



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening von zwei neu synthetisierten Dianiliden (WHG 34 und WHG 33PSA) an isolierten Meerschweinchenpräparaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Magistra Pharmaciae (Mag.pharm.)
an der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Wien

Verfasserin: Christina Müller-Uri
Matrikelnummer: 9807028
Studienrichtung: Pharmazie (A449)
Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Wien, im Oktober 2008

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für seine ausgesprochen exzellente Betreuung während der praktischen Tätigkeit als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Besonders möchte ich auch die freundliche und verständnisvolle Unterstützung hervorheben, die einen nie verzweifeln ließen.

Das ich das Vergnügen hatte die Zeit auch noch mit den besten Kollegen zu verbringen machte dies zu einer schönen familiären Atmosphäre.

Auch danke ich Frau Pakiza Saleh und Herrn Peter Höflich für die technische Hilfestellung, und die nette Unterstützung bei Abwesenheit von Hr. Prof. Christian Studenik.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Familie insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützt und mir Mut gemacht haben, das ich alles schaffen kann, was ich mir vornehme.

INHALTSVERZEICHNIS:

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Erregung von Nervenzellen, Erregungsleitung und –übertragung im Herzen...	
1.1.1. Pharmakodynamische Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzens.....	
1.2. Ruhe- und Aktionspotential.....	
1.2.1. Ruhepotential.....	
1.2.2. Aktionspotential.....	
1.3. Ionenkanäle.....	
1.3.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle.....	
1.3.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle.....	
1.3.3. Spannungsgesteuerte Calciumkanäle.....	
1.3.4. Calciumionen.....	
1.4. Calciumkanalblocker.....	
1.4.1. Pathophysiologische Charakterisierung der Ca-antagonisten.....	
1.4.2. Diltiazem.....	
1.5. Zielsetzung.....	
 2. MATERIAL UND METHODIK.....	
2.1. Versuchstiere.....	
2.2. Präparation der Organe.....	
2.2.1. Isolierung des rechten Vorhofes.....	
2.2.2. Isolierung des Musculus papillaris.....	
2.2.3. Isolierung der Arteria pulmonalis.....	
2.2.4. Isolierung der Aorta.....	
2.2.5. Isolierung des terminalen Ileums.....	
2.3. . Physiologische Nähr- bzw. Elektrolytlösung (Tyrode).....	

2.4.	Versuchsanordnung.....	
2.4.1.	Versuchsapparatur I.....	
2.4.2.	Versuchsapparatur II.....	
2.4.3.	Kraftwandler.....	
2.4.4.	Gasversorgung.....	
2.5.	Versuchsablauf.....	
2.5.1.	Versuchsablauf beim rechten Vorhof.....	
2.5.2.	Versuchsablauf beim Musculus papillaris.....	
2.5.3.	Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis.....	
2.5.4.	Versuchsablauf bei der Aorta.....	
2.5.5.	Versuchsablauf beim terminalen Ileum.....	
2.6.	Testsubstanzen.....	
2.7.	Messgrößen.....	
2.7.1.	Auswertung der Versuchsreihe mit rechten Vorhöfen.....	
2.7.2.	Auswertung der Versuchsreihe mit den Musculus papillaris.....	
2.7.3.	Auswertung der Versuchsreihe mit pulmonalen Arterien, Aorten und terminalem Ilea	
2.8.	Statistik.....	
3.	ERGEBNISSE.....	
3.1.	Testsubstanz WHG 33PSA.....	
3.1.1.	Wirkung auf den rechten Vorhof.....	
3.1.2.	Wirkung auf den Musculus papillaris.....	
3.1.3.	Wirkung auf die Arteria pulmonalis.....	
3.1.4.	Wirkung auf die Aorta.....	
3.1.5.	Wirkung auf das terminale Ileum.....	

3.2. Testsubstanz WHG 34.....	
3.2.1. Wirkung auf den rechten Vorhof.....	
3.2.2. Wirkung auf den Musculus papillaris.....	
3.2.3. Wirkung auf die Arteria pulmonalis.....	
3.2.4. Wirkung auf die Aorta.....	
3.2.5. Wirkung auf das terminale Ileum.....	
3.3. Einfluss des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf die isolierten Organe.....	
3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris...	
3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis....	
3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	
3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum.....	
4. DISKUSSION.....	
4.1. Struktur Wirkungsbeziehung.....	
4.2. Versuche an den isolierten Organen.....	
4.2.1. Versuche am rechten Vorhof.....	
4.2.2. Versuche am Musculus papillaris.....	
4.2.3. Versuche an der Arteria pulmonalis.....	
4.2.3. Versuche an der Aorta.....	
4.2.4. Versuche am terminalen Ileum.....	
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	
7. CURRICULUM VITAE.....	

1. EINLEITUNG

1.1. Erregung von Nervenzellen, Erregungsleitung und –übertragung im Herzen

Eine wichtige Eigenschaft des lebenden Organismus ist seine Erregbarkeit, das bedeutet die Fähigkeit von bestimmten Zellen, auf einen physikalischen oder chemischen Reiz mit einer spezifischen Reaktion, einer Erregung, zu reagieren. Diese dann fortzuleiten und damit Organfunktionen zu beeinflussen. Neben den Nervenzellen sind auch die Rezeptor- und Muskelzellen darauf spezialisiert. (Mutschler et al. 2001)

Das Herz besitzt Muskelzellen bzw. -fasern, die Erregungsimpulse bilden und weiterleiten, sowie solche, die Impulse mit einer Kontraktion beantworten. Im Gegensatz zum Skelettmuskel geschieht die Erregungsbildung innerhalb des Organs: Autonomie des Herzens. Vorhof- und Ventrikelmuskulatur sind funktionell gesehen jeweils ein Synzytium. Das bedeutet die Zellen sind nicht gegeneinander isoliert, sondern durch so genannte Gap junctions miteinander verbunden. Ein Reiz der also irgendwo in den Vorhöfen bzw. Ventrikeln entsteht, führt daher immer zu einer vollständigen Kontraktion beider Vorhöfe bzw. Kammern. Es ist eine Alles oder Nichts Kontraktion. Erregt wird das Herz durch den Sinusknoten, dieser stellt somit den Schrittmacher des Herzens dar. Die Weiterleitung des Schrittmacher-Impulses erfolgt von dort über die beiden Vorhöfe zum Atrioventrikular (AV) – Knoten, einer dreieckigen Anhäufung von Reizleitungszellen zwischen der Mündung des Sinus coronarius und der Vorhofkammergrenze. Dann gelangt er über zwei Faserzüge, den Tawara-Schenkel der His'schen Bündel, zu den Purkinjefasern, die die Erregung bzw. den Impuls auf das Kammermyokard übertragen. In ihm breitet sich der Reiz von innen nach außen und von der Spitze zur Basis aus, was mit Hilfe des EKG (Elektrokardiogramm) auch am intakten Organismus verfolgt werden kann. Das Zellpotential im Sinusknoten ist also ein Schrittmacherpotential.

(Silbernagl et al. 2001)

1.1.1. Pharmakodynamische Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzens

Die pharmakodynamisch-therapeutisch wichtigste Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzens stellt die Steigerung der Kontraktilität dar, die positiv inotrope Wirkung. Diese führt unabhängig von der Vordehnung (Frank-Starling) zu einer Aktivierung und Beschleunigung des Auftretens von Brückenkräften zwischen Aktin und Myosin. Eine positiv inotrope Wirkung haben Substanzen wie zum Beispiel Noradrenalin, Adrenalin, reine β -Sympathomimetika und andere die unter dem Begriff „Herzglykoside“ zusammengefasst werden. Die Wirkung der Sympathomimetika beruht auf der Steigerung der Membranpermeabilität für Calcium-Ionen und damit einer langsamen Zunahme des Ca^{2+} - Einstroms während Phase 2 des Aktionspotentials. Die positiv inotrope Wirkung ist begleitet von einer Zunahme der Steilheit der diastolischen Depolarisation des Aktionspotentials der Schrittmacherzellen. Die daraus resultierende positiv chronotrope Wirkung limitiert die Anwendung dieser Klasse auf die Herzinsuffizienz. Hingegen ist bei den Herzglykosiden die positiv inotrope Wirkung mit einer negativ chronotropen Wirkung kombiniert. Aber auch bei ihnen ist die positiv inotrope Wirkung mit der intrazellulären Mobilisation von freiem Calcium verbunden. (W.Forth et al. 1977)

1.2. Ruhe- und Aktionspotential

Entstehung und Fortleitung von Erregung in Nerven- oder Muskelfasern beruhen also auf ionalen Prozessen, die sich an der Zellen begrenzenden Zellmembran abspielen. Diese Lipid-Protein-Membran trennt das Innere der Faser vom Extrazellularraum. Wegen der unterschiedlichen Ionenverteilung in den beiden Medien herrscht zwischen dem Innen- und dem Außenraum eine ständige Potentialdifferenz oder Spannung, die als Membranpotential bezeichnet wird.

Änderungen des Membranpotentials bilden die Grundlage für die Fortleitung der Erregung und damit für die Signalübertragung und Kontraktionsauslösung. (Mutschler et al. 2001)

1.2.1. Ruhepotential

Das Innere einer erregbaren Zelle hat gegenüber dem Außenraum in Ruhe ein negatives Potential von -60 bis -100mV. Der Grund für die Negativität liegt in den unterschiedlichen Ionenkonzentrationen in den beiden Räumen. Für die Aufrechterhaltung dieser Konzentrationsunterschiede sorgt ein aktiver Transport, im Besonderen die Na^+/K^+ -ATPase. Durch die beschriebene Konzentrationsdifferenz haben die Kalium-Ionen das Bestreben, durch die für sie mittels Kaliumkanälen gut durchlässige Membran nach außen zu diffundieren. Die Natrium-Ionen haben fast keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential, da die nicht erregte Membran für sie nicht durchlässig ist. (Mutschler et al. 2001)

1.2.2. Aktionspotential

Durch einen chemischen oder physikalischen Reiz kann es nun zu einer Membranpotentialänderung kommen. Wird das Membranpotential durch einen solchen Reiz um einen bestimmten Betrag erniedrigt bzw. depolarisiert und dabei eine definierte Schwelle, das Schwellenpotential, überschritten, so nimmt es schlagartig innerhalb kurzer Zeit durch Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen weiter ab. Vorübergehend wird so auch das Zelleninnere positiv gegen die Außenseite der Membran. Danach wird das alte Membranpotential wieder aufgebaut, diesen Vorgang nennt man Repolarisation. Diese Veränderung der Membraneigenschaften, die aus De- und Repolarisationsvorgang besteht, wird als Aktionspotential bezeichnet.

Die Natriumkanäle der Membran werden dann kurzfristig geöffnet und Natrium-Ionen können passiv in Richtung des Konzentrationsgefälles durchströmen. Nun folgen eine rasche Abnahme der Natriumdurchlässigkeit und ein langsamer Anstieg der Kaliumdurchlässigkeit, danach stellt sich wieder ein Ruhepotential ein.

Man kann also drei Phasen zusammenfassen: Die Aufstrichphase des Aktionspotentials bewirkt einen großen Anstieg der Natriumdurchlässigkeit.

Die Repolarisationsphase hingegen raschen Abfall der Natrium- sowie langsamen Anstieg der Kaliumdurchlässigkeit.

Das Hyperpolarisierende Nachpotential ist durch eine verzögerte Abnahme der Kaliumdurchlässigkeit gekennzeichnet. (Mutschler et al. 2001)

1.3.Ionenkanäle

Ein Ionenkanal ist ein Transmembranprotein, das eine Pore in der Zellmembran bildet. Durch diese Pore können verschiedene Ionen die Zellmembran durchqueren. So können Ionen selektiv transportiert werden um, so wie oben beschrieben, ein Membranpotential aufzubauen oder auch nur aus der Zelle zu schleusen. Es gibt relativ unspezifische, aber auch hochselektive Ionenkanäle. Der Ionentransport erfolgt entlang des Konzentrationsgefälles. Ionenkanäle sind in Kombination und Zusammenspiel mit anderen Transportproteinen von großer Bedeutung für die Transportprozesse über die Membransysteme der Zelle. Angefangen von der Regulation des Säure-Base-Haushalts, der osmotischen Aktivität, Aufnahme und Ausscheidung von Stoffen bis zur Erregungsleitung in den Nerven.

Die Leitfähigkeit der meisten Ionenkanäle wird entweder vom vorhandenen Milieu oder gerichteten Signalen drastisch beeinflusst. Solche Kanäle bezeichnet man als gesteuert. Eine sehr große Gruppe von Ionenkanälen wird durch das Membranpotential gesteuert, das sind die so genannten spannungsabhängigen Ionenkanäle. Eine andere Klasse von Ionenkanälen wird durch Liganden aktiviert, sie nennen sich demnach Liganden-gesteuerte Ionenkanäle.

Für den Ionentransport besitzt die Membran mehr oder weniger spezifische Kanäle für Natrium, Calcium, Kalium oder Chlorid. Das bedeutet die Leitfähigkeit der Zellmembran wird davon bestimmt, welche und wie viele Ionenkanäle gerade offen sind. Die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle bestimmt also die Ionendurchlässigkeit.

Es gibt auch noch andere Ionenkanäle die durch mechanische Reize wie zum Beispiel Druck oder Vibration aktiviert werden. (Silbernagl et al. 2001)

1.3.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen sich bei Änderung des Membranpotentials und sind, wie im Kapitel Ionenkanäle erwähnt, unter anderem für die Repolarisation während des Aktionspotentials verantwortlich. Die Aktivierung des Kaliumkanaltyps erfolgt durch Depolarisation der Membran bei dem gleichen Schwellenpotential wie das der Natriumkanäle. Aber die Öffnung des Kaliumkanaltyps erfolgt sehr viel langsamer und hält auch länger an als die des Natriumkanals. (Silbernagl et al. 2001)

1.3.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

Natrium ist in viele Prozesse der Zelle eingebunden. Der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration kann verschiedene Folgen haben, die in Zusammenhang mit Proliferation und Motilität gebracht werden können, wie Änderung des pH-Wertes, Änderung des Energiehaushaltes oder auch Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Sie bestehen aus einer funktionellen alpha-Untereinheit und aus bis zu drei β -Untereinheiten, die regulierend auf die Porenkinetik und Neubildung weiterer Natriumkanäle wirken. (Wlasak 2003)

1.3.3. Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

Der Calciumkanal ist dem des Natriumkanals vergleichbar. Es gibt verschiedene Calciumkanalsubtypen, die sich in ihrer Charakteristik von einander unterscheiden. Bekannt sind der L-Typ („long-lasting“), N-Typ (neuronal), P-Typ („high density in purkinje cells“). Jeder Calciumkanal-Subtyp besteht zumindest aus drei Protein-Untereinheiten, der alpha-Untereinheit und mehreren regulatorischen Untereinheiten. Aktuell werden Calciumkanäle nach ihren Genfamilien eingeteilt.

L-Typ-Calciumkanäle spielen in der glatten Muskulatur, im kardiovaskulären System und in den Neuronen eine wichtige Rolle. Diese Kanalproteine ermöglichen nach einer Depolarisation der Zellmembran den Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle. Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration sind wichtig für viele physiologische Prozesse. Sie bewirken die elektromechanische Kopplung bei der

Muskelkontraktion, der Exzitations-Koppelung von Neurotransmittern, regulieren die Genexpression und steuern Enzymaktivitäten. (Wlasak 2003)

Bei der Therapie von Herzkrankheiten und Bluthochdruck werden Calciumkanalblocker eingesetzt. Diese regulieren die Kontraktionskraft der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Sie hemmen den Calcium-Einstrom in die Muskelzellen. Dieser Einstrom ist der Auslöser der Muskelkontraktion, da er die Aktin-Myosin-Querbrückenbindung initiiert. (Kuschinsky et al.1984)

1.3.4 Calciumionen

Nach Kuschinsky lässt sich tierexperimentell eine direkte Abhängigkeit der Kontraktionskraft des Herzmuskels von der extrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration nachweisen. Das bedeutet, die erhöhte extrazelluläre Calcium²⁺ -Konzentration wirkt positiv und die verminderte extrazelluläre Calcium²⁺-Konzentration negativ inotrop. (Kuschinsky et al. 1984)

„Werden Dosis-Wirkungs-Untersuchungen mit Calcium als Agonist an glatten Muskelpräparaten in Gegenwart von Relaxantien oder Spasmolytika durchgeführt, so zeigt sich in jedem Fall ein Antagonismus in relaxierend wirksamen Konzentrationen gegenüber Calcium. Dieser Antagonismus ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einem Calcium-Antagonismus im Sinne einer Hemmung des Calcium-Einstroms in die Muskelzelle.“ (Pösch et al. 1985)

1.4.Calciumkanalblocker

Die Bezeichnung Calciumantagonisten wurde für Substanzen eingeführt, die den transmembranären Calciuminflux teilweise hemmen, indem sie den Calcium-Einstrom durch den so genannten langsamen, spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal während des Aktionspotentials verringern bzw. hemmen. Daher wird auch von Calcium-Antagonisten, Ca-channel-blocker oder Ca-entry-blocker gesprochen. Dieser Wirkungsmechanismus ist sowohl für die Wirkung auf die glatte Muskulatur, wie auch für die Herzmuskulatur gefordert. (Kuschinsky et al. 1984)

Sowohl aus chemischer als auch aus pharmakologischer Sicht stellen Calcium-Antagonisten keine einheitliche Substanzgruppe dar. Bei den so genannten reinen Calciumblockern unterscheidet man aufgrund ihres Angriffs an drei verschiedenen Bindungsstellen am Calciumkanal Verbindungen von drei Typen:

1,4- Dihydropyridin-Typ (Nifedipin-Typ)

Verapamil-Typ und

Diltiazem-Typ.

Trotz der strukturellen Unterschiede der Verbindungen, gibt es auch bemerkenswerte pharmakokinetische Gemeinsamkeiten. Alle Calciumkanalblocker werden durch CYP3A4 verstoffwechselt. Somit besteht die Möglichkeit von Arzneimittelinteraktionen mit allen Substanzen, die dieses Enzym induzieren oder hemmen. Diese Wechselwirkungen sind von großer Bedeutung, da sehr viele am Herz-Kreislauf-System angreifende Arzneistoffe mittels CYP3A4 biotransformiert werden. (Mutschler et al. 2001)

Alle Calciumkanalblocker binden an die alpha 1c-Untereinheit des L-Typ-Kanals, jedoch je nach Verbindungstyp an unterschiedlichen Bindungsstellen.

Pharmakodynamisch ist den drei Typen gemeinsam, dass sie infolge der Abnahme der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration, aber unterschiedlich stark, am Herzen die Aktivität der Calcium-abhängigen Myosin-ATPase verringern. Dadurch

nimmt der Umsatz an Phosphat und auch der Sauerstoffbedarf ab, dies führt an der glatten Muskulatur zu einer Erniedrigung des Gefäßmuskeltonus und damit zu einer Vasodilatation.

Calciumantagonisten bewirken somit eine direkte Verringerung der Herzarbeit durch Hemmung der elektromechanischen Kopplung und eine dadurch bedingte Erniedrigung der Kontraktilität (negativ inotrope Wirkung). Ferner auch eine indirekte Entlastung des Herzens durch Reduktion der Nachlast und auch der Vorlast. (Romero et al. 2003)

Die Verschiedenen Stoffgruppen unterscheiden sich auch in Bezug auf die Beeinflussung der Erregungsbildung im Sinusknoten und der Erregungsleitung im AV-Knoten. Nur die Calciumkanalblocker vom Verapamil- und Diltiazem-Typ wirken am Sinusknoten negativ chronotrop und am AV-Knoten negativ dromotrop. Durch das unterschiedliche Wirkprofil der Substanzgruppen ergeben sich auch unterschiedliche Indikationen. Indikation aller Typen sind koronare Herzkrankheit zur Anfallsprophylaxe bzw. Intervalltherapie als auch spastische Angina-Formen und Hypertonie. (Mutschler et al. 2001)

1.4.1. Pathophysiologische Charakterisierung der Ca-antagonisten:

„Ca-Antagonisten hemmen über eine Blockierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom L-Typ den Ca-Einstrom in die Zelle. Ihre Anwendung als Antiarrhythmikum und Koronartherapeutikum ergibt sich durch die Hemmung der Kalzium-abhängigen Myosin-ATPase, die auf einer Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration in der Herzmuskelzelle beruht. Auf diese Weise wird die Kontraktilität des Herzens und damit der Energie-u.Sauerstoffbedarf vermindert und das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf verbessert. Durch Erweiterung der peripheren Gefäße infolge einer Erschlaffung der Gefäßmuskulatur nimmt der periphere Widerstand im Gefäßsystem ab, so dass es indirekt auch wieder zu einer Entlastung des Herzens kommt. Die antihypertensive Wirkung der Calciumantagonisten kann auf diese arterielle Vasodilatation mit Verringerung des peripheren Widerstandes zurückgeführt werden.“ (Fleckenstein 1983)

1.4.2. Diltiazem.

Ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Calciumantagonisten, der gefäßerweiternd und im AV-Knoten des Herzens leitungsverzögernd wirkt. Diltiazem gehört zur Klasse der Benzothiazepinen. Angewendet wird es bei koronarer Herzkrankheit, stabiler und instabiler Angina Pectoris und insbesondere bei vasospastischer Angina Pectoris.

Nach oraler Gabe wird Diltiazem praktisch vollständig resorbiert. Die Bioverfügbarkeit liegt wegen eines deutlichen First-Pass-Effekts durch CYP3A4 dagegen nur bei 50%. Diltiazem hat eine Plasmahalbwertszeit von 4-5 Stunden und wird im Organismus desacetyliert und oxidativ O- und N-demethyliert. Die Ausscheidung erfolgt fast ausschließlich in Form von Metaboliten renal.

(Mutschler et al. 2001)

Kardiovaskuläre Krankheiten wie Hypertonie, Angina Pectoris oder supraventrikuläre Arrhythmien sind unter den wichtigsten Todesursachen der Welt. Für die Behandlung von Herzpathologien sind Calciumkanalblocker sehr wichtige Substanzen, infolge ihrer therapeutischen Vielseitigkeit. Obwohl wenige Calcium-Antagonisten beschrieben sind bis heute, sind diese strukturell mit Diltiazem und der Benzothiazepin-Klasse verbunden. Seit den 90ern beschäftigen sich mehrere Forschungsgruppen mit strukturellen Abwandlungen des Diltiazems, die ein ähnliches signifikantes Calciumblocker-Verhalten an den Tag legen sollen.

(Budriesi et al. 2007)

1.5.Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit war die genaue Untersuchung der Wirkung der neu synthetisierten Substanzen WHG 34 und WHG 33 PSA auf die Kontraktionskraft verschiedener isolierter Organe des Meerschweinchens und zu testen in welcher Konzentration die Wirkung auftritt. Da die beiden Substanzen Teilstrukturen des Calcium-Antagonisten Diltiazem beinhalten, sollte die Wirkung der Substanzen auch mit der Wirkung von Diltiazem verglichen werden.

Es wurden Untersuchungen an rechten Vorhöfen und an Musculus papillaris des Meerschweinchenherzens durchgeführt, um eine eventuell positiv oder negativ chronotrope bzw. inotrope Wirkung der Substanzen feststellen zu können.

Um den Einfluss der Kontraktilität auf die glatte Muskulatur zu testen, wurden Präparate der Arteria pulmonalis, der Aorta und des terminalen Ileums zu Versuchszwecken herangezogen.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche dienten Meerschweinchen (HIM-DH), weiblichen und männlichen Geschlechts, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 300-800g und einem Alter von wenigen Wochen. Die Tiere stammten aus der Abteilung für Labortierkunde und –genetik des Forschungsinstitutes für Versuchstierzucht und –haltung in Himberg.

Die nüchternen Meerschweinchen wurden durch einen gezielten Genickschlag getötet, um einen raschen und schmerzlosen Tod zu gewährleisten. Für die Durchführung der Versuche war die Verwendung von nüchternen Tieren von großer Bedeutung, um einen konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des Dünndarms zu erhalten.

2.2. Präparation der Organe

Nach dem Töten wurde der Thorax behutsam mit einer Schere geöffnet um die benötigten Organe ohne Schädigung entnehmen zu können.

Das Herz mit der Arteria pulmonalis musste so rasch wie möglich entnommen werden und sogleich in ein Becherglas mit frisch bereiteter Elektrolytlösung, die mit Oxy mix (95% O₂, 5% CO₂) begast wurde, eingebracht werden. Da es sonst zu einer Hypoxie bzw. Koagulation des Blutes im Herzen gekommen wäre.

Alle entnommenen Präparate wurden in einem Becherglas mit frisch bereiteter Nährlösung ausgewaschen. Die Präparation erfolgte in einer mit Elektrolytlösung gefüllten Petrischale mit Korkboden, die mit Oxy mix durchmischt wurde.

2.2.1. Isolierung des rechten Vorhofes

Da das Meerschweinchenherz nicht sehr groß ist, erfolgte die Trennung der Herzteile unter dem Mikroskop (Nikon SMZ-10A, Japan). Zunächst wurden mit einer Mikropräparierfederschere anhaftende Fettreste, Teile des Perikards und Reste der Lunge entfernt.

Danach wurde das Herz an Basis und Spitze mit Präpariernadeln fixiert um die Vorhöfe abzutrennen. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof und konnte unter dem Mikroskop nicht exakt lokalisiert werden. Daher musste äußerst vorsichtig gearbeitet werden, denn durch Verletzungen und Überdehnungen würde er aufhören zu schlagen und so für die Untersuchungen unbrauchbar werden.

Nach Abtrennung des linken vom rechten Vorhofes wurden, unter Verwendung eines Zwirnfadens, zwei Silberhäkchen angebracht, damit das Organ in die Apparatur eingespannt werden konnte.

Bis zu Beginn der Untersuchung kam der rechte Vorhof wieder in die begaste Nährlösung.

2.2.2. Isolierung des Musculus papillaris

Nach Abtrennung der Vorhöfe und der Pulmonalarterie konnte das Herz mit Präpariernadeln auf dem Korkboden der Petrischale wieder fixiert werden.

Um die Papillarmuskeln zu erreichen wurde der rechte Ventrikel geöffnet, indem ein Schnitt über die Pulmonalarterie entlang des Septums bis zur Herzspitze gemacht wurde. Während des Präparierens muss eine Überdehnung der Muskel vermieden werden, damit ihre Kontraktionskraft nicht verändert wird. Die Purkinjefasern, die für die Herzschrittmachertätigkeit zuständig sind, wurden vom Muskel entfernt, weil sie durch ihre Spontanaktivität den Versuchsablauf hätten negativ beeinflussen können.

Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde dann mittels Zwirnfaden ein Silberhäkchen befestigt, die Sehne durchtrennt und der Muskel vorsichtig herauspräpariert.

Verwendet wurden ausschließlich Muskeln mit einem maximalen Durchmesser von 0,87 Millimeter, da eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet sein musste.

Bis zu Versuchsbeginn wurden die Papillarmuskeln, wie auch schon der Vorhof, in begaster Nährlösung aufbewahrt. (Koch-Weser 1963)

2.2.3. Isolierung der Arteria pulmonalis

Die Präparation der Pulmonalarterie erfolgte wieder unter dem Mikroskop mit einer Federschere. Verwendet wurde der 5-10 mm lange Teil, der direkt vom Herzen weg führt, bis zur Aufgabelung in rechte und linke Arterie.

Nach der Abtrennung wurde das Präparat in der Petrischale mittels Nadeln fixiert und von überschüssigem Muskel- und Fettgewebe befreit. Anschließend wurden ringförmige Stücke von 2-3 Millimeter Länge abgeschnitten, welche nach Aufbewahrung in der Nährlösung in die Versuchsanordnung eingespannt wurden.

2.2.4. Isolierung der Aorta

Um die Aorta besser isolieren zu können, wurde nach der Entnahme des Herzens, der Thorax abgewaschen und das Brustbein auseinander gebrochen.

Dann wurde sehr vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere entlang des Rückgrades ein möglichst langes Stück der thorakalen Aorta herausgeschnitten.

Das ungefähr 3cm lange Stück wurde in ein Becherglas mit Nährlösung überführt.

Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop. Dazu wurde die Aorta in eine mit Kork ausgelegte, mit Nährlösung gefüllte Petrischale transferiert und mit Präpariernadeln fixiert. Das außen anhaftenden Fett- und Muskelgewebe wurde sorgfältig entfernt, wobei darauf zu achten war die Aorta nicht zu verletzen.

Anschließend wurde von dem Präparat ein 2-3 mm langes ringförmiges Stück abgeschnitten, welches später in die Versuchsanordnung eingespannt werden konnte. Bis zum Versuchsbeginn wurde die Aorta in mit Oxymix durchperlter Elektrolytlösung aufbewahrt.

2.2.5. Isolierung des terminalen Ileums

Nach Entnahme des Herzens und Öffnung des Bauchraums mittels einer Schere wurde der Dickdarm zur Seite geklappt. Nun wurde vorsichtig, ohne zu starken Druck oder Zug auf den Darm auszuüben, das terminale Ileum ca. 10cm vor der Einmündung des Ileums in das Caecum mit einem Faden abgebunden, um bei der weiteren Präparation die Enden nicht zu verwechseln, und mit einer Schere durchtrennt. Am caecalen Ende erfolgt diese Trennung relativ schräg vor den Peyer'schen Plaques. Das 10-20cm lange entnommene Darmstück wurde in ein Becherglas mit physiologischer Nährlösung eingebracht. Es musste darauf geachtet werden den Darm nicht zu stark zu dehnen, da dieser sehr empfindlich ist.

Für die weitere Präparation wurde am caecalen Ende ein Darmstück von ca. 1,5 bis 2 cm Länge schräg abgeschnitten. Dieses wurde in eine mit Kork ausgelegte und Elektrolytlösung gefüllte Petrischale übergeführt. Die beiden Enden des Darms wurden mit Präpariernadeln fixiert und zwar so, dass das Darmstück von innen nach außen durchstochen wurde. Falls der Darm mit Chymus gefüllt war, musste dieser vorher noch sorgfältig mit Hilfe einer Pipette, gefüllt mit Tyrode, vom „oberen zum unteren Ende“ durchgespült werden.

Unter dem Mikroskop wurde der Darm auch noch von anhaftendem Mesenterium mit einer Federschere vorsichtig entfernt.

Nun musste man zur Befestigung des Darmstückes in der Versuchsanordnung zwei Silberhäkchen am jejunalen und am caecalen Ende anbringen. Das obere Ende wurde mit einem roten, das untere mit einem schwarzen Zwirnfaden markiert, um beim späteren Einspannen in die Versuchsanordnung, einer Verwechslung der beiden Enden vorzubeugen.

Die Befestigung der Häkchen mit dem Faden erforderte ein gewisses Fingerspitzengefühl, um den Darm nicht zu verletzen oder zu weit zu dehnen. Auch durfte nicht vergessen werden eine kleine Öffnung übrig zu lassen, durch die in späterer Folge die Substanz durchströmen konnte.

Ein Stück eines Bindfadens wurde vorsichtig unter das Präparatende geschoben und wurde mit einem Zweifachknoten an dem schräg abgeschnittenen Ende so befestigt,

dass die Darmöffnung nicht verschlossen wurde. Am Knoten des Bindfadens konnte dann das Silberhäkchen angebracht werden. Diese Art der Befestigung ermöglichte während des Versuchs eine verbesserte Durchspülung des Ileums mit Nährlösung und Testsubstanz an der Darminnenseite.

Die so präparierten Darmstücke wurden in einer mit Oxymix durchperlten Tyrode aufbewahrt.

2.3. Physiologische Nähr- bzw. Elektrolytlösungen (Tyrode)

Die Elektrolytlösung für die Arteria pulmonalis, den rechten Vorhof, den Musculus papillaris, die Aorta und den terminalen Ileum wurde nach der Vorschrift von Reiter (1967), einer modifizierten Krebs-Henseleit Lösung, zubereitet.

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung

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

Die Nährlösung wurde jeden Tag frisch hergestellt.

Von den bereitgestellten Stocklösungen wurden die entsprechenden Mengen mit Ausnahme der CaCl₂ - Lösung in einen 1000ml Messkolben gefüllt, die Glucose eingewogen und mit Aqua bidestillata auf ca. ein $\frac{3}{4}$ der Füllmenge ergänzt. Nach 10-15 min Begasung mit Oxymix wurde anschließend das CaCl₂ tropfenweise unter weiterer Begasung zugesetzt, um eine Fällung der schwer löslichen Calciumsalze, in Form einer Trübung, zu vermeiden.

Schließlich wurde der Messkolben mit Aqua bidestillata bis zur Markierung aufgefüllt und zur optimalen Durchmischung einige Male geschwenkt.

Die Tyrode wurde jeden Tag frisch bereitete und dann in die Organbäder gefüllt, wo sie während des gesamten Versuchverlaufes temperiert und mit Oxymix (95% O₂ , 5% CO₂) begast wurde.

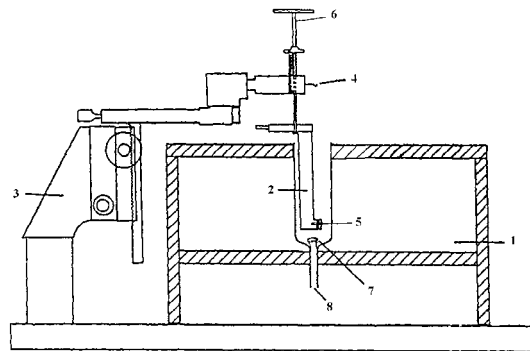
Einerseits war dies wichtig um einen konstanten pH-Wert von 7,2 – 7,4 im physiologischen Bereich zu gewährleisten, und andererseits um die isolierten Organe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen.

2.4.Versuchsanordnung

Für die Versuche standen zwei unterschiedliche Versuchsaapparaturen zur Verfügung. In Apparatur I waren Versuche mit dem Papillarmuskel und dem Vorhof, in Apparatur II mit dem Vorhof und allen anderen Organen möglich.

2.4.1. Versuchsaapparatur I

Abbildung 1 Versuchsaapparatur für den Papillarmuskel und den Vorhof



- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| 1 Wasserbad | 5 Fixierung und Elektrode |
| 2 Organhalterung | 6 Feintrieb |
| 3 Stativ | 7 Muskelkammer |
| 4 Aufhängevorrichtung Organ | 8 Gaszufuhr |

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsaapparatur zur isometrischen Messung der Kontraktionskraft elektrisch gereizter Papillarmuskel sowie zur Messung der Frequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe.

Ziel der Versuchsanordnung war das Herstellen von möglichst physiologischen Bedingungen.

Dafür erforderlich waren eine Temperatur von $35 \pm 1^\circ\text{C}$ beim Herz, diese wurde mittels Thermostats konstant gehalten, ein konstanter pH-Wert von 7,2-7,4 und eine kontinuierliche Versorgung der Präparate mit Sauerstoff und Nährlösung.

Das Organbad tauchte in ein Wasserbad, in dessen Abdeckung die Muskelkammer, deren Volumen 30ml betrug, integriert war. Diese Apparaturteile bestanden aus Acrylglas. Die Temperaturregulation des mit Aqua bidestillata gefüllten Wasserbades erfolgte durch drei, sich im Wasserbad befindlichen Heizstäben, welche mit dem Thermostaten und einem Kontaktthermometer verbunden waren.

Über eine Glasfritte wurde die Nährlösung für die gesamte Versuchsdauer gleichmäßig von unten mit Oxymix (Gasgemisch aus 95% O₂, 5% CO₂) begast, um die optimale Sauerstoffversorgung des Organes zu gewährleisten und zur Aufrechterhaltung eines optimalen physiologischen pH-Wertes. Dieses Oxymix kam aus einer Druckgasflasche.

Geringe Volumenverluste, bedingt durch die Verdunstung von Wasser im Laufe des Versuchstages, wurden vorsichtig mit Krebs-Henseleit-Lösung ergänzt.

Die 5 cm hohe Muskelkammer mit einem Durchmesser von 3 cm und einem Volumen von 30ml wurde in das Wasserbad getaucht und vor dem Versuch mit physiologischer Nährlösung gefüllt.

Die Füllung und Entleerung bzw. Spülung des Organbades erfolgte per Hand mit einer Kunststoffspritze mit befestigtem Gummischlauch.

Das Präparat wurde mittels dem am oberen Ende verknoteten Silberhäkchen in den Silberdraht eingehängt, der als Aufhängevorrichtung die Verbindung zum Kraftwandler darstellt. Das noch freihängende Organende wurde zwischen ein Plexiglasplättchen und eine Platin-Kathode eingespannt und durch Anziehen einer Feststellschraube in der Organhalterung fixiert.

Zur einfacheren Befestigung des Organes ermöglichte der Stativschlitten ein problemloses Heraus- bzw. Hineinführen der Organhalterung aus bzw. in die Muskelkammer. Der Kraftwandler diente zur Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen. Um die maximale Kontraktionskraft der Präparate zu erhalten, war das Anlegen einer der Eichung entsprechenden Vorspannung notwendig. (Reiter 1967)

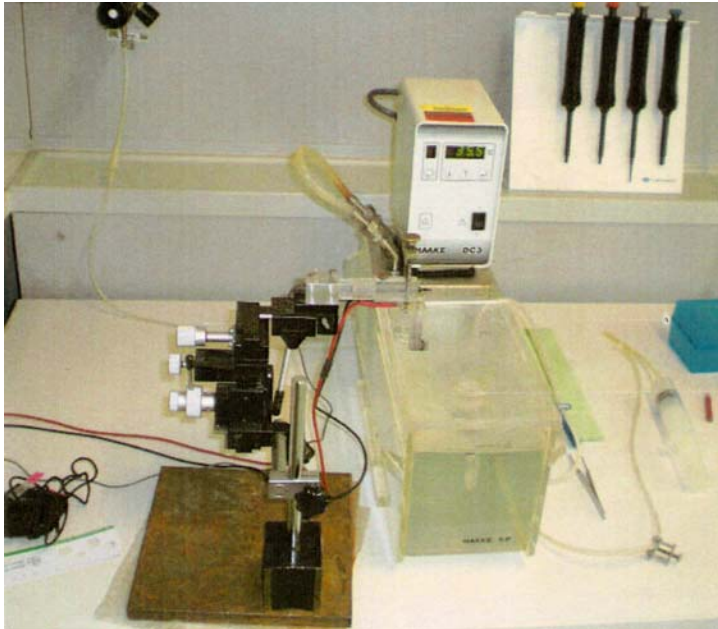
Diese individuell nötige Vorspannung wurde über den Feintrieb, nach Aktivierung des Schreibers und des Kraftwandlers, eingestellt.

Die Eichung der Messapparatur erfolgte durch Anbringung von Eichgewichten an der Organaufhängevorrichtung. Diese Gewichte wurden durch die Erdanziehungskraft nach unten gezogen und lieferten den Bezug zu der Kraft mit welcher das Organ während des Versuches kontrahierte.

Die isometrischen Kontraktionen wurden mit einem Kraftwandler und einem Verstärker (Transbridge TM, 4-Channel Transducer Amplifier) der Firma World Precision Instruments (WPI), Inc., Sarasota, FL, USA gemessen. Die Reizung der Papillarmuskel erfolgte über einen Accupulser A310 der Firma WPI (Hamden, CT, USA).

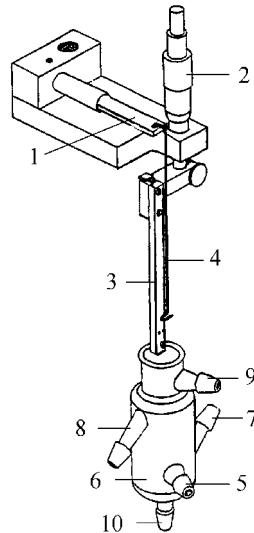
Sowohl die Ergebnisse der Versuchsreihe mit rechten Vorhöfen als auch der Kontraktionskraft von Papillarmuskeln wurden als Linien bzw. Ausschläge von einem Schreiber der Marke Flatbad Recorder BD-112, Dual Channel Firma Kipp & Zonen – Niederlande, aufgezeichnet.

Abbildung 2 Originalabbildung der Versuchsanordnung I



2.4.2. Versuchsapparatur II

Abbildung 3 Versuchsapparatur für Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum



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

Bei diesem Organbad besteht die Muskelkammer aus doppelwandigem Glas, durch das mittels Wasserbad gewärmtes Aqua bidestillata floss, so dass während der gesamten Versuchsdauer eine konstante Temperatur des Organbades von $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ herrschten und somit die physiologische Bedingungen gewährleistet waren.

Die Temperatur des Wasserbades wurde mittels eines Thermostates mit einer Heizspirale konstant gehalten. Die Gas- und Wasserzufuhr erfolgte über Schlauchanschlüsse an der Seite der Muskelkammer.

Das Organbad wurde von oben per Hand mit 27ml Nährlösung befüllt. Zum Wechseln oder Entleeren der Elektrolytlösung diente ein Abflussschlauch, der mit

einer Kunststoffquetschklemme verschlossen war, und sich am Boden des Organbades befand.

Das Präparat wurde mit dem Kraftwandler verbunden indem man es zwischen 2 Silberdrähte einspannte, der eine war an einem Steg fixiert, der andere wurde in die Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt. Die gesamte Apparatur war an einem Stativ befestigt und mit Hilfe eines Stativschlittens konnte die Organhalterung in das Organbad eingetaucht werden.

Zur Erreichung der maximalen Kontraktionskraft wurde die Vorspannung über das Mikrometer eingestellt.

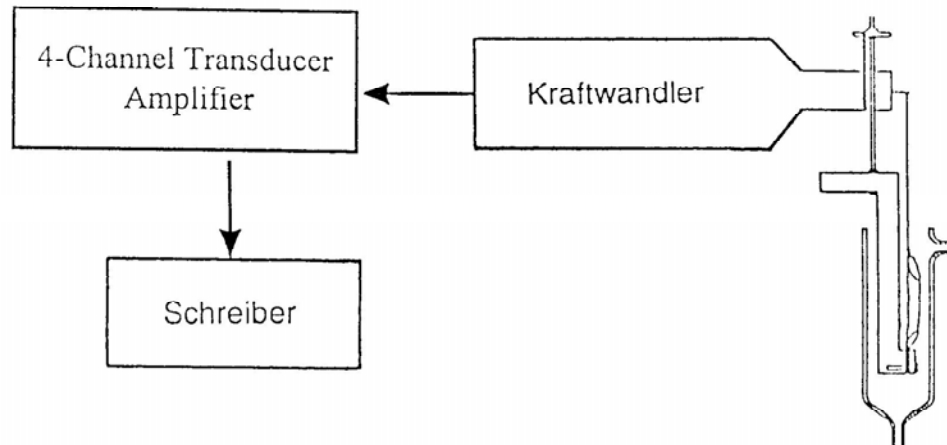
Wie bei Versuchsanordnung I wurden die Ergebnisse über den Kraftwandler und einen Verstärker zum Schreiben übertragen.

Abbildung 4 Originalabbildung der Versuchsanordnung II



2.4.3. Kraftwandler

Abbildung 5 Schematische Darstellung des Kraftmessung und Registrierung



Die Kontraktionskraftmessung mittels Kraftwandler beruht auf folgendem Prinzip:

Der Transformierung einer mechanischen Kraft in ein elektrisches Signal von einem Wandler („transducer“).

Verwendet wurde ein Widerstandswandler mit Dehnungsmessstreifen in Wheatstonscher Brückenschaltung. Der elektrische Widerstand des Messstreifens wurde durch Dehnung verändert, so dass bei einer Krafteinwirkung ein Strom proportional den Dehnungskräften fließt. Die durch eine Muskelkontraktion ausgelösten Signale wurden von einem „4-Channel Transducer Amplifier“ (World Precision Instruments, FL, USA) verstärkt. Die Registrierung erfolgte mit einem Schreiber (Dual Channel Model BD 112 Flatbed Recorder, Kipp & Zonen, NL-2600 Delft, Niederlande) mit automatischem Papiervorschub.

2.4.4. Gasversorgung

Die Gasversorgung der Versuchsaapparaturen, erfolgte über eine zentrale Gasflasche, zu den Ventilen in den Versuchsräumen und den Schläuchen zu den Apparaturen. Zur Feinzerstäubung diente eine Fritte am Ende der Schläuche. Die Regulierung der Dosierung und der Gasmenge erfolgte über an den Schläuchen angebrachte Schraubklemmen.

Das verwendete Gasgemisch namens Oxymix bestand aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid.

Eine konstante Gasversorgung während der gesamten Dauer der Versuche, war von großer Bedeutung, da ein optimaler physiologischer pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 und eine homogene Verteilung der Testsubstanz im Organbad gewährleistet sein mussten.

2.5.Versuchsablauf

2.5.1. Versuchsablauf beim rechten Vorhof

Das Vorhofpräparat wurde wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben mit den Silberhäkchen in die Apparatur eingespannt und in das mit Nährlösung gefüllte und erwärmte Organbad eingetaucht. Es folgte das Einschalten des Schreibers und des Verstärkers. Um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen wurde auf 10,4 mN vorgespannt. Diese Vorspannung wurde während der gesamten Versuchsdauer durch Regulation mit dem Feintrieb konstant gehalten. Aufgrund seiner Plastizität musste öfters nachjustiert werden.

Durch die Spontanaktivität des Sinusknotens war keine Reizung notwendig. In der ersten Phase, der so genannten Anpassungsphase, wurde solange gewartet - circa 30 Minuten - bis der Vorhof konstant und mit einer Frequenz von über 150 Schläge/Minute schlug. Danach folgte die Kontrollphase. Während dieser wurden alle 5 Minuten die Schläge aufgezeichnet und nach fünf konstanten Werten der Schlagfrequenz konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden, wobei mit der niedrigsten Konzentrationsstufe begonnen wurde. Die Substanz wurde kumulativ, mit einer Finnpiette der Nährlösung in der Muskelkammer zugesetzt. Die Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen betrug 45 Minuten. Gemessen wurde die Schlagfrequenz alle fünf Minuten über sechs Zentimeter auf einem Millimeterpapier bei 5mm/s Papiervorschub und mit Hilfe eines Schreibers registriert. Anschließend wurde die Schlagfrequenz abgezählt und mit 5 multipliziert, um auf die Schläge pro Minute zu kommen.

Bei der Einspritzung musste darauf geachtet werden, die Substanz möglichst nahe am Organ in die Nährlösung zu pipettieren ohne dieses zu berühren.

2.5.2. Versuchsablauf beim Musculus papillaris

Nach dem Einspannen des Muskels und dem Absenken in die Nährlösung, wie bereits in Kapitel 2.2.2. beschrieben, wurde eine Vorspannung entsprechend einer Kraft von 3,92 mN angelegt. Diese Ruhespannung ist für die maximale Kraftentwicklung des Papillarmuskels notwendig. Aufgrund der Plastizität des Muskels kam es im Laufe des Versuches zu einer scheinbaren Abnahme der Kontraktionskraft, somit zu einer Spannungsabnahme. Daher war es notwendig die Ruhespannung des Muskels mit Hilfe des Feintriebes zu justieren, um sie während des gesamten Versuchs hindurch konstant zu halten. (Reiter 1967)

Der Papillarmuskel, der im Gegensatz zum Sinusknoten keine Spontanaktivität aufwies, musste zur Stimulierung der Kontraktion elektrisch gereizt werden.

Das Reizgerät, AccupulserTM A310 (World Precision Instruments, Inc., FL, USA) war so eingestellt, dass der Muskel mit Rechteckimpulsen von 3ms Dauer und einer Frequenz von 1Hz gereizt wurde. Dabei wurde die Reizstromstärke 10% über der nötigen Schwellenstromstärke (Reizschwelle) gehalten. So konnte eine über diesen Wert hinausgehende Reizung (Überreizung) vermieden werden. Diese hätte sonst auf Dauer zu einer vollständigen Entleerung der Catecholaminspeicher geführt und hätte somit auch die Ergebnisse verfälschen können(Furchgott et al. 1959).

Andererseits durfte die Reizung des Muskels auch nicht zu knapp über der Schwellenstromstärke liegen, weil dadurch die Gefahr bestand, dass sich das Präparat nicht jede Sekunde kontrahierte und es zu einer Diskrepanz zwischen Reizfrequenz und Kontraktionsfrequenz kam. Es besteht eine Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Reizfrequenz.

In der Kontrollphase wurden alle 5 Minuten jeweils circa 3 Kontraktionsamplituden aufgezeichnet. Mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz konnte erst begonnen werden, wenn die Amplituden einen konstanten Wert hatten (nach circa 40 Minuten). Es wurde wie auch beim Vorhof mit der niedrigsten Konzentrationsstufe begonnen. Die Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen betrug jeweils 45 Minuten, in denen die Abnahme der Konzentrationsamplitude ein „steady state“ erreichte. Die

Dokumentation erfolgte mit einem Schreibgerät, das vom Beginn der Kontrollphase bis zum Versuchsende alle 5 Minuten für circa 5 Sekunden eingeschaltet wurde.

2.5.3. Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis

Die circa drei Millimeter dicken, präparierten Gefäßringe, wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben, wurden in die Apparatur so eingehängt, dass sie zwischen zwei Silberdrähten quer eingespannt wurden, ohne sie dabei zu sehr zu dehnen.

Anschließend wurde die Organhalterung mit dem Organstück in die vortemperierte mit Elektrolytlösung gefüllte Muskelkammer eingetaucht, sodass das Präparat vollständig mit Lösung bedeckt war. Dann wurde der Schreiber und der Verstärker aktiviert und mit dem Positionswahlschalter die Nulllinie definiert. Zur Erreichung der maximalen Kontraktionskraft der Pulmonalarterie wurde nun mit dem Feintrieb auf 9,81 mN vorgespannt, dann wieder auf die Nulllinie zurückgeschaltet. Diese Vorspannung ermöglichte eine maximale Kraftentwicklung. Die Anpassungsphase dauerte circa 45 Minuten, in der eventuelle Abweichungen von der definierten Nulllinie über den Feintrieb korrigiert wurden.

Nach dieser Anpassungszeit wurde die Tyrode durch 25ml einer 90 mM Kaliumchlorid-Lösung (0,67 g KCl in 100ml Elektrolytlösung) ersetzt. Dies war notwendig um wie beim Darm eine Vorkontraktion zu erreichen. Nach etwa 60-90 Minuten war ein konstantes Plateau erreicht. Dieses Plateau wurde als maximale Kontraktionskraft der glatten Muskelzellen gleich 100% gesetzt. Erst nach Erreichen dieser „steady state“, konnte die Substanz kumulativ zugegeben werden. Begonnen wurde wieder mit der niedrigsten Konzentration. Das Organ oder das Verbindungsstück sollte beim Einspritzen mit der Finnipette wieder nicht berührt werden.

Die Substanzzugabe der nächst höheren Konzentrationen erfolgte kumulativ nach 45 Minuten, Veränderungen wurden vom Schreiber aufgezeichnet und konnten so ausgewertet werden.

2.5.4. Versuchsablauf bei der Aorta

Der Versuchsablauf der Aorta entsprach dem in Kapitel 2.5.3. beschriebenen. Die Unterschiede bestanden darin, dass bei der Aorta eine Anpassungszeit von 60 Minuten und eine Vorspannung von 19,6 mN nötig war. Wegen der Elastizität des Gewebes wurde eine Abweichung von der Nulllinie mittels des Feintriebs korrigiert.

2.5.5. Versuchsablauf beim terminalen Ileum

Das wie in Kapitel 2.2.5. präparierte Darmstück wurde mit dem jejunalen Ende nach oben und dem caecalen Ende nach unten in die Versuchsanordnung eingespannt ohne dieses zu dehnen. Auch durften die Enden nicht komplett zugebunden sein, um eine bessere Durchströmung der Darminnenseite mit Nährlösung und Substanz zu erreichen. Danach wurde die Halterung mit dem Darmstück in ein vortemperiertes mit Elektrolytlösung gefülltes Organbad so tief eingetaucht, dass das Präparat vollständig mit Lösung bedeckt war. Danach folgte die Aktivierung des Schreibers und des Verstärkers. Dann wurde mit dem Feintrieb eine Vorspannung von 4,9 mN zur maximalen Kraftentwicklung der glatten Muskulatur angelegt. Das Darmstück musste nun bei der Anpassungsphase solange mit dem Feintrieb auf die Nulllinie gebracht werden, bis es schließlich von selbst circa 30 Minuten konstant auf der Nulllinie blieb. Darmstücke mit einer zu hohen Spontanaktivität, bei denen eine konstante Einstellung nicht möglich war, konnten für den Versuch nicht verwendet werden und mussten verworfen werden.

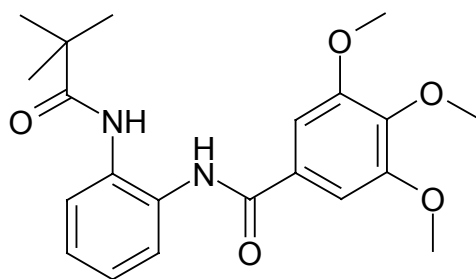
War nun eine konstante Bewegung des Ileums gegeben, wurde die Tyrode abgelassen und eine 60 mM Kaliumchlorid-Lösung (0,45 g KCl in 100ml Elektrolytlösung) eingefüllt. Die erhöhte Kaliumchloridkonzentration bewirkte eine sofortige Kontraktion des Organs, welche vom Schreiber aufgezeichnet wurde. Nach ungefähr 45 Minuten kam es zur Plateaubildung. Dieses Plateau fungierte als Bezugswert der maximalen Kontraktionskraft der glatten Muskelzellen des Ileums. Blieb das Plateau konstant konnte die Substanz kumulativ zugegeben werden. Begonnen wurde mit der niedrigsten Konzentration. Beim Einspritzen mit der FinnpiPETTE musste man darauf achten weder das Verbindungsstück, noch das Organ selbst zu berühren. Durch die ständige Durchperlung der Muskelkammer mit Oxymix verteilte sich die Substanzlösung rasch und homogen in der Nährlösung.

Die nächst höhere Substanzzugabe erfolgte alle 45 Minuten.

2.6. Testsubstanzen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden an den isolierten Organen des Meerschweinchens mit den Substanzen WHG33PSA und WHG34 durchgeführt. Diese Testsubstanzen wurden am Department für Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien neu synthetisiert und von Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt.

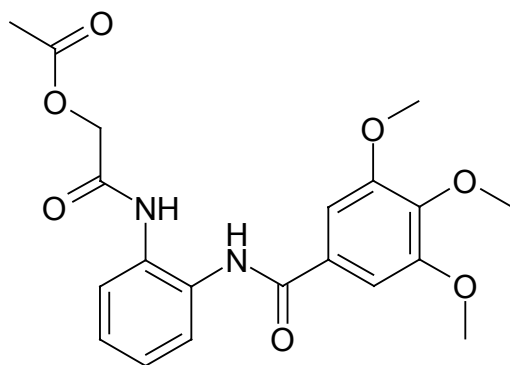
Abbildung 6 Strukturformel der Testsubstanz WHG33PSA



WHG 33 PSA
MG: 386.45
SF: C₂₁H₂₆N₂O₅

N1-{2-[(2,2-dimethylpropanoyl)amino]phenyl}-3,4,5-trimethoxybenzamid

Abbildung 7 Strukturformel der Testsubstanz WHG34



WHG 34
MG: 402.41
SF: C₂₀H₂₂N₂O₇

2-oxo-2-{2-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)amino]anilino}ethylacetat

Es wurden jeden Tag frische Stammlösungen der Testsubstanzen bereitet. Als Lösungsmittel fungierte Dimethylsulfoxid (DMSO).

Bei der Herstellung der Stammlösungen musste das unterschiedliche Kammervolumen (Organbadvolumen) von 8ml bzw. 25ml, je nach Typ der Versuchsanordnung, berücksichtigt werden. Die Berechnung der Einwaage musste so gewählt werden, dass sich bei kumulativer Zugabe der gelösten Substanz eine 100 μ molare Konzentration einstellte. Nach Berechnung wurde somit bei einer Konzentration von 100 μ mol/l 0,966mg (für das 25ml Organbad) oder 0,309mg (für das 8ml Organbad) von WHG33PSA bzw. 1,006mg (für das 25ml Organbad) oder 0,322mg (für das 8ml Organbad) von WHG34 eingewogen und in 100 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Die Organbadkonzentrationen wurden also für 1, 3, 10, 30 und 100 μ mol errechnet, wobei mit einer Finnpiette die Volumina von 1, 2, 7, 20 und 70 μ l eingespritzt wurden.

Begonnen wurde immer mit der niedrigsten Konzentration und alle 45 Minuten wurde die nächst höhere Substanzkonzentration injiziert. So war es jedes Mal möglich ein Plateau zu erreichen, so genannte "steady state" Bedingungen.

2.7.Messgrößen

2.7.1. Auswertung der Versuchsreihe mit rechten Vorhöfen

Die Messgröße dieser Versuche war die Spontanfrequenz. Für die richtige Berechnung der Schläge pro Zeiteinheit mussten die Parameter miteinbezogen werden, mit denen das Schreibgerät arbeitete. Bei einem Papiervorschub von 5 mm/s entsprachen die auf einer Papierstrecke von 6 cm aufgezeichneten Peaks der Anzahl der Schläge in 12 Sekunden. Es musste daher mit dem Faktor 5 multipliziert werden um die Schläge pro Minute zu bekommen.

2.7.2. Auswertung der Versuchsreihe mit den Musculus Papillaris

Bei diesen Versuchen wurden die Änderungen der Kontraktionsamplitude unter Einfluss der Testsubstanzen mit einem Schreibgerät registriert. Um die Kontraktionskraft in mN messen zu können, wurden die Kontraktionsamplituden mit Hilfe eines Lineals abgemessen und diese Werte mit einem Faktor multipliziert, der durch eine Eichung des Kraftwandlers festgestellt werden konnte. Daraus wurde die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft gegenüber dem Kontrollwert ausgerechnet.

2.7.3. Auswertung der Versuchsreihe mit pulmonalen Arterien , Aorten und terminalem Ilea

Die vom Schreiber aufgezeichneten Kontraktionsamplituden aller durchgeführten Versuche wurden mittels eines Lineals abgemessen und mit einem Faktor multipliziert, der durch eine Eichung des Kraftwandlers festgestellt werden konnte. So wurde die Kontraktionskraft an jedem konstanten Wert der Kontraktionskurve in mN gemessen.

Für jede Versuchsreihe dienten zur Ermittlung des arithmetischen Mittelwertes jeweils die „steady states“ ab der Kontrollphase.

Die EC_{50} wurde auf graphischem Wege aus der gemittelten Konzentrations-Wirkungskurve bestimmt. Sie signalisiert jene Konzentration der Testsubstanzen in $\mu\text{mol/l}$, bei der die Kontraktionskraft auf die Hälfte des Kontrollwertes absinkt.

2.8.Statistik

Aus den Messdaten der einzelnen Versuchsreihen wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler dieser Mittelwerte (SEM) von n Versuchen errechnet. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelte man auf graphischem Wege die EC_{50} – Werte in $\mu\text{mol/l}$. Die EC_{50} gibt jene Konzentration von WHG 34 und WHG 33 PSA an, bei der die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Ausgangswertes abgesunken ist. Die statistische Signifikanz der beobachteten Veränderungen der einzelnen Parameter wurde mit Hilfe des „Student-t-Tests für gepaarte Beobachtungen“ bestimmt.

Bei der Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$) wurden die Werte als signifikant bezeichnet, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant. Bei höheren Irrtumswahrscheinlichkeiten waren die Werte nicht signifikant (n.s.).

3. ERGEBNISSE

3.1. Testsubstanz WHG 33 PSA

3.1.1. Wirkung auf den rechten Vorhof.

Nach Erreichen einer konstanten Schlagfrequenz von $228 \pm 6,04$ konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. Bei der ersten Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer geringen Abnahme der Schläge pro Minute. Bei der nächst höheren Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ kam es zu einem nicht signifikanten sehr geringen Anstieg der Schlagfrequenz. Ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ nahm die Schlagfrequenz wieder ab. Bei der letzten Konzentrationsstufe wurde ein Wert von $167 \pm 5,61$ Schlägen pro Minute gemessen, was einem Prozentsatz von $73,39 \pm 2,82$ entspricht.

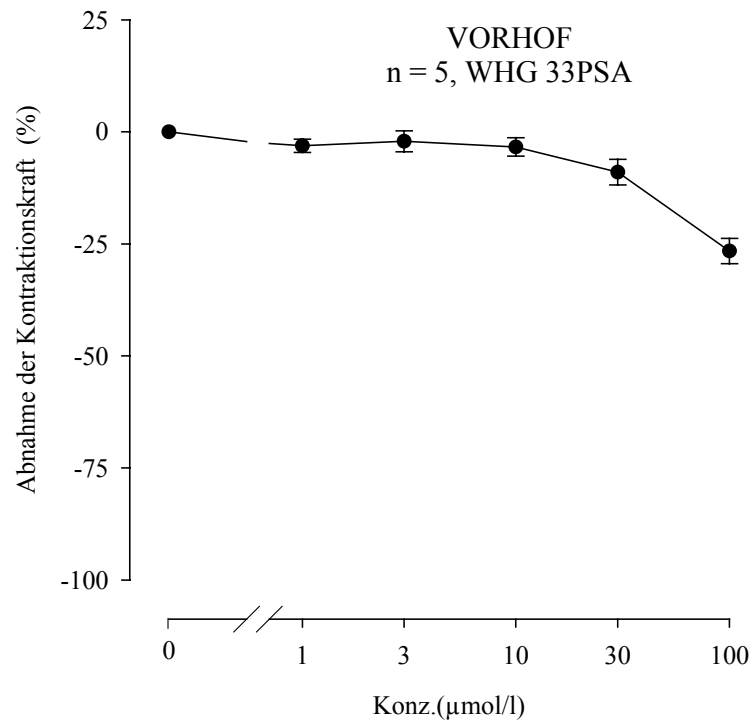
Die Wirkung erwies sich somit als negativ chronotrop.

Tabelle 2 Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des rechten Vorhofs

WHG 33PSA ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	228 $\pm$ 6,04	0 $\pm$ 0	5	-
1	221 $\pm$ 7,31	-3,1 $\pm$ 1,47	5	n.s.
3	223 $\pm$ 6,63	-2,11 $\pm$ 2,33	5	n.s.
10	220 $\pm$ 4,74	-3,37 $\pm$ 2,07	5	n.s.
30	207 $\pm$ 4,64	-8,99 $\pm$ 2,85	5	n.s.
100	167 $\pm$ 5,61	-26,61 $\pm$ 2,82	5	0,05

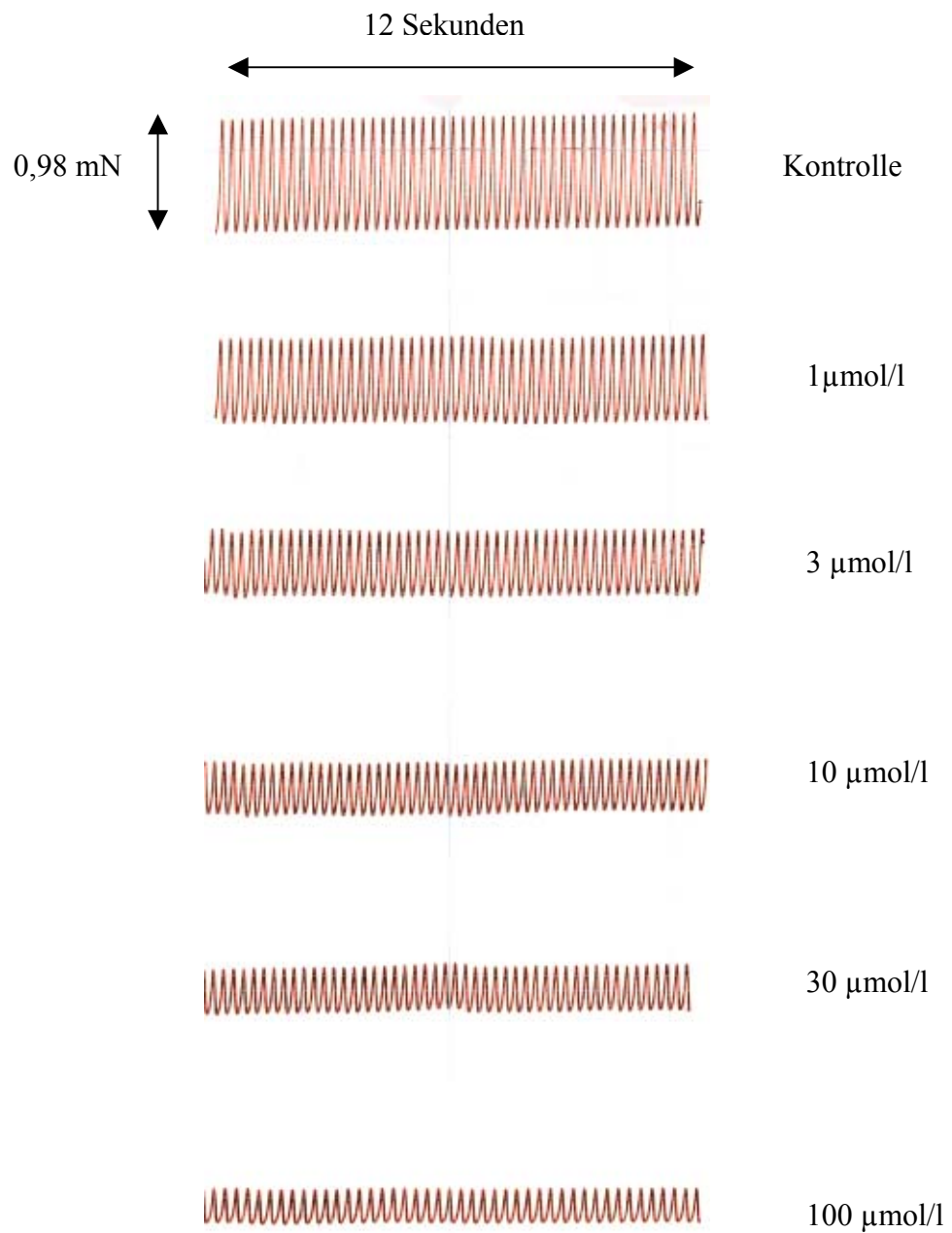
Die in Tabelle 2 dargestellten Werte sind neben den Konzentrationsangaben und der Anzahl der durchgeführten Versuche auch die arithmetischen Mittelwerte der Konzentrationsänderungen, sowohl in mN als auch in Prozent, und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Abbildung 8 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG33PSA auf den rechten Vorhof



Die Änderung der Schlagfrequenz wurde auf der Ordinate in Prozent, die Konzentration von WHG 33PSA in $\mu\text{mol/l}$ auf der Abszisse aufgetragen. Die Darstellung der arithmetischen Mittelwerte erfolgte als Punkte, der Standardfehler als Balken.

Abbildung 9 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 33PSA auf die Schlagfrequenz der Präparate des rechten Vorhof



In dieser Abbildung sind die Originalaufzeichnungen des Schreibers von einem der fünf Versuche an isolierten Vorhöfen ersichtlich. Es wurde die Anzahl der Schläge während eines zwölf Sekunden dauernden Zeitintervalls aufgezeichnet. Die Schlaganzahl wurde dann mit fünf multipliziert. Die kumulative Substanzzugabe erfolgte alle 45 Minuten.

3.1.2. Wirkung auf den Musculus papillaris

Nach dem Einspannen des Papillarmuskels wurde er durch elektrische Impulse zum Schlagen gebracht, wie schon in Kapitel 2.5.2. beschrieben. Aufgezeichnet wurden die Amplituden, deren Größe ein Maß für die Kontraktionskraft des Muskels darstellt.

Auch hier wurde zuerst ein Kontrollwert ermittelt. Dieser setzte sich aus fünf Werten zusammen und ist mit 100% festgesetzt worden.

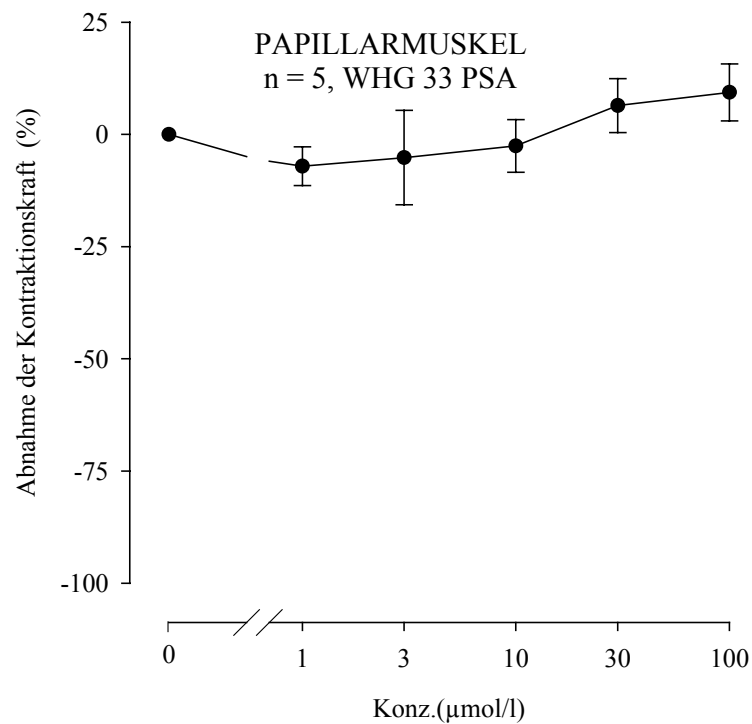
WHG 33PSA verursachte zuerst eine geringfügige Erniedrigung der Kontraktionskraft bis auf $97,42 \pm 5,86\%$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$. Danach kam es wieder zu einer Zunahme der Kontraktionskraft, die nach der letzten Substanzzugabe bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ mit $109,35 \pm 6,34$ endete.

Tabelle 3 Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Papillarmuskels

WHG 33PSA ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$2,29 \pm 0,87$	0 ± 0	5	-
1	$2,08 \pm 0,77$	$-7,08 \pm 4,31$	5	n.s.
3	$1,93 \pm 0,62$	$-5,18 \pm 10,53$	5	n.s.
10	$2,05 \pm 0,69$	$-2,58 \pm 5,86$	5	n.s.
30	$2,25 \pm 0,77$	$6,42 \pm 6,02$	5	n.s.
100	$2,30 \pm 0,77$	$9,35 \pm 6,34$	5	n.s.

Diese Tabelle gibt den Kontrollwert und die auf ihn bezogenen arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und % aus fünf Versuchen wieder. Nebenbei sind auch deren Standardfehler und die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

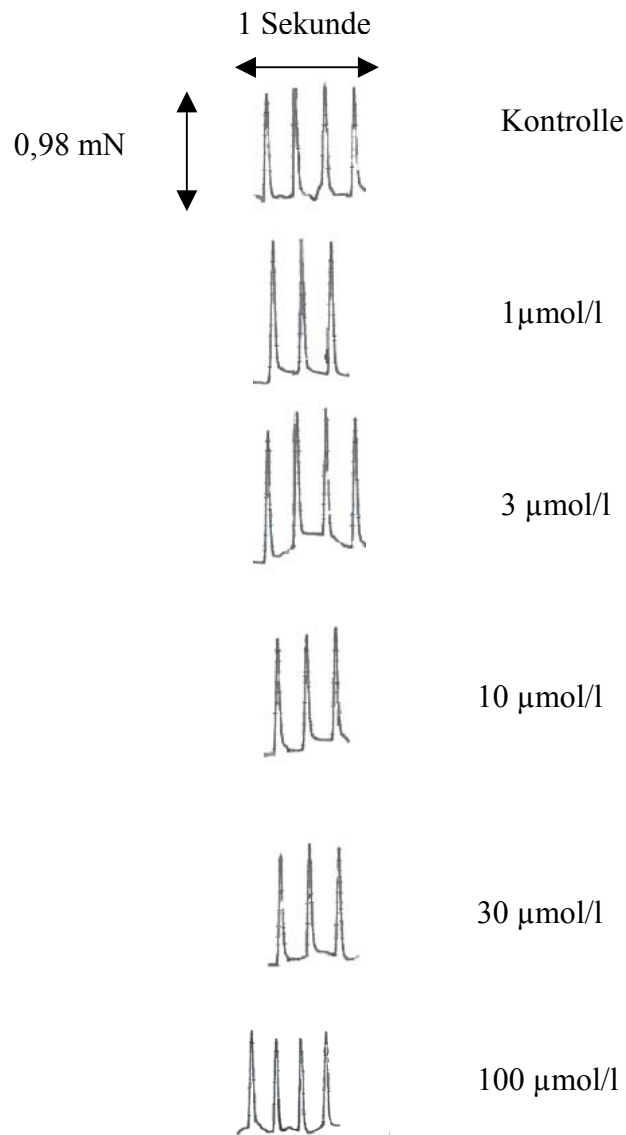
Abbildung 10 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 33PSA auf isolierte Präparate des Papillarmuskels



Auf der Abszisse werden die unterschiedlichen Konzentrationen von 1 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der Ordinate die prozentuale Zunahme der Kontraktionskraft.

Die in der Abbildung dargestellten Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar und die Balken die Standardabweichung.

Abbildung 11 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft isolierter Präparate des Papillarmuskels



Die Kontraktionskraft ist in dieser Originalabbildung aus der Größe der Amplituden ersichtlich, die von einem Schreiber aufgezeichnet wurden. Die Einwirkzeit der verschiedenen Konzentrationen von WHG 33PSA betrug jeweils 45 Minuten.

Die Abbildungen lassen die Kontraktionskraft am Ende der Kontrollphase bzw. am Ende der Einwirkzeit der jeweiligen Konzentrationen erkennen.

3.1.3. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Nach der Vorkontraktion der Pulmonalarterie mit einer 90 mM Kaliumchloridlösung und einer Anpassungszeit wurde die in 100 µl gelöste Testsubstanz WHG 33PSA kumulativ alle 45 Minuten eingespritzt. Getestet wurde die Abnahme der Kontraktionskraft bezogen auf den Kontrollwert.

Dieser Kontrollwert wurde kurz vor der ersten Substanzzugabe bei der „steady state“ Bedingungen herrschten und als 100% angenommen.

Es wurden fünf Versuche gemacht und ein Mittelwert der Kontrollwerte von $15,59 \pm 1,97$ mN errechnet.

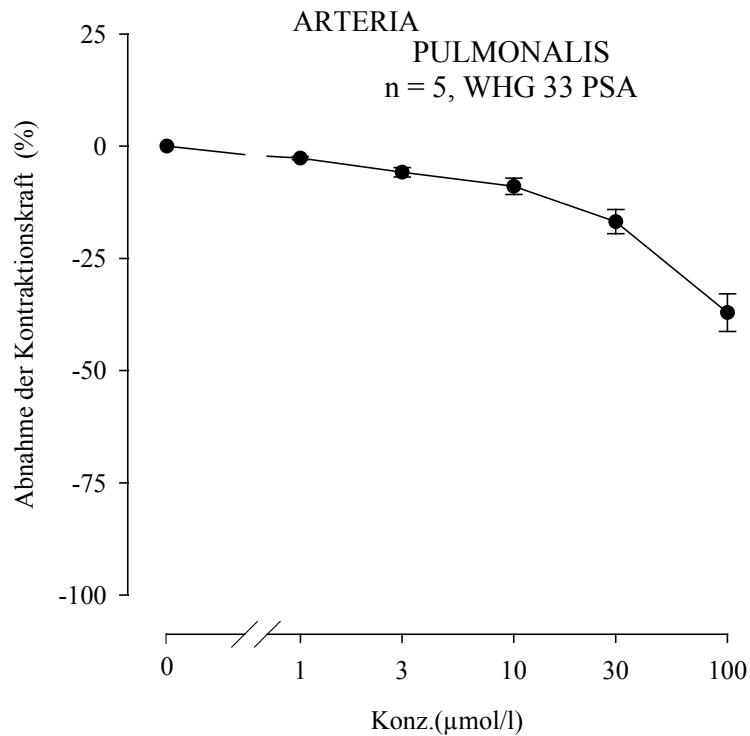
Die Auswertung ergab eine stetige Abnahme der Kontraktionskraft auf bis zu $10,08 \pm 1,61$ mN bei 100 µmol/l.

Tabelle 4 Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Arterie pulmonalis

WHG 33PSA (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	15,59±1,97	0±0	5	-
1	15,20±1,95	-2,68±0,36	5	n.s.
3	14,75±1,94	-5,83±1,06	5	n.s.
10	14,24±2,02	-8,95±1,82	5	n.s.
30	13,12±1,84	-16,81±2,70	5	n.s.
100	10,08±1,61	-37,08±4,18	5	0,05

Die in Tabelle 4 enthaltenen Werte sind neben den Konzentrationsangaben und der Irrtumswahrscheinlichkeit, die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionsänderungen in mN wie auch in Prozent und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

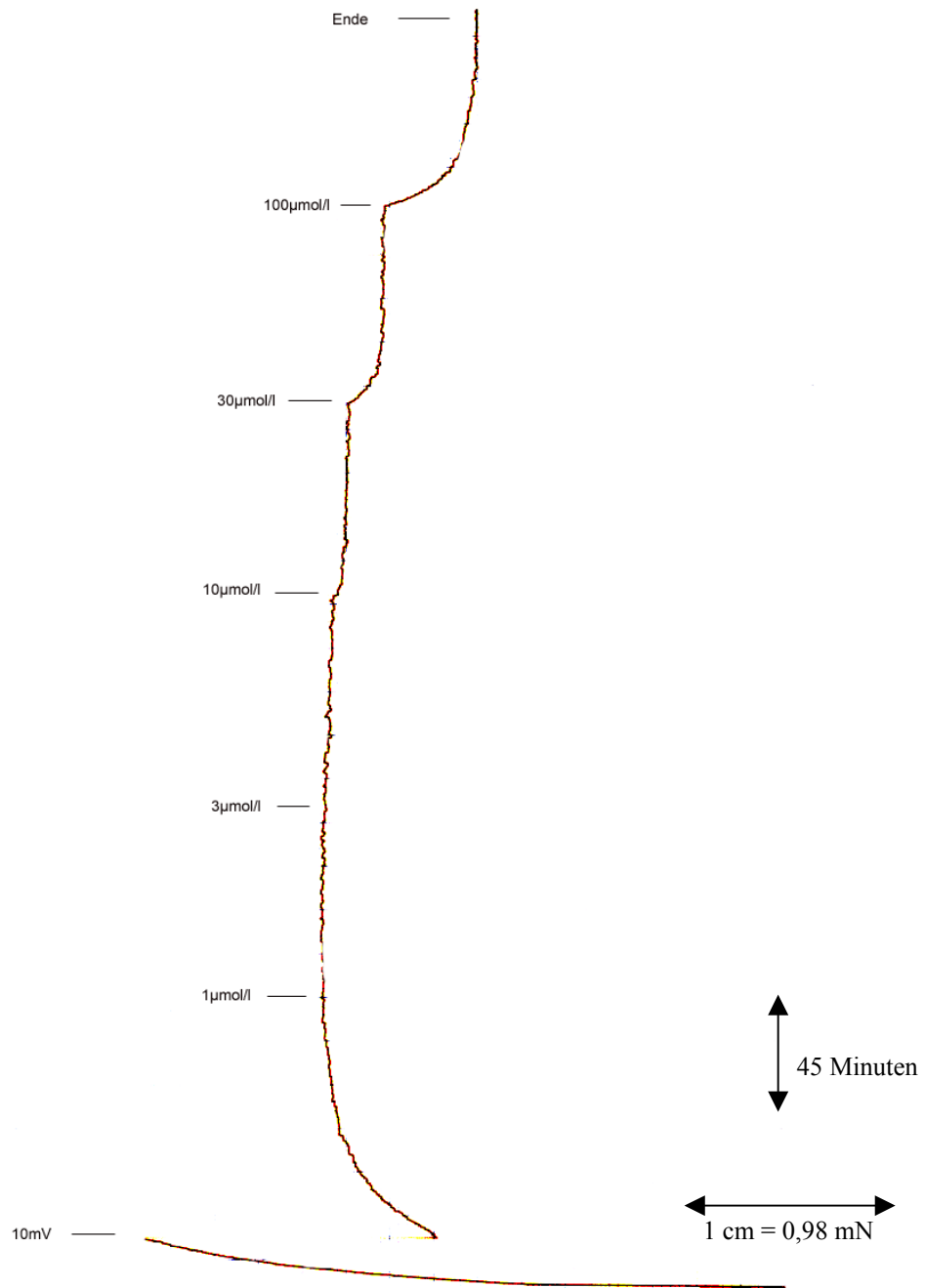
Abbildung 12 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 33PSA auf isolierte Arteria pulmonalis Präparate



Die Abbildung 12 stellt die Abnahme der Kontraktionskraft nach der kumulativen Substanzzugabe von WHG 33PSA graphisch dar. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ und auf der Ordinate die Konzentrationsabnahme in Prozent aufgetragen.

Als Punkte wurden die arithmetischen Mittelwerte und als Balken ihre Standardfehler (SEM) dargestellt.

Abbildung 13 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft der Pulmonalarterie



Die Kurve gibt die Kontraktionsänderung der isolierten Pulmonalarterie nach der kumulativen Zugabe von WHG 33PSA in den verschiedenen Konzentrationen wieder. Der zeitliche Abstand zwischen den Substanzzugaben betrug 45 Minuten.

3.1.4. Wirkung auf die Aorta

Die Aorta wurde mit einer 90 mM Kaliumchloridlösung vorkontrahiert und nach Abwarten des Endes der Plateauphase konnte mit der Zugabe der Testsubstanz WHG 33PSA in den verschiedenen Konzentrationen begonnen werden. Die Anpassungszeit zwischen den einzelnen Substanzzugaben lag bei 45 Minuten.

Als 100% wurde der Kontrollwert $8,03 \pm 1,12$ mN errechnet.

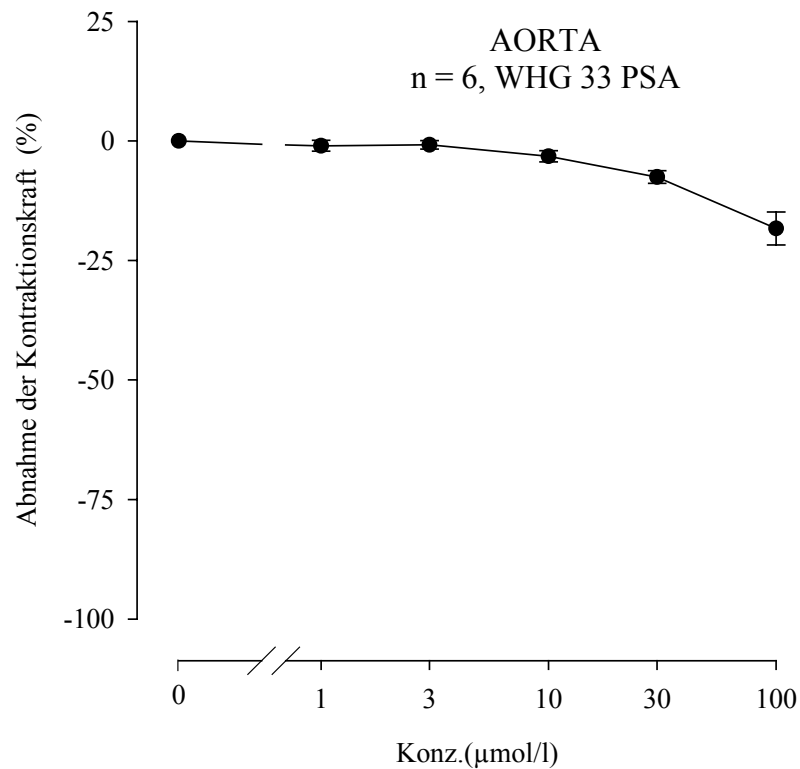
Die Kontraktionskraft der Aorta-Präparate nahm im Laufe des Versuches stetig ab, bis auf die sehr geringe Zunahme bei 3 $\mu\text{mol/l}$. Der niedrigste Wert von $81,70 \pm 3,45\%$ wurde bei der letzten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ gemessen.

Tabelle 5 Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Aorta

WHG 33PSA ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$8,03 \pm 1,12$	0 ± 0	6	-
1	$7,96 \pm 1,12$	$-1,01 \pm 1,14$	6	n.s.
3	$7,96 \pm 1,09$	$-0,81 \pm 0,89$	6	n.s.
10	$7,79 \pm 1,11$	$-3,22 \pm 1,16$	6	n.s.
30	$7,47 \pm 1,11$	$-7,53 \pm 1,32$	6	n.s.
100	$6,71 \pm 1,15$	$-18,3 \pm 3,45$	6	0,05

Neben den arithmetischen Mittelwerten in mN und Prozent enthält diese Tabelle auch deren Standardfehler (SEM), die Anzahl der durchgeführten Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle.

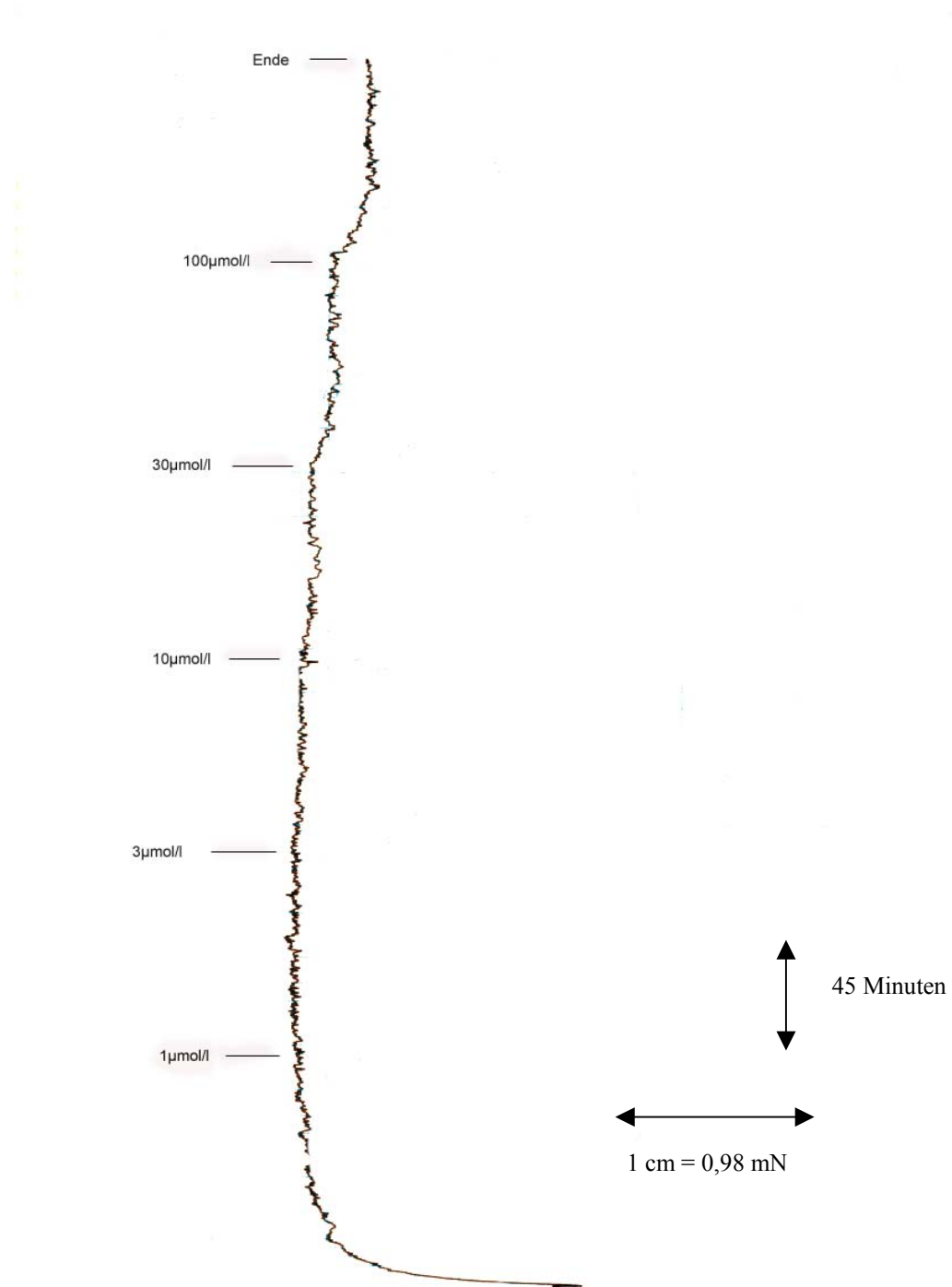
Abbildung 14 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 33PSA auf isolierte Aorta-Präparate



Auf der Abszisse werden die unterschiedlichen Konzentrationen von 1 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der Ordinate die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft.

Die in der Abbildung zu sehenden Punkte, stellen die arithmetischen Mittelwerte der sechs Versuche dar und die Balken den Standardfehler.

Abbildung 15 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft isolierter Aorta-Präparate



Diese Kurve gibt die Kontraktionsänderung, nach kumulativer Zugabe von WHG 33PSA, alle 45 Minuten wieder.

3.1.5. Wirkung auf das terminale Ileum

Die isolierten Präparate des Darms wurden mit einer 60mM Kaliumchloridlösung zuerst vokontrahiert. 100% der Kontraktionskraft wurden mit dem Kontrollwert von $17,76 \pm 3,71$ mN definiert. Die Änderungen der Kontraktionskraft durch WHG 33PSA wurde in sechs Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Es war von Anfang an, ab der ersten Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$, eine stetige Abnahme der Kontraktion zu beobachten. Das Ende des Versuches, bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$, markierte ein Wert von $6,49 \pm 2,04$ mN. Dies entspricht $33,88 \pm 5,09\%$. Es konnte somit auch eine EC_{50} von $47 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden.

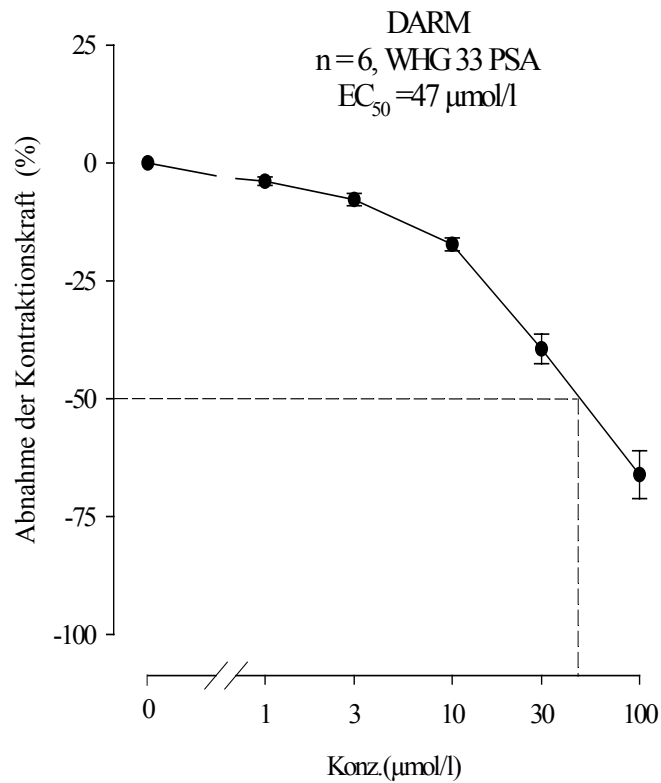
Tabelle 6 Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des terminalen Ileum

WHG 33PSA ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$17,76 \pm 3,71$	0 ± 0	6	-
1	$17,06 \pm 3,53$	$-3,86 \pm 0,91$	6	n.s.
3	$16,34 \pm 3,36$	$-7,77 \pm 1,31$	6	n.s.
10	$14,63 \pm 3,05$	$-17,25 \pm 1,36$	6	0,05
30	$10,86 \pm 2,58$	$-39,44 \pm 3,13$	6	0,01
100	$6,49 \pm 2,04$	$-66,12 \pm 5,09$	6	0,01

Tabelle 6 enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft, die dazugehörigen Prozentzahlen und Standardfehler aus sechs Versuchen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit.

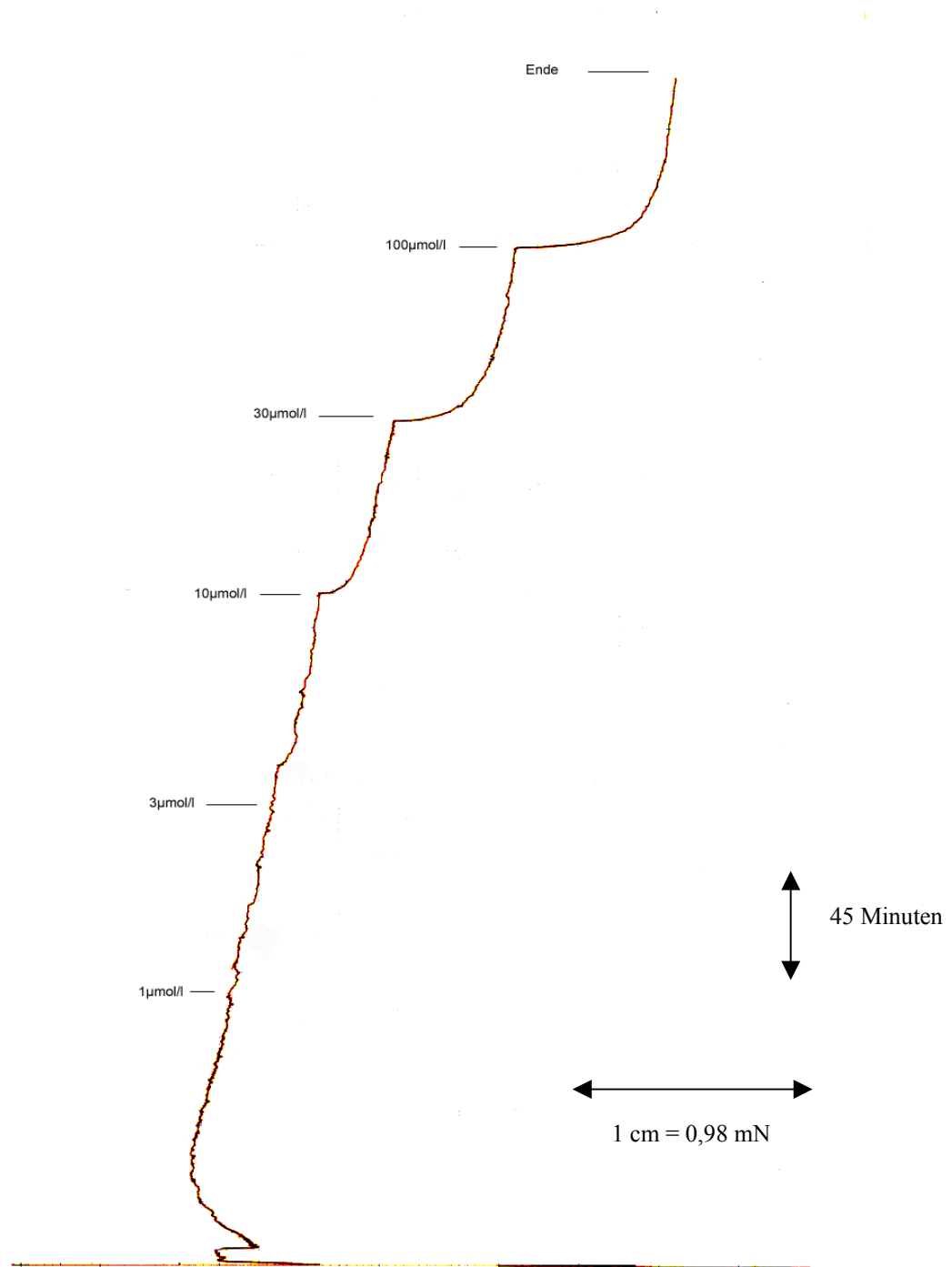
Die Werte werden alle auf die Kontrolle bezogen.

Abbildung 16 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 33PSA auf den Darm



Auf der Abszisse werden die Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 33PSA, auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft aufgetragen. Die in der Graphik zu sehenden Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte und die Balken, die Standardabweichung dar. Die eingezeichneten gestrichelten Linien in der Graphik weisen auf die erreichte EC₅₀ von 47 µmol/l hin.

Abbildung 17 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 33PSA auf die Kontraktionskraft des Darms



Diese Kurve gibt die Änderung der Kontraktion bei Erhöhung der Konzentration, alle 45 Minuten, wieder.

3.2. Testsubstanz WHG 34

3.2.1. Wirkung auf den rechten Vorhof.

Nach dem Erreichen einer konstanten Schlagfrequenz, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Als ermittelter Kontrollwert und somit 100% wurden $245 \pm 3,45$ mN festgelegt. Bei den ersten beiden Konzentrationen kam es zu einem Anstieg der Schlagfrequenz um insgesamt 6,14%.

Doch ab der Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ war eine gering negativ chronotrope Wirkung zu beobachten.

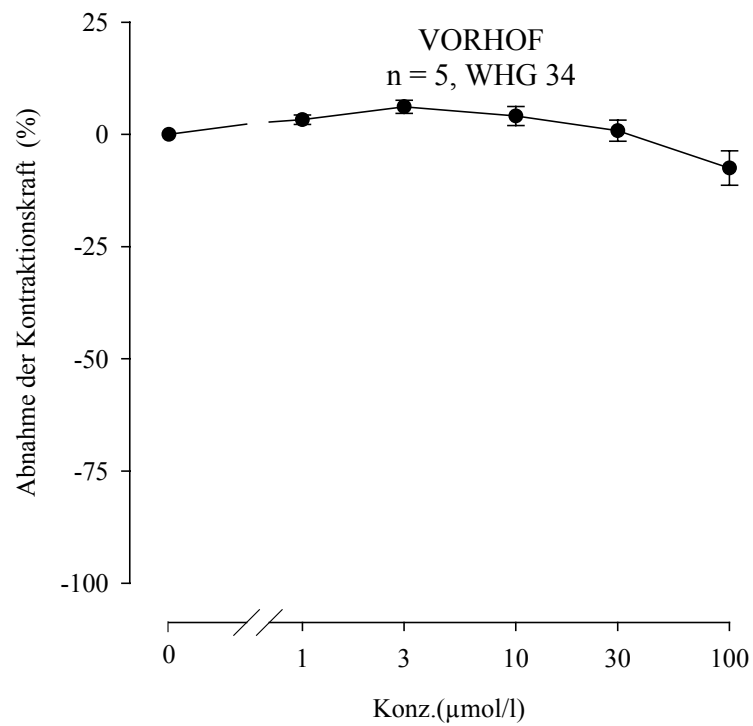
Bei der letzten Konzentration wurde ein Wert von $231 \pm 7,48$ erreicht, dies entspricht $92,50 \pm 3,82$ %.

Tabelle 7 Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Vorhof

WHG 34 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$245 \pm 3,45$	0 ± 0	5	-
1	$253 \pm 4,06$	$3,28 \pm 1,04$	5	n.s.
3	$260 \pm 4,18$	$6,14 \pm 1,44$	5	n.s.
10	$255 \pm 6,12$	$4,09 \pm 2,12$	5	n.s.
30	$247 \pm 6,44$	$0,83 \pm 2,34$	5	n.s.
100	$231 \pm 7,48$	$-7,5 \pm 3,82$	5	n.s.

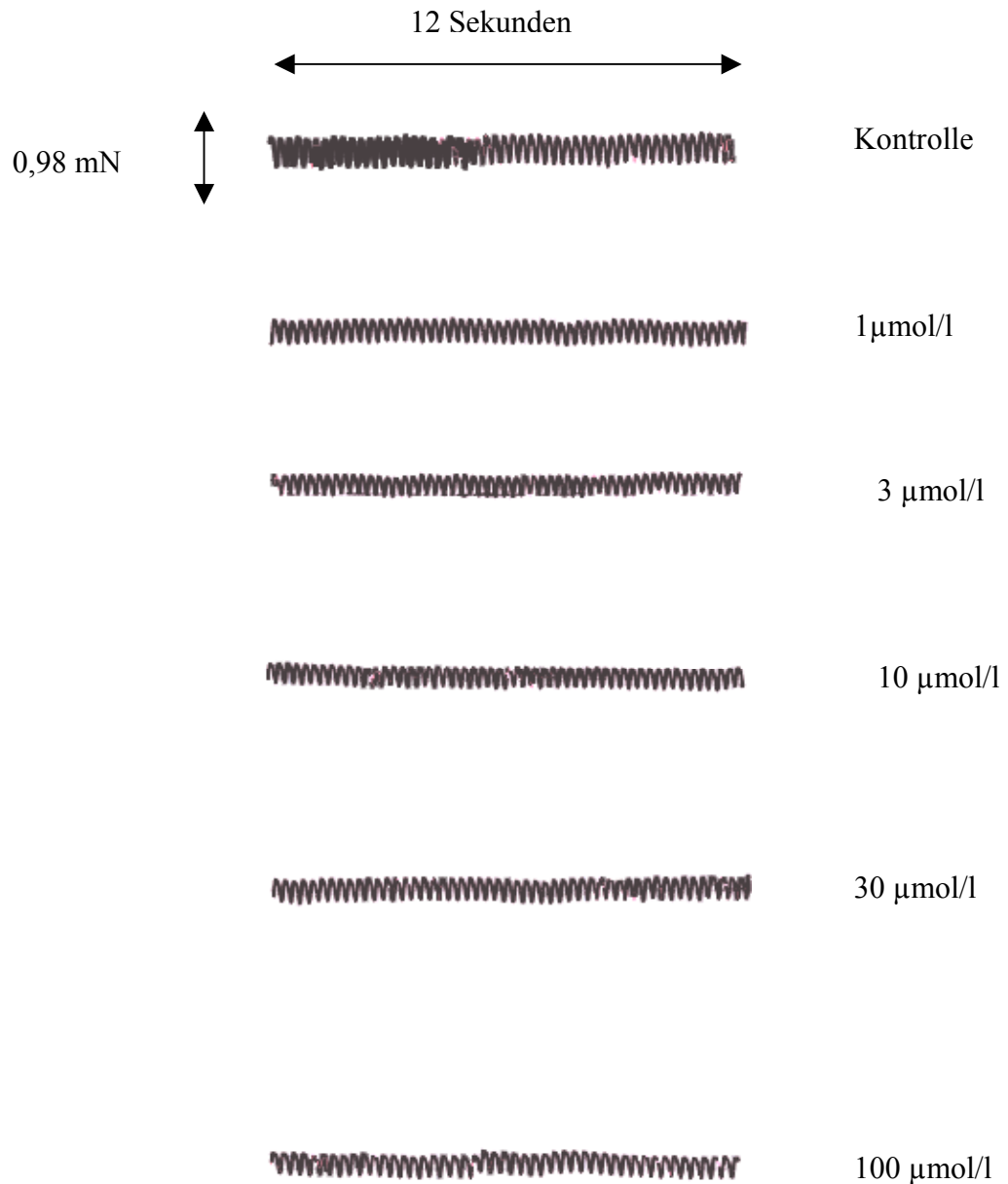
Die Tabelle enthält zu den arithmetischen Mittelwerten und deren Standardfehlern (SEM), die Irrtumswahrscheinlichkeit und die Anzahl der Versuche.

Abbildung 18 Konzentrations-Wirkungskurve von WHG34 auf den rechten Vorhof



Die Konzentrationsstufen 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ werden auf der x-Achse aufgetragen, die Abnahme der Schlagfrequenz auf der y-Achse. Die Markierung der arithmetischen Mittelwerte erfolgen durch die Punkte, ihre Standardfehler durch die Balken.

Abbildung 19 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG34 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs



Die Abbildung zeigt die Abnahme der Schlagfrequenz eines isolierten rechten Vorhofs in den verschiedenen Konzentrationen, die alle 45 Minuten zugesetzt wurden.

3.2.2. Wirkung auf den Musculus papillaris

Die Präparate des Papillarmuskels wurden in die Versuchsanordnung I eingespannt und zur Kontraktion angeregt, mittels eines Reizgerätes.

Nachdem sich der Kontrollwert von $1,32 \pm 0,49$ mN über einen Zeitraum von circa 40 Minuten nicht verändert hatte, konnte mit der kumulativen Zugabe der in 100 μ l DMSO gelösten Testsubstanz WHG 34 begonnen werden.

Der Kontrollwert wurde als 100 Prozent definiert.

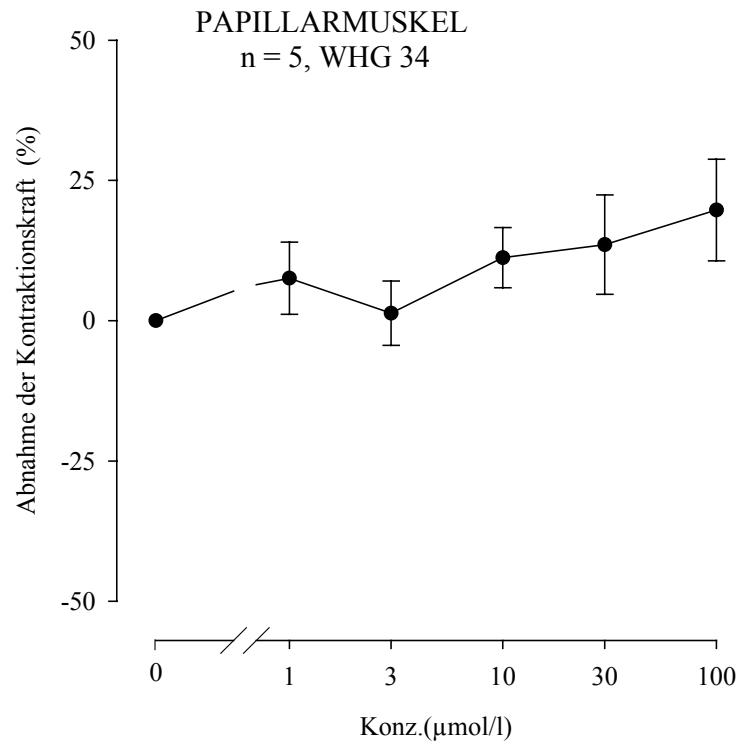
WHG 34 zeigte eine schwach positiv inotrope Wirkung. Das Maximum wurde mit $119,72 \pm 9,06\%$ bei einer Konzentration von 100 μ mol/l erreicht. Davor kam es einmal bei der Konzentration von 3 μ mol/l zu einem leichten Abfall der Kontraktion.

Tabelle 8 Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Papillarmuskels

WHG 34 (μmol/l)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	1,32 $\pm$ 0,49	0 $\pm$ 0	5	-
1	1,34 $\pm$ 0,42	7,57 $\pm$ 6,43	5	n.s.
3	1,29 $\pm$ 0,44	1,34 $\pm$ 5,75	5	n.s.
10	1,52 $\pm$ 0,62	11,24 $\pm$ 5,36	5	n.s.
30	1,36 $\pm$ 0,37	13,56 $\pm$ 8,85	5	n.s.
100	1,48 $\pm$ 0,44	19,72 $\pm$ 9,06	5	0,05

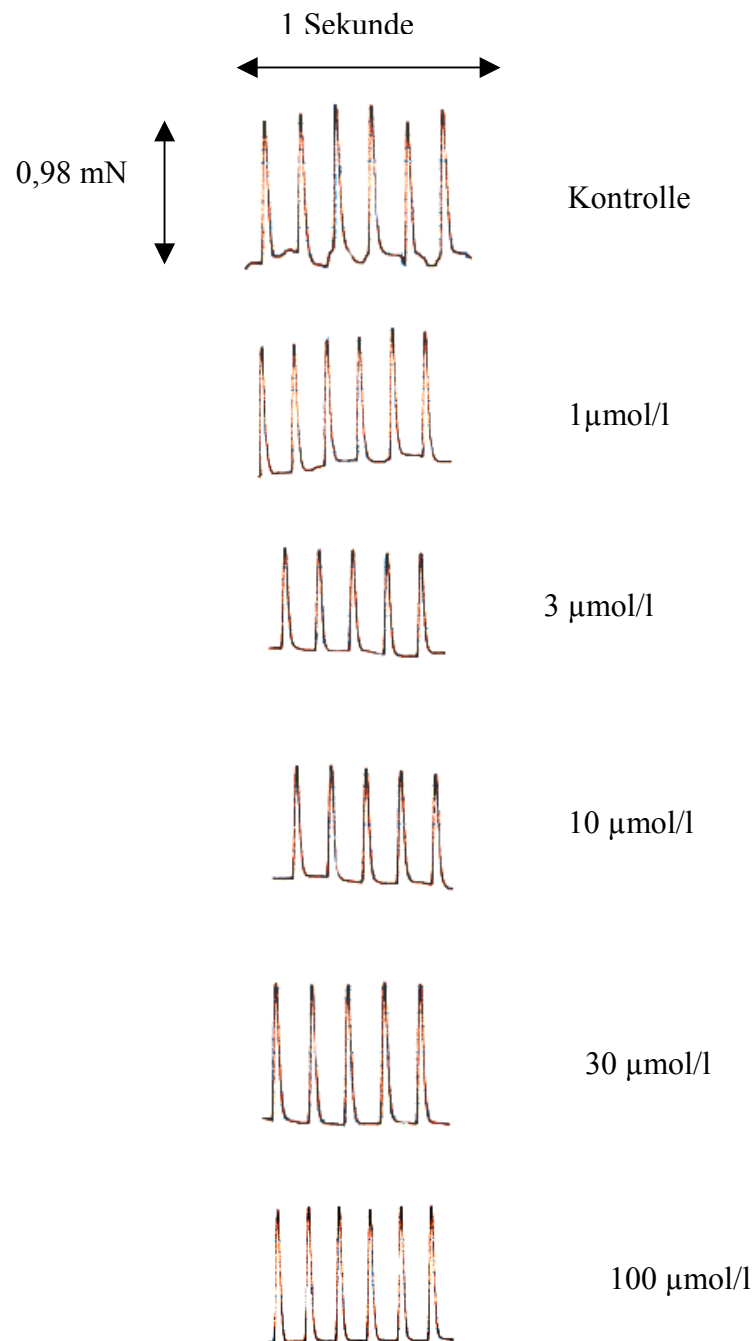
Die Tabelle zeigt neben den arithmetischen Mittelwerten und deren Standardfehlern (SEM) auch die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit. Die Werte wurden bezogen auf die Kontrolle und in mN und % angegeben.

Abbildung 20 Konzentration-Wirkungskurve von WHG 34 am isolierten Papillarmuskel



Die Graphik zeigt die Änderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels nach der kumulativen Zugabe von der Testsubstanz WHG 34. Die Konzentrationen in µmol/l wurden auf der x-Achse und die Kontraktionszunahme in % wurden auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte, die Balken ihre Standardabweichung.

Abbildung 21 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft isolierter Präparate des Papillarmuskels



Die Originalabbildung zeigt den Einfluss von WHG 34 auf die Größe der Amplitude.
Der Zeitabstand zwischen zwei Einspritzungen betrug 45 Minuten.

3.2.3. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Zuerst wurde die Pulmonalarterie mit einer 90 mM Kaliumchloridlösung vorkontrahiert. Nach einer bestimmten Anpassungszeit wurde die gelöste Testsubstanz WHG 34 alle 45 Minuten kumulativ eingespritzt. Getestet wurde die Abnahme der Kontraktionskraft bezogen auf einen Kontrollwert. Es wurden fünf Versuche gemacht und ein Mittelwert der Kontrollwerte von $18,21 \pm 3,51$ mN ermittelt.

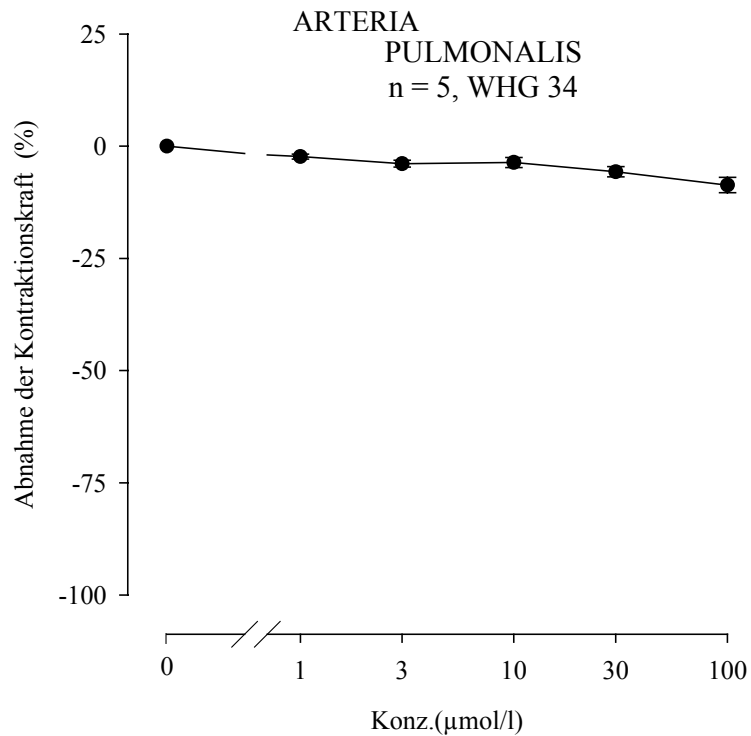
Die Auswertung ergab eine nicht signifikante geringe Abnahme der Kontraktionskraft auf $16,80 \pm 3,49$ mN bei der letzten Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 9 Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Arteria pulmonalis

WHG 34 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$18,21 \pm 3,51$	0 ± 0	5	-
1	$17,75 \pm 3,54$	$-2,31 \pm 0,57$	5	n.s.
3	$17,59 \pm 3,51$	$-3,91 \pm 0,76$	5	n.s.
10	$17,64 \pm 3,54$	$-3,64 \pm 1,10$	5	n.s.
30	$17,28 \pm 3,49$	$-5,7 \pm 1,14$	5	n.s.
100	$16,80 \pm 3,49$	$-8,67 \pm 1,71$	5	n.s.

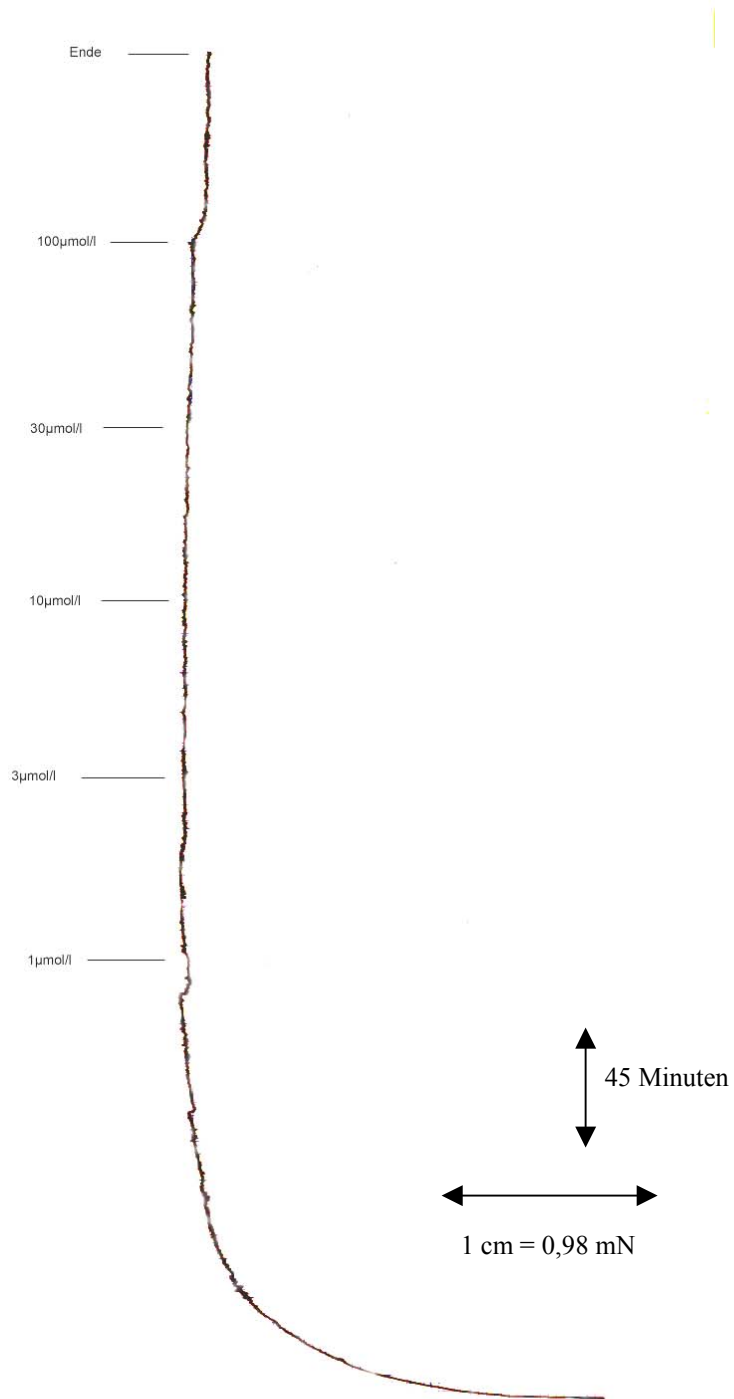
Die in der Tabelle enthaltenen Werte sind neben den Konzentrationsangaben, die arithmetischen Mittelwerte in mN und Prozent, wie auch die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Abbildung 22 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 34 auf isolierte Pulmonalarterien



Die Abbildung stellt die Abnahme der Kontraktionskraft nach der kumulativen Substanzzugabe von WHG 34 graphisch dar. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen und auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme aufgetragen. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte und die Balken ihre Standardfehler dar.

Abbildung 23 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft der Pulmonalarterie



Diese Kurve gibt die Kontraktionsänderung nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz alle 45 Minuten, wieder.

3.2.4. Wirkung auf die Aorta

Die Aorta wurde zuerst vorkontrahiert mit einer 90mM Kaliumchloridlösung und nach Einstellen eines gleichbleibenden Kontrollwertes konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden.

Der Kontrollwert mit 100% wurde mit $10,798 \pm 1,432$ mN errechnet.

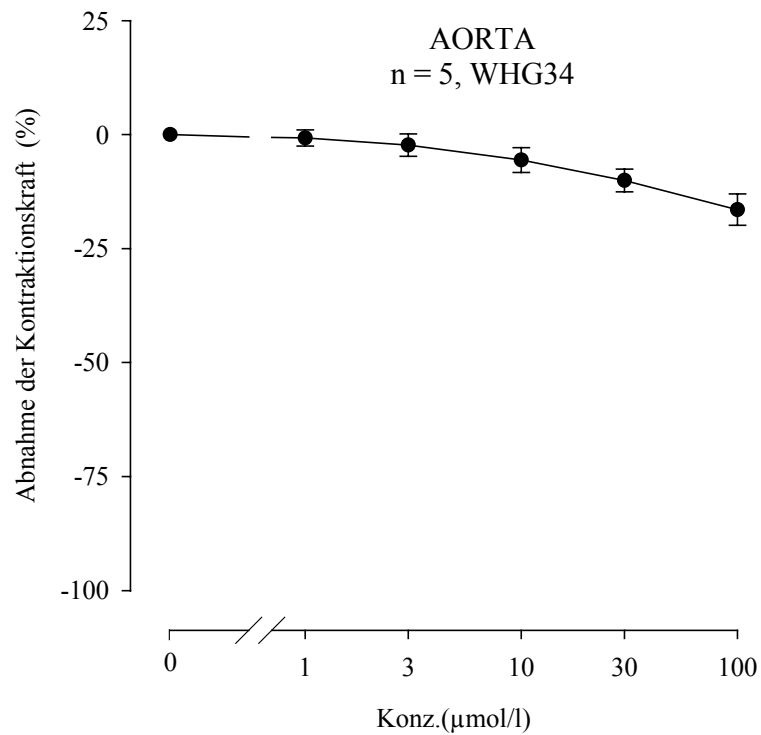
Die Kontraktionskraft der Aorta-Präparate nahm im Verlauf des Versuches gering und nicht signifikant ab. Der niedrigste Wert von $83,544 \pm 3,429\%$ wurde bei der letzten Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ gemessen

Tabelle 10 Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des Aorta

WHG 34 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$10,798 \pm 1,432$	0 ± 0	5	-
1	$10,620 \pm 1,263$	$-0,744 \pm 1,761$	5	n.s.
3	$10,416 \pm 1,195$	$-2,298 \pm 2,452$	5	n.s.
10	$10,096 \pm 1,188$	$-5,572 \pm 2,735$	5	n.s.
30	$9,674 \pm 1,221$	$-10,068 \pm 2,479$	5	0,05
100	$9,078 \pm 1,284$	$-16,456 \pm 3,429$	5	0,05

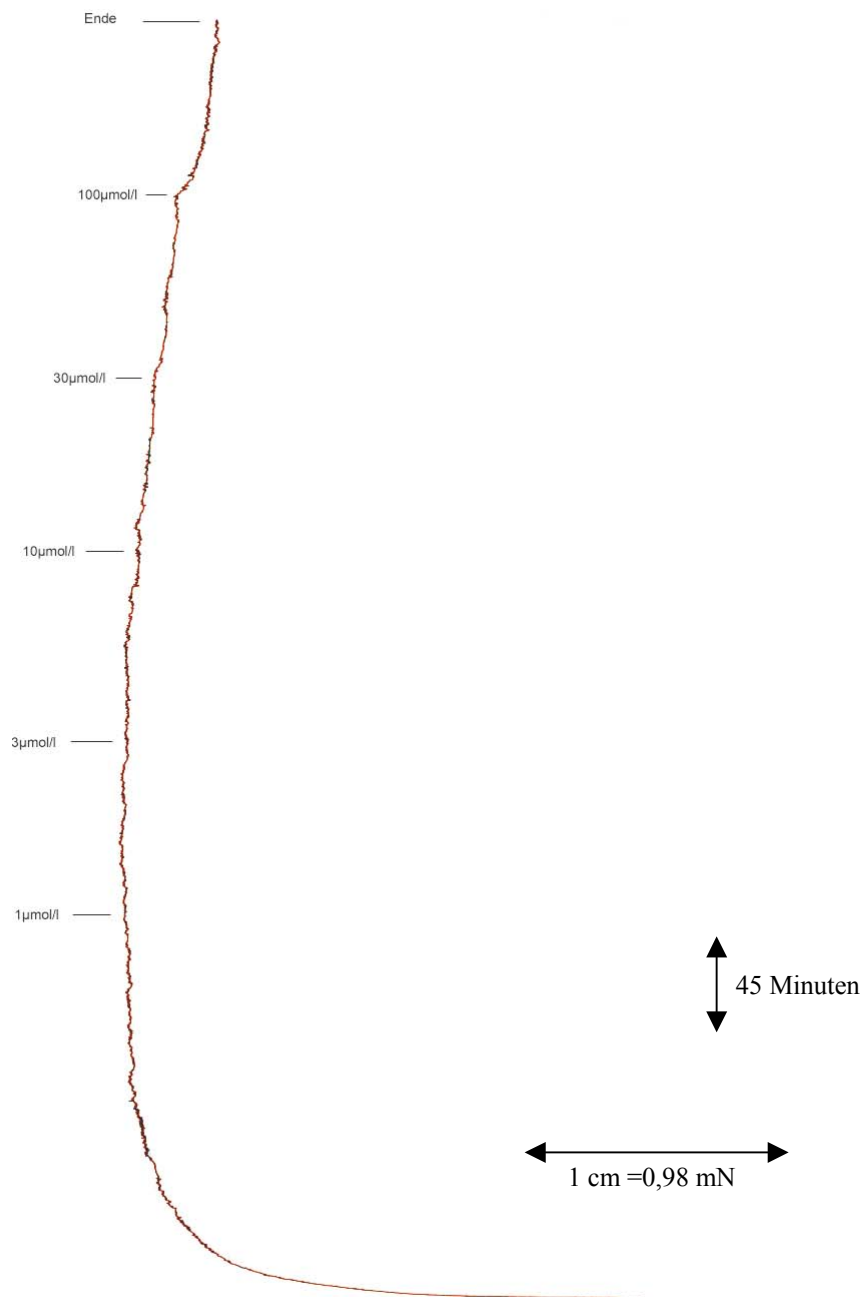
Die Tabelle gibt die erhaltenen arithmetischen Mittelwerte aus fünf Versuchen wieder. Ebenso sind ihre Standardfehler und die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

Abbildung 24 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 34 auf isolierte Aorta-
präparate



Auf der Abszisse werden die unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz WHG 34 aufgetragen und auf der Ordinate die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft. Die in der Abbildung zu sehenden Punkte sind die arithmetischen Mittelwerte und die Balken deren Standardabweichung.

Abbildung 25 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft isolierter Aorta-Präparate



Die Kurve gibt die Kontraktionsänderung nach kumulativer Substanzzugabe, alle 45 Minuten wieder.

3.2.5. Wirkung auf das terminale Ileum

Die isolierten Darmpräparate wurden zuerst vorkontrahiert. Es wurden fünf Versuche gemacht und getestet ob die Substanz WHG 34 eine Änderung der Kontraktionskraft des Darms bewirkt.

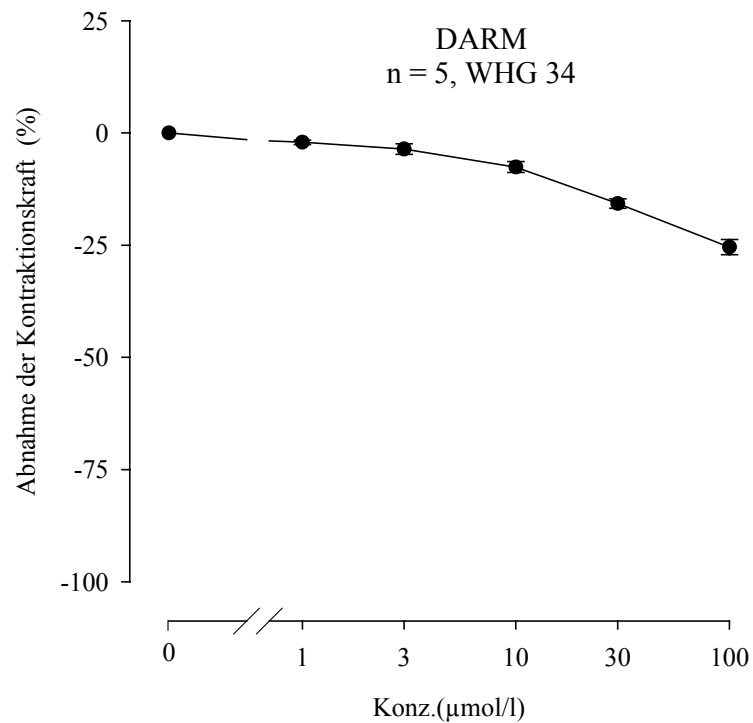
Der Kontrollwert wurde mit $12,87 \pm 1,70$ mN berechnet und als 100 Prozent definiert. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft des Darms. Am Ende des Versuches erreichte die 100 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration einen Wert von $9,67 \pm 1,40$ mN das $74,57 \pm 1,70\%$ entspricht.

Tabelle 11 Wirkung von WHG 34 auf die Kontraktionskraft von isolierten Präparaten des terminalen Ileum

WHG 34 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	12,87 $\pm$ 1,70	0 $\pm$ 0	5	-
1	12,61 $\pm$ 1,69	-2,09 $\pm$ 0,52	5	n.s.
3	12,38 $\pm$ 1,60	-3,59 $\pm$ 1,16	5	n.s.
10	11,89 $\pm$ 1,58	-7,6 $\pm$ 1,23	5	n.s.
30	10,86 $\pm$ 1,48	-15,74 $\pm$ 1,05	5	0,05
100	9,67 $\pm$ 1,40	-25,43 $\pm$ 1,70	5	0,05

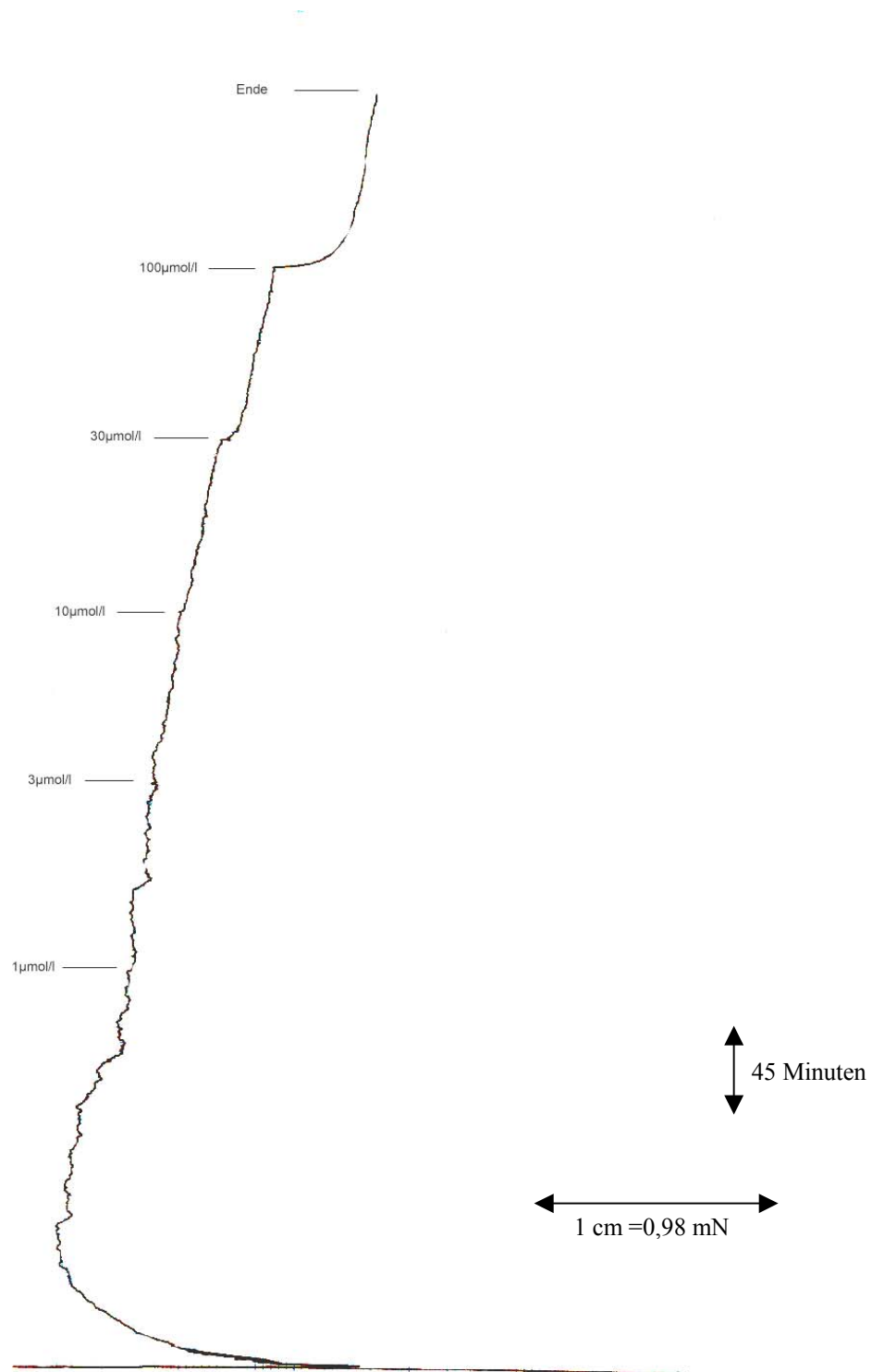
Aus der Tabelle 11 sind nicht nur die arithmetischen Mittelwerte, sondern auch ihre Standardabweichungen, bezogen auf den Kontrollwert, ersichtlich. Die Angabe der Werte erfolgte in mN und Prozent.

Abbildung 26 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 34 auf isolierte Darmpräparate



Die Abbildung soll graphisch die Abnahme der Kontraktion darstellen. Auf der Abszisse werden die Konzentrationen von 1 bis 100 µmol/l aufgetragen und auf der Ordinate die Änderung in Prozent. Die dargestellten Punkte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 27 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 34 auf isolierte Darm-
Präparate



Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums durch das Einwirken von WHG 34.

3.3. Einfluss des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf die isolierten Organe

Da das verwendete Lösungsmittel eine Wirkung auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskel, Pulmonalarterie, Aorta und Darm aufzeigte, mussten die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche in die der Testsubstanzen miteinbezogen werden.

3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

Tabelle 12 Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

DMSO Musculus papillaris	fc ±SEM	fc ± SEM	Anzahl der Versuche
µmol/l	(mN)	(%)	n
Kontrolle	0,47 ±0,06	0 ±0	3
1	0,46 ±0,08	-3,70 ±3,70	3
3	0,43 ±0,07	-10,42 ±3,84	3
10	0,36 ±0,05	-23,70 ±90,82	3
30	0,29 ±0,03	-73,40 ±2,32	3
100	0,25 ±0,02	-45,95± 10,26	3

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und %, und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Tabelle 13 Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

DMSO Arteria pulmonalis	fc ±SEM	fc ± SEM	Anzahl der Versuche
μmol/l	(mN)	(%)	n
Kontrolle	8,43±1,03	0 ±0	3
1	8,62 ±0,93	-2,72 ±1,72	3
3	8,71 ±0,85	-4,01 ±3,05	3
10	8,69 ±0,96	-3,39 ±1,38	3
30	8,72±0,98	-3,74 ±1,24	3
100	8,66 ±1,00	-2,91 ±1,03	3

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und % bei 3 Versuchen.

3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

Tabelle 14: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO Aorta	fc ±SEM	fc ± SEM	Anzahl der Versuche
μmol/l	(mN)	(%)	n
Kontrolle	9,78 ±2,14	0 ±0	3
1	10,00 ±2,23	-1,84 ±0,95	3
3	10,00 ±2,21	-1,93 ±0,91	3
10	9,95 ±2,20	-1,51 ±1,38	3
30	9,92 ±2,20	-1,08±2,46	3
100	9,83 ±2,15	-0,34 ±2,34	3

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und %, daneben die Anzahl der durchgeführten Versuche.

3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum

Tabelle 15 Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum

DMSO terminales Ileum	fc ±SEM	fc ± SEM	Anzahl der Versuche
μmol/l	(mN)	(%)	n
Kontrolle	30,54 ±10,19	0 ±0	3
1	30,26 ±10,18	-1,51 ±0,53	3
3	29,64 ±10,10	-4,56 ±1,92	3
10	29,09 ±10,28	-8,66 ±3,38	3
30	28,48 ±10,24	-11,59±3,65	3
100	28,83 ±10,12	-19,35 ±4,2	3

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und % und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

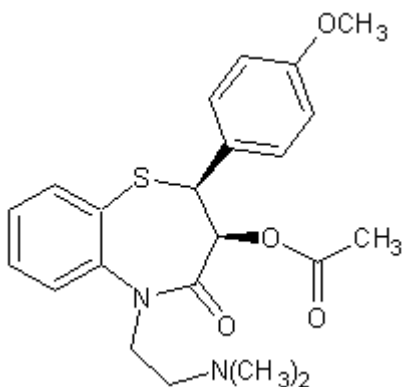
4. DISKUSSION

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung der Substanzen WHG 33PSA und WHG 34 an den folgenden isolierten Organen des Meerschweinchens untersucht: rechter Vorhof, Papillarmuskel, Pulmonalarterie, Aorta und terminales Ileum. Beide Substanzen wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert. Die zugesetzten Konzentrationen von WHG 33PSA und WHG 34 waren 1, 3, 10, 30, und 100 $\mu\text{mol/l}$.

Das Ziel war es, den Einfluss dieser neu synthetisierten Substanzen auf die Kontraktionskraft der verschieden isolierten Präparate zu untersuchen und da sie Teilstrukturen des Diltiazems aufweisen mit diesem noch zu vergleichen.

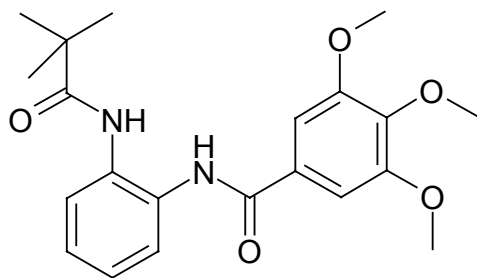
4.1. Struktur Wirkungsbeziehung

Abbildung 28 Strukturformel von Diltiazem, WHG 33PSA und WHG 34



Diltiazem
SF: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$
MG: 414,519 g/mol

Diltiazem ist ein *5-(2-Dimethylaminoethyl)- 2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-2,3,4,5-tetrahydro- 1,5-benzothiazepin-3-ylacetat*.

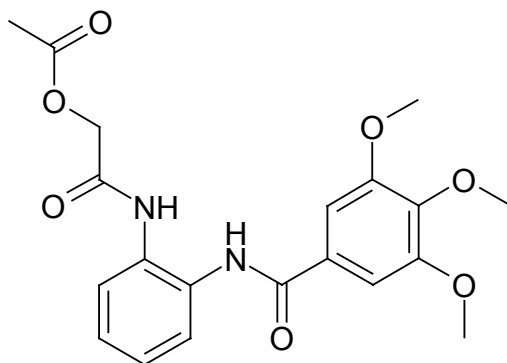


WHG 33 PSA

MG: 386.45

SF: $C_{21}H_{26}N_2O_5$

N1-{2-[(2,2-dimethylpropanoyl)amino]phenyl}-3,4,5-trimethoxybenzamid



WHG 34

MG:402.41

SF: $C_{20}H_{22}N_2O_7$

2-oxo-2-{2-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)amino]anilino}ethylacetat

Diltiazem ist ein Benzothiazepin-Derivat. Es hat in Position 5 einen 2-(dimethylamino)ethyl Rest, in Position 2 ein p-Methoxyphenyl und in Position 3 einen Acetyl-Rest. Es weist 2 Chiralitätszentren in Position 2 und 3 auf, wodurch 4 Stereoisomere möglich sind. (Gökler 2008)

Die Grundstruktur bei WHG 33PSA und WHG 34 verändert sich dahingehend, dass das Benzothiazepin-Element aufgebrochen wird und der Schwefel eliminiert wurde. Stattdessen wurde eine Amidgruppe zwischen die beiden Phenylringe eingefügt,

wodurch ein Benzanilid entstanden ist. Ausserdem unterscheiden sich die beiden Substanzen vom Diltiazem durch 2 weitere Methoxygruppen am Benzolring.

WHG 33PSA wird somit zu einem Trimethoxybenzamid hat statt dem 2-(dimethylamino)ethyl-Rest einen 2-(dimethylpropanoyl)amino-Gruppierung.

Bei WHG 34 ist die Dimethylaminoethylgruppe durch eine Ethylacetatgruppierung, am Anilinteil, ersetzt.

Die unterschiedliche Wirkung von beiden Substanzen auf die Organe, kann vermutlich auf die unterschiedlichen Substituenten zurückgeführt werden.

4.2. Versuche an den isolierten Organen

4.2.1. Versuche am rechten Vorhof

Bei WHG 34 kam es zu einer geringen Erniedrigung der Schlagfrequenz um 7,5%.

WHG 33PSA verursacht hingegen eine Abnahme der Schlagfrequenz um 26,61%. Dieser negativ chronotrope Effekt könnte auf die Dimethylpropanolgruppe zurückzuführen sein.

Tabelle 16 Vergleich der Wirkung der Testsubstanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf den rechten Vorhof

Testsubstanz	fc±SEM (%) Kontrolle	fc±SEM (%) Konzentration 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
WHG 33PSA	100±0	73,39±2,82	/
WHG 34	100±0	92,50±3,82	/

4.2.2. Versuche am Musculus papillaris

Bei beiden Substanzen konnte eine geringe positiv inotrope Wirkung registriert werden, wenn gleich die von WHG 34 stärker ausgeprägt war. Der höchste Wert wurde bei beiden Substanzen bei der höchsten Konzentration von 100 µmol/l erreicht.

Tabelle 17 Vergleich der Wirkung der Testsubstanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf den Musculus papillaris

Testsubstanz	fc±SEM (%) Kontrolle	fc±SEM (%) Konzentration 100 µmol/l	EC₅₀ (µmol/l)
WHG 33PSA	100±0	109,35±6,34	/
WHG 34	100±0	119,72±9,06	/

4.2.3. Versuche an der Arteria pulmonalis

Die Kontraktilität der Pulmonalis nimmt bei beiden Testsubstanzen ab, jedoch ist die Abnahme bei WHG 33PSA um 28,41% mehr als bei WHG 34. Dies könnte eventuell auf die Dimethylpropanoylgruppe am Aminophenyl zurückzuführen sein.

Tabelle 18 Vergleich der Wirkung der Testsubstanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf die Arteria pulmonalis

Testsubstanz	fc±SEM (%)	fc±SEM (%)	EC ₅₀ (µmol/l)
	Kontrolle	Konzentration 100 µmol/l	
WHG 33PSA	100±0	62,92±4,18	/
WHG 34	100±0	91,33±1,71	/

4.2.4. Versuche an der Aorta

Weder WHG 33PSA noch WHG 34 übten eine starke Relaxation auf die glatte Muskulatur der Aorta aus. Beide Substanzen zeigten in den Versuchen eine geringe Abnahme der Kontraktion.

Tabelle 19 Vergleich der Wirkung der Testsubstanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf die Aorta

Testsubstanz	fc±SEM (%) Kontrolle	fc±SEM (%) Konzentration 100 µmol/l	EC₅₀ (µmol/l)
WHG 33PSA	100±0	81,70±3,45	/
WHG 34	100±0	83,544±3,429	/

4.2.5. Versuche am terminalen Ileum

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei WHG 33PSA zu einer stark signifikanten spasmolytischen Wirkung kam. Auch WHG 34 zeigt eine spasmolytische Wirkung jedoch nicht in dem Ausmaß wie WHG 33PSA, dessen Kontraktilität um 66,12% sinkt. WHG 34 senkt die Kontraktilität der Darmmuskulatur im Vergleich dazu um nur 25,43%. Auch wurde bei WHG 33PSA eine EC_{50} bei $47\mu\text{mol/l}$ erreicht im Gegensatz zu WHG 34, wo keine EC_{50} erreicht wurde.

Tabelle 20 Vergleich der Wirkung der Testsubstanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf das terminale Ileum

Testsubstanz	$fc \pm SEM$ (%) Kontrolle	$fc \pm SEM$ (%) Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
WHG 33PSA	100 $\pm$ 0	33,88 $\pm$ 5,09	47
WHG 34	100 $\pm$ 0	74,57 $\pm$ 1,70	/

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung der neu synthetisierten Substanzen WHG 33PSA und WHG 34 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs sowie auf die Kontraktilität verschiedener isolierter Präparate des Meerschweinchens untersucht. Für die Untersuchungen an der glatten Muskulatur verwendete man Präparate der Arteria pulmonalis, der Aorta und des terminalen Ileums, für die am Herzen Präparate des Musculus papillaris und des Atrium cordis dextrum.

Die Präparate wurden in ein mit physiologischer Nährlösung (pH 7,2-7,4; 35%) gefülltes Organbad, welches mit Oymix (95% O₂ und 5% CO₂) durchperlt wurde, mit jeweils verschiedener Vorspannung eingebracht. Nach einer Kontrollphase, die je nach Organ 30 bis 90 Minuten betrug, wurden Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l WHG 33PSA bzw. WHG 34 in die Organkammer injiziert.

Da das Lösungsmittel DMSO, in dem die Testsubstanzen gelöst wurden, selbst eine Wirkung auf die Kontraktilität zeigte, mussten für jedes Präparat mehrere Lösungsmittelversuche durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche mussten überall, wo das Lösungsmittel eine Wirkung zeigte, in die Ergebnisse der Testsubstanzen mit einbezogen werden.

Nach Auswertung der Ergebnisse von WHG 33PSA und WHG 34 wurden diese miteinander und bei erreichten EC₅₀ Werten auch mit Diltiazem verglichen.

WHG 33PSA zeigte bei den Versuchen am rechten Vorhof bei einer Konzentration von 100 µmol/l eine negativ chronotrope Wirkung mit $73,39 \pm 2,82\%$.

WHG 33PSA und WHG 34 zeigten bei den Papillarmuskel-Versuchen eine schwach positiv inotrope Wirkung, die bei WHG 34 bei 100 µmol/l mit $119,72 \pm 9,06\%$ ihr Maximum hatte.

WHG 33PSA zeigt hingegen bei der Arteria pulmonalis eine negativ inotrope Wirkung ab der ersten Konzentration. WHG 33PSA hat also die stärkere Wirkung und zeigt auch eine signifikant selektive spasmolytische Wirkung.

Der EC₅₀ Wert für den negativ inotropen Effekt von Diltiazem liegt bei 5,0 µmol/l, der EC₅₀ Wert für einen negativ chronotropen Effekt bei 0,8 µmol/l.

(Erker et al.1996)

Vergleicht man nun WHG 33PSA und WHG 34 bezüglich ihrer negativ inotropen Wirkung mit Diltiazem, so kann man feststellen das die beiden Testsubstanzen einen wesentlich geringeren Effekt aufweisen, da bei keinen der beiden eine EC_{50} erreicht werden konnte. Auch in Bezug auf die negativ chronotrope Wirkung erwiesen sich beide Substanzen als deutlich weniger wirksam. Bei WHG 34 konnte keine EC_{50} erreicht werden. Bei WHG 33PSA betrug die EC_{50} 47 $\mu\text{mol/l}$ und somit auch das 58fache der EC_{50} von Diltiazem.

6. LITERATURVERSZEICHNIS

Budriesi R, Cosimelli B, Ioan P, Carosati E, Ugenti MP, Spisani R (2007) Diltiazem analogues: the last ten years on structure activity relationships. *Biol Pharm Bull* 14:279-87

Erker T, Laimer I, Huck S, Boehm S, Studenik C, Heistracher P (1996) Synthesis and calcium antagonistic activity of 8-[N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]amino]-5,6,7,8-tetrahydrothieno[3,2-b][1,4]thiazepine fumarate. *Arch Pharm* 329:347-351

Fleckenstein A (1983) History of calcium antagonists *Pharm Bull* 52:13-16

Forth W, Henschler D, Rummel W (1977) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2.Auflage, Bibliographisches Institut-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich

Furchgott R F and the Gubareff T (1958) The high energy phosphate content of cardiac muscle under various conditions which alter contractile strenght. *J.Pharmacol Exptl Therap* 124:203

Gökler A (2008) Pharmakologisches Screening von zwei neu synthetisierten Dianiliden (WHG 40 und WHG 44) an isolierten Meerschweinchenpräparaten

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

Koch-Weser J and Blinks J R (1963) The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacol Rev* 15:601

Kuschinsky G, Lüllmann H (1984) Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Kortning M (2001) Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8.Auflage, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Pösch G, Juan H (1985) Allgemeine Pharmakodynamik. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

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

Romero M, Sanchez I, Pujol MD (2003) New advances in the field of calcium channel antagonists:cardiovascular effects and structure-activity relationships. Pharm Bull 1:113-41

Silbernagl S, Despopulus A (2001) Taschenatlas der Physiologie. 5.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

Wlasak R (2003) Die Bedeutung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen für Proliferation und Migration der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y.Dissertation der Medizin. Fakultät der Friedrich Schiller-Universität

7. CURRICULUM VITAE

Name: Christina Müller-Uri

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 22.12.1980

Geburtsort: Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Religionsbekenntnis: röm. kath.

Eltern: Regina Müller-Uri (geb. Kases),
Mag. pharm. Dr. Christian Müller-Uri

Ausbildung:

1986-1987	Volksschule II Ehrenbrunnengasse, 2320 Schwechat
1987-1990	private Volksschule Erdbergstrasse, 1030 Wien
1990-1998	Bundesrealgymnasium Ehrenbrunnengasse, 2320 Schwechat
1998-2002	Medizinische Fakultät der Universität Wien Studium der Medizin
1998-2008	Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien Studium der Pharmazie
2007	Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien

Berufstätigkeit:

seit 2003 Landschaftsapotheke, 2320 Schwechat