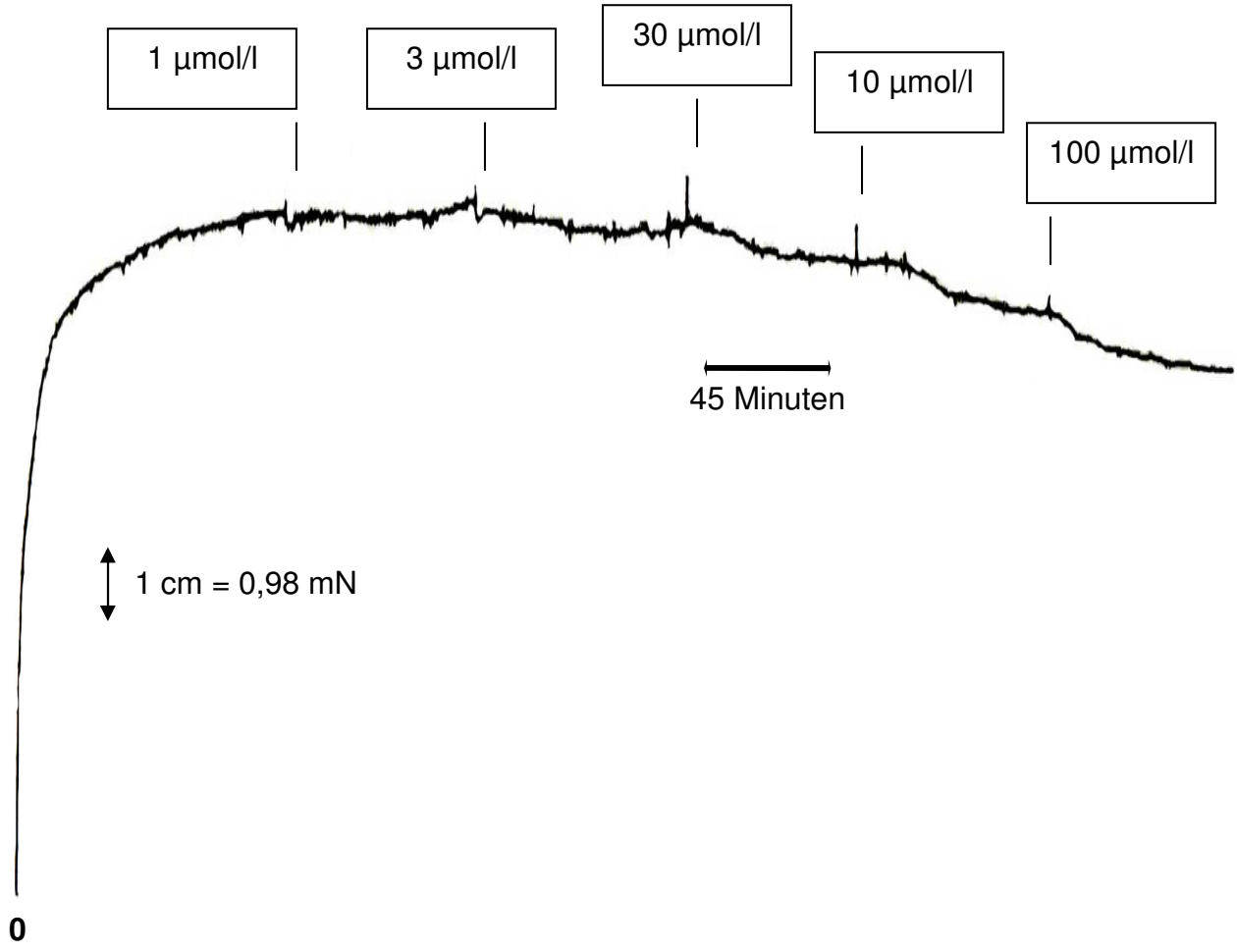
Abbildung 36: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 63MT an der Aorta



Legende zu Abbildung 36:

Der Graph zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft bei zunehmender Dosis an WHG 63MT. Die y-Achse stellt die Abnahme der Kontraktionskraft der Hauptschlagader in Prozent dar. Die x-Achse gibt logarithmisch die jeweils enthaltene Konzentration an Testsubstanz im Organbad in µmol/l an. Die Punkte mit den Balken stellen die Mittelwerte mit deren Standardfehlern aus den 6 Versuchen dar.

Abbildung 37: Originalaufzeichnung von WHG 63MT an der Aorta



Legende zu Abbildung 37:

Die Originalaufzeichnung bestätigt wieder die mäßige aber kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta unter Einfluss der Testsubstanz. Nach Erreichen des Plateaus an maximaler Kontraktion, werden die einzelnen Konzentrationen an WHG 63MT, gemäß dem Pipettierschema, eingespritzt. Der ganze Vorgang wird permanent mit dem sensiblen Schreiber aufgezeichnet.

4.2.4. Wirkung WHG 63MT auf die Arteria pulmonalis

Die 5 Versuche an der isolierten und präparierten Arteria pulmonalis verliefen erneut, wie bei dem Wirkstoff WHG 65T, nach Kapitel 3.6.5. ab. Untersucht wurde die Abnahme der Kontraktilität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der Testsubstanz WHG 63MT.

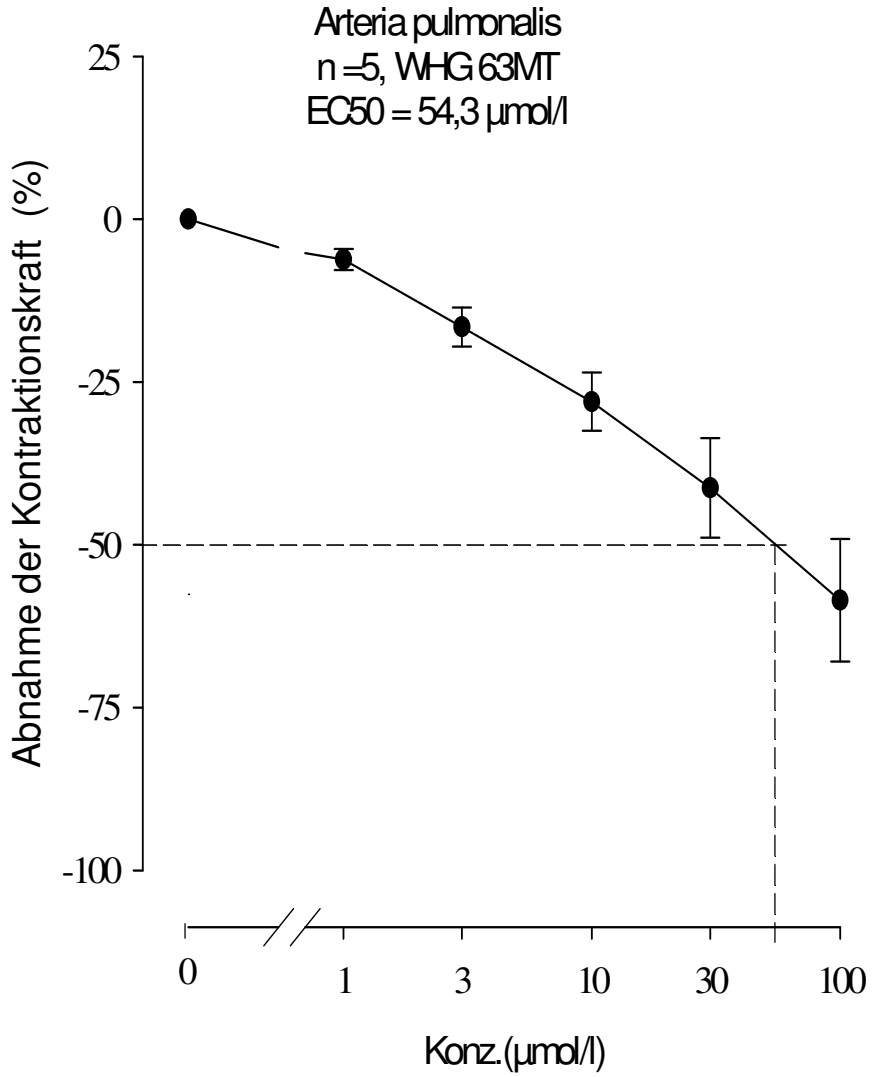
Tabelle 12: Messergebnisse WHG 63MT an der Arteria pulmonalis

WHG 63MT (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**6,44 ± 1,47**	**0,00 ± 0,00**	**5**	**-**
1	**6,11 ± 1,46**	**-6,19 ± 1,62**	**5**	**n.s.**
3	**5,50 ± 1,36**	**-16,54 ± 3,01**	**5**	**0,05**
10	**4,81 ± 1,29**	**-28,03 ± 4,46**	**5**	**0,05**
30	**4,03 ± 1,34**	**-41,28 ± 7,66**	**5**	**0,01**
100	**2,89 ± 1,24**	**-58,51 ± 9,41**	**5**	**0,01**

Legende zu Tabelle 12:

Die tabellarische Darstellung beinhaltet die Anzahl der Versuche (n), die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), die aus den Versuchen errechneten Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) in mN und in %, bezogen auf den Kontrollwert von 6,44 ± 1,47 mN.

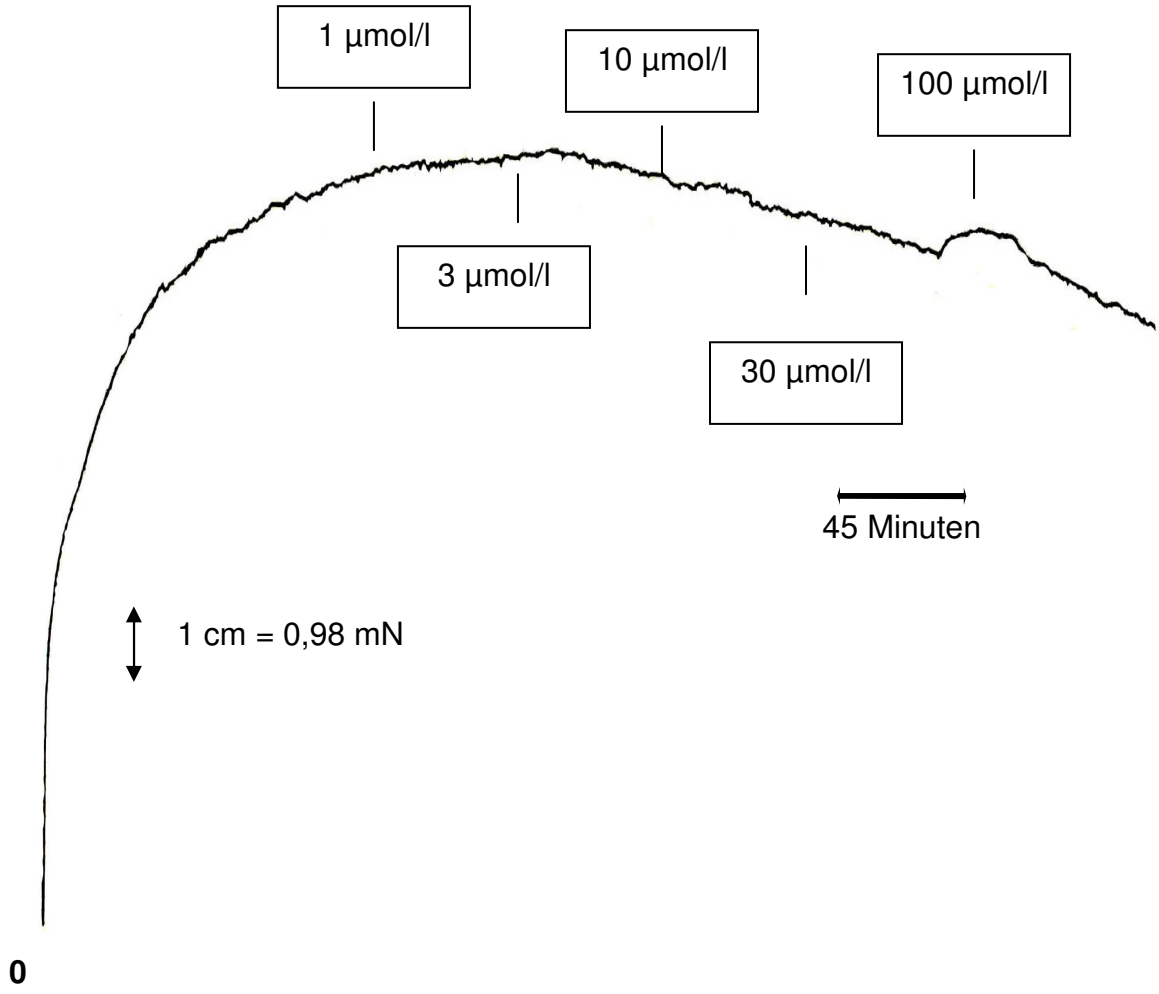
Abbildung 38: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 63MT an der Arteria pulmonalis und EC_{50}



Legende zu Abbildung 38:

Die Ordinate gibt die Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis in Prozent an. Die Abszisse zeigt logarithmisch die zugefügten Konzentrationen an WHG 63MT in µmol/l. Aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist eine starke Abnahme der Kontraktionskraft ersichtlich. Es wird das erste Mal eine EC50 erreicht. Bei einer Konzentration von 54 µmol/l, kommt es zu einer Minderung der Kontraktionskraft an der Pulmonalarterie auf die Hälfte des Kontrollwerts. Die im Abstand von 45 Minuten liegenden schwarzen Punkte, stellen die arithmetischen Mittelwerte aus den 5 Versuchen dar. Die Länge der Balken repräsentiert die Höhe der Standardfehler.

Abbildung 39: Originalaufzeichnung von WHG 63MT an der Arteria pulmon alis



Legende zu Abbildung 39:

Das, durch den Amplifier verstärkte Signal der mechanischen Kontraktion an der Arteria pulmonalis, wurde mittels eines sensiblen Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet. Nachdem ein konstantes Plateau erreicht wurde, wurde auf die Konzentrationen von 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l die entsprechende Testsubstanzmenge injiziert. Dies erfolgte im Abstand von 45 Minuten.

4.2.5. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum

Die spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum konnte in 6 Versuchsreihen belegt werden. Das Experiment wurde wie in Kapitel 4.1.5. gemäß Kapitel 3.6.6. durchgeführt.

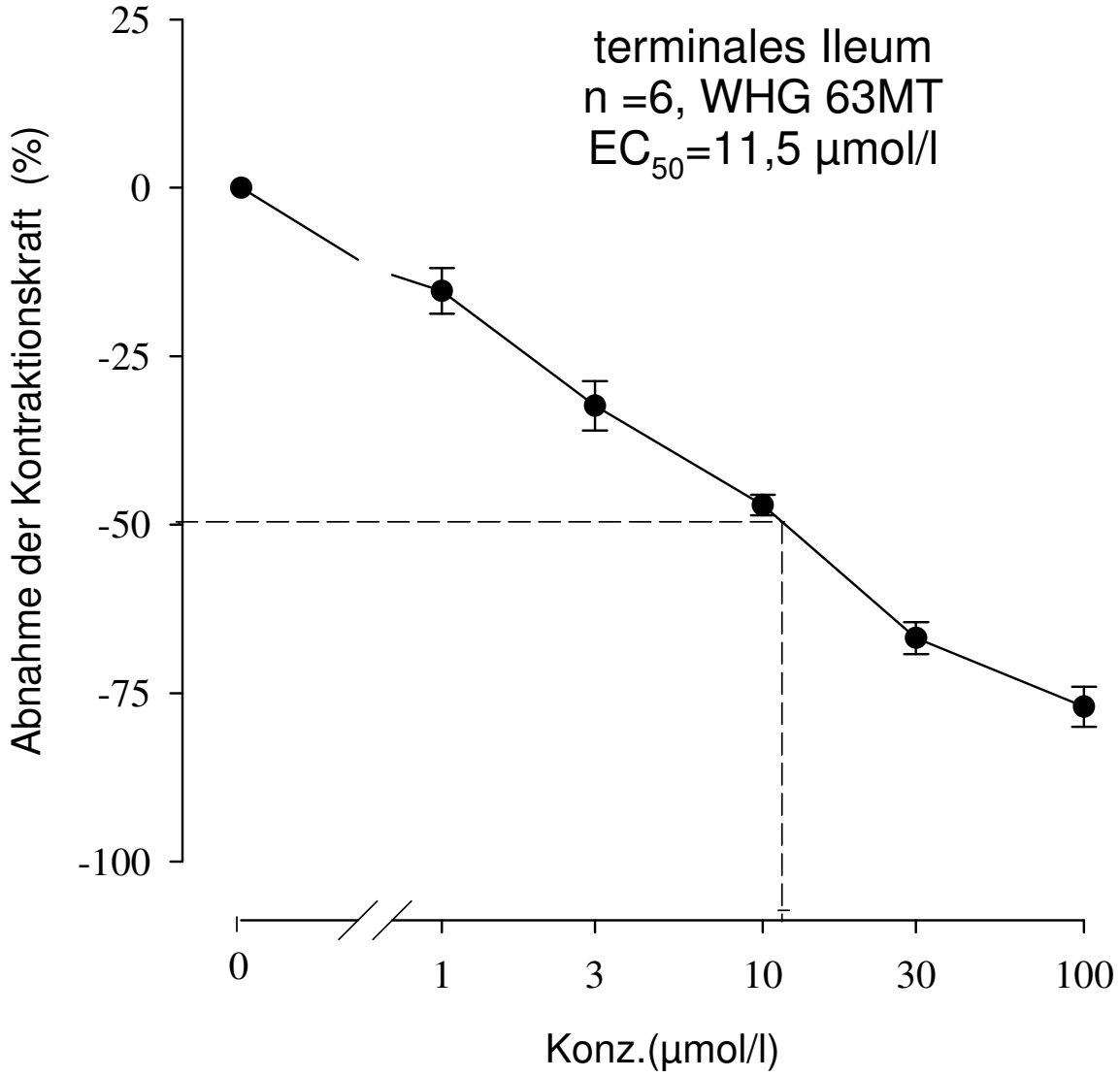
Tabelle 13: Messergebnisse WHG 63MT am terminalen Ileum

WHG 63MT (µmol/l)	fc± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**10,99 ± 0,59**	**0,00 ± 0,00**	**6**	**-**
1	**9,23 ± 0,26**	**-15,3 ± 3,38**	**6**	**0,05**
3	**7,38 ± 0,35**	**-32,34 ± 3,67**	**6**	**0,01**
10	**5,79 ± 0,23**	**-47,07 ± 1,55**	**6**	**0,01**
30	**3,61 ± 0,23**	**-66,83 ± 2,38**	**6**	**0,001**
100	**2,49 ± 0,31**	**-77,03 ± 2,98**	**6**	**0,001**

Legende zu Tabelle 13:

Die Tabelle zeigt die errechneten Mittelwerte der Kontraktion der Darmpräparate in mN und in Prozent. Ebenso werden deren Standardfehler in mN und in Prozent dargestellt. Die ermittelten Prozentwerte beziehen sich immer auf den Kontrollwert von 10,99 ± 0,59 mN. Da die Versuche stets bei 5 mV durchgeführt wurden, musste mit einem Eichfaktor des Kraftwandlers von 0,98 gerechnet werden. Aus der Tabelle ersichtlich sind auch die Anzahl der Versuchsreichen (n). Ebenso die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), die Aufschluss über die Signifikanz der 6 Versuche bei den einzelnen Konzentrationen gibt.

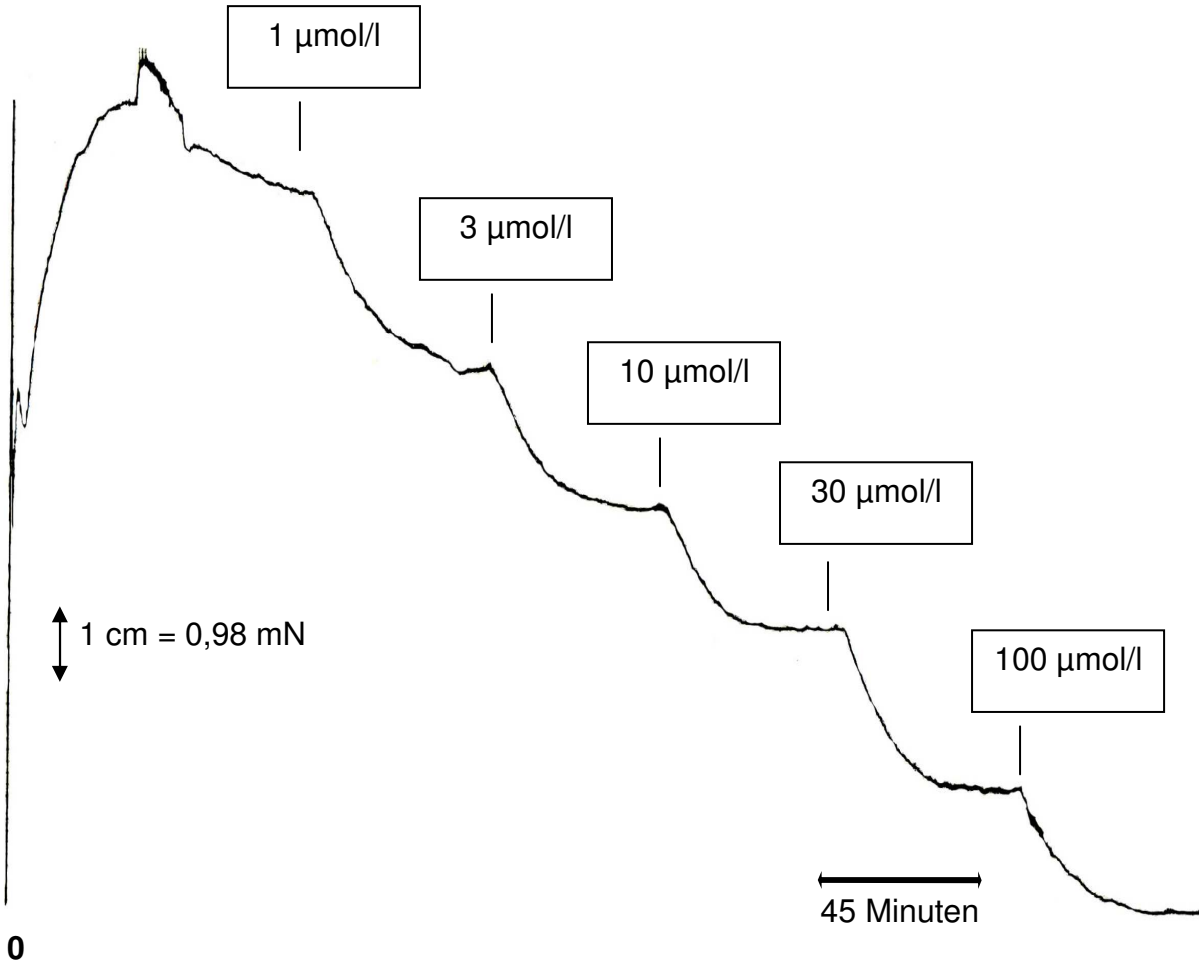
Abbildung 40: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 63MT am terminalen Ileum und EC_{50}



Legende zu Abbildung 40:

Der Graph zeigt eine sehr starke dilatierende Wirkung der Testsubstanz WHG 63MT auf das terminalen Ileum an. Es wird sogar eine EC50 bei einer Konzentration von 11,5 µmol/l erreicht (strichlierte Linie). Die EC50 ist jene Konzentration, bei der die Kontraktionskraft auf die Hälfte den Ausgangswerts absinkt. Die x-Achse stellt die jeweiligen Konzentrationen der injizierten Wirksubstanz in µmol/l dar Die y-Achse veranschaulicht die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die 6 schwarzen Punkte symbolisieren die Mittelwerte aus den 6 Versuchen, die Balken die Standardfehler. Der zwischenzeitliche Abstand der einzelnen Punkte beträgt 45 Minuten.

Abbildung 41: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 41:

Die mittels Schreiber aufgenommene Originalabbildung bestätigt die vorherige Dosis-Wirkungs-Kurve. Man sieht den deutlich dilatierenden Effekt der Testsubstanz WHG 63MT auf das terminale Ileum. Nach Erreichen des konstanten Kontraktionsplateaus (100 % Wert) werden, im Abstand von 45 Minuten, die einzelnen µmol/l an WHG 63 MT, laut dem Pipettierschema, eingespritzt. In dieser Abbildung erkennt man sehr gut, wie wichtig es ist, eine stets kontinuierliche Gaszufuhr zu gewährleisten. Kurz vor der ersten Substanzinjektion war die Gaszufuhr vorübergehend unterbrochen. Diese Störung zeigte sofort einen Ausschlag am Graphen an, der sich aber schnell wieder einpendelte.

4.3. Resultate der Testsubstanz WHG 63MT unter Einfluss von Antagonisten

Da wir nur eine gewisse Auswahl an Antagonisten und Agonisten zur Verfügung hatten, konnte der Wirkmechanismus der Testsubstanz WHG 63MT, nur näherungsweise ermittelt werden. Um den 100%igen Wirkmechanismus der Substanz analysieren zu können, müsste der Wirkstoff an einzelnen Zellen getestet werden.

4.3.1. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum unter Einfluss von Glibenclamid

Der nach Kapitel 3.2.4. isolierte und fertig präparierte Darm, wurde vorsichtig an die entsprechende Versuchsapparatur angebracht. Es wurde mit 4,9 mN bei einer Stromstärke von 5 mV vorgespannt. Nach der Anpassungsphase von 20 Minuten wurde die Tyrode abgelassen und durch eine 60 mmolaren Kaliumchloridlösung ersetzt. Dies führte zu einer maximalen Kontraktion des terminalen Ileums. Nach Erreichen eines konstanten Plateaus, konnte mit der Injektion des Antagonisten Glibenclamid begonnen werden. Dies erfolgte in 2 voneinander unabhängigen Versuchen. Einmal bei einer Konzentration von 30 µmol/l und einmal bei einer Konzentration von 100 µmol/l. Nach Ablauf der 45 Minuten, die notwendig waren um einen konstanten Plasmaspiegel an Glibenclamid zu erhalten, wurde bei beiden Versuchen die Testsubstanz WHG 63MT in der Konzentration von 15 µmol/l in das Organbad pipettiert (siehe Kapitel 3.7.3.).

Glibenclamid ist ein Kaliumkanalblocker (siehe Kapitel 3.7.1.1.). Um mögliche Hinweise über den Wirkmechanismus von WHG 63MT zu erhalten wurde untersucht, ob nach Testsubstanzzugabe der Effekt von Glibenclamid gleich blieb oder aufgehoben wurde. Hiermit konnte indirekt ermittelt werden, ob die Wirkung von WHG 63MT, zumindest teilweise, auf einer Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen beruhte.

Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten wurden je 3 Versuchsreihen mit 30 µmol/l und mit 100 µmol/l Glibenclamid durchgeführt

Tabelle 14: Messergebnisse von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 µmol/l Glibenclamid

Konzentration	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**8,02 ± 1,58**	**3**	**-**
Glibenclamid 30 µmol/l	**5,37 ± 1,37**	**3**	**-**
+ WHG 63 MT 15 µmol/l	**1,20 ± 0,21**	**3**	**0,05**

Tabelle 15: Messergebnisse von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 100 µmol/l Glibenclamid

Konzentration	fc± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**8,31 ± 3,55**	**3**	**-**
Glibenclamid 100 µmol/l	**4,43 ± 1,71**	**3**	**-**
+ WHG 63 MT 15 µmol/l	**2,23 ± 0,81**	**3**	**0,05**

Legende zu Tabelle 14+15:

Die beiden Tabellen zeigen die Wirkung von 30 bzw.100 µmol/l Glibenclamid und 15 µmol/ WHG 63MT auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums an. Es sind die aus 3 Versuchen errechneten Mittelwerte sowie deren Standardfehler in mN angegeben. Ebenso sind die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ersichtlich.

Abbildung 42: Balkendiagramm von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 µmol/l Glibenclamid

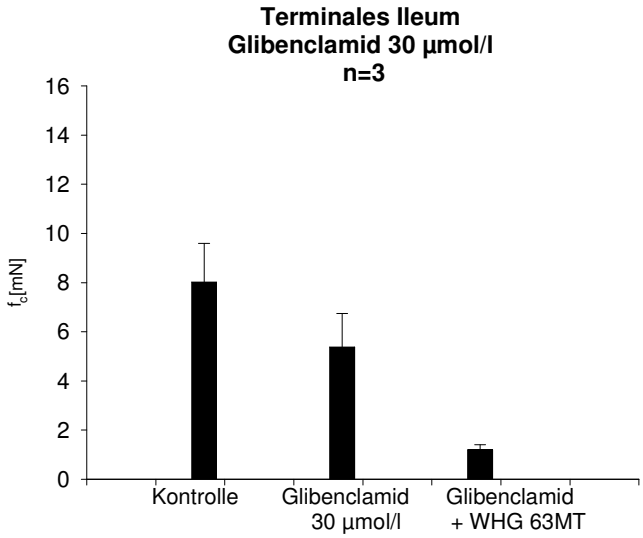
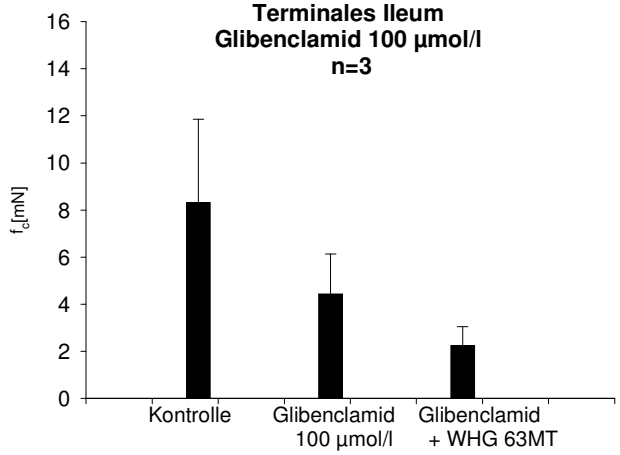


Abbildung 43: Balkendiagramm von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 100 µmol/l Glibenclamid



Legende zur Abbildung 42+43:

Die Balkendiagramme zeigen anschaulich, dass es bei Zugabe des Kaliumkanalblockers Glibenclamid, zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft kam. Dies geschah sowohl bei dem Versuch mit der niedrigen Konzentration an Glibenclamid, als auch bei dem Versuch mit der hohen Dosis. Bei einer weiteren Injektion, diesmal der Testsubstanz WHG 63MT, kam es zu einer fortschreitenden Abnahme der Kontraktionskraft. Die Ordinate stellt die Kontraktionskraft in mN dar. An der Abszisse werden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in µmol/ dargelegt. Die schwarzen Balken stellen die Mittelwerte der einzelnen Versuche dar. Die strichförmigen Verlängerungen repräsentieren die Standardfehler.

Abbildung 44: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 µmol/l Glibenclamid

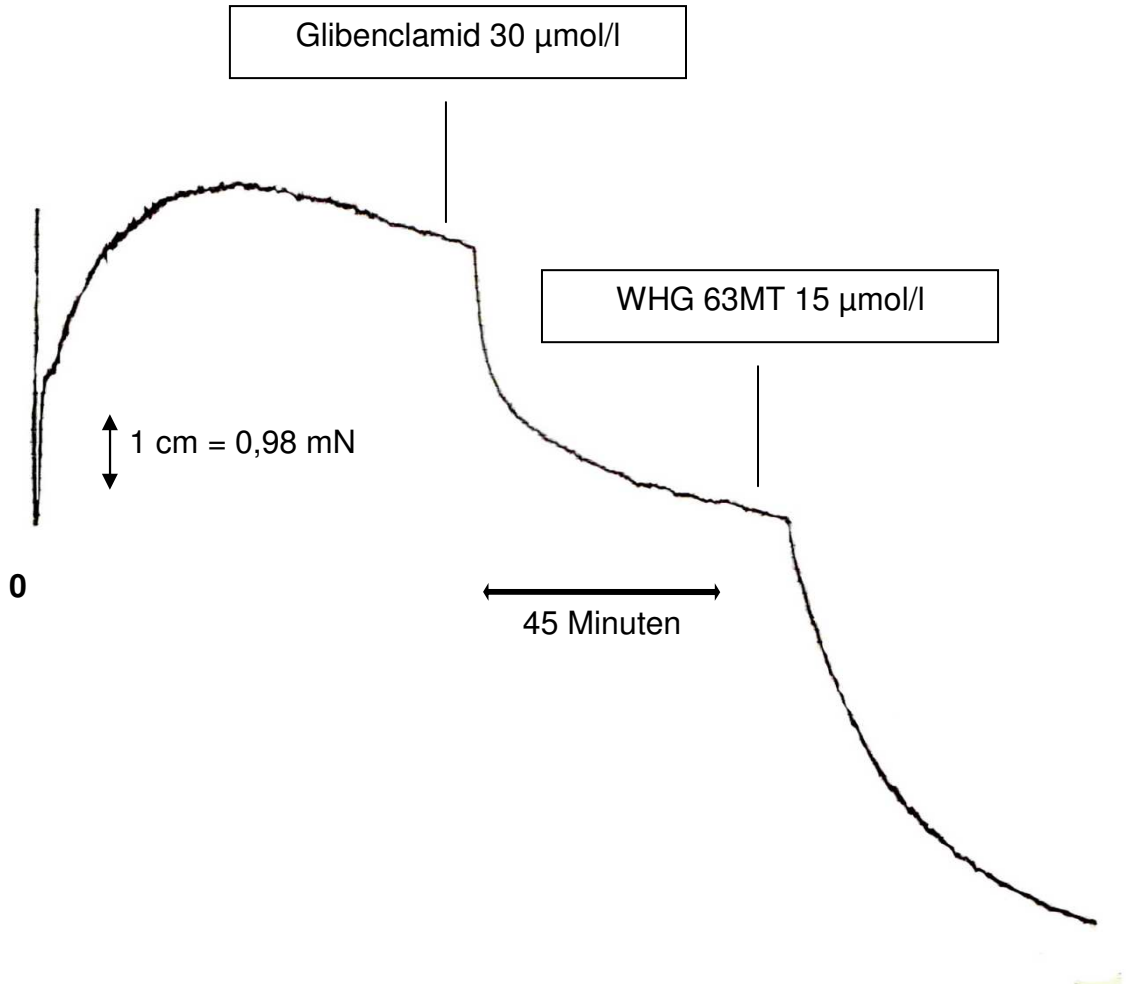
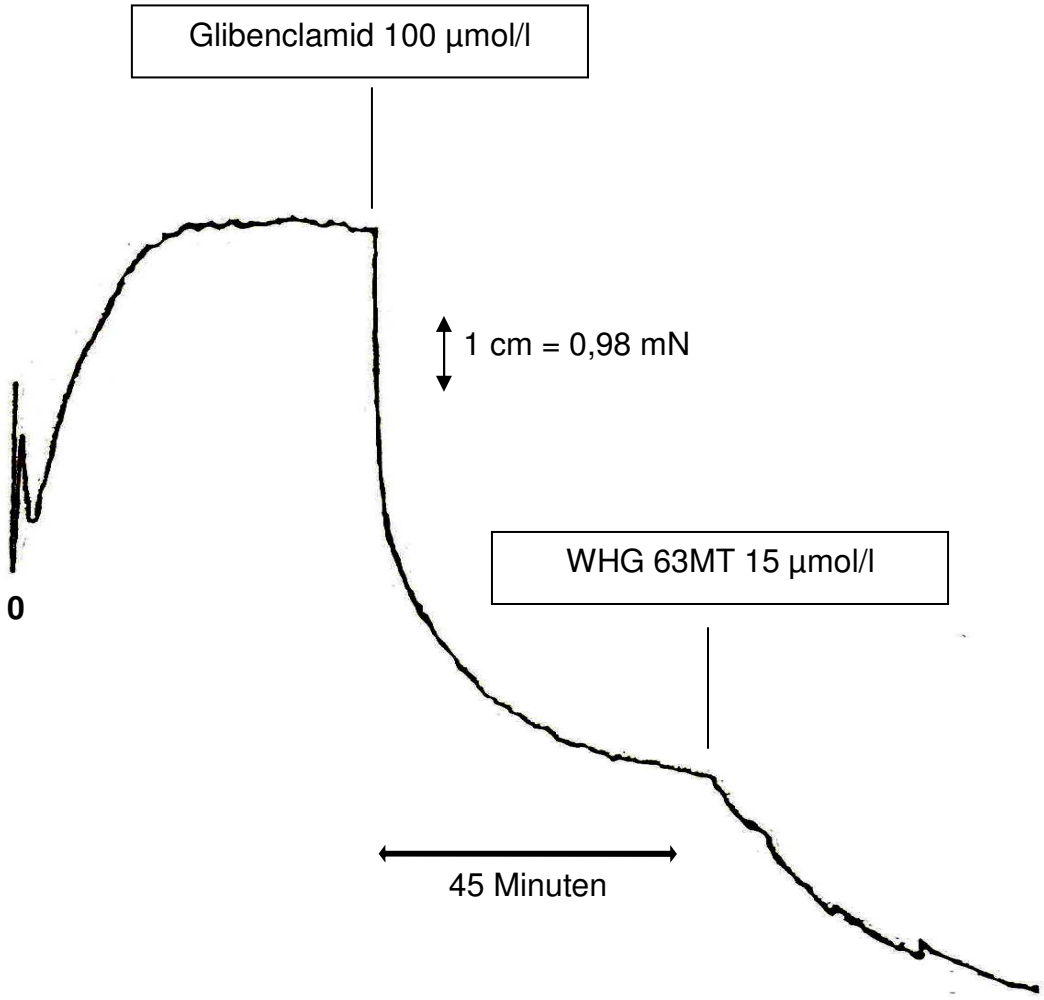


Abbildung 45: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von 100 µmol/l Glibenclamid



Legende zu Abbildung 44+45:

Die beiden Originalskizzen zeigen, nach Erreichen des Kontraktionsniveaus, die Änderung des Kurvenverlaufs nach der Einspritzung von 30 µmol/l bzw. von 100 µmol/l an. Als nach 45 Minuten jeweils 15 µmol/l an WHG 63MT injiziert wurden, kam es zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft.

4.3.2. Wirkung WHG 63MT auf das terminalen Ileum unter Einfluss von Nitro-L-Arginin

Die Versuchsvorbereitungen am terminalen Ileum erfolgten in gleicher Weise wie vorhin bei Glibenclamid. Der Unterschied lag darin, dass nach dem konstanten Plateau, 100 µmol/l an Nitro-L-Arginin eingespritzt wurden (statt 30 bzw 100 µmol/l Glibenclamid). Nach Erreichen des „steady-states" wurden wieder 15 µmol/l der Testsubstanz WHG 63MT in das Organbad pipettiert und die Auswirkungen auf die Kontraktilität aufgezeichnet.

Nitro-L-Arginin ist ein NO-Synthase-Hemmer. Es wird daher als NO-Antagonist eingesetzt (siehe Kapitel 3.7.1.2.). Die Versuchsreihen wurden mit dem Antagonisten Nitro-L-Arginin in Kombination mit der Testsubstanz durchgeführt. Dies diente zum Abklären, ob die spasmolytische Wirkung von WHG 63MT am terminalen Ileum, zumindest teilweise, auf die Beteiligung des NO-Systems beruhte.

Es wurden 3 Versuchreihen durchgeführt.

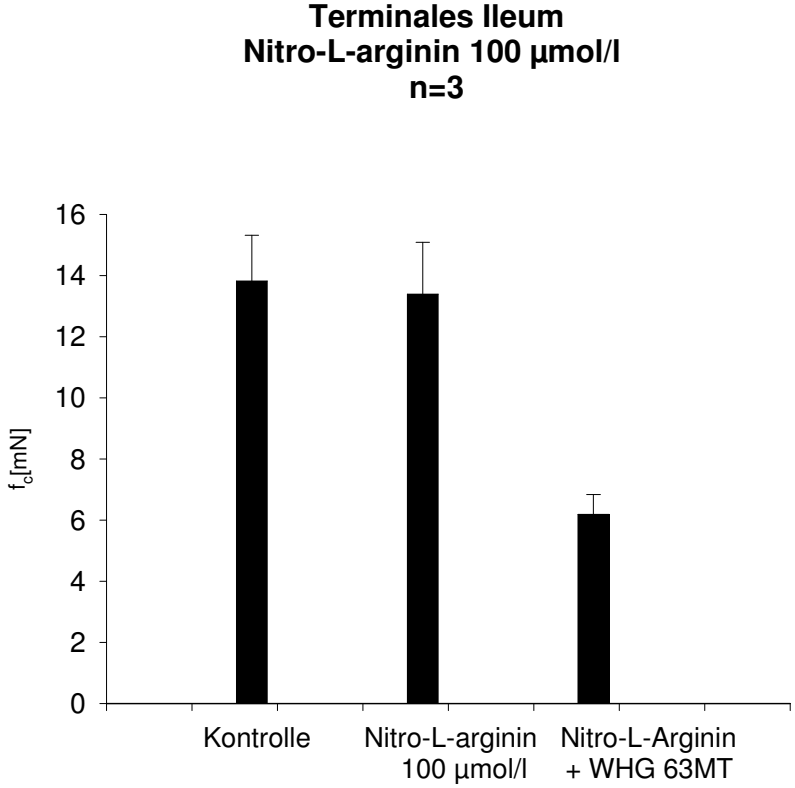
Tabelle 16: Messergebnisse von WHG 63 MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Nitro-L-Arginin

Konzentration	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
Kontrolle	**13,82 ± 1,50**	**3**	**-**
Nitro-L-Arginin 100 µmol/l	**13,39 ± 1,70**	**3**	**-**
+ WHG 63 MT 15 µmol/l	**6,19 ± 0,64**	**3**	**0,05**

Legende zu Tabelle 16:

Die Tabelle zeigt einen Kontrollwert am terminalen Ileum von 13, 82 ± 1,50 mN. Die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN, wurden aus den 3 Versuchen (n) errechnet. Ebenso ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angegeben, die Aufschluss über die Signifikanz der 3 Versuche liefert.

Abbildung 46: Balkendiagramm von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Nitro-L-Arginin

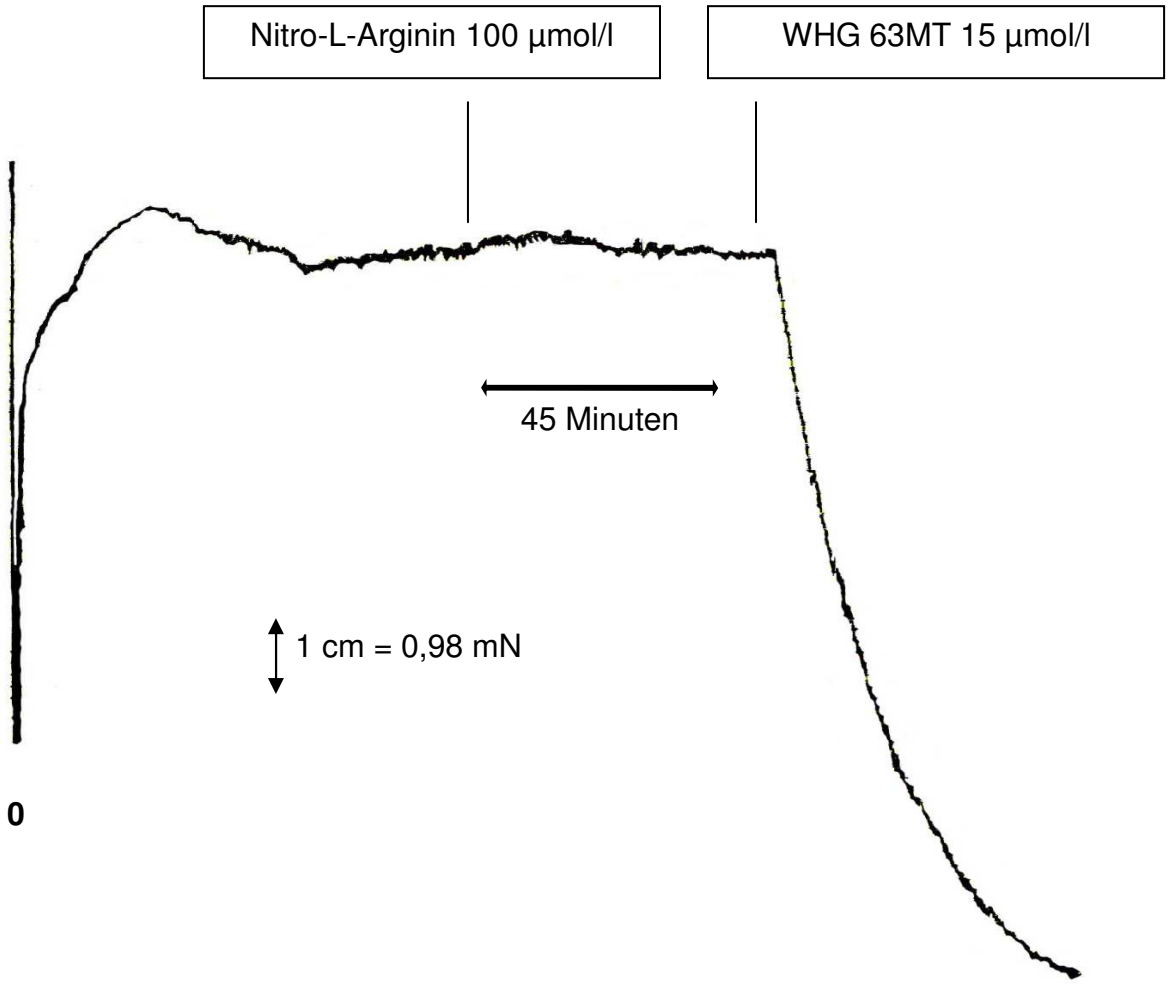


Legende zu Abbildung 46:

Aus dem Balkendiagramm lässt sich erkennen, dass der Antagonist Nitro-L-Arginin kaum zu einer Veränderung der Kontraktionskraft am terminalen Ileum führt. Die Testsubstanz WHG 63MT zeigt jedoch eine starke Abnahme der Kontraktilität.

Die x-Achse veranschaulicht die jeweiligen Substanzkonzentrationen in µmol/l, die y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Genauso wie bei Glibenclamid stellen die breiten senkrechten Balken die arithmetischen Mittelwerte aus den 3 Versuchen dar. Die Standardfehler werden durch die strichförmigen Verlängerungen symbolisiert.

Abbildung 47: Originalaufzeichnung von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Nitro-L-Arginin



Legende zu Abbildung 47:

Die kontinuierlich aufgezeichnete Originalabbildung der Kurve bestätigt die vorherige Aussage des Balkendiagramms. Nach Erreichen eines Plateaus an maximaler Kontraktion, wurde durch die Injektion des Antagonisten Nitro-L-Arginin die Kurve kaum verändert. Erst nach Zugabe von WHG 63MT kam es zu einer starken spasmolytischen Wirkung. Die Aufzeichnung erfolgte wie üblich mit einem hoch empfindlichen Schreiber in Form von Kurven auf einem Millimeterpapier.

4.4. Resultate der Testsubstanz WHG 63MT unter Einfluss von Agonisten

4.4.1. Wirkung WHG 63MT auf das terminale Ileum unter Einfluss von Histamin

Der Versuch mit dem Agonisten Histamin am terminalen Ileum wurde genau nach Kapitel 3.7.4. durchgeführt.

Jeden morgen wurde eine Verdünnungsreihe aus Histamindihydrochlorid in den Konzentrationen 3 µmol/l, 1 µmol/l, 0,3 µmol/l und 0,1 µmol/l angefertigt.

Diese Konzentrationen aus reinem Agonisten dienten als Kontrollwerte. Alle 10 Minuten wurde, ausgehend von der höchsten Konzentration, eine Dosis in das Organbad injiziert. Zeitgleich wurde für 1 Minute der Ausschlag mit Hilfe eines Detektors dokumentiert. Da keine kumulative Anreicherung an Histamin erwünscht war, musste zwischen den einzelnen Konzentrationen das Organbad mehrmals mit Tyrode gespült werden.

Für die eigentliche Untersuchung von WHG 63MT wurde das Organbad, mit Hilfe eines speziellen Schlauchsystems, mit 15 µmol/l an Testsubstanz versetzt. Nun wurden in gleicher Weise, die einzelnen Histaminkonzentrationen in das Organbad pipettiert und mittels Schreiber aufgezeichnet.

Histamin (siehe Kapitel 3.7.2.1.) hat eine spasmogene Wirkung auf den Darm. In den 3 durchgeführten Versuchen wurde indirekt eruiert, ob die spasmolytische Wirkung von WHG 63MT, zumindest teilweise, auf einen antihistaminergen Effekt zurückzuführen ist.

Tabelle 17: Messergebnisse von Histamin allein am terminalen Ileum

Histamin (µmol/l) KONTROLLE	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)
3	24,76 ± 5,67	3
1	21,12 ± 5,89	3
0,3	16,04 ± 4,40	3
0,1	8,46 ± 1,34	3

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte (f_c) der Kontraktionskraft bei den einzelnen Konzentrationen aus den 3 Kontrollversuchen an. Ebenso sind deren Standardfehler (SEM) angegeben.

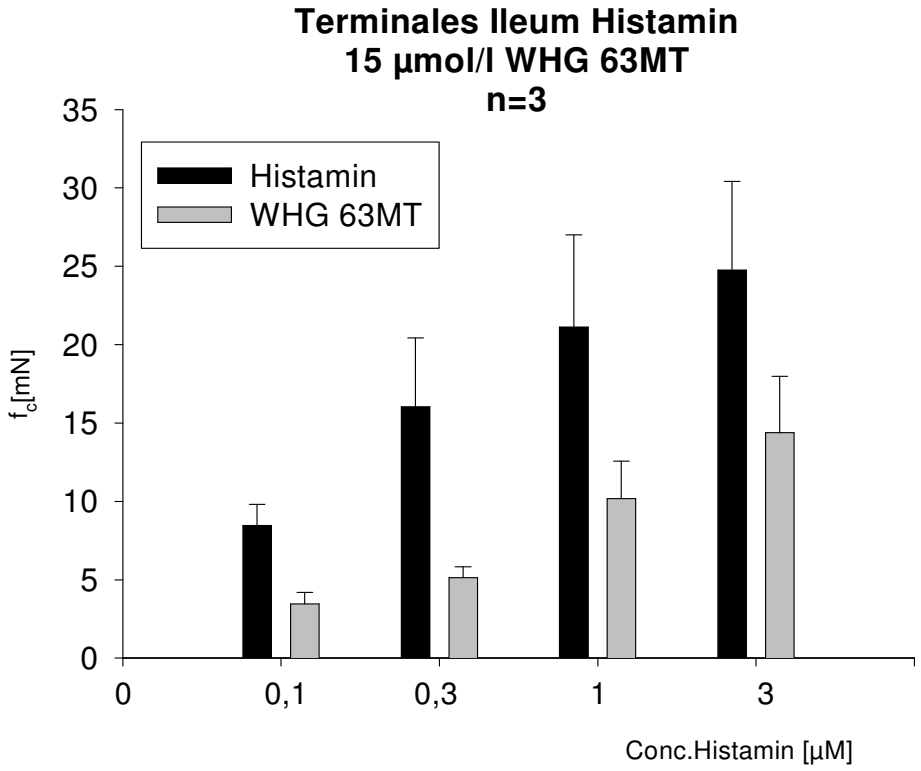
Tabelle 18: Messergebnisse von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Histamin

15 µmol/l WHG 63MT + Histamin (µmol/l) SUBSTANZ	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr-scheinlichkeit (P)
3	14,39 ± 3,60	3	0,05
1	10,17 ± 2,40	3	0,05
0,3	5,13 ± 0,70	3	0,05
0,1	3,46 ± 0,73	3	0,05

Legende zu Tabelle 18:

Diese Tabelle zeigt die veränderten arithmetischen Mittelwerte (f_c) in Kombination mit der Testsubstanz WHG 63MT an. Man sieht, dass es in Anwesenheit von WHG 63MT zu einer Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum kommt. Weiters sind die Anzahl der durchgeführten Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angegeben.

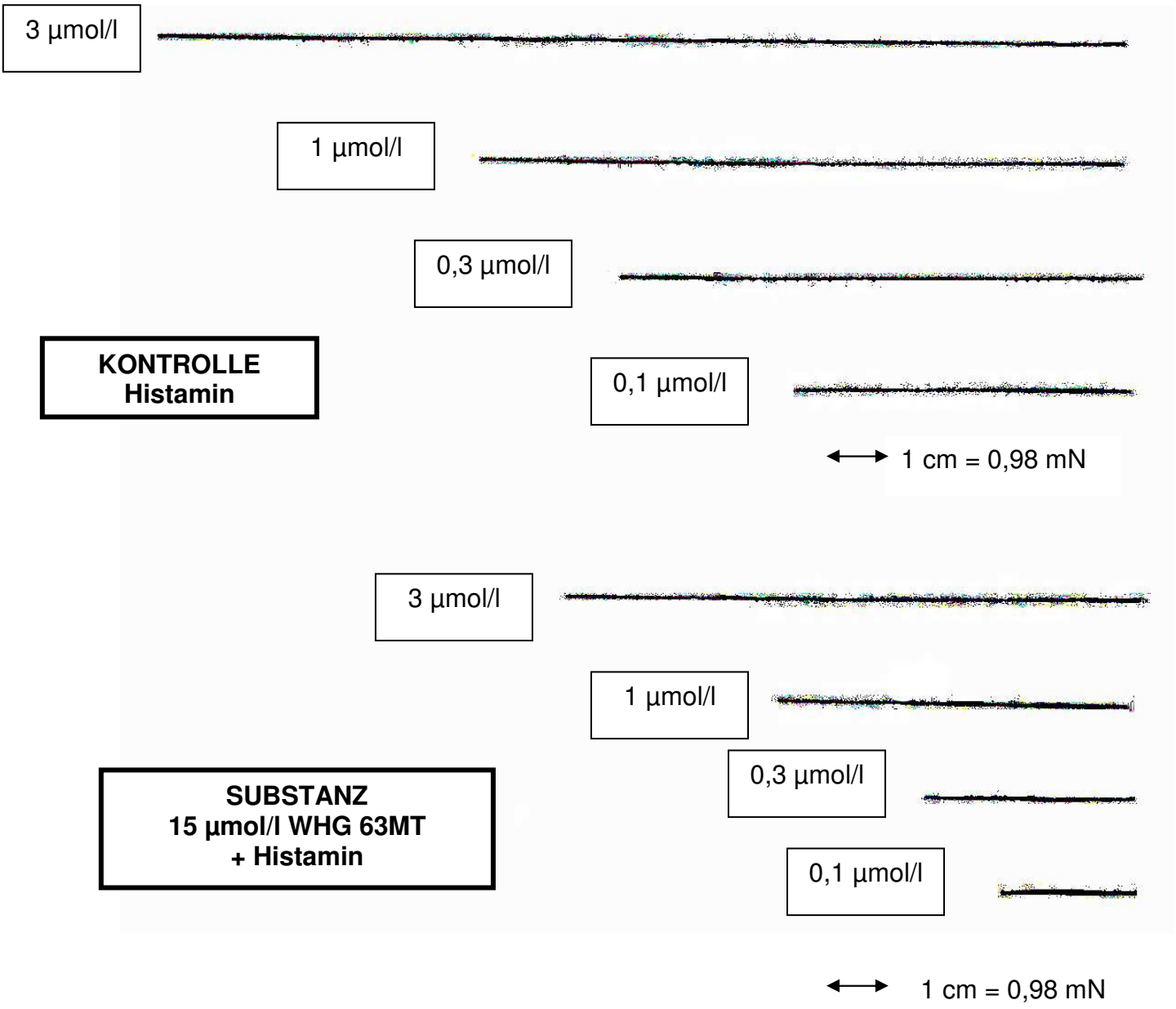
Abbildung 48: Balkendiagramm von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Histamin



Legende zu Abbildung 48:

Die Ordinate zeigt die Kontraktionskraft des Darms in mN an. Die Abszisse veranschaulicht die zugeführten Konzentrationen an Histamindihydrochlorid. Die Balken stellen die Mittelwerte der untersuchten Konzentrationen dar und die strichförmigen Verlängerungen ihre Standardfehler. Die schwarz gefärbten Pfosten stehen für die Kontrollwerte mit dem Agonisten Histamin allein. Die grau schraffierten Balken stellen die Höhe der Kontraktionskraft des terminalen Ileums in Anwesenheit von Histamin gemeinsam mit der Testsubstanz WHG 63 MT dar.

Abbildung 49: Originalaufzeichnung von Histamin allein am terminalen Ileum + Originalaufzeichnung von WHG 63MT am terminalen Ileum unter Einfluss von Histamin



Legende zu Abbildung 49:

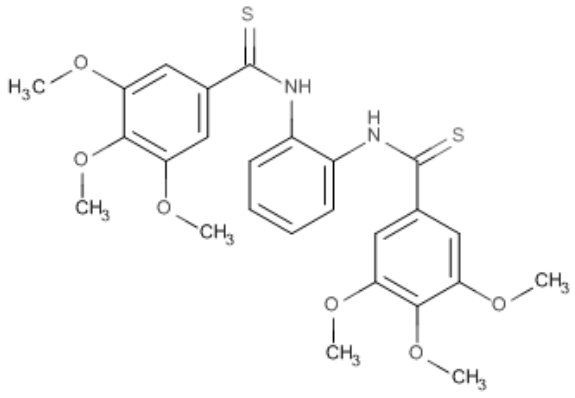
Der Agonist Histamin wird in 4 verschiedenen Konzentrationen im Abstand von 10 Minuten injiziert. Im ersten Schritt wird Histamin allein eingespritzt. Im zweiten Schritt wird Histamin in analoger Weise in das Organbad pipettiert, jedoch unter Anwesenheit der Testsubstanz WHG 63MT. Man sieht deutlich, dass es im Beisein der Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum kommt. Diese mittels Schreiber aufgenommene Originalaufzeichnung bestätigt wieder die Aussage der Tabelle und des Balkendiagramms.

5. DISKUSSION

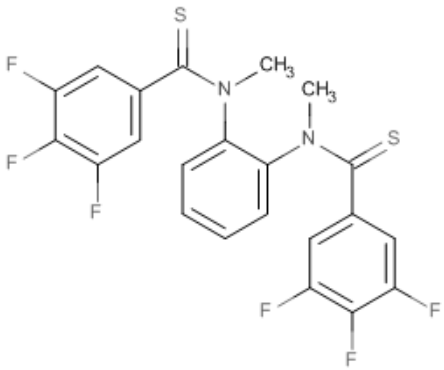
Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden die beiden Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT auf ihre eventuelle Wirkung und auf den daraus resultierenden möglichen Wirkmechanismus getestet.

Die Untersuchungen erfolgten an den 5 isolierten Organen des Cavia porcellus: Atrium cordis dextrum, Musculus papillaris, Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum. Dazu wurden die Testsubstanzen in 5 verschiedenen Konzentrationen analysiert. Der genaue Ablauf der Versuche wurde bereits in den vorherigen Kapiteln detailliert beschrieben.

Im Folgenden wird näher auf die Wirkung von WHG 65T und WHG 63MT eingegangen. Weiters werden die beiden strukturell sehr nahe verwandten Verbindungen, hinsichtlich ihrer verschieden starken Wirkungen miteinander verglichen. Chemisch unterscheiden sich die beiden Substanzen darin, dass WHG 65T mit 6 Methoxygruppen substituiert ist, während WHG 63MT anstelle dieser 6 Fluoratome besitzt. Weiters hat WHG 63MT jeweils eine zusätzliche Methylgruppe an den beiden Thioamid-Stickstoffen.



WHG 65T



WHG 63MT

Im Anschluss daran wurden, aufgrund des stark relaxierenden Efffekts von WHG 63MT auf das terminale Ileum, weitere Versuchsreihen durchgeführt. Diese dienten

der Ermittlung des möglichen Wirkmechanismus. Dazu wurde WHG 63MT in Kombination mit den Antagonisten Glibenclamid und Nitro-L-Arginin und dem Agonist Histamin getestet.

Im vorherigen Kapitel 4 wurden die Ergebnisse der beiden Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT aus den Versuchsreihen bereits eingehend dargestellt. Im kommenden Kapitel werden diese nun noch näher analysiert.

5.1. Versuchreihen an isolierten Organen von Meerschweinchen

5.1.1. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel

Die Versuche am Atrium cordis dextrum und am Musculus papillaris des quergestreiften Herzmuskels dienten zur Untersuchung des Einflusses der beiden Testsubstanzen auf die Inotropie und Chronotropie. Am rechten Vorhof wurde auf einen negativ oder positiv chronotropen Effekt geprüft, am Papillarmuskel auf einen negativ oder positiv inotropen Effekt. Um die eventuelle Wirkung darzustellen, musste der Musculus papillaris mit Hilfe einer Elektrode gereizt werden. Beim rechten Vorhof war dies, wegen des autonom schlagenden Sinusknotens, nicht notwendig.

Organ	WHG 65T f bzw f_c ± SEM (in %) bei 100 µmol/l Endkonzentration	EC_{50} (µmol/l)	WHG 63MT f bzw f_c ± SEM (in %) bei 100 µmol/l Endkonzentration	EC_{50} (µmol/l)
Atrium cordis dextrum	**-5,58 ± 3,00**	**-**	**-4,65 ± 3,51**	**-**
Musculus papillaris	**5,99 ± 3,83**	**-**	**-23,4 ± 7,02**	**-**

Die Tabelle zeigt, dass die Substanzen WHG 65T und WHG 63MT keinen nennenswerten Einfluss auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs besitzen. Beide Verbindungen zeigen bei einer Endkonzentration von 100 µmol/l nur einen verschwindend kleinen negativ chronotropen Effekt auf das Atrium cordis dextrum. Beim Musculus papillaris zeigen beide Substanzen eine unterschiedliche Wirkung. WHG 65T führt bei 100 µmol/l zu einer marginalen Zunahme der Inotropie, während WHG 63MT zu einer, bis zu viermal stärkeren, Abnahme führt. Eine EC_{50} konnte, unter Einfluss der beiden Testsubstanzen, sowohl beim rechten Vorhof als auch beim Papillarmuskel bei weitem nicht erreicht werden.

Die Testsubstanz WHG 65T hatte am Atrium cordis dextrum einen Kontrollwert von 235,83 ± 14,80 Schläge pro Minute. Dieser wurde aus 6 Versuchen ermittelt. Während der kumulativ zugefügten Menge an Substanz kam es zu einer belanglosen Abnahme der Schlagfrequenz. Bei der Endkonzentration von 100 µmol/l war der negativ chronotrope Effekt um 5,58 ± 3,00 % im Vergleich zum Ausgangswert gesunken. Die erhaltenen Werte zeigen keine Signifikanz.

Der negativ chronotrope Effekt von WHG 63MT war mit einer Abnahme von 4,65 ± 3,51 %, verglichen zum Kontrollwert, auch kaum merkbar. Der Ausgangswert aus 4 Versuchen betrug 201,25 ± 6,25 Schläge pro Minute. Bei den unterschiedlich zugefügten Substanzkonzentrationen kam es zu einer minimalen Abnahme der Schlagfrequenz. Ausnahme war der kurze Anstieg auf Höhe des Kontrollwerts bei 30 µmol/l. Auch bei dieser Testsubstanz sind die Resultate statistisch nicht signifikant.

Bei einer Amplitude von 1,70 ± 0,37 mN (100 % Wert) konnte mit der Zugabe von WHG 65T, nach dem Pipettierschema laut Tabelle 3, begonnen werden. Anfangs kam es zu einer leichten Abnahme der Inotropie. Ab 10 µmol/l kam es dann zu einem Anstieg der Kontraktionskraft, die bei der Endkonzentration von 100 µmol/l leicht über den Ausgangswert hinausging (+ 5,99 ± 3,83 %). Die ermittelten Werte aus den 6 Versuchsreihen zeigen keine Signifikanz.

Nach dem Einstellen einer konstanten Amplitude von 1,27 ± 0,25 mN konnten WHG 63MT kumulativ injiziert werden. Verglichen zu WHG 65T kam es hier, statt einem

minimal positiv inotropen Effekt, zu einem doch stärkeren Negativeffekt. Die Abnahme der Kontraktionskraft beim Papillarmuskel betrug, bei einer Endkonzentration von 100 µmol/l, 23,4 ± 7,02 % verglichen zum Ausgangswert. Die Versuche wurden an 7 verschiedenen Papillarmuskeln durchgeführt. Ab einer Konzentration von 3 µmol/l galten die Ergebnisse als signifikant.

5.1.2. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen

Um einen konstanten Kontraktionstonus der glatten Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum zu erreichen, wurden die Organe chemisch mit einer KCl-Lösung maximal vorkontrahiert. Bei Aorta und Arteria pulmonalis verwendete man eine 90 mmolare KCl-Lösung, während beim terminalen Ileum eine 60 mmolare Lösung verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen konnte nun die potentiell dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der beiden Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT untersucht werden.

Organ	WHG 65T f_c ± SEM (in %) bei 100 µmol/l Endkonzentration	EC_{50} (µmol/l)	WHG 63MT f_c ± SEM (in %) bei 100 µmol/l Endkonzentration	EC_{50} (µmol/l)
Aorta	**-7,17 ± 6,56**	**-**	**-31,88 ± 5,62**	**-**
Arteria pulmonalis	**-4,66 ± 2,89**	**-**	**-58,51 ± 9,41**	**54,3**
terminales Ileum	**-46,81 ± 7,48**	**-**	**-77,03 ± 2,98**	**11,5**

Aus dieser Tabelle ist sehr gut ersichtlich, dass WHG 63MT einen sehr viel stärken Effekt auf die Vasorelaxation bzw. auf die Darmspasmolyse besitzt als die Vergleichssubstanz WHG 65T. Die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft konnte bei beiden Substanzen am terminalen Ileum erreicht werden. Eine besonders starke Wirkung zeigt WHG 63MT an der Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum. Bei diesen Organen konnte sogar eine EC_{50} erreicht werden. Diese Konzentration, bei der die Kontraktionskraft auf die Hälfte des Ausgangswertes sank, war jedoch an der

Arteria pulmonalis mit 54,3 µmol/l um einiges höher als beim terminalen Ileum mit 11,5 µmol/l.

Bei einem konstanten Kontraktionsplateau von 7,48 ± 1,87 mN konnte nun wieder mit der kumulativen Injektion von WHG 65T begonnen werden. In Anwesenheit der steigenden Konzentrationen an Testsubstanz, kam es zu einer sehr geringen Abnahme der Kontraktionskraft um 7,17 ± 6,56 % verglichen zum Ausgangswert. An der Aorta wurden 5 Versuchsreihen durchgeführt, die aber keine Signifikanz aufwiesen.

Bei dem 100 % Wert von 9,68 ± 1,53 mN wurde im Folgenden die Testsbustanz WHG 63MT in den Konzentration 1 µmol/l, 2 µmol/l, 7 µmol/l, 20 µmol/l und 70 µmol/l in das Organbad pipettiert. Im Vergleich zur analogen Testsubstanz WHG 65T, kam es hier zu einer mehr als 4fach höheren Abnahme der Kontraktionskraft bei der Endkonzentration von 100 µmol/l. Die Wirkungen von WHG 65T auf die Aorta sind ab 3 µmol/l signifikant und bei 100 µmol/l sogar sehr signifikant.

Die Testsubstanz WHG 65T führte an der Arteria pulmonalis zu einem unbedeutenden vasorelaxierenden Effekt von -4,66 ± 2,89 % bezogen auf den Maximalkontraktions-Kontrollwert von 12,45 ± 1,22 mN. Es wurden 5 Versuchsreihen an der Arteria pulmonalis absolviert, die als nicht signifikant eingestuft werden mussten.

In Anwesenheit der Testsubstanz WHG 63MT kam es zu einer starken Abnahme der Kontraktilität um 58,51 ± 9,41 % bezogen zum 100 % Wert von 6,44 ± 1,47 mN. Aus den 5 durchgeführten Versuchen konnte sogar eine EC_{50} bei 54,3 µmol/l erreicht werden. Die Testergebnisse sind bei den Konzentrationen 3 µmol/l und 10 µmol/l als signifikant anzusehen. Ab einer Konzentration von 30 µmol/l sind die Resultate sogar sehr signifikant.

Der stärkste Effekt der Testsubstanz WHG 65T konnte am terminalen Ileum verzeichnet werden. Hier kam es, verglichen zum konstanten Kontraktionsplateau von 8,38 ± 0,73 mN, zu einer ausgeprägten Spasmolyse. Bei 100 µmol/l war der konzentrationsabhängige relaxierende Effekt um 46,81 ± 7,48 %, im Vergleich zum

Ausgangswert, gesunken. Eine mittlere effiziente Konzentration aus den 5 Versuchen (EC_{50}) konnte jedoch nicht erreicht werden. Ab einer Konzentration von 3 µmol/l sind die ermittelten Werte statistisch signifikant bzw. sehr signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 % bzw. 1%). Ab 30 µmol/l sind die Resultate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % hochsignifikant.

Durch die Testsubstanz WHG 63MT konnte am terminalen Ileum die stärkste Wirkung von allen Versuchen überhaupt erreicht werden. Daher wurde auch hier die Untersuchung des Wirkmechanismus durchgeführt. Die konzentrationsabhängige Spasmolyse sank bei 100 µmol/l bereits um 77,03 ± 2,98 % bezogen zum maximalen Kontraktionswert von 10,99 ± 0,59 mN. Diese Wirkung ging aus 6 Versuchsreihen hervor. Die erzielte EC_{50} liegt bei 11,5 µmol/l. Die Testergebnisse sind bis zu einer Konzentration von 10 µmol/l als signifikant bzw. sehr signifikant einzustufen. Ab einer Konzentration von 30 µmol/l gelten die Ergebnisse als hochsignifikant.

5.2. Versuchsreihen von WHG 63MT am terminalen Ileum in Kombination mit Antagonisten und Agonisten

5.2.1. Versuchsreihen mit dem Antagonist Glibenclamid

Mit Hilfe des bekannten Wirkstoffs Glibenclamid sollte Aufschluss über den möglichen Mechanismus der spasmolytischen Wirkung durch die Testsubstanz WHG 63MT gegeben werden. Da durch Glibenclamid die ATP-abhängigen Kaliumkanäle blockiert werden wurde untersucht, ob diese durch die nachträgliche Injektion der Testsubstanz wieder geöffnet werden. Dazu wurde zuerst Glibenclamid in den Konzentrationen 30 µmol/l bzw. 100 µmol/l in jeweils 3 voneinander unabhängigen Versuchen in das Organbad pipettiert. Nach 45 Minuten wurden 15 µmol/l der Testsubstanz WHG 63MT injiziert. Sowohl bei der niedrigeren als auch bei der höheren Konzentration an Glibenclamid kam es unter WHG 63MT zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft. Somit könnte die Darmspasmolyse unter anderem auf eine mögliche Kaliumkanal-öffnende Wirkung zurückgeführt werden, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, bei beiden Konzentrationen an Glibenclamid, statistisch signifikant war.

Da sich sowohl in der Testsubstanz WHG 65T als auch in der Testsubstanz WHG 63MT jeweils 2 Schwefelatome befinden, kann spekulativ mit einer H_2S-Freisetzung gerechnet werden.

Schwefelwasserstoff (Hydrogensulfid) ist ein giftiges Gas, welches intensiv nach faulen Eiern riecht. Es entsteht unter anderem bei Fäulnis- und Zersetzungsprozessen, bei Reaktionen von Säuren mit Schwermetallsulfiden und macht einen geringen Bestandteil des Erdgases aus. Nach pulmonaler Resorption hoher Dosen werden vor allem das ZNS und der Respirationstrakt in Mitleidenschaft gezogen. Bei chronischer Exposition kann es zu degenerativen Veränderungen der Cornea kommen (Aktoris et al 2009).

In den letzten Jahren erkannte man jedoch, dass Schwefelwasserstoff, ähnlich wie Stickstoffmonoxid, eine Funktion als gasförmiger Mediator besitzt. Die Enzyme Cystathionin-y-lyase (CSE) und Cystathionin-ß-Synthase (CBS) katalysieren die Synthese des gasförmigen Transmitters aus schwefelhältigen Aminosäuren (L-Methionin, L-Cystein). Die Katalyse von endogenem H_2S wird im ZNS vor allem durch CBS bewerkstelligt, während die Bildung im Blutgefäßsystem vor allem durch CSE angetrieben wird (Moore et al. 2003).

Im Rahmen weiterer in vivo und in vitro Untersuchungen konnte ein vasodilatierender Effekt von H_2S im kardiovaskulären System nachgewiesen werden. Dieser dilatierende Effekt kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle zustande (Zhao et al. 2001, Moore et al. 2003, Cheng et al. 2004).

Durch die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und somit zu einer Inaktivierung spannungsabhängiger L-Typ Ca^{++}-Kanäle. In weiterer Folge führt dies zu einer Abnahme der intrazellulären Konzentration an freien Calciumionen, die zu einer resultierenden Dilatation bzw. Relaxation im Herz-Kreislauf-System führt (Nelson et al. 1995).

Eine weitere wissenschaftliche Untersuchung erforschte den Konnex zwischen Hydrogensulfid und seiner Rolle bei Myokardischämie. Unter Einfluss von H_2S kam es sowohl zu einem kardioprotektiven Effekt als auch zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität nach einem Myokardinfarkt. Die Studie wurde anhand eines Rattenmodells durchgeführt (Zhu et al. 2006).

5.2.2. Versuchsreihen mit dem Antagonist Nitro-L-Arginin

Der NO-Antagonist Nitro-L-Arginin ist bekannt dafür, dass er NO-Synthasen blockiert. Mit ihm wurde an 3 Versuchen getestet, ob die relaxierende Wirkung von WHG 63MT, zumindest partiell, durch NO-Freisetzung zustande kam. Um die NO-Synthasen zu inhibieren, versetzte man das Organbad zuerst mit 100 µmol/l Nitro-L-Arginin. Danach wurden wieder 15 µmol/l WHG 63MT injiziert. Dabei kam es zu einer beachtlichen Spasmolyse, die mitunter auf einer möglichen Aktivierung der NO-Synthasen und somit auf einer NO-Freisetzung beruhte. Die Wirkung der Testsubstanz WHG 63MT auf die NOS ist statistisch signifikant.

5.2.3. Versuchsreihen mit dem Agonist Histamin

Das biogene Amin Histamin führt unter anderem zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur. Um nun zu eruieren, ob die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz WHG 63MT, zumindest teilweise, auf einen antihistaminergen Effekt beruhte, wurden die Versuchsreihen mit diesem Agonisten durchgeführt.
Dazu wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen (3 µmol/l, 1 µmol/l, 0,3 µmol/l, 0,1 µmol/l) an Histamin am terminalen Ileum protokolliert. Anschließend wurde überprüft, ob die spasmogene Wirkung von Histamin in Anwesenheit von 15 µmol/l WHG 63MT abnahm. Da dies der Fall war kann man von einem möglichen, an der Wirkung beteiligten, antihistaminergen Effekt sprechen, der statistisch signifikant ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit befasste sich mit dem pharmakologischen Screening von zwei Carbothioamiden, die am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien neu entwickelt wurden.

Die beiden Testsubstanzen WHG 65T und WHG 63MT wurden in den Konzentrationen 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l an 5 verschiedenen isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Bei diesen Organen handelte es sich um die quergestreifte Herzmuskulatur, genauer gesagt um das Atrium cordis dextrum und den Musculus papillaris. Des Weiteren wurden die Versuche an der Aorta, Arteria pulmonalis und dem terminalen Ileum durchgeführt, die allesamt eine glatte Muskulatur aufweisen.

Am Atrium cordis dextrum wurde der Einfluss der beiden Testsubstanzen auf die Chronotropie getestet. Am Musculus papillaris wurde auf eine negative oder positive Inotropie geprüft. Bei den restlichen Organen der glatten Muskulatur untersuchte man, ob und wie stark, die beiden Testsubstanzen zu einer Änderung der Kontraktionskraft führten. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden in der Regel mindestens 5 Versuchsreihen durchgeführt.

Die Testverbindung WHG 65T zeigte wenig bis kaum Effekte auf die quergestreifte Herzmuskulatur. Es kam lediglich zu einer minimalen Abnahme der Chronotropie und zu einer minimalen Zunahme der Inotropie. An den glatten Muskelorganen der Aorta und der Arteria pulmonalis kam es ebenfalls nur zu einer marginalen Abnahme des Kontraktionstonus. Am terminalen Ileum hingegen konnte eine starke Spasmolyse festgestellt werden, bei der die Kontraktionskraft fast auf die Hälfte des Ausgangswertes sank. Die Resultate der Testsubstanz WHG 65T sind hauptsächlich nicht signifikant. Allein am terminalen Ileum konnte ab 10 µmol/l eine statistische Signifikanz festgestellt werden.

WHG 63MT hatte am Atrium cordis dextrum einen kaum wahrnehmbaren negativ chronotropen Effekt. Am Musculus papillaris konnte, in Anwesenheit der Testsubstanz, ein stärkerer negativ inotroper Einfluss verzeichnet werden. Hier nahm die Kontraktionskraft um fast ein Viertel ab. An den glattmuskulären Organpräparaten konnte unter WH 63MT die stärkste Wirkung festgestellt werden. Sowohl bei der Aorta als auch bei der Arteria pulmonalis und dem terminalen Ileum kam es zu einer stark dilatatierenden bzw. spasmolytischen Wirkung. An der Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum konnte sogar eine EC_{50} erreicht werden. Diese wurde am terminalen Ileum bereits bei einer Konzentration von 11,5 µmol/l erreicht, während bei der Arteria pulmonalis eine höhere Konzentration (54,3 µmol/l) notwendig war.
Die Testsubstanz WHG 63MT hatte insgesamt eine stärkere Wirkung auf alle Organe, mit Ausnahme des Atrium cordis dextrum, als die Vergleichssubstanz WHG 65T. Am Atrium cordis dextrum konnte auch keine Signifikanz festgestellt werden. Bei allen übrigen Organen konnten, ab einer durchschnittlichen Konzentration von 10 µmol/l, die Werte als statistisch signifikant eingestuft werden. Beim terminalen Ileum war dies sogar schon bei 1 µmol/l der Fall.

Da die am stärksten ausgeprägte relaxierende Wirkung am terminalen Ileum unter WHG 63MT protokolliert werden konnte, wurde zur Untersuchung des Wirkmechanismus diese Testsubstanz an jenem Organ getestet. Dazu wurden Antagonisten (Glibenclamid, Nitro-L-Arginin) und Agonisten (Histamin) verwendet, deren Wirkungen bereits bekannt waren. Somit konnten indirekt die möglichen Wirkprofile der Testverbindung WHG 63MT untersucht werden. Das Resümee ist, dass die Wirkung von WHG 63MT auf mehreren Wirkmechanismen beruhen muss. Unter anderem konnten eine mögliche Kaliumkanal-öffnende, NO-freisetzende und antihistaminerge Wirkung festgestellt werden, die statistische Signifikanz aufweisen.

Da die beiden Testsubstanzen mit jeweils 2 Schwefelatomen ausgestattet sind, kann auch eine potentielle H_2S Freisetzung an der Wirkung beteiligt sein. Diese führt in weiterer Folge zu einer Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und somit zu einer Vasorelaxation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aktories K, Förstermann U, Hoffmann F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer, 10. Auflage, 451,472-474,616-617,624-626, 1031

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 287, H2316-H2323

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

Koch-Weser J (1963) Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. Am J Physiol 204: 451 – 457

Moore PK, Bhatia M, Moochhala S (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? , Trends Pharmacol. Sci: 24, 609-611

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, (2008) Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, Wissenschafliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 596-573, 417, 469, 358

Nelson DL, Cox MM, (2009) Lehninger Biochemie. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin-Heidelberg: 1217-1218

Popesko, P.; Rajtova, V. & Horak, J. (2003) A colour atlas of anatomy of small laboratory animals, Volume 1: rabbit, guinea pig; Wolfe Publishing Ltd., 1992; Reprinted in 2002 by Saunders, an imprint of Elsevier Science Ltd.: 193,195

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

Rosemann S (2002) Verbesserung der Kontraktilität von Dünndarmstreifen bei nekrotisierender Pankreatitis durch NO – Antagonismus und Einfluss von Endotoxin. Dissertation Freie Universität Berlin

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) Anatomie, Physiologie Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP)channel opener EMBO J 20: 6008-6016

Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CH, Whiteman M, Lu J, Moore PK, (2006) Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats, J Appl Physiol: 261-267

8. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Elisabeth Maria Födermayr
Adresse	Hauptwohnsitz: Weyermayrgutstraße 16, 4470 Enns Nebenwohnsitz: Pramergasse 28/30, 1090 Wien
Geburtsdatum	12. September 1983
Geburtsort	Linz
Staatsbürgerschaft	Österreich
Eltern	Dr.med.vet Ernst Födermayr, Tierarzt DI Hilde Födermayr, Landwirtin
Geschwister	Bruder (22 Jahre), Student

Ausbildung

Seit Juni 2009	Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie
Seit Oktober 2003	Studium der Pharmazie, Wien
1998-2003	HandelsakademieSteyr Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
1994-1998	Bundesgymnasium Steyr, Abgang mit gutem Erfolg
1991-1994	Volksschule Enns