



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening einer neu synthetisierten Substanz (IL349) an isolierten Organen von Meerschweinchen

Verfasserin

Danijela Jerkovic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

*"Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden.
Es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun."*

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

*Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass meine Diplomarbeit entstehen konnte.
Ihnen möchte ich hiermit meinen ausdrücklichen Dank aussprechen.*

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine fachliche und engagierte Betreuung während der praktischen Tätigkeit als auch bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Die angenehme Arbeitsatmosphäre und die verständnisvolle Betreuung werden mir in wertvoller Erinnerung bleiben.

Mein Dank geht auch an die Arbeitsgruppe um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker aus dem Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie, für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz.

*Ein ganz großes Dankeschön möchte ich meinen lieben Eltern aussprechen, die mich in allen Entscheidungen bedingungslos unterstützen und mich auf meinem Ausbildungsweg immer begleitet und gefördert haben. Sie haben mir immer Kraft gegeben, mein Ziel zu erreichen.
Mama i tata, hvala vam za svu vasu ljubav i podrsku!*

Ich danke von ganzem Herzen meinem Freund, der mich während des ganzen Studiums liebevoll unterstützt und an mich geglaubt hat.

Besonders möchte ich mich bei meinen Studienkolleginnen bedanken, die mich auf meinem gesamten Studienweg begleitet haben und mit mir gemeinsam im Labor gearbeitet haben.

Abschließend ein großes Danke an alle meine Freunden, die Freud und Leid mit mir teilten und meine Zeit in Wien unvergesslich gemacht haben.

Danke

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1. Zielsetzung	1
1.2. Resveratrol	2
1.2.1. Allgemein.....	2
1.2.2. Vorkommen und Entdeckung	3
1.2.3. Biosynthese	4
1.2.4. Wirkung und Verwendung.....	6
1.2.5. Pharmakokinetik	8
2. Materialien und Methoden	10
2.1. Testsubstanz IL 349	10
2.2. Lösungsmittel und Pipettierschema	11
2.3. Glibenclamid.....	13
2.4. Physiologische Elektrolytlösung und Begasung	14
2.5. Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate	17
2.6. Versuchstiere.....	18
2.7. Isolierung und Präparation der Organe	20
2.7.1. Isolierung der Arteria pulmonalis	22
2.7.2. Isolierung des Atrium cordis dextrum.....	23
2.7.3. Isolierung des Musculus papillaris.....	25
2.7.4. Isolierung des Ileum terminalis.....	26
2.7.5. Isolierung der Aorta descendes	28
2.8. Versuchsanordnung.....	30
2.8.1. Versuchsassparatur A.....	31
2.8.2. Versuchsassparatur B	34
2.8.3. Gasversorgung.....	37
2.8.4. Wasserbad	38
2.8.5. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber	39
2.9. Versuchsablauf.....	41
2.9.1. Versuchsablauf bei Atrium cordis dextrum	42
2.9.2. Versuchsablauf bei Aorta descendens.....	43
2.9.3. Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis	44
2.9.4. Versuchsablauf bei Ileum terminalis.....	45
2.9.5. Versuchsablauf bei Musculus papillaris.....	46
2.10. Auswertung der Ergebnisse und Statistik.....	48
2.10.1. Auswertung – Atrium cordis dextrum.....	48
2.10.2. Auswertung – Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis.....	48
2.10.3. Auswertung – Musculus papillaris.....	49
2.10.4. Statistik.....	50

3. Ergebnisse	51
3.1. Wirkungen der Testsubstanz IL 349	52
3.1.1. Wirkung von IL 349 auf das Ileum terminalis	52
3.1.2. Wirkung von IL 349 auf die Aorta descendens.....	55
3.1.3. Wirkung von IL 349 auf die Arteria pulmonalis	58
3.1.4. Wirkung von IL 349 auf den Musculus papillaris.....	61
3.1.5. Wirkung von IL 349 auf das Atrium cordis dexter	64
3.2. Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus).....	67
3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid	68
3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid	71
4. Diskussion	74
4.1. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen.....	74
4.2. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel	76
4.3. Versuchsreihen mit IL349 in Kombination mit Glibenclamid.....	77
4.3.1. Versuch mit IL 349 in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid.....	78
4.3.2. Versuch mit IL 349 in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid.....	78
5. Zusammenfassung	79
6. Literaturverzeichnis	81
7. Curriculum Vitae.....	85

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von der Substanz **IL 349**, welche an der Universität Wien am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert wurde, an isolierten und anschließend präparierten Organen von Meerschweinchen untersucht.

Dabei handelt es sich, ebenso wie bei der Substanz Resveratrol, um ein Stilbenderivat.

Es wurden Untersuchungen am isolierten rechten Vorhof und am isolierten Papillarmuskel durchgeführt, um eine eventuell positiv oder negativ chronotrope bzw. inotrope Wirkung der Substanz feststellen zu können.

Um die Wirkung auf glattmuskuläre Organe aufzuzeigen, wurden weitere Versuche an der isolierten Aorta, der isolierten Arteria pulmonalis und am isolierten terminalen Ileum durchgeführt. Hier wurde ein vasodilatatorischer bzw. spasmolytischer Effekt erwartet.

Es sollten Substanzen gefunden werden, die eine Gewebeselektivität aufweisen, d.h. Gefäße dilatieren ohne eine signifikante kardiale Wirkung aufzuweisen.

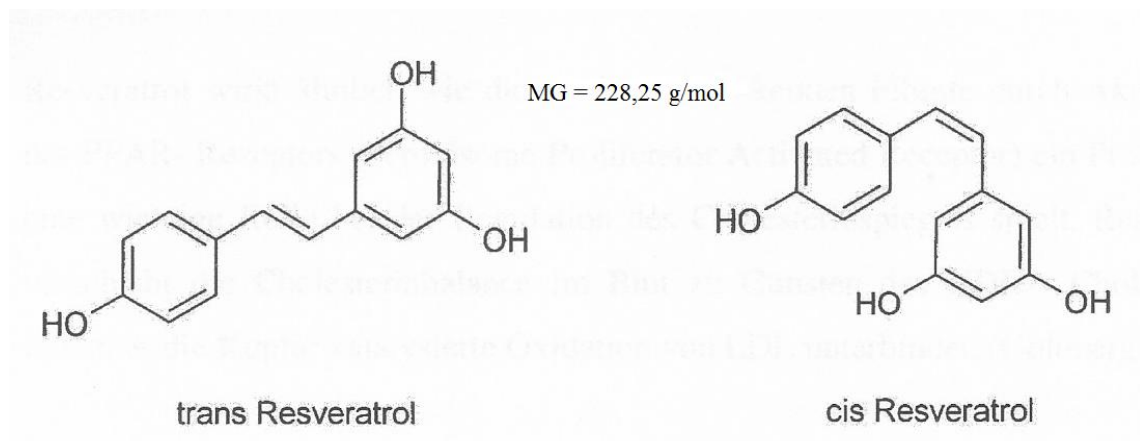
Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es notwendig die exakten Präpariertechniken der entsprechenden Organe, sowie die richtige Einstellung der Messgeräte zu erlernen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein möglicher Wirkmechanismus getestet und zwar an jenem Organ, an dem die Testsubstanz die stärkste Wirkung gezeigt hat.

1.2. Resveratrol

1.2.1. Allgemein

Abbildung 1: Struktur von Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilben)



Resveratrol ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, welches zur Klasse der Flavonoide gehört. Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes Phytoalexin, das in Nahrungsmitteln sowie in einigen medizinischen Pflanzen, wie z.B. Eukalyptus und Vertreter der Vitaceae (z.B. *Vitis vinifera*) zu finden ist (Celotti et al 1997, Jang et al 1997).

Phytoalexine (gr. *phytos* = Pflanze, *alekein* = "abwehren") sind antibiotische Polyphenol-Verbindungen, die zum pflanzeigenen Immunsystem gehören (Gehm et al. 1997).

Resveratrol wird von Pflanzen als Stressmetabolit bei verstärkter Belastung gebildet, um sich vor schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, zu hoher Ozonbelastung, Krankheiten oder Infektionen durch Pilze zu schützen (Urena et al. 2003). Diesen Naturstoff wird auch eine fungizide Wirkung zugeschrieben (Soleas et al. 1997, Becker et al. 2003).

Chemisch gesehen handelt es sich um ein Stilbenderivat, das mit dem synthetischen, nichtsteroidalen, selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator Diethylstilbestrol (DES) verwandt ist (Gehm et al. 1997).

1.2.2. *Vorkommen und Entdeckung*

Resveratrol wurde erstmals im Jahr 1963 von Nonomura et al. aus den Wurzeln von Japanischen Staudenknöterich (*Polygonum cuspidatum*) isoliert und identifiziert. Diese Heilpflanze weist den höchsten Gehalt an Resveratrol auf und wird sowohl in der traditionellen japanischen Medizin (*Ko-jo-kon*) als auch in der indischen Ayurveda-Medizin (*Darakchasava*) angewendet, um verschiedene Erkrankungen wie z.B. Pilzinfektionen, Hautentzündungen sowie Erkrankungen des Herzens, der Blutgefäße und der Lunge zu behandeln (Paul et al. 1999).

Der Nachweis von Resveratrol in Weintrauben erfolgte 1976 von Langcake und Pryce, aber erst seit 1992 erkannte man das große Potential dieses Stoffes (Biba 2004).

Resveratrol kommt in verschiedenen Pflanzenfamilien vor und ist vor allem in Weintrauben, Maulbeeren, Himbeeren und Erdnüssen, aber auch in Kiefern, Lein- und Sesamsaat, Fichte, Lilie, Eukalyptus zu finden.

Dieses Stilben gilt als „Wirkstoff des Rotweins“ und kommt am reichlichsten in der Kulturpflanze *Vitis Vinifera* (*Vitaceae*) vor.

Resveratrol konnte in geringeren Konzentrationen in den Traubkernen, Reben, Stielen und Wurzeln des Weinstocks nachgewiesen werden, die höchste Konzentration wurde jedoch in den Schalen der Trauben gefunden (5-10 mg/ 100g Weintrauben, Celotti et al. 1996).

Im roten Traubensaft beträgt die Konzentration von Resveratrol bis zu 1100 µg/l , im weißen 200 µg/l und im Rotwein zwischen 30 und 50 mg/l.

Der höhere Gehalt im Rotwein beruht auf dem Fermentierungsprozess, an dem die Schalen länger beteiligt sind. Weiß- und Rosé-Weinen enthalten im Vergleich zu Rotwein nur wenig Resveratrol, da bei der Herstellung die Traubenschalen früher entfernt werden. Auch Traubensaft, der nicht fermentiert wird, stellt keine bedeutende Resveratrolquelle dar.

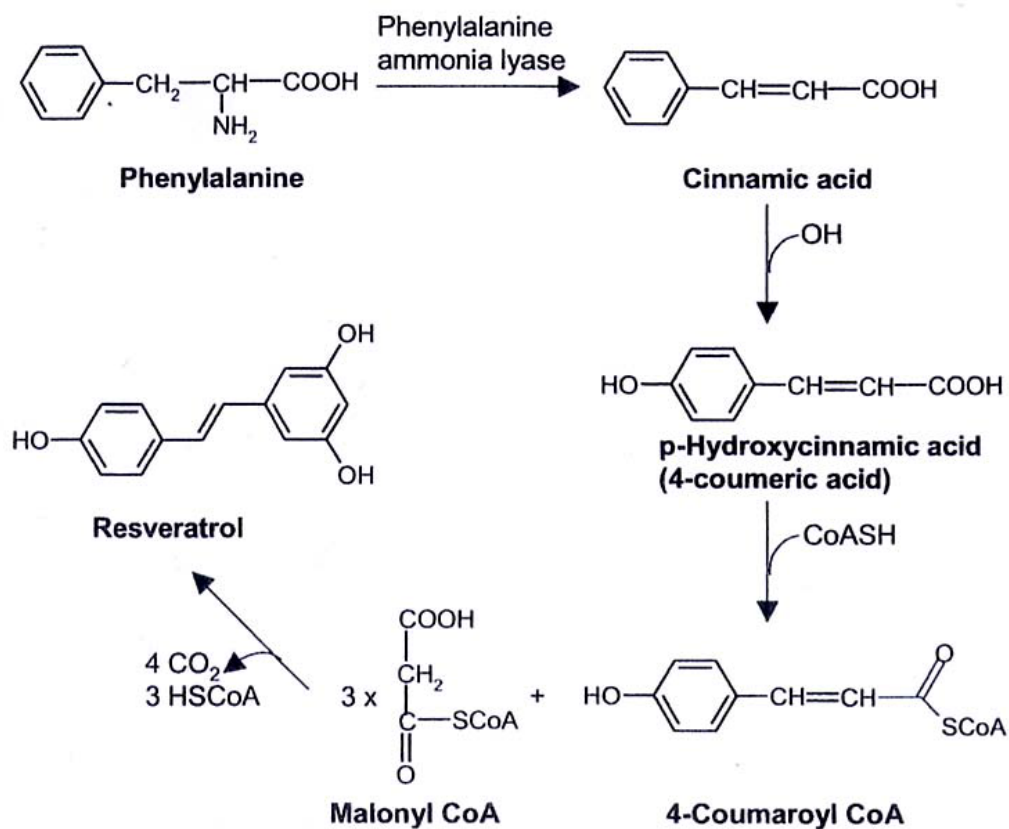
Weiters konnte bei Studien in Spanien nachgewiesen werden, dass der Gehalt an Resveratrol in den Trauben um das 2-3 fache ansteigt, wenn diese vor der Gärung zusätzlich mit UV-Strahlen behandelt oder gekühlt werden (Cantos et al. 2000).

Neben der prozentuell häufigsten Form, dem E-Resveratrol, kommt in der Natur auch das Z-Resveratrol, sowie deren Glykoside, Piceid und Astringin, vor (Soleas et al. 1997).

1.2.3. Biosynthese

Die Resveratrol-Biosynthese wird von manchen Pflanzen zum Schutz vor chemischen, mechanischen und physikalischen Schädigungen, bereits einige Stunden nach dem Stressauslösen, aktiviert (Urena et al. 2003).

Abbildung 2: Biosynthese von Resveratrol

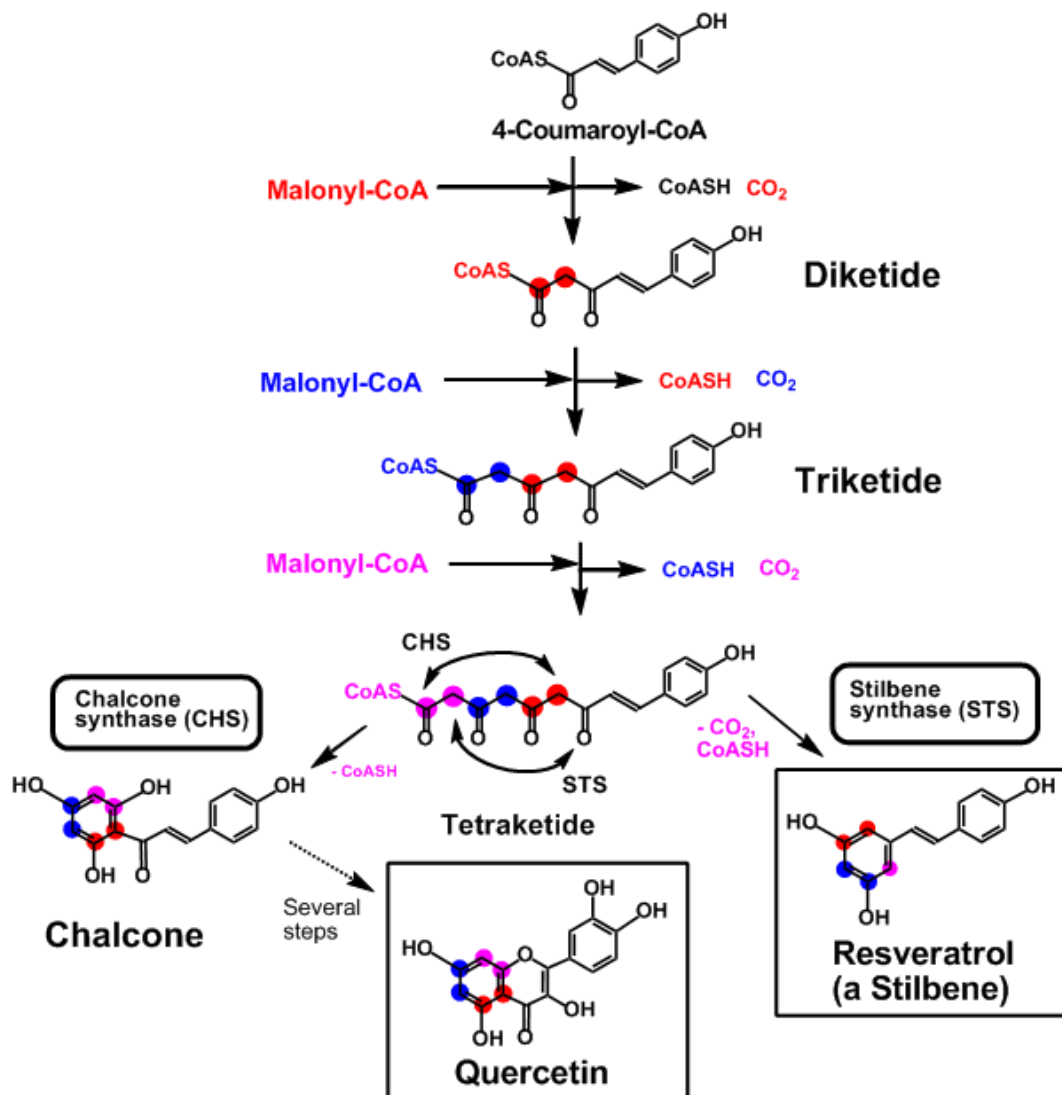


Die Biosynthese von Resveratrol erfolgt über den Shikimisäure-Weg.

Die Aminosäure Phenylalanin ist das Edukt der Resveratrol-Biosynthese. Zuerst kommt es durch oxidative Desaminierung zur Bildung von Zimtsäure, die in weiterer Folge enzymatisch zur p-Cumarinsäure (p-Hydroxyzimtsäure) hydroxyliert wird.

Durch eine spezifische CoA-Ligase wird die Cumarinsäure zum Thioester umgesetzt. Im letzten Schritt kommt es mit Hilfe der Resveratrol-Synthetase zur Kondensation von 4-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA, unter Abspaltung von CO_2 und CoA-SH und zur Bildung von Resveratrol (Wu et al. 2001).

Abbildung 3: Biosynthese von Resveratrol (Schröder 2009)



Beide Enzyme, sowohl die Chalcon-Synthetase (CHS) als auch die Stilben-Synthetase (STS), gehören zur Gruppe der Polyketid-Synthetasen und die Reaktionen verlaufen völlig identisch bis zur Entstehung des Tetraketides nach der dreimaligen Kondensation mit Malonyl-CoA.

Der entscheidende Unterschied liegt in der Faltung des resultierenden Tetraketids.

Bei der Ringfaltung zum Resveratrol wird die endständige Carboxylgruppe als CO_2 abgespalten, während bei der Chalcon-Bildung die Carboxylgruppe erhalten bleibt (Schröder 2009).

Chalcon-Synthetase ist ein essentielles Enzym bei der Synthese der Blütenfarbstoffe und kommt, im Gegensatz zur Stilben-Synthetase, in allen Pflanzen vor.

1.2.4. Wirkung und Verwendung

In den letzten drei Jahrzehnte wurden viele wissenschaftlichen Studien über Resveratrol veröffentlicht und diesen Naturstoff als Wundermittel angepriesen.

Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten und am besten untersuchten Wirkungen behandelt werden.

- **Kardioprotektive Wirkung**

Resveratrol wurde vor 20 Jahren international bekannt, vor allem als mögliche Erklärung für den Begriff „französische Paradox“, der 1992 von Dr. Renaud geprägt wurde (Kleine-Gunk 2007).

Das „*französische Paradox*“ beschreibt das Phänomen, dass in Frankreich, trotz Alkoholkonsums und fettreicher Ernährung, die Mortalitätsrate an koronaren Herzerkrankungen sehr gering ist und die Alterungsprozesse wenig ausgeprägt sind.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein Weinkonsum von ca. 20-30 g pro Tag das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung um 40 % reduziert. Diese kardioprotektive Wirkung wird dem im Rotwein in hoher Konzentration vorliegenden Resveratrol zugeschrieben (Kleine-Gunk 2007).

- ***Antioxidative Aktivität und Gefäßschutz***

Resveratrol fungiert vor allem als Fänger von Lipid-Peroxy-Radikalen und seine starke antioxidative Wirkung wurde bereits durch mehrere biologische Studien belegt (Belguendouz et al. 1989).

Frankel et al. bemerkte 1993, dass dieses Stilben-Derivat die kupferkatalysierte LDL-Peroxidation (LDL = low density lipoprotein) signifikant mehr verhindert als α -Tocopherol (fettlöslich, <1 mg/l in Wasser), während die HDL-Oxidation (HDL = high density lipoproteins) gefördert wird.

Auf diese Weise trägt Resveratrol im Fettstoffwechsel dazu bei, die Cholesterin-Werte zu senken und verhindert damit die Gefäßschädigungen und die Bildung von arteriosklerotischem Plaque.

Die Studien haben ergeben, dass Resveratrol die Zusammenballung der Thrombozyten bei Plaqueruptur verhindert und hilft, das Herz vor den schädlichen Auswirkungen freier Radikale zu bewahren (Zbikowska und Olas 2000, Rotondo et al. 1996).

- ***Antiinflammatorische Wirkung***

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Resveratrol einen gewissen Schutz vor Arteriosklerose besitzt und zwar durch die Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und intrinsische Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) (Tsai et al. 1999), zwei wesentliche Schlüsselenzyme der Entzündungsreaktion (Kleine-Gunk 2007).

Resveratrol stärkt das Immunsystem, wirkt entzündungshemmend, hemmt einige Pilze sowie Herpes-Viren.

- ***Antikanzerogene und antimutagene Wirkung***

Am meisten diskutiert wird eine mögliche anticancerogene und antimutagene Wirkung von Resveratrol bzw. seiner Einfluss auf die Zellproliferation.

Anhand von Versuchen, die bei diversen Krebsarten durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Resveratrol zum Schutz vor verschiedenen Tumorkrankheiten auf mehreren Wegen beitragen kann (Aggrwal et al. 2004).

Die Studien haben gezeigt, dass Resveratrol die DNA-Polymerase, die Ribonukleotidreduktase, sowie die Aktivität der Ornithindecaboxylase, das Schlüsselenzym für die Polyaminbiosynthese, hemmt (Fontecave et al. 1998).

Polyamine sind Verbindungen, die sehr wichtig für die Zellproliferation sind und beim Tumorwachstum charakteristisch erhöht sind (Löser et al. 1990, Elitsur et al. 1992, Fontecave 1998).

Resveratrol kann auf Prozesse einwirken, welche die Bildung und Weiterentwicklung von einigen Krebszellen hemmen können.

Durch die Inhibition von *nuclear factor κ B* (NF- κ B) und *activating protein 1* (AP-1), wird die Apoptose in Krebszellen induziert (Yeung et al. 2004). So wird eine eventuelle Schutzfunktion bei Leukämie, Darm-, Haut-, Lungen- und Prostatakrebs diskutiert.

- **Östrogene Wirkung**

Da Resveratrol ähnliche chemische Struktur wie synthetisches Östrogen Diethylstilbestrol (DES) aufweist, wird auch eine östrogen-ähnliche Wirkung vermutet. Es wurde bereits die anticancerogene Wirkung bei Mammatumoren, zwar an Zellkulturen von Mäusen experimentell bestätigt, bei menschlichen Mammakarzinomen konnte sie aber bislang noch nicht bewiesen werden (Gehm et al. 1997).

1.2.5. Pharmakokinetik

Die Studien haben gezeigt, dass Resveratrol nach peroraler Verabreichung sehr gut resorbiert, jedoch rasch in der Leber metabolisiert wird. Bereits 30 Minuten nach Wirkstoffzufuhr lag nahezu die gesamte Menge in glukuronidierter oder konjugierter Form vor. Freies Resveratrol konnte nur noch in Spuren nachgewiesen werden (Walle et al. 2004).

Resveratrol wird als trans-Resveratrol-3-O-glucuronid und trans-Resveratrol- β -sulfat größtenteils renal ausgeschieden und der nicht metabolisierte Anteil bindet vor allem an Albumin. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei ca. 9 Stunden.

Die Bioverfügbarkeit von diesen Stilben-Derivat beträgt etwa 90% (Goldberg et al. 2003), aber aufgrund der raschen Clearance ist Verweildauer im Blutkreislauf kurz (Soleas et al. 2001).

Das viel propagierte Thema „Rotwein als Allheilmittel“ wird immer noch diskutiert, während die negativen Auswirkungen (wie z.B. Leberzirrhose, körperliche Abhängigkeit und psychotische Störungen) von chronischem Alkoholgenuss zweifelsfrei bewiesen sind.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Erkenntnisse über Resveratrol relativ neu und nicht in allen Details erforscht sind.

Viele Ergebnisse beruhen heute noch auf experimentellen, in-vitro Studien bzw. Untersuchungen am Tiermodell und müssen in weiteren Forschungen bezüglich Bioverfügbarkeit und Metabolismus überprüft werden.

Unbestritten bleibt jedoch, dass es sich bei Resveratrol um eine hochinteressante Substanz mit vielfältigen Wirkungen und großem Potential handelt.

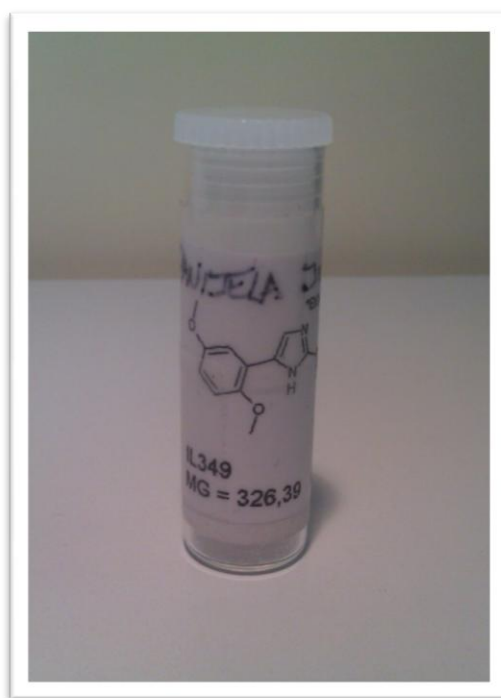
2. Materialien und Methoden

2.1. Testsubstanz IL 349

Wie schon erwähnt, wurde die Testsubstanz IL 349 von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker an der Universität Wien (Department für Pharmazeutische/Medizinische Chemie) neu synthetisiert und für die Untersuchungen dem Department für Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung gestellt.

Dabei handelt es sich, ebenso wie bei der Substanz Resveratrol, um ein Stilbenderivat, wobei der IL 349 anstatt der Ethylengruppierung einen Imidazolring als Grundgerüst besitzt. Von diesem gehen ähnlich wie bei Resveratrol jeweils zwei Phenylringe aus, wobei der Phenylring am C-5 noch zwei Methoxygruppen (in Position 2 und 5) enthält.

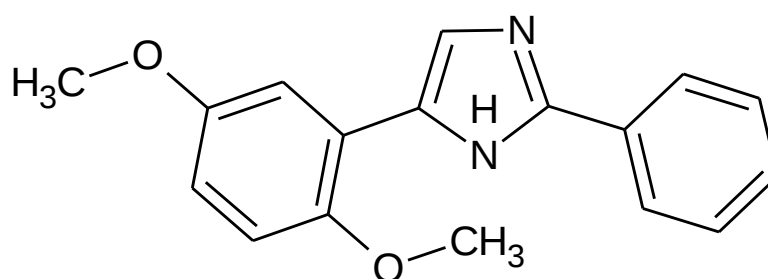
Abbildung 4: Testsubstanz IL 349



Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz IL 349:

Bezeichnung:	IL 349
Molekulargewicht:	326,39 g/mol
Nomenklatur:	5-(2,5-Dimethoxyphenyl)-2-phenyl-1H-imidazol
Molekül-/Summenformel:	$C_{19}H_{22}N_2O_3$
Farbe:	weiß
Löslichkeit:	unlöslich in Wasser, gut löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Abbildung 5: Chemische Struktur von IL 349



2.2. Lösungsmittel und Pipettierschema

Da die Testsubstanz IL 349 wasserunlöslich war, musste sie jeden Morgen vor Versuchsbeginn in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden.

DMSO ist ein dipolares Lösungsmittel, das in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und dadurch für die Versuche besonders geeignet ist. Da Dimethylsulfoxid eine geringe Eigenwirkung auf die Organe besitzt, musste dies auch bei der Auswertung der einzelnen Versuchsergebnisse berücksichtigt werden.

Die benötigte Stammlösung der IL 349 wurde täglich frisch hergestellt und bereits gelöste Substanz konnte am nächsten Tag nicht mehr verwendet werden.

Die Einwaage der Testsubstanz in mg wurde über die molare Masse ermittelt, sodass durch kumulative Zugabe der Stocklösung am Ende des Versuchs eine maximale Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht wurde.

In Tabelle 1 ist die Berechnung der Einwaage, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fassungsvermögen der Organbäder, zusammengefasst:

Tabelle 1: Verwendete Einwaagen

<i>Substanz</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Volumen Organbad</i>	<i>Einwaage Substanz (100 µmol/l)</i>
IL 349	326,39 g/mol	8 ml	0,26 mg
		25 ml	0,82 mg

Nach der Erreichung der konstanten Kontrollphase (Anpassungsphase) wurden die Stammlösungen von 1 µl, 2 µl, 7 µl, 20 µl und 70 µl in Intervallen von 45 Minuten in das Organbad mittels Eppendorf- bzw. Finnpiquette (Labsystems, Finnland) injiziert. Dadurch wurden Badkonzentrationen von 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l erreicht (siehe Tabelle 2).

Die 45-minütigen Zeitspannen sollen eine Plateau-Einstellung („steady state“) im Organbad gewährleisten, was eine konstante Blutplasmaspiegel an Wirkstoffen bedeuten soll.

Tabelle 2: Pipettierschema

<i>Applizierte Menge der Stammlösung</i>	<i>Endkonzentration/Organbad</i>
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

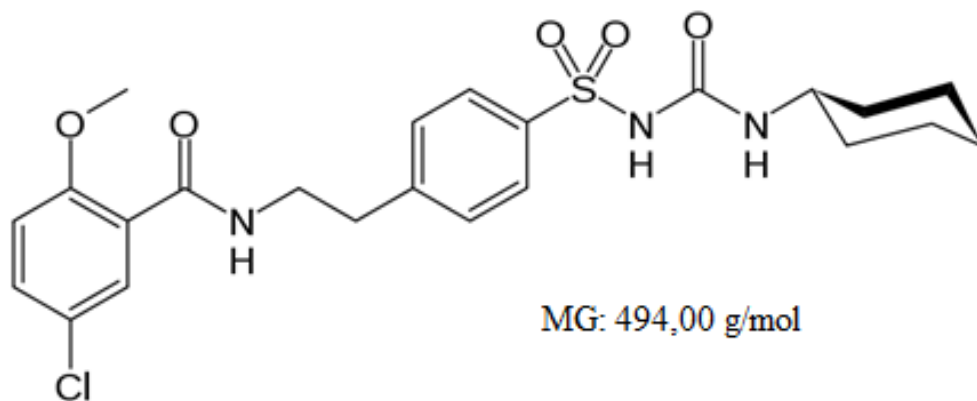
Das Injizieren der Stammlösung sollte vorsichtig, möglichst ohne dabei die Aufhängevorrichtung, das Präparat oder den Kraftwandler zu berühren und immer im gleichen Bereich des Organbades, möglichst nahe am Organ, erfolgen.

Die genauen Zeitpunkte der Stammlösungszugabe wurden am Millimeterpapier des Schreibers gekennzeichnet, um später die Berechnungen möglichst exakt durchführen zu können.

2.3. Glibenclamid

Im zweiten Teil der Diplomarbeit wurde der Wirkmechanismus der Testsubstanz IL 349 mit Glibenclamid (K_{ATP} -Kanalblocker) getestet.

Abbildung 6: Glibenclamid-Strukturformel



5-Chlor-N-[2-[4-(cyclohexyl carbamoylsulfamoyl) phenyl]ethyl]-2-methoxy-benzamid

Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoff-Derivat, das pharmakologisch als orales Antidiabetikum bei Patienten mit einem nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (Typ 2) eingesetzt wird.

Die Sulfonylharnstoffderivate binden in der B-Zelle der Pankreasinseln an spezifische SUR-1 Bindungsstellen und blockieren dadurch die ATP-abhängigen Kaliumkanäle.

Dadurch kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran und in weiterer Folge zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle.

Calcium strömt in die B-Zelle ein und bewirkt eine vermehrte Exozytose des granular gespeicherten Insulins (Forth et. al. 2005, Mutschler et al. 2001).

Weiters führt die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanäle zur Konstriktion der Glattmuskelzellen.

Die wichtigsten unerwünschten Nebenwirkungen sind schwere und lang anhaltende Hypoglykämien („hypoglykämischer Schock“), die sich langsam entwickeln.

Gelegentlich kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden, allergischen Reaktionen und zu einem Wachstum der Schilddrüse. Sehr selten kommt es zu Leukopenie, Thrombozytopenie oder Agranulozytose.

Die Sulfonylharnstoffe und deren Derivate fördern die Gewichtszunahme und können ein cholestatischer Ikterus hervorrufen.

2.4. Physiologische Elektrolytlösung und Begasung

Um die isolierten Organe künstlich am Leben zu erhalten, mussten diese gleich nach der Isolierung, aber auch während der Präparation und Versuchsdurchführung in physiologischer Elektrolytlösung aufbewahrt werden.

Um sowohl einen konstanten pH-Wert im physiologischen Bereich (pH 7,2-7,4), als auch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sicherzustellen, wurde die Nährlösung kontinuierlich mit Oxymix™ bzw. Carbogen (Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2) begast.

Als Nährstofflösung wurde die sogenannte Tyrode-Lösung verwendet, die nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode benannt ist. Diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung musste täglich nach den Vorschriften von Reiter (1967) frisch zubereitet werden, während die verwendete Stammlösungen in größeren Mengen hergestellt werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung

<i>Substanz</i>	<i>Molekular- gewicht</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>ml/Stocklösung/l Tyrode</i>	<i>mmol/l</i>
NaCl	58,442g/mol	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,550 g/mol	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO₃	84,010 g/mol	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO₄	120,370 g/mol	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH₂PO₄	136,090 g/mol	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
CaCl₂	110,980 g/mol	34,00 g/250 ml	3,20	3,92
Glucose	180,160 g/mol	Reinsubstanz	1,98	-

Die entsprechende Menge der einzelnen Komponenten (siehe Tabelle 3), außer CaCl₂, wurde mit Hilfe einer Bürette in einen zwei Liter fassenden Messkolben gefüllt. Dieser wurde fast zur Gänze (auf ~ ¾ des Endvolumens) mit Aqua bidestillata aufgefüllt.

Nach einer 10-minütigen Perfusion mit Oxymix™ (über ein Schlauchsystem), wurde das Calciumchlorid tropfenweise und langsam dazu pipettiert.

Das wichtigste dabei war es darauf zu achten, dass die CaCl₂-Lösung mit der automatischen Messpipette sehr vorsichtig und unter anhaltender Begasung dazugegeben wurde, um die Bildung und Ausfällung schwerlöslicher Calcium-Salze zu verhindern.

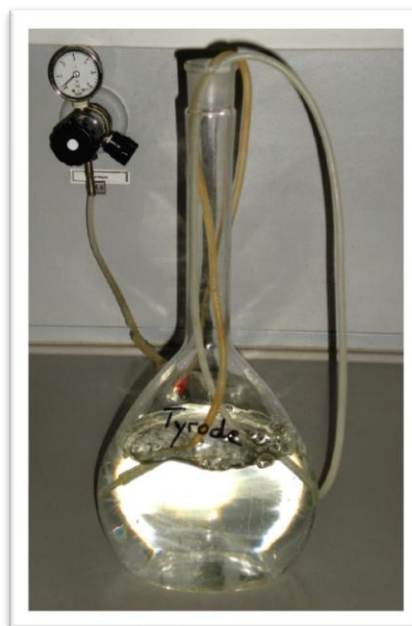
War eine weiße Trübung festzustellen, musste die neue Tyrode angefertigt werden, da die Nährstofflösung somit nicht mehr die exakte Zusammensetzung hätte und ein einwandfreies Arbeiten nicht mehr gewährleistet wurde.

Nach dem Hinzufügen von Calciumchlorid wurde die Elektrolytlösung weitere zehn Minuten mit Oxymix™ begast und zuletzt mit Aqua bidestillata bis zur 2l Volumsmarke aufgefüllt und durch Schwenken homogenisiert.

Die gefertigte Elektrolytlösung wurde verwendet:

- zur Herstellung der Kaliumchlorid-Lösung, die zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate (Aorta, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis) verwendet wurde
- zum Spülen der Organbäder vor/nach dem Versuch
- zur Befüllung der Organbäder
- zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Präparate
- zur Transport der einzelnen Organe
- als Nährstofflösung in Glaspetrischalen während der Präparation
- zur Versuchsdurchführung am Vorhof und am Papillarmuskel

Abbildung 7: Begaste Nährstofflösung



2.5. Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate

Die Kaliumchloridlösung war für die Untersuchungen der Testsubstanz IL 349 an Ileum terminalis, Aorta descendens und Arteria pulmonalis notwendig, da diese einen konstanten Tonus des kontraktile Gewebes und eine maximale Kontraktion der Präparate gewährleistet.

Nach der Vorkontraktion der glatten Muskulatur könnte die, durch die Testsubstanz hervorgerufene, vasodilatierende bzw. spasmolytische Aktivität festgestellt werden.

Die quergestreifte Muskulatur des Musculus papillaris wurde nicht durch KCl-Lösung vorkontahiert, sondern im physiologischen Nährmedium elektrisch gereizt.

Der Atrium cordis dexter ist das einzige Präparat, das man nicht vorkontrahieren musste, da es ein spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten (SA-Knoten) besitzt.

Die KCl-Lösungen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen, 60 mmol für das terminale Ileum und 90 mmol für Aorta und Arteria pulmonalis, hergestellt.

Die entsprechende Menge des Kaliumchlorids (siehe Tabelle 4) wurden in einen 100 ml fassenden Messkolben eingewogen und mit Tyrode auf 100 ml aufgefüllt.

Tabelle 4: Kaliumchloridlösungen für Vorkontraktion

<i>Organpräparat</i>	<i>Kaliumchlorid-Einwaage (in g)</i>	<i>Volumen der Nährlösung (in ml)</i>
Ileum terminalis	0,45	100
Aorta	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100

2.6. Versuchstiere

Die Versuche zur Feststellung der Wirkung von der Testsubstanz IL 349 wurden an fünf verschiedenen isolierten Organen (Aorta, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis, Atrium cordis dexter und Musculus papillaris) von Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) durchgeführt.

Die Versuchstiere waren vier bis sechs Wochen alt, wiesen alle ein durchschnittliches Körpergewicht von 250-600g auf und stammen aus dem Forschungsinstitut für Versuchstierzucht und -haltung, Abteilung für Labortierkunde und -genetik, in Himberg (Himberg, Österreich, Stamm „TRIK“).

Für die Durchführung der Versuche eignen sich die Meerschweinchen besonders gut, weil die Charakteristik der Ionenkanäle dieser Tiere, denen des menschlichen Herzens sehr ähnlich sind.

Um ein zu große Darmmotilität zu verhindern und einen möglichst konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur beizubehalten, war es für die Versuchsdurchführung von großer Bedeutung, nüchterne Meerschweinchen zu verwenden.

Die Meerschweinchen wurden durch einen präzisen Genickschlag durch geübtes Fachpersonal getötet, wodurch ein schneller und zugleich schmerzfreier Tod garantiert werden konnte.

Besonders wichtig war es, das Herz und seine Gefäße so rasch als möglich herauszupräparieren und in eine zuvor bereitgestellte Elektrolytenlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) zu transferieren, um einen möglichen Sauerstoffmangel (Hypoxie) sowie eine Koagulation des Blutes im Herzen zu verhindern.

Nach dem Exitus der Tiere und Entnahme des noch schlagenden Herzens aus dem Thorax, wurde das Abdomen mit einer OP-Schere ventral-median geöffnet.

Ein ca. 20 cm langes Dünndarmstück (*Ileum terminalis*) wurde vorsichtig herauspräpariert, wobei das aboral (jejunal) gelegene Ende mit einem roten Bindefaden

markiert wurde, um die beiden Enden, bei der folgenden Präparierung, nicht zu verwechseln. Als nächster Schritt wurde, mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere, thorakale Aorta (*Aorta descendens*) entlang des Rippenbogens entnommen.

Die weitere Präparation von Arteria pulmonalis und Papillarmuskel erfolgte unter dem Mikroskop (Zeiss, Jena), in einer mit Kork und einem Gummiring ausgelegten und mit Nährlösung gefüllten Petrischale.

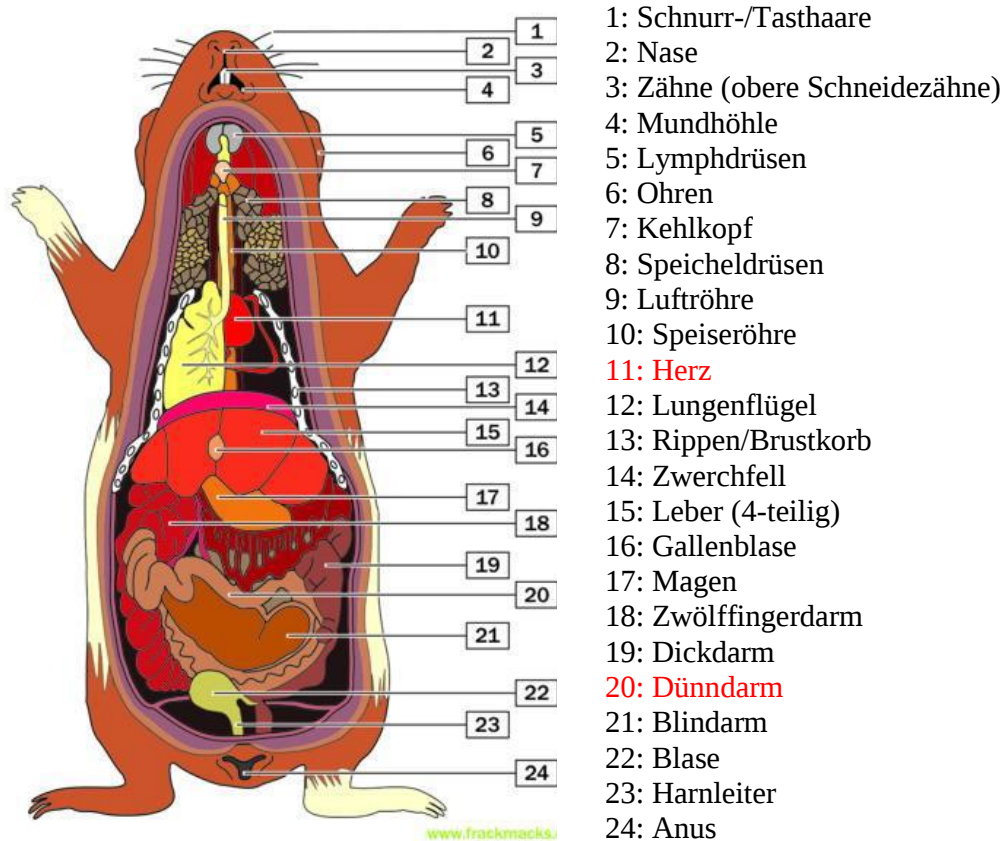
Um eine ausreichende Versorgung an Sauerstoff und Nährstoffen gewähzuleisten, wurden alle explantierte Tierorgane gleich nach der Entnahme, während der Präparation und auch natürlich während der Versuche mit einer frisch bereiteten Elektrolytenlösung angereichert, die zusätzlich mit Oxymix™ (95% Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid) begast wurde.

Abbildung 8: Meerschweinchen



2.7. Isolierung und Präparation der Organe

Abbildung 9: Anatomie eines Meerschweinchens



- **Entnahme der Organe**

Unmittelbar nach der Tötung des Versuchstieres wurden Bauch- und Brustraum mittels einer OP-Schere geöffnet, um eine optimale Organentnahme zu gewährleisten.

Zuerst wurde das Herz, dann Ileum terminalis und schließlich die Aorta vorsichtig herausgeschnitten. Die isolierte Organe wurden so rasch wie möglich in eine frisch bereitete und begaste physiologische Nährlösung eingebracht, um sie dadurch während der Versuchsdurchführung künstlich am Leben zu erhalten.

Abbildung 10: Sezierbesteck



- **Präparierung der Organe**

Aufgrund der geringen Größe des Meerschweinchenherzens erfolgte die Präparation der einzelnen Organe unter dem Lichtmikroskop (Nikon SMZ-10 A, Japan).

Dafür wurden Glaspetrishalen, die zu drei Viertel mit Oxy mix™ begaster Nährlösung gefüllt und mit einem Korkboden ausgelegt wurden, verwendet.

Die isolierte Organe wurden mit Stecknadeln auf Korkboden, der mit einem Gummischlauch fixiert wurde, befestigt.

Weiteres Präparierbesteck, wie z.B. Pinzetten und Federgriffscheren dienten dazu, umgebendes Fett- oder Muskelgewebe zu entfernen.

Generell sollte während des Präpariervorganges sehr präzise und relativ rasch gearbeitet werden.

Hier musste darauf geachtet werden, dass das Gewebe nicht zu lange im trockenen und unbegasteten Zustand verweilte, sowie nicht verletzt oder überdehnt wurde, ansonsten hätte es zu Absterben der Organe und folglich zu verfälschten Ergebnissen kommen können.

Abbildung 11: Präparierbesteck und Lichtmikroskop



2.7.1. Isolierung der Arteria pulmonalis

Wichtig für die Präparation der Arteria pulmonalis war eine rasche Explantation des lebendigen, noch schlagenden Herzens.

Dieses wurde sofort nach der Entnahme in eine mit Oxymix™ begaste Nährlösung übergeführt und vorsichtig mit Daumen und Zeigefinger massiert, um noch das vorhandene Blut zu entfernen und Blutgerinnung zu vermeiden.

Das Herz wurde in einer mit Tyrode gefüllten Petrischale fixiert und, nach der Entfernung von Perikard und Teilen der Lunge, wurde die Arteria pulmonalis getrennt. Dies musste so nahe wie möglich am Herzen erfolgen, da für die Versuche nur das ca. 1cm kurze Stück (*Truncus pulmonalis*) bis zu Aufgabelung in rechte und linke Arterie herangezogen wurde.

Die isolierte Pulmonalarterie wurde anschließend an den Enden mit Präpariernadeln auf dem Korkboden befestigt und von noch vorhandenen Muskel- und Fettgewebereste unter Zuhilfenahme von Pinzette und Federgriff-Mikroschere befreit.

Nach der Reinigung wurden 3-4 mm lange ringförmige Stücke vorsichtig geschnitten, die direkt, ohne Silberhäkchen, in die Versuchsanordnung eingespannt werden konnten.

2.7.2. *Isolierung des Atrium cordis dextrum*

Das explantierte Herz musste zuerst von anhaftenden Lungenteile und Fettgewebe gesäubert werden, um anschließend den Atrium cordis dextrum, inklusive den Sinusknoten, zu isolieren.

Unter dem Lichtmikroskop wurde das Perikard vorsichtig geöffnet und durch einen Schnitt entlang des Sulcus coronarius wurde der rechte Vorhof isoliert.

Um die Überdehnungen des Herzgewebes und Beeinträchtigung des Sinusknotens, der sich in der rechten Vorhofwand an der Eintrittsstelle der Vena cava superior befindet, zu vermeiden, musste man äußerst präzise arbeiten.

Bei einer eventuellen Verletzung des Sinusknotens, würde er seine Fähigkeit, spontan Erregungen zu bilden, verlieren, sofort zu schlagen aufhören und somit für die weitere Untersuchungen unbrauchbar werden.

Abbildung 12: Isolierung des rechten Vorhofs



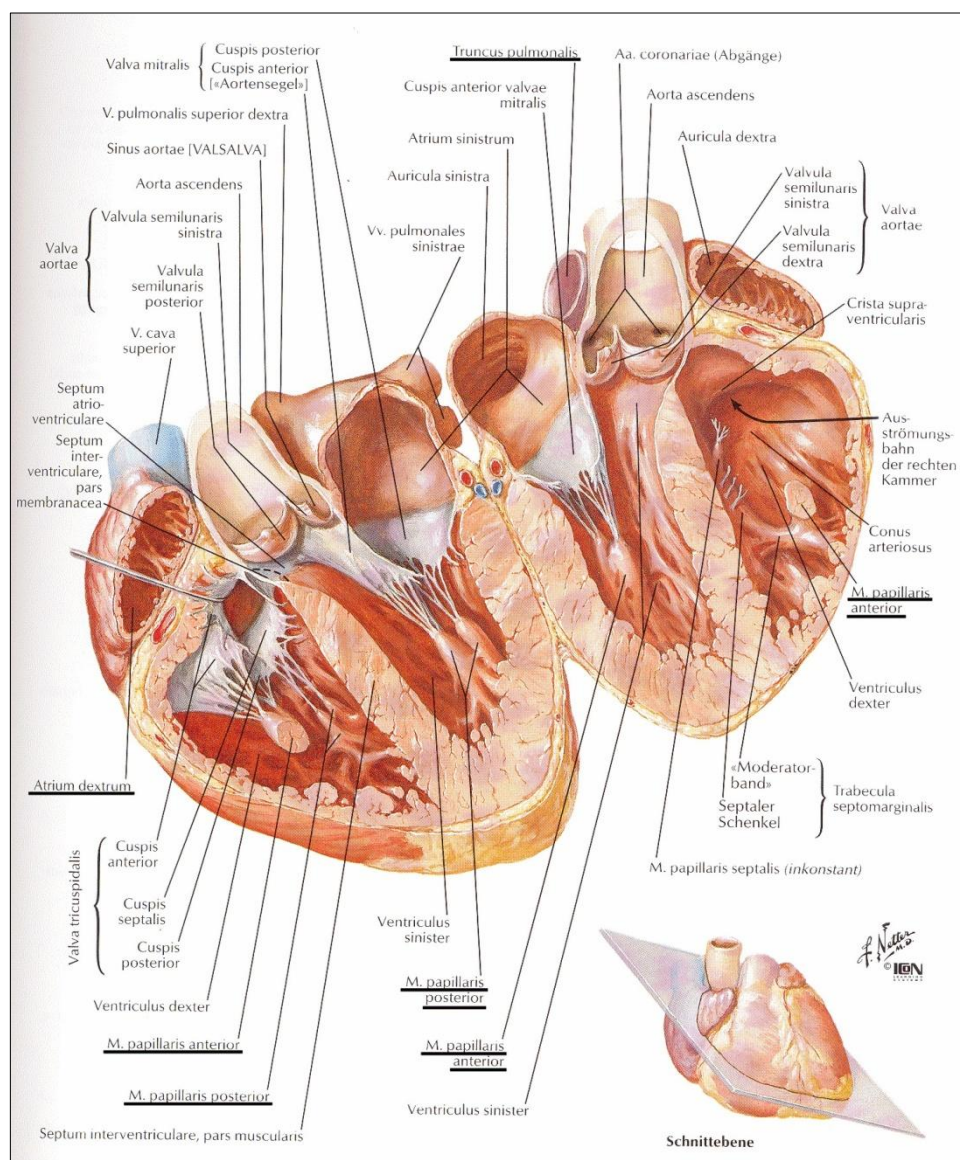
Nach der Abtrennung des Atrium cordis dextrum vom Herzen wurde dieser an der unteren Spitze und am oberen Ende, wo Fettgewebe zur Befestigung nicht entfernt wurde, mittels Präpariernadeln am Korkboden der Glaspetrishale befestigt.

An diesen beiden Stellen wurden zwei kleine Silberdrahthaken mit Hilfe des Bindefadens angebracht, um den Vorhof anschließend in die Versuchsanordnung einspannen zu können.

Da das Fettgewebe in der Apparatur nach oben zeigen sollte, wurden zwei verschieden farbige Fäden genutzt - roter Bindfaden für „oben“ und schwarzer Bindfaden für „unten“.

Der fertig präparierte Atrium wurde bis zum Einspannen in die Apparatur in Elektrolytlösung aufbewahrt und mit Oxymix™ durchperlt.

Abbildung 13: Schematische Darstellung des Herzens – Querschnitt (Netter FH 2003)



2.7.3. Isolierung des *Musculus papillaris*

Die Papillarmuskeln befinden sich in den Herzkammern (drei im rechten und zwei im linken Ventrikel) und verbinden die Sehnenfäden mit den Segelklappen (siehe Abbildung 13).

Sie kontrahieren sich am Beginn der Kammersystole und stellen deswegen ein ideales Modell zur Untersuchung der Inotropie dar.

Nach der Abtrennung der Arteria pulmonalis und Atrium cordis dextrum wurde der rechte Ventrikel über die Arteria pulmonalis, entlang des Septums bis zur Herzspitze mit einer Federgriff-Mikroschere aufgeschnitten, geöffnet und mit Stecknadeln fixiert.

Um weitere Papillarmuskeln freisetzen zu können, wurde derselbe Vorgang auch mit dem linken Ventrikel wiederholt.

Die Papillarmuskeln wurden von Purkinje-Fasern, die den Erregungsleitungssystem bilden, sorgfältig befreit, um eine Beeinträchtigung des späteren Versuchsablaufs durch ihre Spontanaktivität zu vermeiden.

Danach wurde mit einem Bindefaden ein Silberdrahthäkchen am Ansatz der Papillarmuskelsehne befestigt und anschließend die Sehne durchgetrennt und die Muskeln vorsichtig herausgeschnitten.

Die Papillarmuskeln wurden nur mit einem kleinen Haken versehen, da das Präparat an einer Seite in der Versuchsanordnung eingeklemmt werden musste.

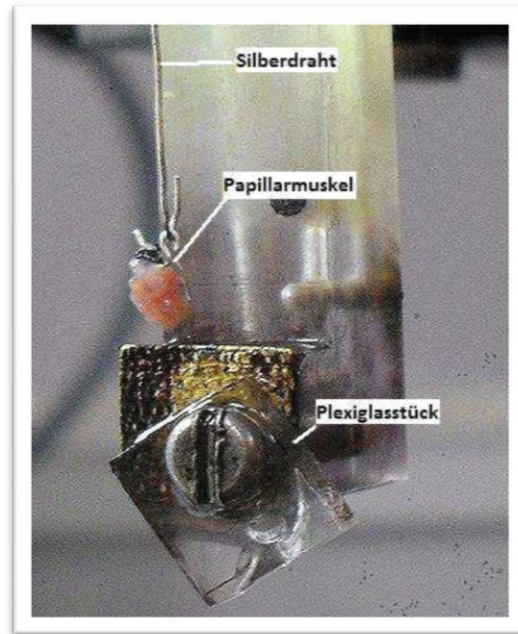
Besonders musste darauf geachtet werden, die Muskeln während der Präparierung nicht zu überdehnen und dadurch ihre Kontraktionskraft negativ zu beeinträchtigen.

Um eine genügende Sauerstoffversorgung der Gewebe zu garantieren, wurden ausschließlich Papillarmuskeln mit einem Durchmesser von weniger als 0,87 Millimeter verwendet (Koch-Weser 1963).

Die Muskeln des rechten Ventrikels sind kleiner, als kräftige Muskeln der linken Kammer und wurden dadurch für die Versuche bevorzugt verwendet.

Die präparierten Papillarmuskeln wurden in einer mit OxyMix™ begaste Elektrolytlösung bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

Abbildung 14: Präparat des Musculus papillaris



2.7.4. Isolierung des Ileum terminalis

Der Dünndarm (*Intestinum tenue*) erstreckt sich vom Pylorus bis zum Dickdarm (*Intestinum crassum*) und gliedert sich in drei Abschnitte: das Duodenum, das Jejunum und das Ileum.

Für die Versuche wurde nur das *Ileum terminalis* verwendet.

Nach der Explantation des Herzens und der thorakalen Gefäße wurde das Abdomen (ventral-median) mit einer OP-Schere in Längsrichtung aufgeschnitten. Um zum terminalen Abschnitt zu gelangen, musste man zuerst den Übergang vom Dünndarm zum Dickdarm lokalisieren (ca. 10 cm vor der Einmündung des Ileums in das Caecum). Ein ca. 20 Zentimeter langer Abschnitt wurde herausgezogen, von überschüssigem Mesenterium vorsichtig und ohne Verletzung des Gewebes befreit und dann mit einer Schere extrahiert.

Um eine Verwechslung der Enden zu vermeiden, wurde an der jejunalen Seite ein Bindfaden angebunden.

Die Präparation des Ileum terminalis fand wieder unter dem Lichtmikroskop, in einer mit Nährlösung befüllten und begasten Glaspetrischale statt.

Dafür wurde ein ca. 0,5 – 1 cm langes Darmstück an den Enden leicht schräg abgeschnitten, damit dadurch die Öffnungen vergrößert wurden.

Um das Einrollen des Darmstückes zu verhindern, wurde es, an den durch das schräge Abschneiden entstandenen Spitzen, mit Stecknadeln am Korkboden fixiert.

Es war wichtig für die Versuchsergebnisse, die empfindliche glatte Muskulatur des Dünndarms nicht durch übermäßiges Dehnen oder Drücken zu verletzen.

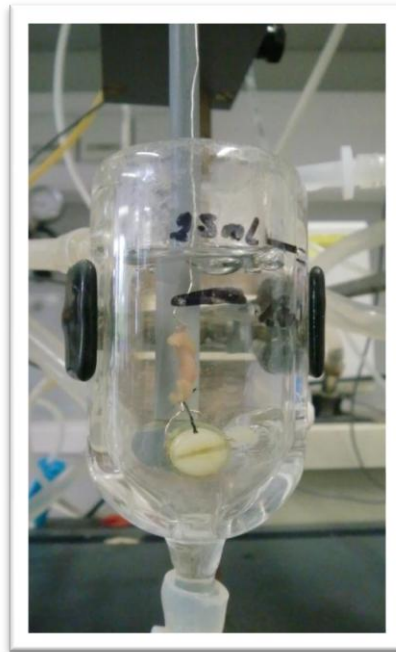
Nach Durchspülen mit Tyrode (mittels einer kleinen Pasteurpipette), um eventuell vorhandene Chymusreste zu entfernen, wurde an jedem Darmende (jejunale und caecale Ende) ein Silberhäkchen befestigt.

Hierfür verwendete man unterschiedlich farbige Bindfäden, um das Dickdarmende (schwarzer Faden) und das Magenende (roter Faden) beim späteren Einspannen in die Apparatur nicht zu verwechseln.

Wichtig war es dabei darauf zu achten, dass die Darmöffnungen an beiden Enden nicht verschlossen wurden, da sonst später eine gleichmäßige Durchspülung mit Nährstofflösung verhindert wurde. Das freibleibende Darmlumen gewährleistete das Einwirken der Testsubstanz auf die Darminnenseite.

Der fertig präparierter Teil des Ileums wurde bis zu Versuchsbeginn in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

Abbildung 15: Präparat des Ileum terminalis

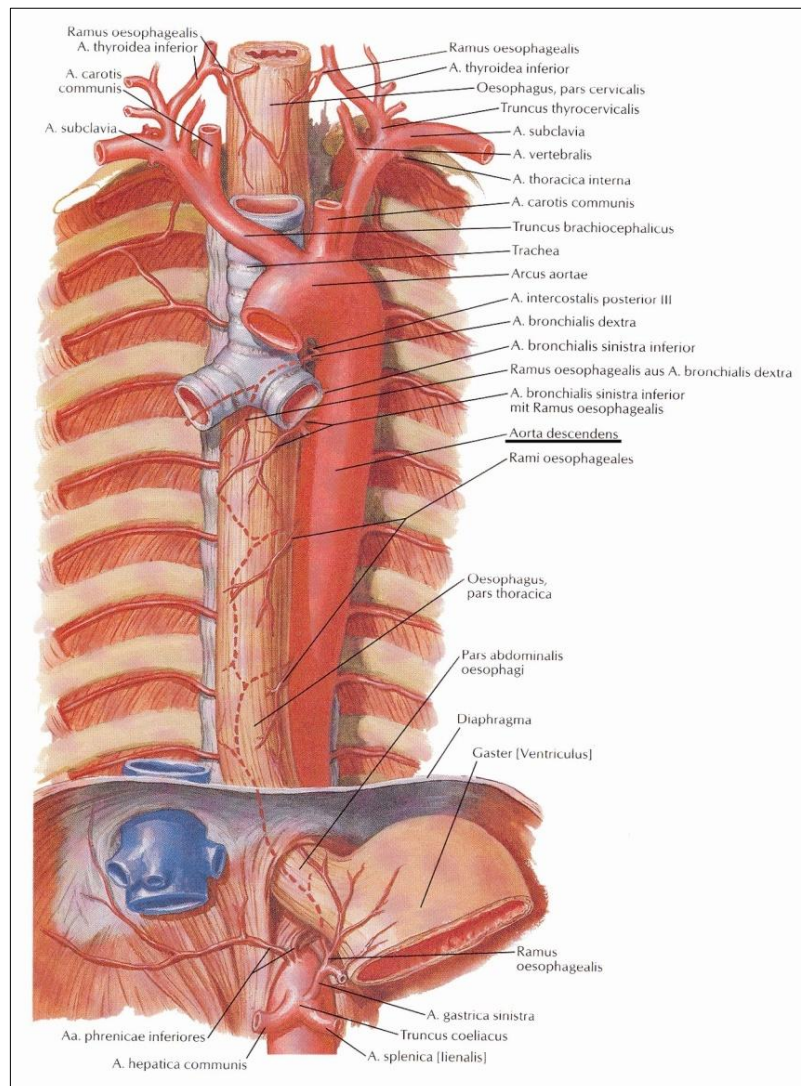


2.7.5. Isolierung der Aorta descendens

Nach Entnahme der anderen Organe wurde die, an der Wirbelsäule anliegende, thorakale Aorta isoliert. Dazu wurde der Thorax mit Hilfe einer Schere vollständig geöffnet, das Zwerchfell eingeschnitten und die Wirbelsäule stark nach vorne gedrückt.

Mit einer Pinzette wurde die angewachsene Aorta am cranialen Ende vorsichtig vom Rückgrat (*Spina dorsalis*) wegezogen und mit einer Feder-Mikroschere ein ca. 3 cm langes Stück herausgeschnitten.

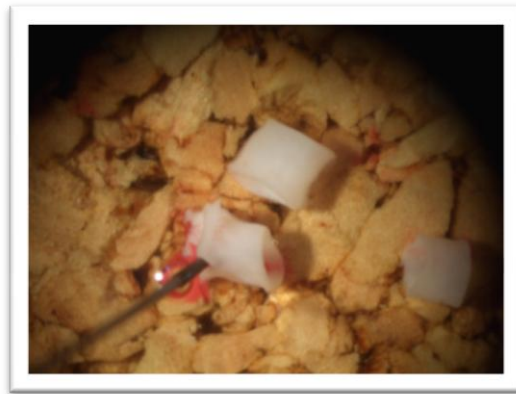
Abbildung 16: Verlauf der Aorta entlang des Rückgrates (Netter FH 2003)



Die Aorta wurde dann in einer mit Tyrode gefüllten Glaspetrishale mit zwei Steckadeln fixiert und unter einer Lupe präpariert. Anschließend wurden vorsichtig, ohne dabei das Präparat zu verletzen oder zu stark zu dehnen, mittels Federschere und Pinzette die Reste von anhaftende Fett- und Muskelgewebe, sowie das im Lumen gestockte Blut entfernt.

Das gereinigte Aortastück wurde in 2-3 mm lange, ringförmige Segmente zerschnitten, die direkt, ohne Häkchen an die Versuchsanordnung eingespannt werden konnten.

Abbildung 17: Ringförmig geschnittene Aortenpräparate



2.8. Versuchsanordnung

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den Organversuchen garantieren zu können, musste man die konstanten physiologischen Bedingungen, hinsichtlich Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffversorgung (Oxymix™) sowie Nährmedium, für die Präparate gewährleisten.

Für die praktische Arbeit an isolierten Meerschweinchenorganen standen zwei verschiedene Versuchsaapparaturen, im weiteren Verlauf Apparatur A und Apparatur B genannt, zur Verfügung. Die beide Apparaturen wiesen dasselbe Funktionsprinzip auf und unterschieden sich nur hinsichtlich Aufbau und Befestigungsmechanismus.

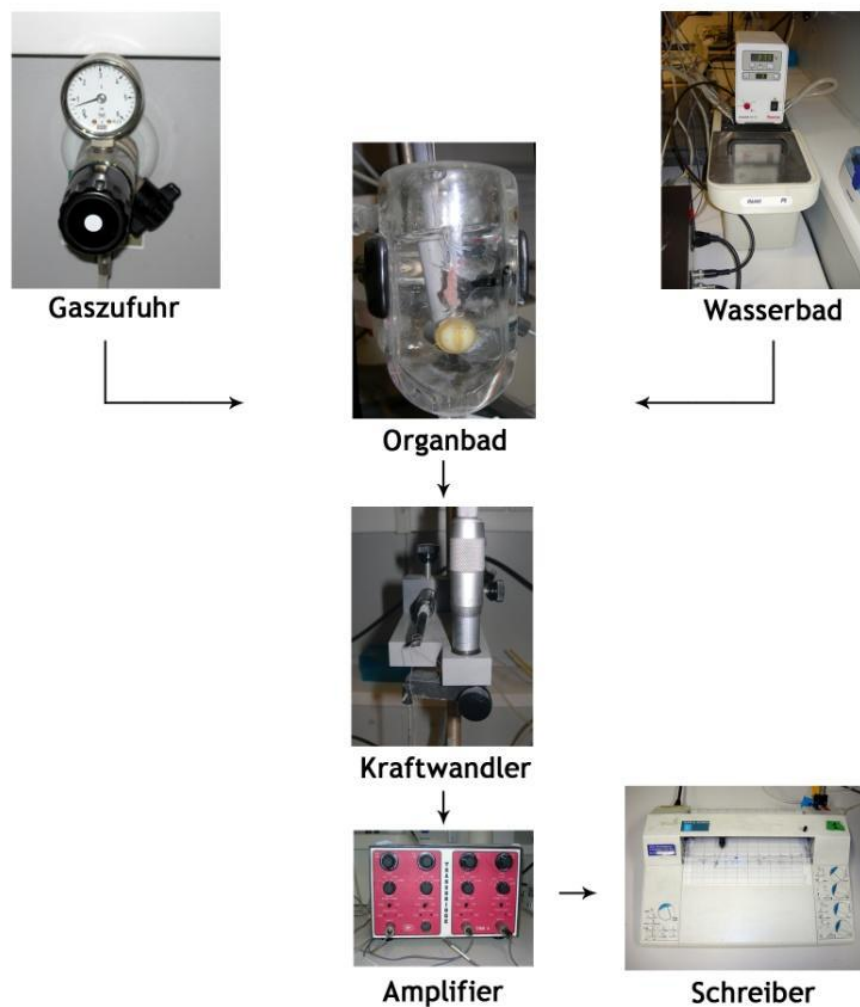
Für das Einspannen des Musculus papillaris, welches elektrisch gereizt werden musste, wurde die Apparatur A (siehe Abbildung 19) verwendet, während die Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und Ileum terminalis in die Apparatur B (siehe Abbildung 21) eingespannt wurden.

Bei beiden Versuchsaapparaturen handelte es sich um mit Oxymix™ begaste Organbäder mit Aufhängevorrichtungen für isolierte Organe. Diese Glasbehälter wurden mit 35 ± 1 °C (Apparatur A) bzw. mit 37 ± 1 °C (Apparatur B) temperiertem Wasser umspült. Somit wurde eine konstante physiologische Temperatur der Elektrolytlösung während des gesamten Versuchsablaufes gewährleistet.

Die Organpräparate wurden an Silberhäkchen fixiert und mit Hilfe eines Silberdrahtes, der mit einem Kraftwandler verbunden war, an die Apparaturen eingespannt.

Jede Veränderung am Organ - in Form einer Kontraktion oder einer Spasmolyse - wurde mit dem Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt und an den Amplifier weitergeleitet. Dieser wiederum verstärkte das ankommende Signal und führte es zum Schreiber, der die Versuchsergebnisse auf einem Millimeterpapier aufzeichnete.

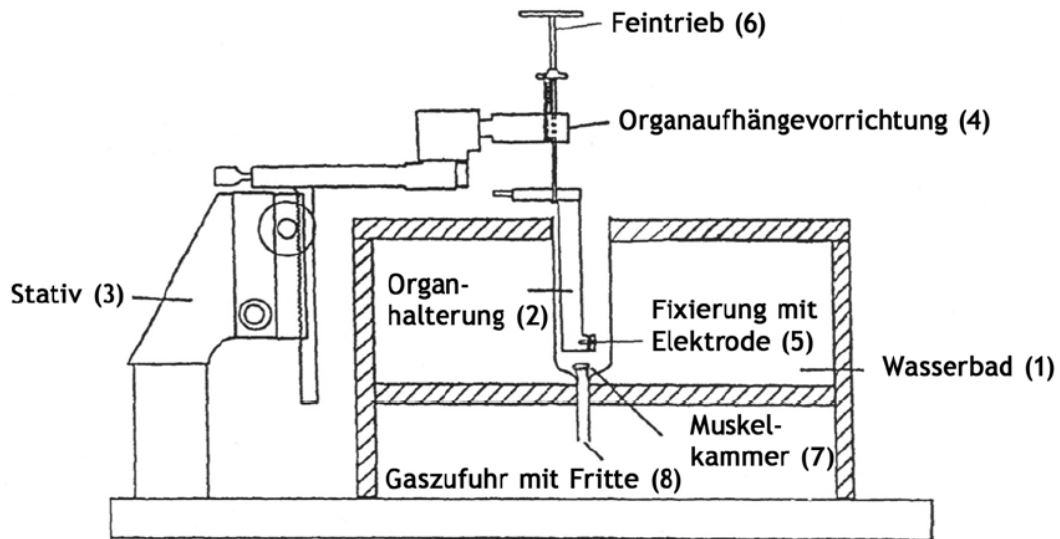
Abbildung 18: Übersicht der Versuchsanordnung



2.8.1. Versuchsanordnung A

Mit der Versuchsanordnung A wurden die Eigenwirkungen der Testsubstanz IL 349 auf den Musculus papillaris des Meerschweinchens untersucht.

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung A in der Seitenansicht



Das Gerät bestand aus einem Organbad bzw. einer Muskelkammer (7) aus Glas, welches in ein Wasserbad (1) aus Polymethylmethacrylat (PMMA) hinein tauchte. Das transparente Becken ermöglichte es, die eventuelle Fehlerquellen wie z.B. eine getrübbte Nährlösung oder unzureichende Gasversorgung, rechtzeitig zu erkennen und rasch zu beheben.

Das Organbad wurde mit 25 ml physiologischer Nährlösung befüllt und kontinuierlich von unten, über eine Glasfritte (8), mit Carbogen¹ begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Organs, sowie einen konstanten pH-Wert von 7,2-7,4 zu gewährleisten.

Das Wasserbad wurde mit Aqua bidestillata gefüllt und mittels Heizspirale, welche mit dem Thermostat („HAAKE“ von Thermo Fisher Scientific) und einem Kontaktthermometer verbunden war, beheizt.

Eine konstante Temperierung der Elektrolytlösung auf 35 ± 1 °C war notwendig, um möglichst optimale physiologische Bedingungen sicherzustellen und das Überleben der isolierten Organe zu ermöglichen.

¹ Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂

Der, bereits mit Silberdrahthäkchen, präparierte Musculus papillaris (siehe Kapitel 2.7.3.) wurde auf der Organhalterung (2) befestigt, welche auf einem Stativ (3) montiert war.

Das Präparat wurde zuerst mit dem Häkchen auf einen Silberdraht eingehängt und dann am frei hängenden Ende zwischen einer kleinen Plexiglasscheibe und einer Platin-Kathode, einem Silberchloridplättchen, (5) eingeklemmt.

Dabei war es sehr wichtig darauf zu achten, dass es beim Befestigen zu keiner Überdehnung des Präparats kam.

Um einer O₂-Mangelversorgung des Organs vorzubeugen, musste die Muskelhalterung mithilfe des Stativschlittens so rasch wie möglich in das Organbad abgesenkt werden, bis das Präparat vollständig in die temperierte, begaste Elektrolytlösung eintauchte.

Um eine maximale Kontraktionskraft des Musculus papillaris zu erreichen, war das Anlegen einer spezifischen Vorspannung, mittels Feintrieb (6), notwendig.

Da der Papillarmuskel, im Gegensatz zum Vorhof, nicht befähigt ist, spontan zu schlagen, musste er über die Elektrode gereizt werden. Dieser elektrische Impuls wurde von einem Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, World Precision Instruments, Hamden, CT, USA) erzeugt.

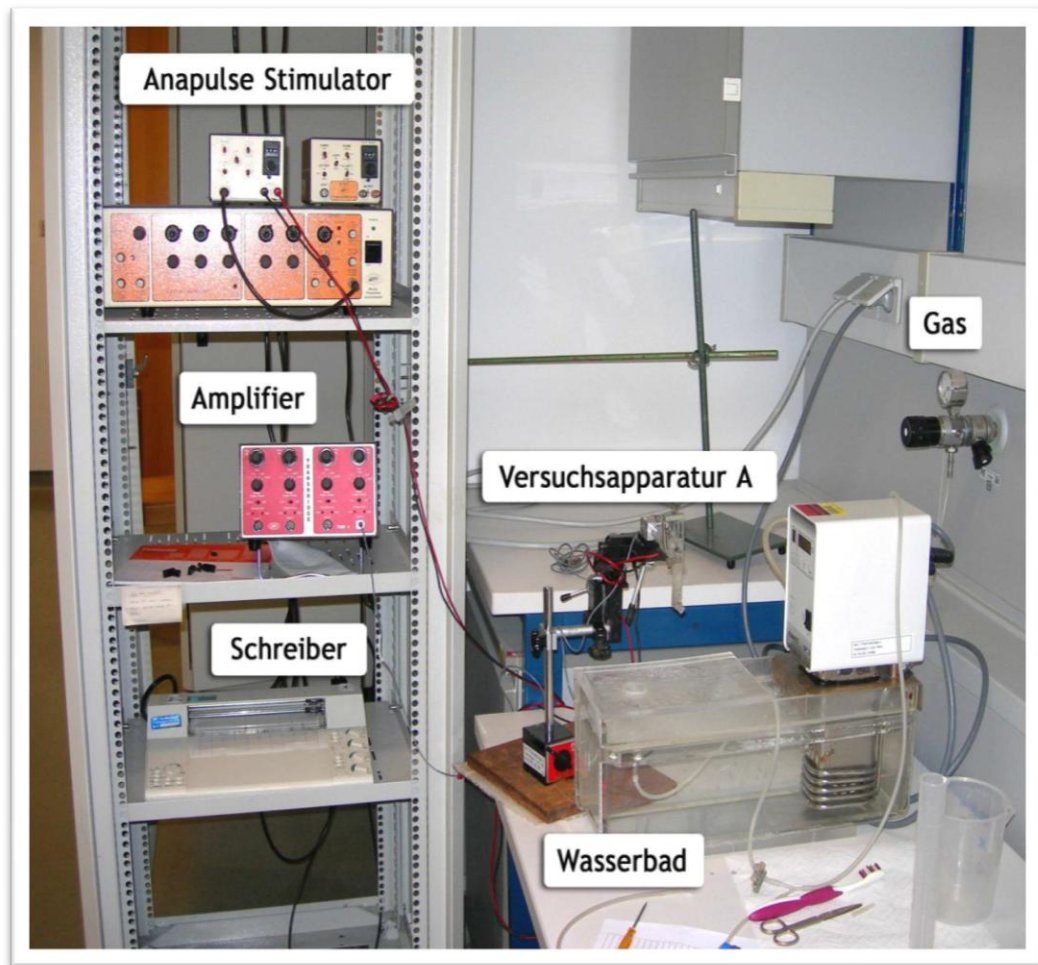
Der Silberdraht stellt die Verbindung zum Kraftwandler (4) (das eigentliche Messinstrument) dar, durch den die Kontraktionen des Organs in Stromimpulse transformiert werden.

Die elektrischen Impulse werden an einem Amplifier (Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) verstärkt und an den Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual-Channel, Kipp & Zonen, NL) übertragen.

Im Gegensatz zu Versuchsausrüstung B, hat die Versuchsausrüstung A nur eines Zulaufsystems, nämlich für Gaszufuhr.

Die Reinigung der Muskelkammer erfolgte durch Absaugen der Tyrode mit Hilfe einer Kunststoffspritze, an die ein Gummischlauch befestigt worden, sowie mehrmaliges Durchspülen mit verdünnter Salzsäure und Aqua purificata.

Abbildung 20: Originalabbildung der Versuchsanordnung A

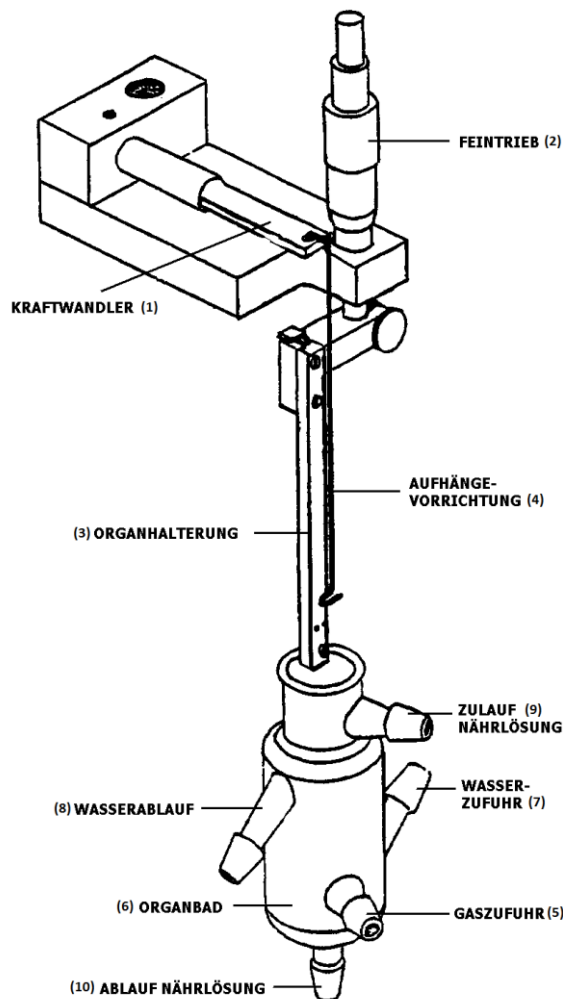


2.8.2. Versuchsanordnung B

Die Versuchsanordnung B wurde zur Messung der Kontraktionsänderung von den Präparaten Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und Ileum terminalis verwendet.

Der Versuchsablauf erfolgte nach einem sehr ähnlichen Prinzip wie bei Apparatur A (siehe Kapitel 2.8.1.). Der Unterschied lag in der Form des Organbades, der Fixierungsmöglichkeit der Organe und in der benötigten Temperatur.

Abbildung 21: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung B



Bei Organbad (6) handelte es sich um eine 8 ml bzw. 25 ml fassende Muskelkammer aus doppelwandigem Glas, zwischen deren Wänden auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiertes Wasser zirkulierte.

Die Wassertemperatur wurde mittels eines Thermostates mit einer Heizspirale während der Versuchsdauer konstant gehalten.

Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde die sich im Organbad befindende Nährlösung permanent von unten über eine Glasfritte mit Carbogen begast. Die Gaszufuhr (5) erfolge über einen seitlich angebrachten Schlauchanschluss und die einströmende Gasmenge konnte man mittels kleiner Schrauben regulieren.

Ein Abflussschlauch (10) an der Unterseite des Organbades war mit einer Kunststoffquetschklemme verschlossen und ermöglichte ein erleichtertes Wechseln der Elektrolytlösung bzw. das Durchspülen der Präparate.

Die einzelne Präparate wurden an dem Kraftwandler (1) vertikal befestigt, indem man sie zwischen zwei gebogenen Silberdrähtchen einspannte.

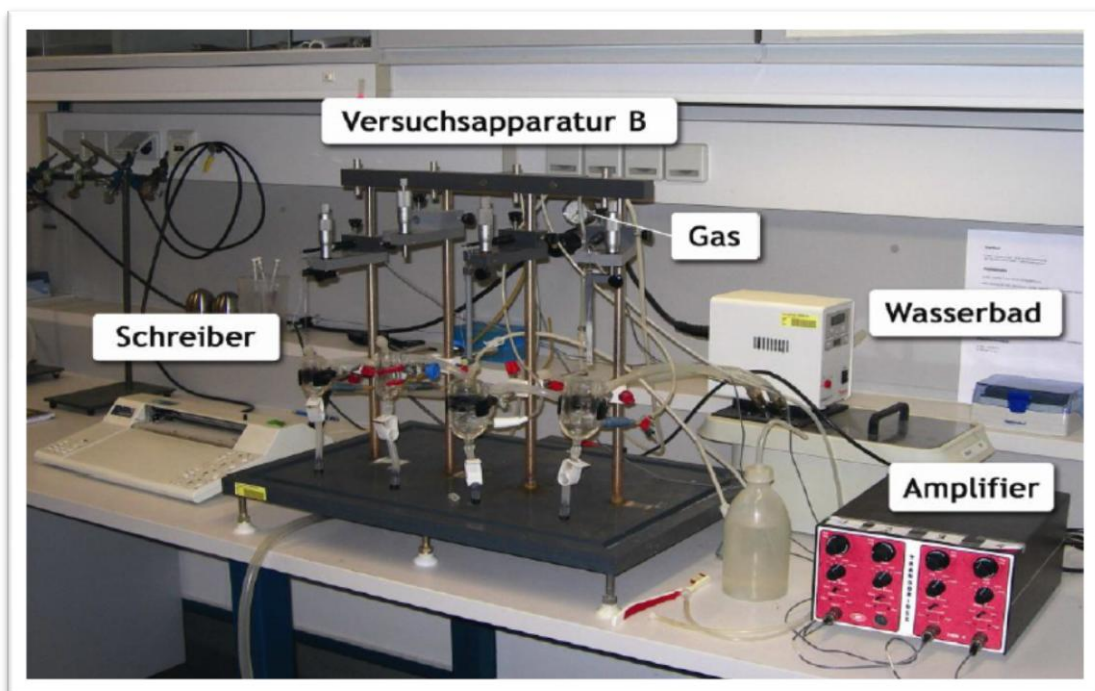
Die präparierte Aorta- und Arteria pulmonalis-Ringe wurden direkt zwischen der Aufhängevorrichtung (4) und dem L-förmigen Draht am unteren Ende der Organhalterung (3) eingespannt, während das Ileum terminalis und Atrium cordis dexter mit den schon vorher befestigten Silberhäkchen (siehe Kapitel 2.7.4. und 2.7.2.) eingehängt wurden.

Der Aufhängevorgang musste möglichst rasch ablaufen, um eine O₂-Mangelversorgung des Muskels zu vermeiden. Wichtig war hierbei auch, dass der Muskel durch Zug oder Druck nicht beschädigt wurde.

Die einzelne befestigte Präparate wurden dann mit dem Stativschlitten in das mit Nährstofflösung gefüllte Organbad (6) abgesenkt und konnten, zur Erreichung der maximalen Kontraktionskraft, mit dem Feintrieb (2) präzis vorgespannt werden.

Die Transformierung einer mechanischen Kraft in ein elektrisches Signal und Aufzeichnung der Ergebnisse erfolgten analog zur Apparatur A (siehe Kapitel 2.8.1.).

Abbildung 22: Originalabbildung der Versuchsapparatur B



2.8.3. Gasversorgung

Wie schon erwähnt (siehe Kapitel 2.4.), stellt eine ausreichende Gasversorgung der isolierten Organe eine Schlüsselrolle bei allen Versuchen dar.

Die einzelnen Organe mussten sowohl unmittelbar nach der Isolierung, als auch während der Präparation, Aufbewahrung und des gesamten Versuchsablaufs mit Oxymix™ (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) konstant begast werden.

Die Begasung war von Bedeutung für eine:

- ausreichende Sauerstoffversorgung der Präparate (Hypoxievermeidung)
- Sicherstellung und Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,4
- optimale, homogene Verteilung der eingespritzten Testsubstanz im Organbad.

Die konstante Gaszufuhr wurde über eine Gasleitstelle geregelt, welche eine gleichbleibende Intensität und Qualität ermöglichte. Von dieser zentralen Gasflasche wurde Oxymix™ über mehrere Ventile im Versuchslabor verfügbar gemacht. Von den einzelnen Gasventilen an den Arbeitsplätzen führten elastische Kunststoffschläuche zu den Versuchsaapparaturen.

Am Ende der Plastikschläuche, direkt vor dem Einlass in die Bäder, befanden sich Glasfritten, die eine Feinzerstäubung des Gasstroms in den Organbäder ermöglicht. Mit Schraubklemmen, die an den Anfängen der Schläuche angebracht werden, konnte die austretende Gasmenge fein reguliert und dem Bedarf angepasst werden.

Abbildung 23: Originalabbildung der Gaszufuhr



2.8.4. Wasserbad

Eine möglichst konstante physiologische Temperatur und optimale Bedingungen während des Versuchsablaufs wurden durch die Verwendung von Wasserbad mit eingebautem Thermostat gewährleistet.

Die Versuche an Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und terminales Ileum wurden bei einer Wasserbadtemperatur von 37 ± 1 °C durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.2.). Bei den Versuchen am Musculus papillaris musste das Wasserbad eine Temperatur von 35 ± 1 °C aufweisen (siehe Kapitel 2.8.1.).

Um die entsprechende Temperatur schon am Beginn des Versuches sicherzustellen, musste das Thermostat des Wasserbades rechtzeitig, ca. 30 Minuten vor dem Einspannen des Präparates, eingeschaltet werden.

Abbildung 24: Originalabbildung des Wasserbades



2.8.5. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Die Präparate wurden über einen Silberdraht mit dem Kraftwandler, der das eigentliche Messinstrument darstellte, verbunden.

Das Prinzip des Kraftwandlers oder „Transducers“ (Transbridge™, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) beruht auf der Umwandlung einer mechanischen Kraft, mit der sich das eingespannte Organ kontrahierte, in eine elektrische Größe.

Dafür wurde ein Widerstandswandler mit Dehnungstreifen in Wheatstone'scher Brückenschaltung (Typ AE875, Aksjeselskapet, Horten, Norwegen) verwendet.

Bei Änderung der Kontraktionskraft bzw. der Dehnung kommt es zur Änderung des elektrischen Widerstandes des Messstreifens und damit zur proportionalen Änderung des angelegten Stromflusses.

Die nötige Exzitationsspannung für den Transducer lieferten zwei 6 V Batterien (Varta Spezial, No. 430, EC 4R 25).

Die durch Kontraktionen der isolierten Organe entstandenen Signale wurden von einem „Transbridge™“ 4-Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments,

Sarasota, Florida, USA) verstärkt und die Versuchsergebnisse wurden von einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 Dual Channel, Kipp & Zonen, Netherlands) mit automatischem Papiervorschub registriert.

Abbildung 25: Schematische Darstellung der Signalgewinnungskaskade

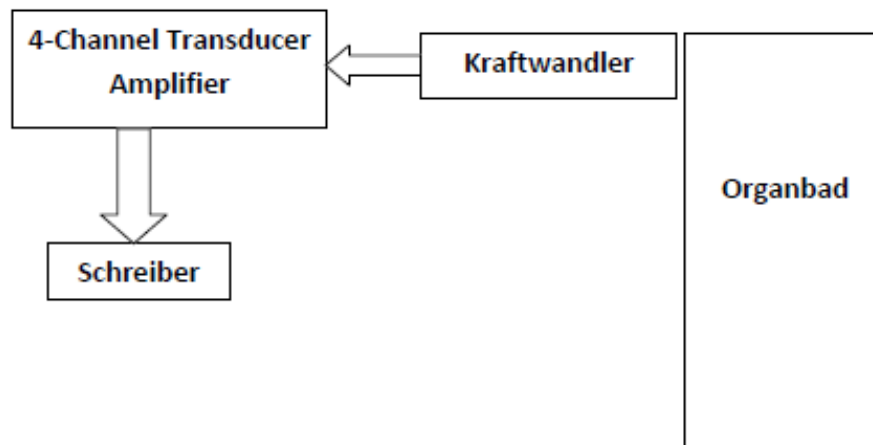
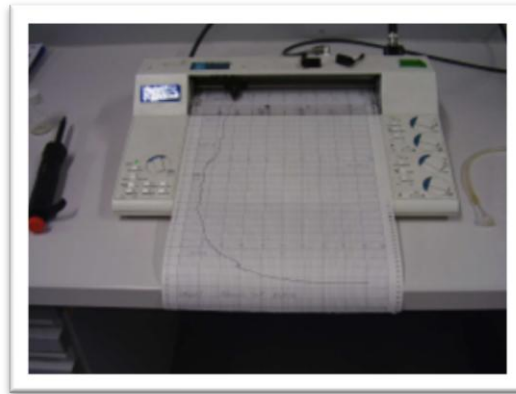


Abbildung 26: Originalabbildung eines „Transbridge™“ 4-Channel Transducer Amplifiers



Abbildung 27: Originalabbildung eines Flatbed Recorder BD 112 Dual Channel



2.9. Versuchsablauf

In diesem Kapitel wird die genaue Durchführung der Versuche und die jeweiligen Versuchsbedingungen an den isolierten Organen detailliert beschrieben.

Die Versuche - Isolierung und Präparation der einzelnen Organe - wurden jeden Tag mit gleichbleibender Methodik und unter identen Bedingungen durchgeführt (Reiter 1967).

Um reproduzierbare Ergebnisse, die durch Verunreinigungen nicht beeinträchtigt werden, zu erhalten, war es nötig zu Beginn und am Ende jedes Arbeitstages, sowie nach jedem Organwechsel die Organbäder und dazugehörigen Halterungen sorgfältig zu reinigen.

Um auskristallisierte Salze der Nährstofflösungen am Organbäder zu entfernen, wurden sie mit einer 0,1N Salzsäure gefüllt und nach kurzem Einwirken mit einer Bürste durchgeputzt. Anschließend wurden die Bäder noch 2-3 mal mit Aqua bidestillata gründlich ausgespült und mit Tyrode gefüllt.

Es war notwendig, die Testung der Substanzwirkung an den unterschiedlichen isolierten Organen mehrmals durchzuführen, um aussagekräftige Ergebnisse zu ermöglichen.

2.9.1. Versuchsablauf bei Atrium cordis dextrum

Zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz IL 349 auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum wurde die Versuchsanordnung B verwendet.

Um die Funktionsfähigkeit des Organs aufrecht zu erhalten, wurde der noch schlagende Vorhof sofort nach der Präparation (siehe Kapitel 2.7.2.) vorsichtig an der Aufhängevorrichtung ohne Spannung eingehängt. Ein Überdehnen beim Einspannen war zu vermeiden, um die Autonomie des Sinusknotens nicht zu gefährden.

Nach der Befestigung wurde das Präparat mit Hilfe des Stativschlittens in das Organbad, das mit begaster und auf 37 ± 1 °C temperierter Nährlösung gefüllt wurde, gebracht.

Eine elektrische Reizung war in dem Fall nicht notwendig, da das Organ durch den sich im rechten Vorhof befindlichen Sinusknoten fähig war, spontane Schläge zu erzeugen.

Nachdem der Schreiber und der Verstärker in Betrieb genommen wurden, wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 10,4 mN (was einer Größenordnung von 10,4 cm am Millimeterpapier entsprach) bei einer Stromstärke von 5 mV und einem Speed von 5 mm/s angelegt, um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen und für alle Versuche die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen.

Während des ganzen Versuchsaufbaues musste die Spannung mit Hilfe des Mikrometers nachjustiert werden, da der Vorhof aufgrund seiner Plastizität ständig etwas nachgab.

Im Anschluss an eine ca. 30-minütige Anpassungszeit wurde die so genannte Kontrollphase von 45 Minuten durchgeführt, wobei die Schlagfrequenz am Millimeterpapier registriert wurde. Die Aufzeichnung wurde nicht ständig durchgeführt, sondern es wurden alle 5 Minuten für 12 Sekunden (entspricht sechs Kästchen auf dem Millimeterpapier) die Schläge aufgezeichnet.

Die Schlagfrequenz des Vorhofes wurde solange kontrolliert, bis die Schläge regelmäßig und konstant waren. Nach mindestens drei konstanten Werten konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz nach dem Pipettierschema (siehe Tabelle 2) begonnen werden.

Die Substanzlösung wurde mit Hilfe der Kolbenhubpipette möglichst immer an der selben Stelle, in Organnähe, eingespritzt, ohne das Präparat oder den Kraftwandler zu berühren.

Die Messung der Schlagfrequenz des Atriums erfolgte alle 5 Minuten und nach jeweils 45 Minuten (entspricht der Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen) wurde die nächste Konzentration des Wirkstoffs hinzugefügt.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Schreibers mit einem Papiervorschub von 5 mm/s registriert. Zur Auswertung musste die Schlaganzahl mit dem Faktor fünf multipliziert werden, um die Schlagfrequenz pro Minute ermitteln zu können.

2.9.2. *Versuchsablauf bei Aorta descendens*

Die ringförmig präparierte Aortastücke (siehe Kapitel 2.7.5.) konnten direkt auf die L-förmig gebogenen Silberdrähte in die Aufhängevorrichtung der Versuchsanordnung B eingespannt werden.

Beim Einspannen war es wichtig darauf zu achten, dass die Präparate nicht durch die Enden der Drähte beschädigt werden oder zu stark gedehnt werden.

Mit Hilfe des Stativschlittens wurde die Organhalterung, ohne unnötige Zeitverzögerung, in das mit begaster Elektrolytlösung gefüllte Organbad eingebracht, das bereits eine physiologische Temperatur von 37 ± 1 °C erreicht hatte.

Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und auf den Nullpunkt positioniert. Mit dem Feintrieb wurde eine Vorspannung von 19,6 mN bei einer Stromstärke von 10 mA und einem Speed von 5 mm/s angelegt.

Es folgte eine 20-minütige Anpassungszeit, in der die eventuelle Abweichungen von der Nulllinie mittels Mikrometer korrigiert wurden.

Nach erfolgter Gewöhnungszeit wurde der Amplifier auf 5 mV umgestellt und mit dem Feintrieb wieder auf die Nulllinie positioniert. Der Schreiber wurde hinabgelassen, wodurch mit der Kurvenaufzeichnung begonnen werden konnte.

Die im Organbad befindliche Elektrolytlösung wurde durch Öffnen der Schlauchklemmen abgelassen und durch eine 90 mmol/l KCl-Lösung (0,67 g KCl in 100 ml Tyrode, siehe Tabelle 4) ersetzt, um damit eine Vorkontraktion zu erreichen und so danach die Veränderung der Kontraktionskraft messen zu können.

Durch die Kaliumchlorid-Lösung kam es zu einer schnellen Kontraktion der Aorta, die durch ein rasches Ausschlagen des Schreibers nach links erkennbar war.

Nach ca. 45-60 Minuten stellte sich eine konstante Kontraktion und somit die Plateauphase ein. Wurde dieses „steady state“, welches mit 100 % definiert wurde, erreicht, konnte mit der Testsubstanz-Zugabe begonnen werden, wobei alle 45 Minuten die nächst höhere Konzentration eingespritzt wurde (Pipettierschema, siehe Tabelle 2).

Die Kontraktionsveränderungen bzw. eine eventuelle Abnahme der Kontraktion des Organs wurden während der gesamten Versuchsablauf vom Schreiber aufgezeichnet und konnten nachher ausgewertet werden.

Dabei war es wichtig, die Testsubstanz möglichst immer an derselben Stelle zu injizieren und die Präparate, sowie die Organhalterung nicht zu berühren, da sonst zu falschen Aufzeichnungen bzw. Resultaten kommen kann.

2.9.3. *Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis*

Die Versuche an der vorbereiteten Ringe der Arteria pulmonalis (die Messung der Kontraktionsabnahme und die Substanzzugabe) wurden analog zu denen der Aorta descendens durchgeführt.

Das Präparat wurde zwischen zwei Silberdrahthäkchen in die Apparatur B (siehe Kapitel 2.8.2.) eingespannt und in das Organbad, mit der auf 37 ± 1 °C temperierten und mit Oxy mix begasten physiologischen Nährlösung, eingetaucht.

Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5 mV Stromstärke, und nicht 19,6 mN wie bei Aorta, angelegt wurde.

Nach 30 Minuten Anpassungszeit, wurde ein 90 mmolare KCl zur Vorkontraktion dazugegeben. Nachdem ein konstanter Plateauwert erreicht wurde, wurde die

Testsubstanz-Lösung (1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) alle 45 Minuten zugespritzt.

Die Veränderungen der Kontraktionskraft (Kontraktionsabnahme) wurden wieder mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

2.9.4. Versuchsaufbau bei *Ileum terminalis*

Das isolierte und präparierte Ileumstück (siehe Kapitel 2.7.4.) wurde vorsichtig und möglichst rasch mittels den bei der Präparation befestigten Silberdrahthäkchen in die Versuchsanordnung B eingehängt und ins, auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ temperierte und begaste, Organbad abgesenkt.

Es war dabei zu achten, dass das Darmende (jejunale Ende) nach oben und das Magenende (caecale Ende) nach unten zeigten und beide offen bleiben, um eine bessere Durchspülung des Lumens mit Nährlösung und Substanz während des Versuchsaufbaus zu erreichen.

Im Anschluss wurde der Schreiber und Verstärker aktiviert und eine Vorspannung von 4,9 mN bei 5 mV Stromstärke, zur maximalen Kraftentwicklung der glatten Muskulatur, eingestellt. Durch das Vorspannen wurden die gleichen Bedingungen für alle Versuche geschaffen, was besonders wichtig für die Reproduzierbarkeit war.

Während der etwa 20 Minuten dauernden Gewöhnungszeit waren die Kontraktionen der Darmmuskulatur an der Bewegung des Schreibers erkennbar und dieser musste immer wieder mittels Feintrieb auf die definierte Nulllinie gestellt werden.

War eine konstant bleibende Peristaltik des Ileums erreicht, konnte die Aufzeichnung des Versuchs begonnen.

Um die Abnahme der Kontraktionskraft bzw. die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz messen zu können, war eine maximale Vorkontraktion des Muskels mit Kaliumchlorid-Lösung notwendig. Die physiologische Nährlösung wurde über den Gummischlauch abgelassen und schnell durch die frisch zubereitete 60 mM KCl-Lösung (0,45 g KCl in 100 ml Tyrode, siehe Tabelle 4) ersetzt. Die erhöhte KCl-Konzentration bewirkte eine starke und schnell auftretende Kontraktion des Ileums, die aber auch schnell abnahm und wieder langsam anstieg.

Nach ca. 45 Minuten war die maximale, 100%-ige Kontraktion erreicht und die Kurve bildete ein Plateau aus, das als Kontrollwert bei der Auswertung verwendet werden konnte.

Sodann konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz IL 349 (Pipettierschema, siehe Tabelle 2) im Abstand von jeweils 45 Minuten Einwirkzeit, begonnen werden.

Die Substanzlösung bedingte eine Abnahme der Kontraktion, die mit dem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet wurde.

Dabei wurde, wie bereits erwähnt, darauf geachtet, die Substanzlösung möglichst immer an derselben Stelle und möglichst nahe dem Organ, zu injizieren, ohne mit der Finnpipette den Kraftwandler oder das Organ selbst zu berühren, um ein Verfälschen der Ergebnisse zu verhindern.

2.9.5. *Versuchsablauf bei Musculus papillaris*

Anhand des Musculus papillaris wurde die Auswirkung der Testsubstanz IL 349 auf die Kontraktionskraft untersucht.

Der isolierte und präparierte Papillarmuskel wurde, wie in Kapitel 2.8.1. beschrieben, in der Versuchsanordnung A fixiert, wobei eine Ende über den befestigten Silberhäkchen an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt und das freie untere Ende in die Organhalterung eingeklemmt wurde, um einen Kontakt zur Reizelektrode herzustellen. Der so eingespannte Muskel wurde in die mit Nährstofflösung befüllte und begaste Muskelkammer eingebracht.

Eine konstante Temperierung der Elektrolytlösung auf 35 ± 1 °C war notwendig, um möglichst optimale physiologische Bedingungen sicherzustellen.

Am Gerät wurde die Stromstärke auf 5 mV (2 mV oder 1 mV bei Bedarf), sowie die Geschwindigkeit auf 5 mm/s eingestellt und die Spitze des Schreibers auf die definierte Nulllinie gebracht. Eine Vorspannung von 3,92 mN wurde mittels Feintrieb angelegt und während des gesamten Versuchsablaufs stets nachjustiert, um eine Abnahme der

Inotropie des Papillarmuskels aufgrund einer Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Da dem Papillarmuskel die spontan schlagenden Purkinjefasern entfernt wurden, musste er durch gezielte elektrische Reizung über Silberelektroden zur Kontraktion angeregt werden. Diese erfolgte mit Hilfe des Reizgerät Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, World Precision Instruments, Hamden, CT, USA).

Nach einer ca. 30-minütigen Anpassungszeit wurde das Präparat mittels Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms (entspricht 60 Amplituden pro Minute) gereizt.

Über eine Isolation Unit wurde die Reizstärke so lange erhöht, bis der Papillarmuskel zu kontrahieren begann. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Reizung regelmäßig erfolgte und dass die Stromstärke nicht zu hoch war (maximal 10 % über der minimalen Reizschwelle), da sonst die endogene Catecholaminspeicher, Adrenalin und Noradrenalin, zu schnell entleert worden wären. Dies würde zu einer konstanten Abnahme der Kontraktionsamplitude (s.g. „run down“) und somit zur Verfälschung der Versuchsergebnisse führen (Furchgott R. F. et al. 1959).

Danach erfolgte eine mindesten 45 Minuten lange Kontrollphase, in der alle 5 Minuten fünf bis sechs aufeinander folgende Kontraktionsamplituden aufgezeichnet und auf Millimeterpapier abgemessen wurden. Erst bei Vorliegen von konstanten Amplituden konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanzlösung nach Pipettierschema (siehe Tabelle 2) begonnen werden.

Alle 5 Minuten wurden sechs Amplituden aufgezeichnet und nach 45 Minuten Einwirkzeit wieder die nächst höhere Konzentration der Testsubstanz eingespritzt. Am Ende jedes Konzentrationsintervalls wurde die Geschwindigkeit auf 20 mm/s (Schnell-Lauf) eingestellt, um einen übersichtlicheren, breiteren Graphen zu erhalten.

2.10. Auswertung der Ergebnisse und Statistik

2.10.1. Auswertung – *Atrium cordis dextrum*

Bei den Versuchen an dem Atrium cordis dextrum wurde die Änderung der spontanen Schlagfrequenz des Sinusknoten (Chronotropie) überprüft.

Die Aufzeichnungen erfolgten hier alle fünf Minuten und nicht permanent. Mittels des Schreibgerätes mit einem Papiervorschub von 5 mm/s, wurde die Schlagfrequenz innerhalb von 12 Sekunden bzw. über eine Strecke von 6 Zentimeter auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet. Die abgezählten Impulse wurden mit dem Faktor 5 multipliziert, um die Anzahl der Schläge pro Minuten zu errechnen.

Die letzte Kontrollmessung stellte den Referenzwert (entspricht 100%) dar, mit der jeweils die letzten Messwerte aller übrigen Konzentrationen verglichen wurden. Der Prozentwert wurde berechnet und die Einflüsse der Testsubstanz anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt.

Am Ende der kumulativen Zugabe der Testsubstanz konnte eine neutrale, positiv oder negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof festgestellt werden.

2.10.2. Auswertung – *Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis*

Bei diesen Versuchen könnte die, durch die Testsubstanz hervorgerufene, vasodilatierende bzw. spasmolytische Aktivität festgestellt werden.

Um die Abnahme der Kontraktionskraft der isolierten Organe ermitteln zu können, müssen die Präparate zuerst chemisch mit der KCl-Lösung maximal vorkontrahiert werden (siehe Kapitel 2.5.). Wenn die Kontraktionskurve, die während des gesamten Versuchsablaufes mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde, die Plateauphase erreicht hatte, wurde die Testsubstanz IL 349 dazugegeben (Pipettierschema, siehe Kapitel 2.2.).

Um die Auswertung die Abstände von der Nulllinie zu den Messpunkten bzw. dem erreichten Plateau, das als 100%-Wert gilt, exakter bestimmen zu können, wurde der jeweilige Einspritzstelle markiert.

Die vom Schreiber aufgezeichneten Kontraktionsamplituden wurden mittels eines Lineals abgemessen und mit dem Kalibrationsfaktor des Kraftwandlers (bei 5 mV galt: 1 cm entspricht 0,98 mN) multipliziert, um die genauen Messwerte in mN zu ermitteln. Wurden aber die Messungen mit 2mV oder 10mV Spannung durchgeführt, so waren die Korrekturfaktoren 0,2 bzw. 2.

In weiterer Folge wurde die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft im Bezug auf den Referenzwert ermittelt. Letztendlich wurde daraus eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, aus der, wenn vorhanden, der EC_{50} -Wert berechnet werden konnte.

2.10.3. Auswertung – *Musculus papillaris*

Bei den Versuchsreihen des *Musculus papillaris* wurde die Änderung der Kontraktionskraft (Inotropie) durch die Einwirkung der Analysesubstanz IL 349 ermittelt.

Hier wurden, wie beim *Atrium cordis dextrum*, alle fünf Minuten Aufzeichnungen gemacht und im 45-minütigen Abstand die nächst höhere Konzentration der Testsubstanz eingespritzt.

Um die Kontraktionskraft in Millinewton (mN) messen zu können, wurden die Längen der jeweils 6 aufgezeichneten Amplituden mittels Lineal abgelesen und abhängig von der verwendete Stromstärke mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert. Die meisten Messungen wurden bei 2 mV aufgezeichnet und mit dem Faktor 0,4 multipliziert, um die Versuche zu standardisieren. Wurden aber die Versuche mit 5mV Spannung durchgeführt, so war der Korrekturfaktor 0,98.

Die Durchschnittslänge der letzten Kontrollmessung stellte den Referenzwert dar und wurde als 100% angenommen. Jeweils die Amplituden der letzten Messung der verschiedenen Konzentrationen wurden mit diesem Wert verglichen und man konnte in weiterer Folge die Abnahme in Prozent errechnen.

2.10.4. Statistik

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.2.), musste die geringe Eigenwirkung des Lösungsmittels, Dimethylsulfoxid, berücksichtigt werden. Zunächst wurden die Messergebnisse der Versuche ausgewertet und erst danach der DMSO-Wirkung entsprechend subtrahiert oder addiert.

Aus den Messdaten von „n“ Versuchen wurden, unter Verwendung des Programmes „Sigma Plot 9.0“, die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM = *standard error of mean*) errechnet und in Konzentrations-Wirkungskurven eingetragen, wobei die Veränderungen der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz in Prozent auf die Ordinate und die injizierte Testsubstanz-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ logarithmisch auf die Abszisse aufgetragen wurden.

Die EC_{50} -Wert wurde dann auf graphischem Wege aus der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt. Dieser Wert stellt jene effektive Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) von Testsubstanz IL 349 dar, bei der die Kontraktionskraft (Inotropie) bzw. die Schlagfrequenz (Chronotropie) auf die Hälfte des Ausgangswertes absinkt.

In den Tabellen wurde die Chronotropie mit „f“ (*frequency*) und die Inotropie mit „fc“ (*force of contraction*) bezeichnet.

Unter Verwendung des „Student-t-Tests für gepaarte Beobachtungen“ wurden die erhaltene Messergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz beurteilt, wobei die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$) als signifikant und jene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant bezeichnet wurden. Die Werte mit höheren Irrtumswahrscheinlichkeiten galten als nicht signifikant (n.s.).

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen die Wirkung von Testsubstanz IL 349 auf die isolierten Organe der Meerschweinchen.

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, wurden als Organe für die Versuchsreihen Musculus papillaris, Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis und Atrium cordis dextrum herangezogen, wobei pro Organ ca. vier Versuche durchgeführt wurden, um aussagekräftige und repräsentative Ergebnisse gewährleisten zu können.

Die Konzentrations-Wirkungskurve wurde für das jeweilige Organ erstellt und aus den erhaltenen Messdaten wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardfehler errechnet.

Für die Untersuchung des Wirkmechanismus mit Glibenclamid mussten mindestens drei Versuchsreihen an einem ausgewählten Organ (Aorta descendens) durchgeführt werden.

3.1. Wirkungen der Testsubstanz IL 349

3.1.1. Wirkung von IL 349 auf das Ileum terminalis

Die Wirkung der Testsubstanz IL 349 auf die Inotropie (Kontraktionskraft) des Ileum terminalis wurde an vier isolierten Präparaten ermittelt.

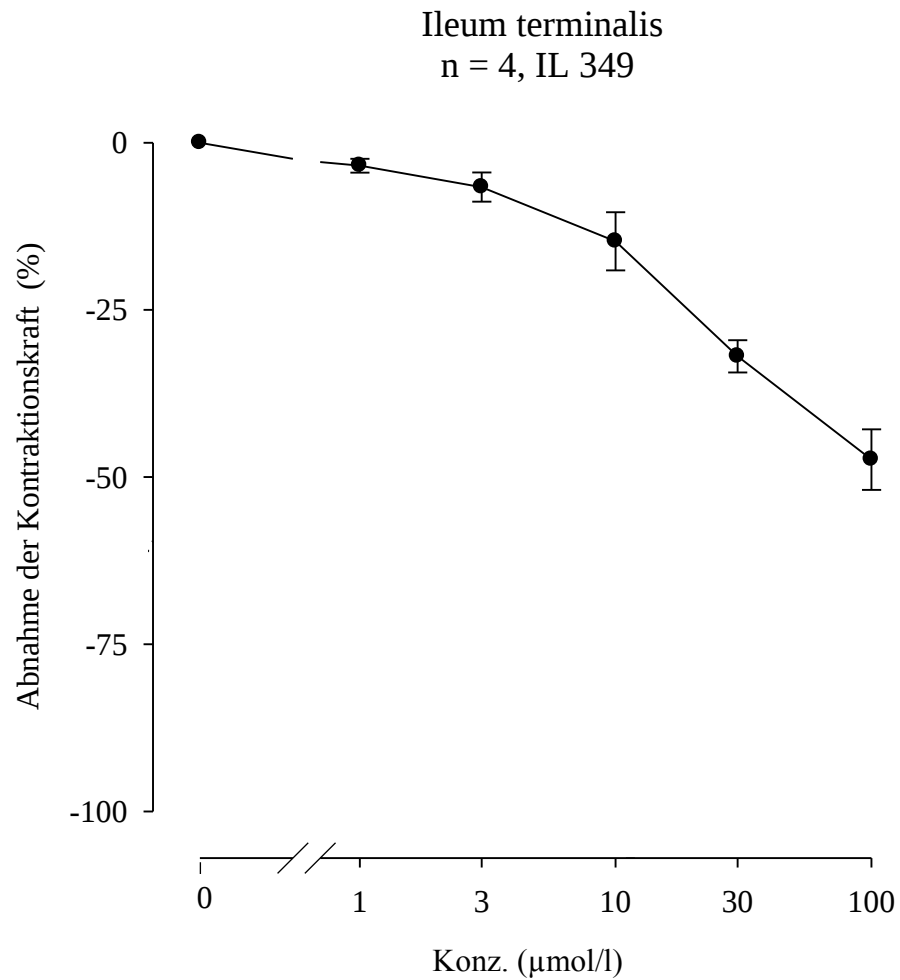
Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche von IL 349 am Ileum terminalis

<i>IL 349 ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	13,03 $\pm$ 1,54	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	12,62 $\pm$ 1,63	-3,44 $\pm$ 1,04	4	n.s.
3	12,16 $\pm$ 1,44	-6,64 $\pm$ 2,19	4	n.s.
10	11,10 $\pm$ 1,36	-14,75 $\pm$ 4,35	4	0,05
30	8,83 $\pm$ 0,97	-31,95 $\pm$ 2,40	4	0,01
100	6,77 $\pm$ 0,71	-47,38 $\pm$ 4,53	4	0,01

Legende zu Tabelle 5:

In Tabelle 5 werden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) im mN und Prozent (%) bei verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von 4 Versuchen wiedergegeben.

Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungskurve von IL 349 am Ileum terminalis



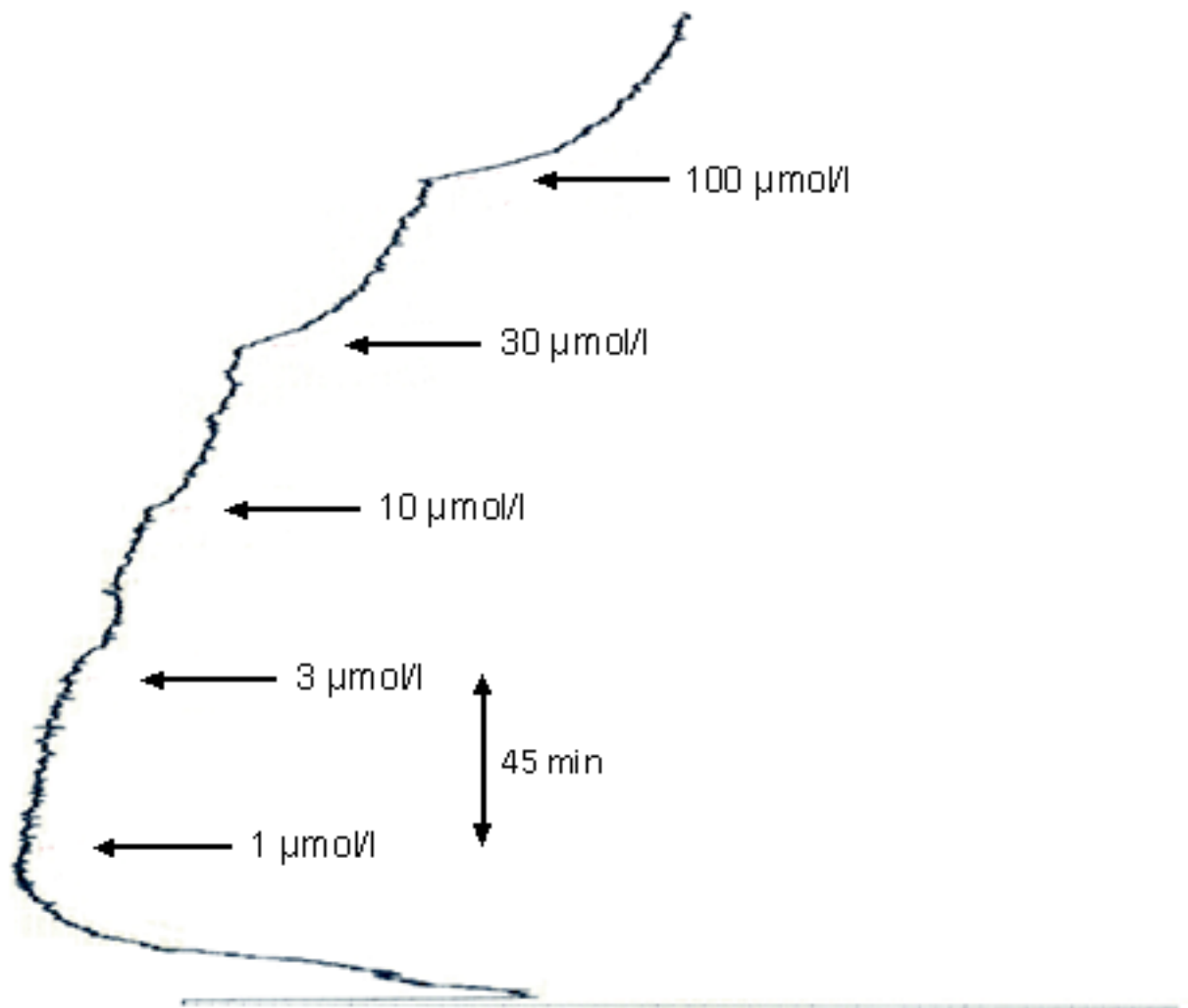
Legende zu Abbildung 28:

Die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz IL 349 in $\mu\text{mol/l}$ sind auf der x-Achse dargestellt. Die Änderungen bzw. die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent (%) sind auf der y-Achse abgebildet.

Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte ($n=4$), während die vertikal verlaufenden Balken die dazugehörigen Standardabweichungen darstellen.

In der Abbildung 28 ist klar ersichtlich, dass aufgrund der schwachen Wirkung keine EC_{50} graphisch ermittelt werden konnte.

Abbildung 29: Originalaufzeichnung der Wirkung von IL 349 am Ileum terminalis



Legende zu Abbildung 29:

Durch das Einwirken der Testsubstanz IL 349 in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Ileum terminalis ergibt sich der Kurvenverlauf. Durch Zugabe der Testsubstanz, die im Abstand von 45 Minuten in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurde, kam es zur leichten Abnahme der Inotropie bzw. zur leichten Relaxierung des terminalen Ileums.

3.1.2. Wirkung von IL 349 auf die Aorta descendens

Die Wirkungsermittlung der Testsubstanz IL 349 auf die Änderung der Kontraktilität (Inotropie) der Aorta descendens wurde in vier kontrollierten Versuchen geprüft.

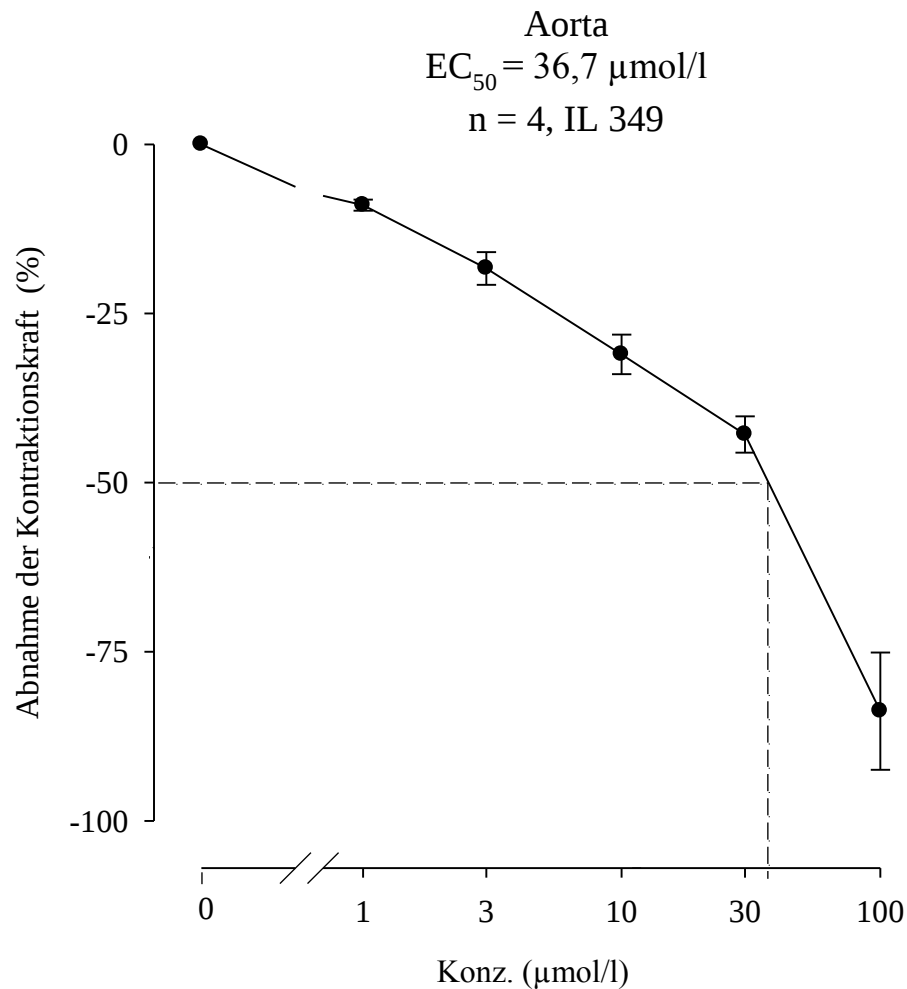
Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche von IL 349 an der Aorta descendens

<i>IL 349 ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	14,30 $\pm$ 1,03	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	11,52 $\pm$ 1,83	-8,99 $\pm$ 0,83	4	n.s.
3	11,68 $\pm$ 0,91	-18,34 $\pm$ 2,42	4	0,05
10	9,90 $\pm$ 0,93	-31,05 $\pm$ 2,92	4	0,01
30	8,15 $\pm$ 0,59	-42,89 $\pm$ 2,67	4	0,01
100	2,38 $\pm$ 1,31	-83,79 $\pm$ 8,66	4	0,001

Legende zu Tabelle 6:

In Tabelle 6 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) sowohl in mN, als auch in Prozent dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche, sowie deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurve von IL 349 an der Aorta

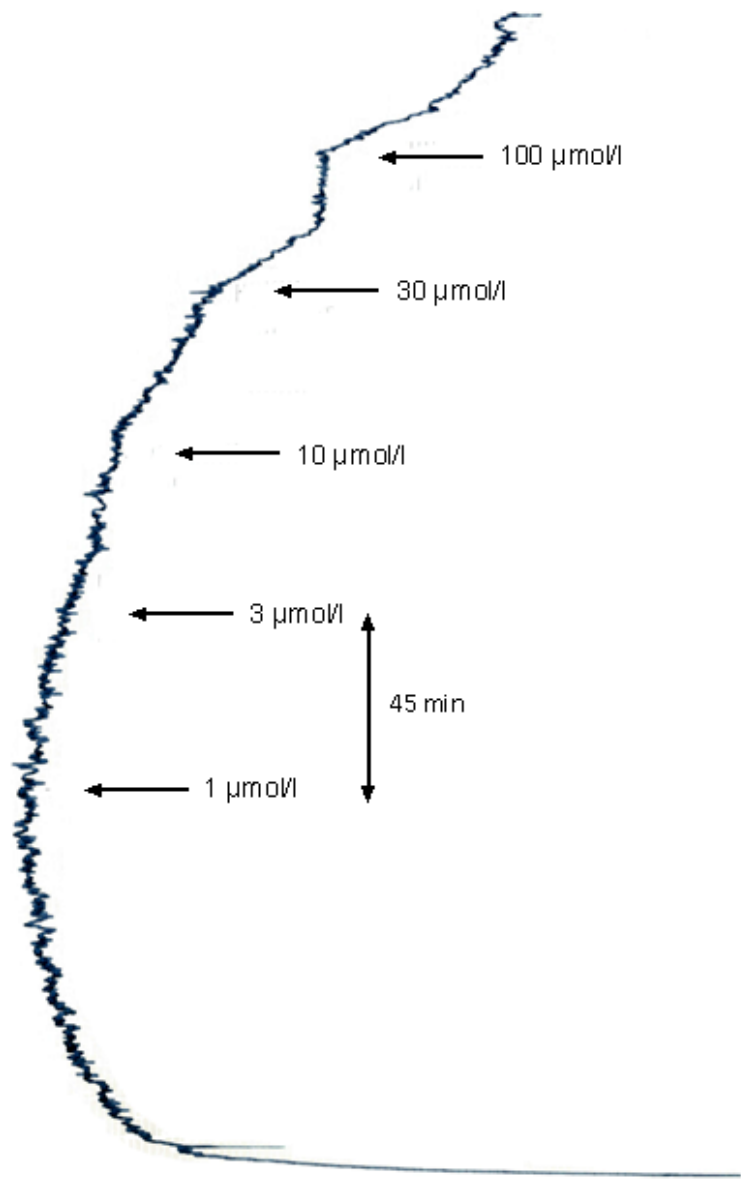


Legende zu Abbildung 30:

Auf der Abszisse sind die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz IL 349 von 1 - 100 $\mu\text{mol/l}$ dargestellt, auf der Ordinate die Änderungen bzw. die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die schwarzen Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die senkrecht verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Bereits ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ konnte man eine deutliche Abnahme der Kontraktion verzeichnen, welche mit zunehmender Konzentration noch deutlicher wurde. Schließlich wurde bei einer Konzentration von 36,7 $\mu\text{mol/l}$ die EC_{50} erreicht.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von IL 349 an der Aorta



Legende zu Abbildung 31:

Der Kurvenverlauf ergibt sich durch das Einwirken der Testsubstanz IL 349 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Aorta descendens, was deren Relaxierung zur Folge hatte. In der vorliegenden Kurve sieht man die Abnahme der Kontraktion durch ihren schnellen Abfall.

Die dargestellten Pfeile markieren die unterschiedlichen Konzentrationsstufen und der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

3.1.3. Wirkung von IL 349 auf die Arteria pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz IL 349 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis wurde wiederum an vier isolierten Präparaten überprüft.

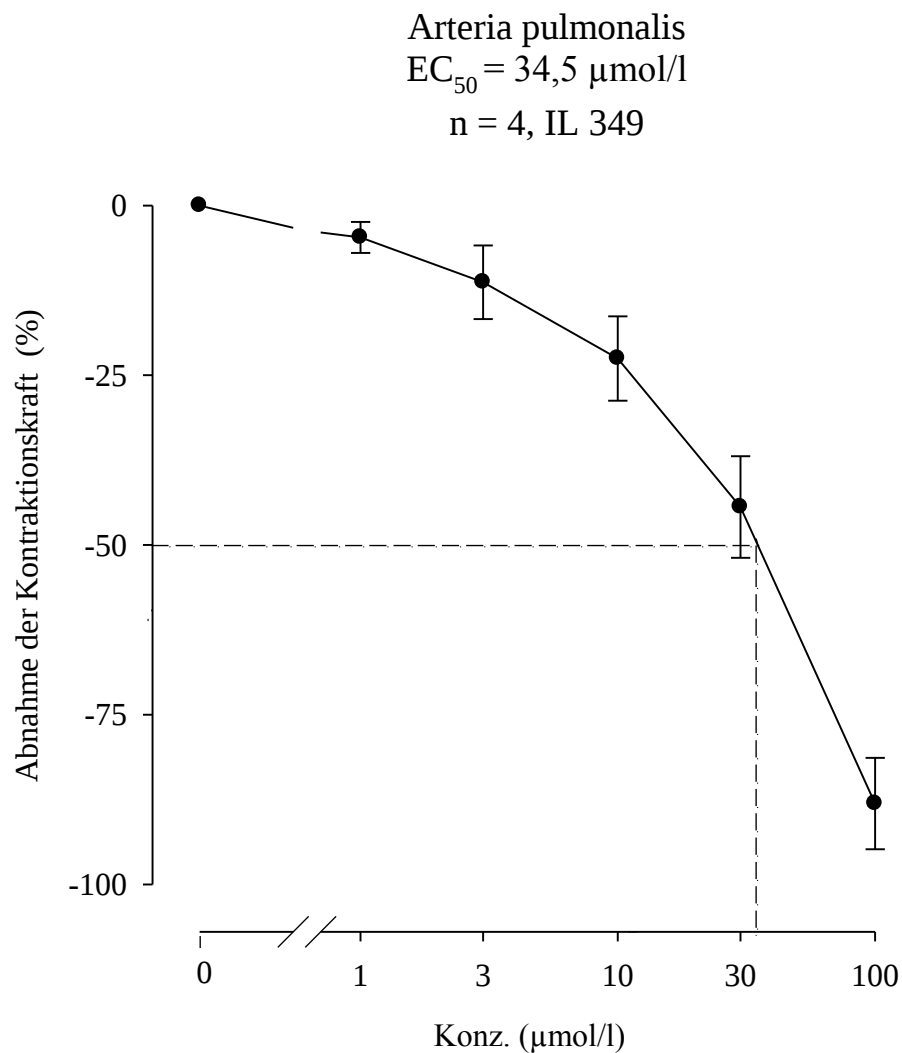
Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche von IL 349 an der Arteria pulmonalis

IL 349 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,68 \pm 1,81$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$9,23 \pm 1,76$	$-4,70 \pm 2,29$	4	n.s.
3	$8,61 \pm 1,69$	$-11,30 \pm 5,41$	4	0,05
10	$7,55 \pm 1,60$	$-22,54 \pm 6,22$	4	0,05
30	$5,29 \pm 1,09$	$-44,42 \pm 7,48$	4	0,01
100	$1,79 \pm 0,80$	$-88,09 \pm 6,72$	4	0,001

Legende zu Tabelle 7:

In Tabelle 7 sind Konzentrationsangaben ($\mu\text{mol/l}$), arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung (f_c) mit Standardabweichung (SEM) in mN und Prozent, sowie Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungskurve von IL 349 an der Arteria pulmonalis

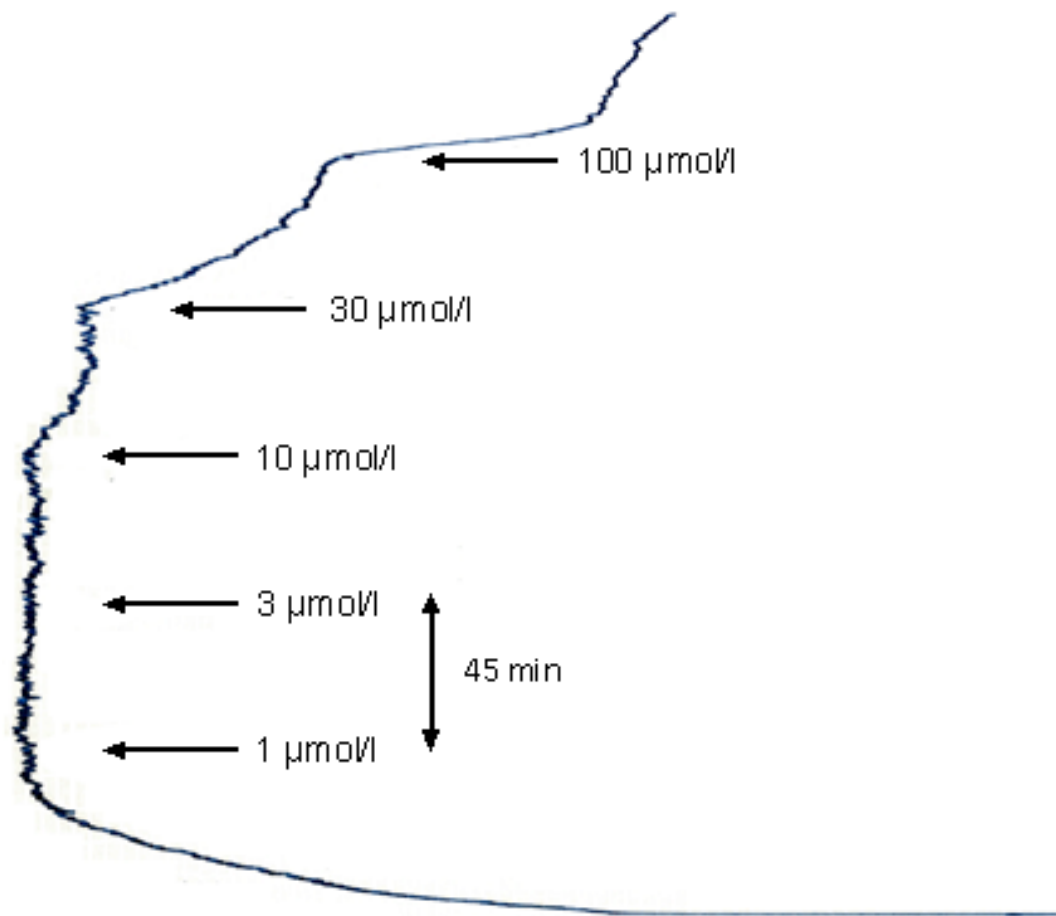


Legende zu Abbildung 32:

Abbildung 32 zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis, wobei die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz IL 349 in $\mu\text{mol/l}$ auf der x-Achse und die Abnahme der Inotropie in Prozent auf der y-Achse aufgetragen wurden. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

An der Abbildung sieht man eine deutliche Abnahme der Inotropie, wobei die erreichte EC_{50} von $34,5 \mu\text{mol/l}$ durch die beiden strichlierten Linien gezeigt wird.

Abbildung 33: Originalaufzeichnung der Wirkung von IL349 an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 33:

Die Originalaufzeichnung des Schreibers zeigt die Relaxierung der Arteria pulmonalis durch das Einwirken der Testsubstanz IL 349 in unterschiedlichen Konzentrationen, die kumulativ im Abstand von 45 Minuten zugegeben wurden. Die Endpunkten wurden mit Pfeilen markiert.

3.1.4. Wirkung von IL 349 auf den Musculus papillaris

Eine mögliche negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz IL 349 auf isolierte und elektrisch stimulierte Musculus papillaris wurde an vier Präparaten überprüft.

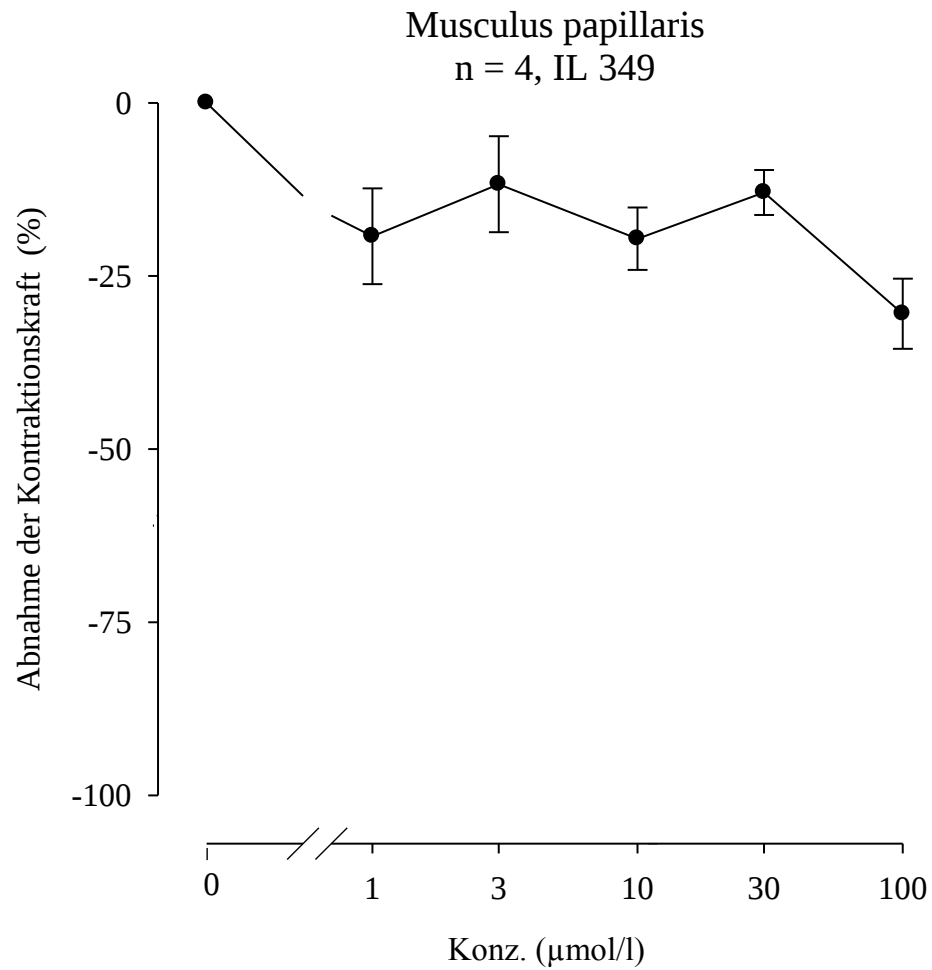
Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche von IL 349 am Musculus papillaris

<i>IL 349 ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)</i>	<i>$f_c \pm \text{SEM}$ (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	$2,70 \pm 0,31$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$2,20 \pm 0,36$	$-19,26 \pm 6,92$	4	0,05
3	$2,41 \pm 0,37$	$-11,75 \pm 6,93$	4	0,05
10	$2,22 \pm 0,32$	$-19,62 \pm 4,51$	4	0,05
30	$2,36 \pm 0,30$	$-12,95 \pm 3,25$	4	0,05
100	$1,84 \pm 0,16$	$-30,46 \pm 5,07$	4	0,01

Legende zu Tabelle 8:

Tabelle 8 enthält die Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$, arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) mit Standardfehler (SEM) in mN und Prozent, sowie Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) ermittelt aus vier Versuchen.

Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungskurve von IL 349 am Musculus papillaris

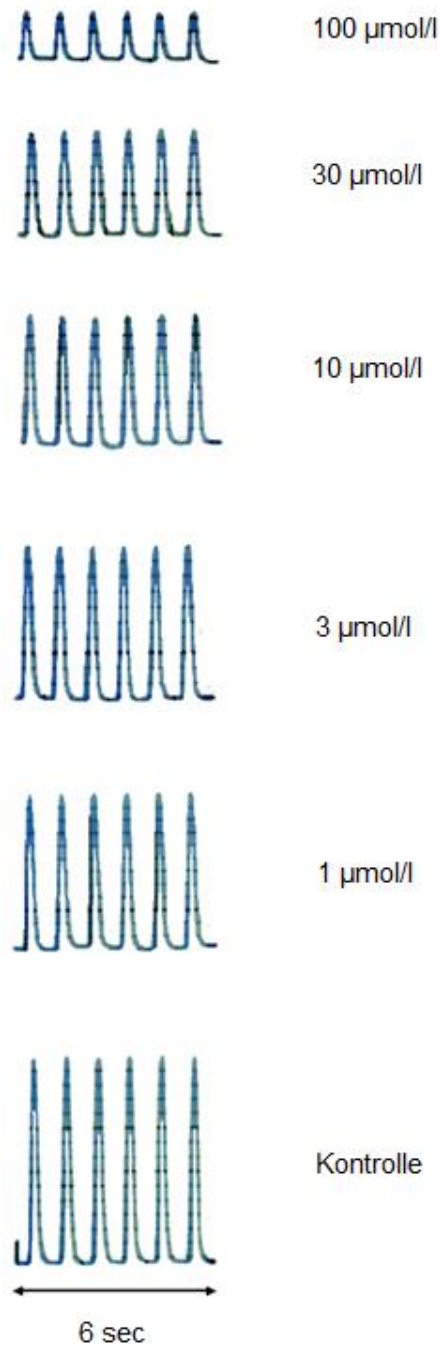


Legende zu Abbildung 34:

Auf der Abszisse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz IL 349 in µmol/l dargestellt, die Änderungen der Inotropie in Prozent sind auf der Ordinate aufgetragen. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte aus vier Versuchen, die vertikal verlaufenden Balken deren Standardfehler.

IL 349 zeigte eine leicht negativ inotrope Wirkung, die sich jedoch als statistisch nicht signifikant erwies und es konnte auch kein EC₅₀-Wert graphisch ermittelt werden.

Abbildung 35: Originalaufzeichnung der Wirkung von IL 349 am Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 35:

Durch das Einwirken der Testsubstanz IL 349 auf den Musculus papillaris in unterschiedlichen Konzentrationen nahm die Kontraktionskraft im Vergleich zum Kontrollwert geringfügig ab. Die kumulative Zugabe der Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen von 1 - 100 $\mu\text{mol/l}$ erfolgte in Intervallen von 45 Minuten.

3.1.5. Wirkung von IL 349 auf das Atrium cordis dexter

Bei den Versuchen am spontan schlagenden Atrium cordis dexter wurde die chronotrope Wirkung der Testsubstanz IL 349 untersucht.

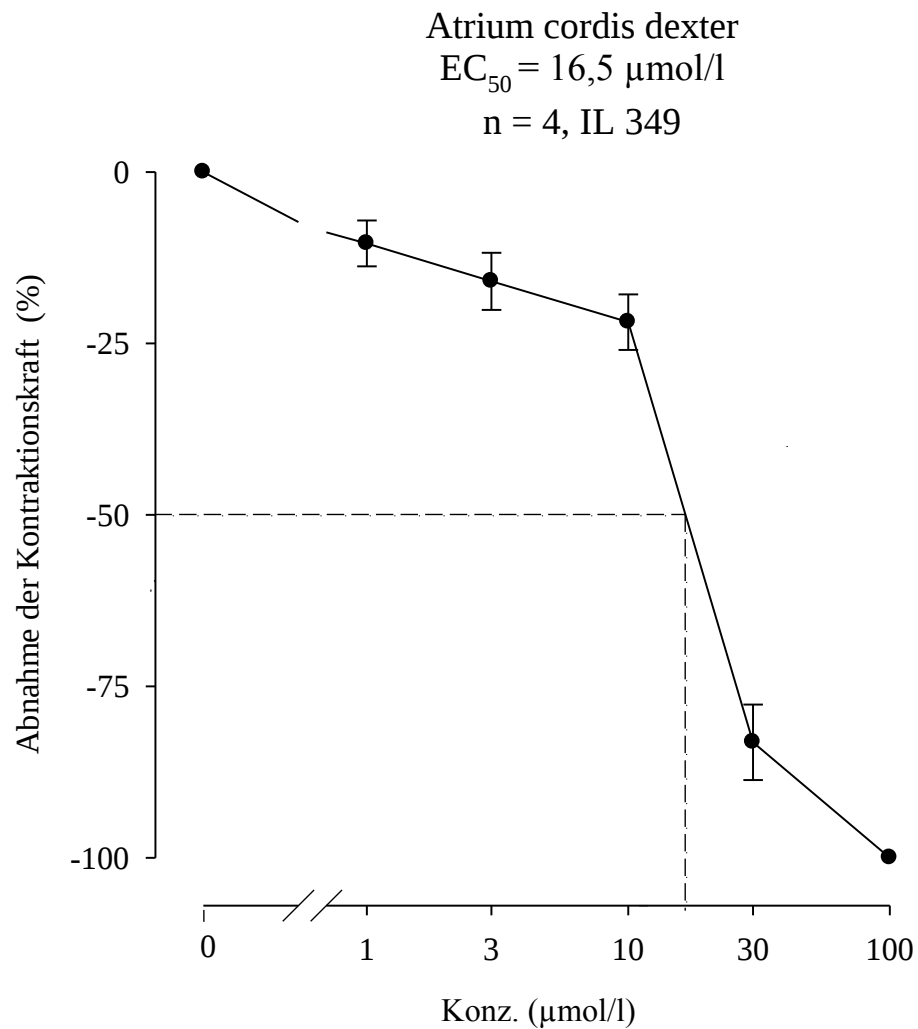
Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche von IL 349 am Atrium cordis dexter

IL 349 ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	226,25 $\pm$ 10,68	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	203,75 $\pm$ 17,12	-10,42 $\pm$ 3,35	4	n.s.
3	191,25 $\pm$ 17,72	-15,94 $\pm$ 4,16	4	0,05
10	177,50 $\pm$ 16,14	-21,90 $\pm$ 4,05	4	0,05
30	141,25 $\pm$ 18,53	-83,17 $\pm$ 5,50	4	0,001
100	0,00 $\pm$ 0,00	-100,0 $\pm$ 0,00	4	0,001

Legende zu Tabelle 9:

Tabelle 9 gibt die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des Sinusknotens pro Minute und die Standardfehlern (SEM) bei verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz aus vier Versuchen wieder. Weiters ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) dargestellt.

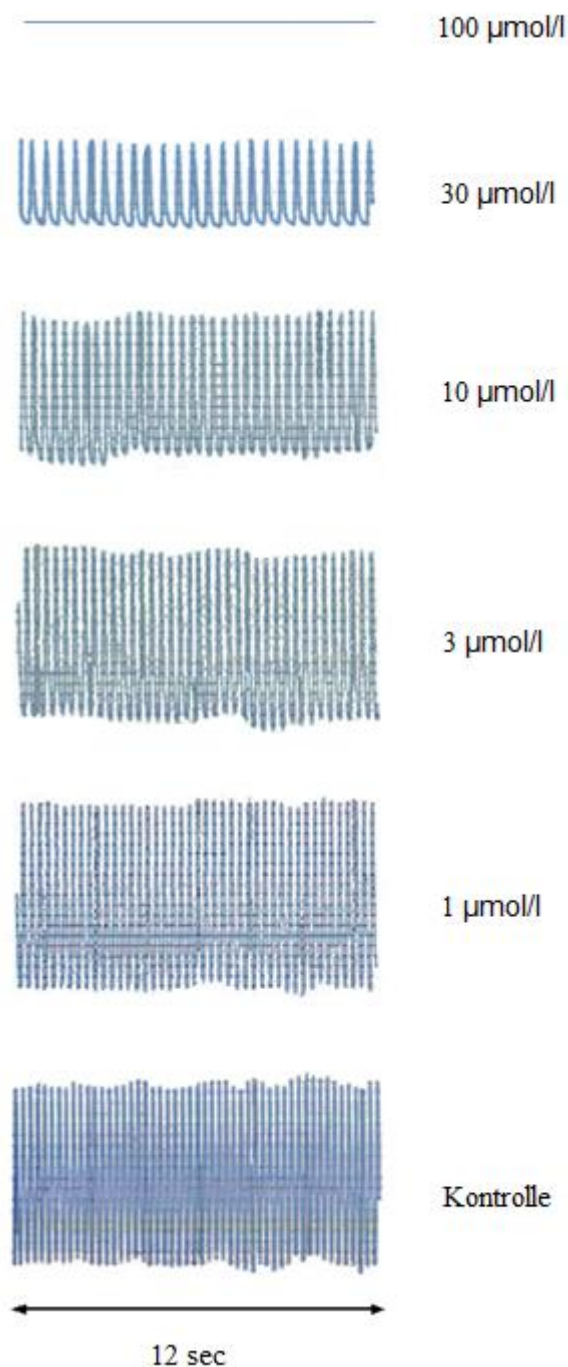
Abbildung 36: Konzentrations-Wirkungskurve von IL 349 am Atrium cordis dexter



Legende zu Abbildung 36:

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt die Wirkung von IL 349 auf isolierte rechte Vorhöfe. Die Abszisse enthält die logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$, während die Änderung bzw. die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent auf der Ordinate aufgetragen wird. Die Punkte auf dem Graphen zeigen die Mittelwerte der Schlagfrequenz aus vier Versuchen, die Balken die dazugehörigen Standardfehler.

Abbildung 37: Originalaufzeichnung der Wirkung von IL 349 am Atrium cordis dexter



Legende zu Abbildung 37:

Die Abbildung 37 zeigt die konzentrationsabhängige Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofes nach kumulative Zugabe von Testsubstanz IL 349 in Intervallen von 45 Minuten. Die Schläge wurden in Abständen von fünf Minuten und über einen Zeitraum von zwölf Sekunden aufgezeichnet.

3.2. Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)

Die Untersuchung des Wirkmechanismus wurde an der Aorta descendens durchgeführt. Die Präparation und das Einspannen der Aorta an der Apparatur B, sowie die maximale Vorkontraktion mit KCl-Lösung wurden bereits im Kapiteln 2.7.5. und 2.8.2. beschrieben.

Bei dieser Versuchsreihe wurde im ersten Schritt der Einfluss von einem K_{ATP} -Kanalblocker, Glibenclamid, deren Wirkmechanismus im Kapitel 2.3. erklärt wurde, in zwei verschiedenen Konzentrationen von 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ auf die Aorta getestet.

Nach 45 Minuten wurden, im zweiten Schritt, 40 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz IL 349 gespritzt und die Wirkung bzw. Änderung der Kontraktionskraft beobachtet. Die Konzentration von 40 $\mu\text{mol/l}$ wurde verwendet, weil diese den EC_{50} -Wert darstellt (siehe Kapitel 3.1.2.).

Dabei sollte untersucht werden, ob die statistisch höchstsignifikante dilatierende Wirkung von IL 349 auf die Aorta descendens durch eine Öffnung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle erfolgte.

3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid

Der mögliche Wirkmechanismus der Testsubstanz IL 349 wurde als erstes in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid untersucht.

Dafür wurden drei Präparate der Aorta descendens verwendet.

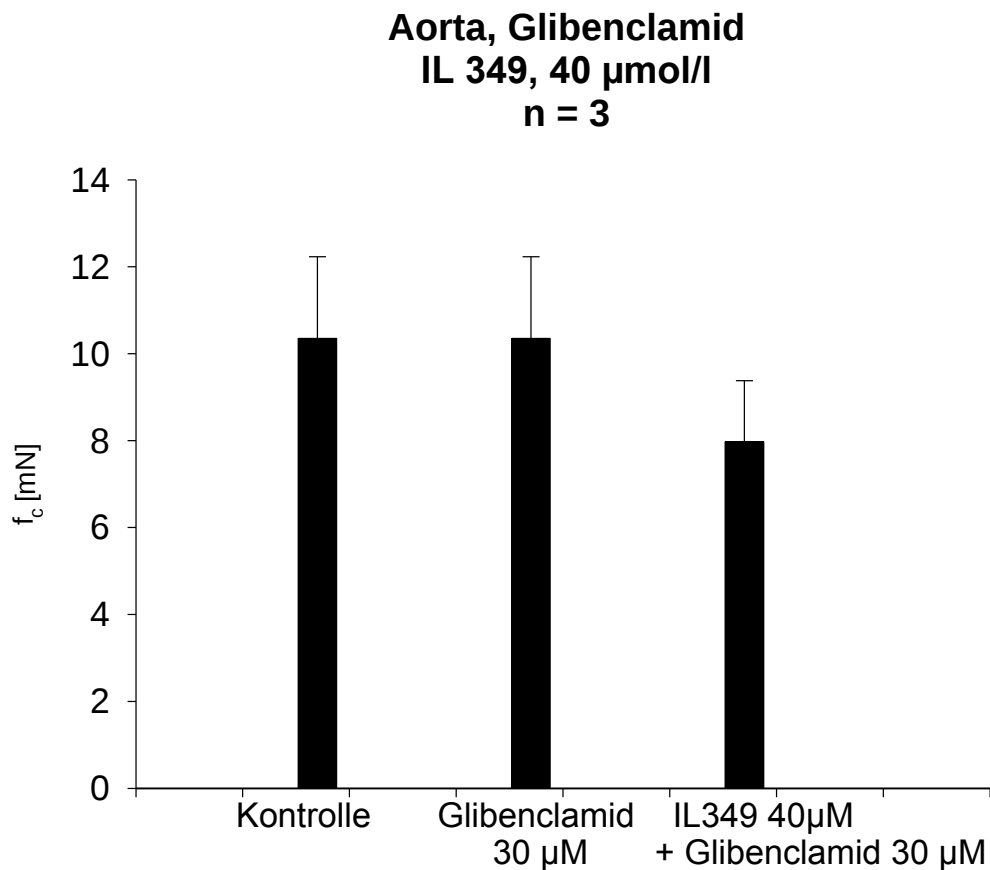
Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche von IL 349 in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid an der Aorta

<i>Glibenclamid</i>	<i>fc ± SEM (mN)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle (0)	10,35 ± 1,88	3	-
30 µmol/l	10,35 ± 1,88	3	n.s.
+ 40 µmol/l IL 349	7,97 ± 1,41	3	n.s.

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

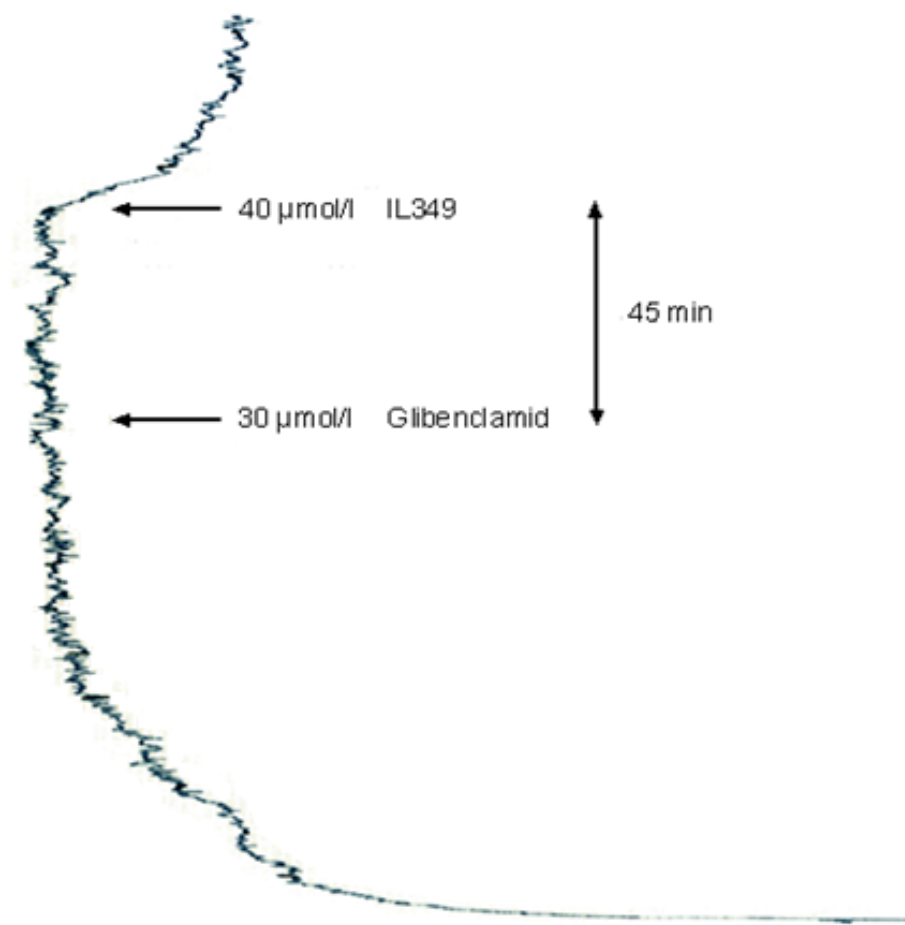
Abbildung 38: Balkendiagramm von IL 349 an der Aorta descendens mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Auf der Abszisse wurden die verwendete Konzentrationen der einzelnen Substanzen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN.

Der erste Balken stellt die Kontrolle dar, die anderen beiden zeigen die Änderung der Kontraktionskraft an der Aorta descendens durch Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und durch die Kombination von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 40 $\mu\text{mol/l}$ IL 349. Die senkrechte Balken werden aus den Mittelwerten der drei Versuche gebildet und die über den Balken dargestellten Striche markieren die Standardfehler.

Abbildung 39: Originalaufzeichnung von IL 349-Wirkung an der Aorta descendens unter Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Dieser Graph zeigt die Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und die Folge nach zusätzlicher Zufuhr von 40 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz. Bei der Zugabe des Glibenclamid kommt es zu keiner Änderung der Kontraktionskraft. Die Zufuhr der Testsubstanz IL 349 äußert sich in einer Dilatation der Aorta von 23 Prozent. Die beiden Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid

Bei den nächsten fünf Versuchen wurde die Wirkung von IL 349 auf die ATP-abhängigen Kaliumkanäle in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid untersucht.

Nach maximaler Kontraktion des Organs wurden 100 µmol/l Glibenclamid und nach 45 Minuten 40 µmol/l Testsubstanz hinzugefügt.

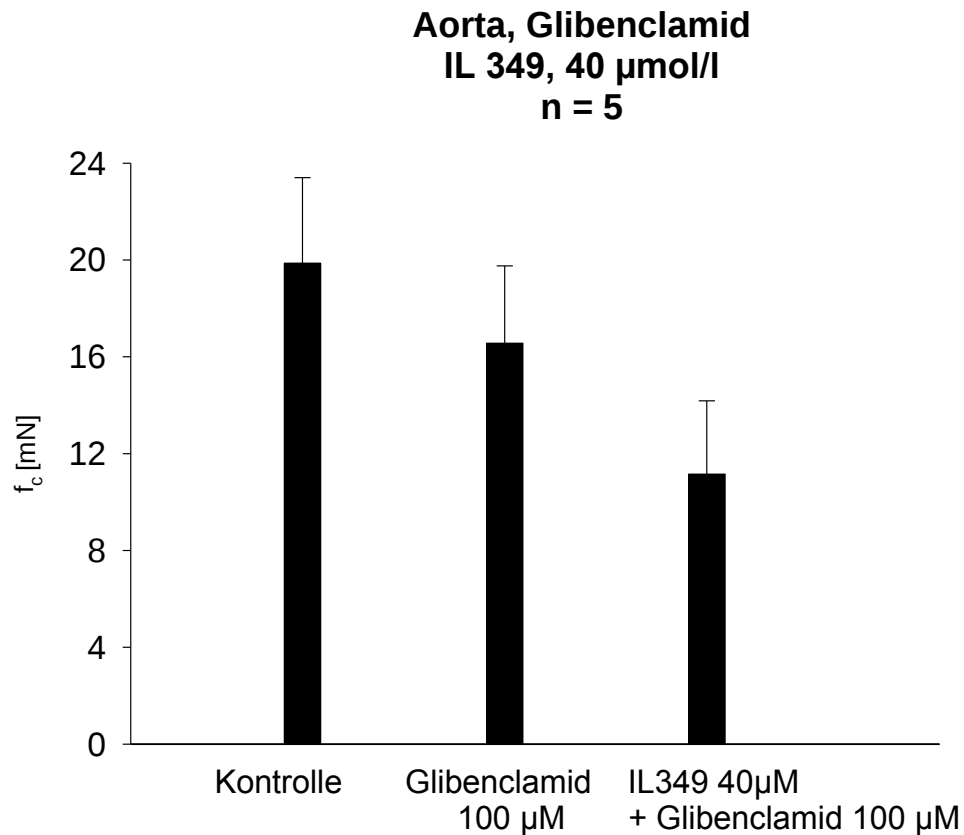
Tabelle 11: Ergebnisse der Versuche von IL 349 in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid an der Aorta

<i>Glibenclamid</i>	<i>fc ± SEM (mN)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle (0)	19,87 ± 3,53	5	-
100 µmol/l	16,56 ± 3,20	5	n.s.
+ 40 µmol/l IL 349	11,15 ± 3,03	5	n.s.

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

- fc = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

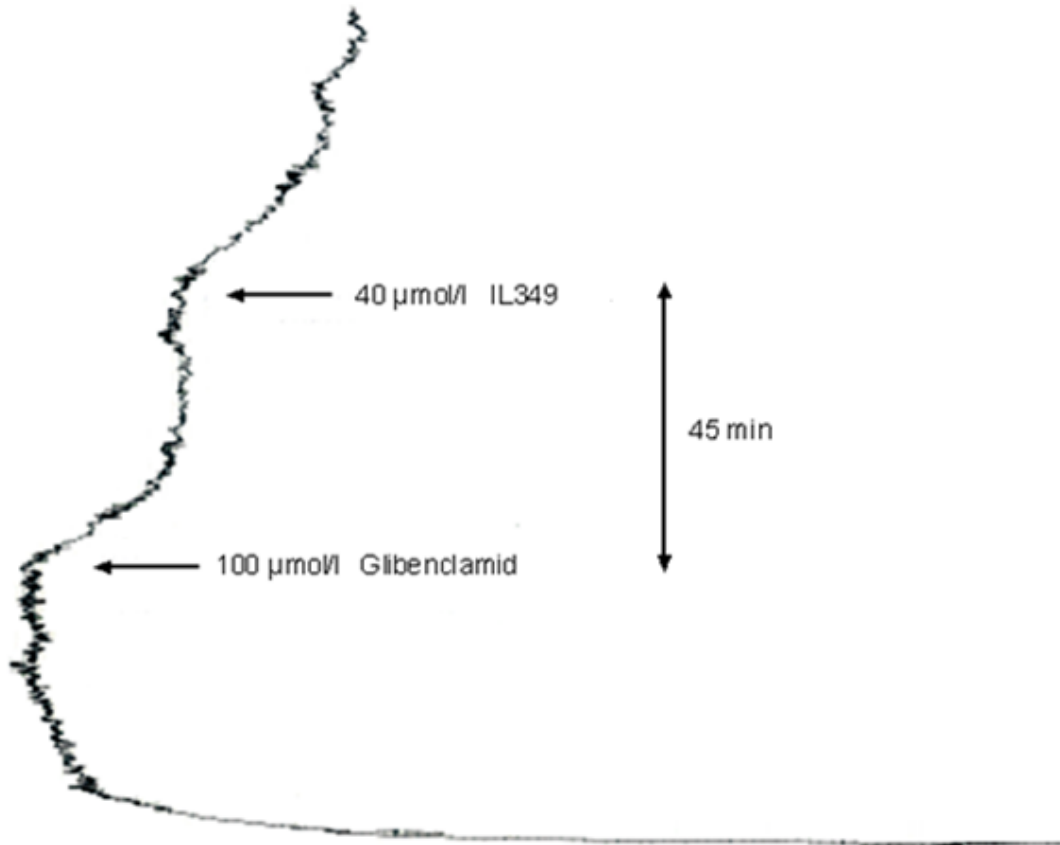
Abbildung 40: Balkendiagramm von IL 349 an der Aorta descendens mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



In diesem Diagramm werden auf der x-Achse die Substanzkonzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN eingezeichnet.

Die schwarzen Balken, die aus den arithmetischen Mittelwerten der fünf durchgeführten Versuche gebildet werden, stellen den Effekt von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und der anschließend hinzugefügte Testsubstanz (40 $\mu\text{mol/l}$) im Vergleich zur Kontrolle dar. Die strichförmige Verlängerung über den Balken symbolisiert die Standardabweichung.

Abbildung 41: Originalaufzeichnung von IL 349-Wirkung an der Aorta descendens unter Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die Dokumentation durch den Schreiber zeigt deutlich, dass es bei einer Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Durch die Zugabe von 40 $\mu\text{mol/l}$ IL 349 konnte die Aorta descendens sogar noch weiter dilatiert werden.

Der jeweilige Zeitpunkt der Substanzzugaben wird mit Pfeilen hervorgehoben.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung, sowie der mögliche Wirkmechanismus des neu synthetisierten, und noch nicht untersuchten Resveratrol-Derivates, IL 349, getestet. Die Untersuchungen wurden an fünf isolierten Organen von Meerschweinchen erforscht: Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis, Musculus papillaris und Atrium cordis dexter.

Erwartet wurde eine vasodilatatorische und spasmolytische Wirkung auf glattemuskuläre Präparate, während am Papillarmuskel und den rechten Vorhof eine negativ inotrope bzw. chronotrope Wirkung der Testsubstanz vermutet wurde.

Die genaue Vorgangsweise der Isolierung und Präparation der Organe, als auch der Versuchsablauf wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln detailliert beschrieben. Die Ergebnisse wurden im 3. Kapitel präsentiert und anhand von Tabellen, Diagramme und der Original-Aufzeichnungen ausgewertet. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, die in den Experimenten gewonnen wurden, analysiert und ausführlich diskutiert.

4.1. Versuchsreihen an glattemuskulären Organen

Die glattemuskuläre Präparate (Aorta, Pulmonalarterie und das terminale Ileum) mussten chemisch mit einer Kaliumchlorid-Lösung (siehe Kapitel 2.5.) maximal vorkontrahiert werden, um einen möglichst konstanten Muskeltonus zu erreichen.

Die Aorta und Arteria pulmonalis wurden mit einer 90 mM KCl-Lösung vorkontrahiert, während für die Vorkontraktion der Darmpräparate eine 60 mM KCl-Lösung verwendet wurde. Nach Erreichen der Plateauphase folgte kumulative Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz IL 349 in Abständen von 45 Minuten.

Der Einfluss auf die Kontraktionskraft der einzelnen Präparate wurde als Kurve aufgezeichnet. Somit konnte eine vasodilatatorische bzw. spasmolytische Wirkung untersucht werden.

Tabelle 12: Wirkungen von IL 349 auf die glatte Muskulatur

<i>Organpräparat</i>	<i>IL 349 fc ± SEM (%) bei Endkonzentration</i>	<i>EC₅₀ (μmol/l)</i>
Aorta descendens	-83,79 ± 8,66	36,7
Arteria pulmonalis	-88,09 ± 6,72	34,5
Ileum terminalis	-47,38 ± 4,53	> 100

Anhand der Werte in der Tabelle 12 ist gut ersichtlich, dass die Testsubstanz IL 349 eine starke Wirkung auf die Aorta und Arteria pulmonalis ausübt, während der Effekt am terminalen Ileum schwächer ausgeprägt wurde.

Der Kontrollwert vor der Substanzzugabe bei der Aorta wurde mit $14,30 \pm 1,03$ mN definiert und als 100 % festgelegt.

Es war von Anfang an, bereits ab der ersten Konzentration, eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft zu erkennen (siehe Abbildung 32), wobei der Endwert bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ $2,38 \pm 1,31$ mN bzw. $-83,79 \pm 8,66$ % betrug. Die EC_{50} wurde bei $36,7 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Bei der Arteria pulmonalis betrug der Mittelwert der Kontraktionskraft in der Kontrollphase $9,68 \pm 1,81$ mN (entspricht 100%).

Die Testsubstanz führte zu Beginn (in Konzentrationen von 1, 3 und $10 \mu\text{mol/l}$) nur zu einer leichten Relaxation der Muskulatur der Pulmonalarterie. Die erste signifikante Abnahme der Kontraktionskraft wurde nach dem Zusetzen von $30 \mu\text{mol/l}$ registriert ($5,29 \pm 1,09$ mN bzw. $-44,42 \pm 7,48$).

Beim terminalen Ileum wurde eine schwächere Wirkung im Vergleich zur Aorta und zur Arteria pulmonalis ermittelt.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft. Der durchschnittliche Kontrollwert betrug $13,03 \pm 1,54$ mN und fiel dann auf einen Endwert von $6,77 \pm 0,71$ mN ab. Aufgrund des schwachen Einflusses von IL 349 auf die Kontraktionskraft des Ileum terminalis konnte hier keine EC_{50} erreicht werden (siehe Abbildung 29).

Es konnte eine signifikante vasodilatierende Wirkung von Testsubstanz IL 349 bei der Aorta descendens ($EC_{50}=36,7$) und Arteria pulmonalis ($EC_{50}=34,5$) festgestellt werden, während am Ileum terminalis eine schwache spasmolytische Wirkung registriert wurde.

4.2. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel

Als quergestreifte Organe wurden Musculus papillaris und Atrium cordis dexter verwendet.

Der Papillarmuskel wurde mittels elektrischer Reizung zur Kontraktion angeregt und nach der Substanzzugabe konnte eine positiv/negativ inotrope Wirkung beobachtet werden.

Am rechten Vorhof, der spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten (SA-Knoten) besitzt, sollte eine eventuell vorhandene positiv oder negativ chronotrope Wirkung geprüft werden.

Tabelle 13: Wirkungen von IL 349 auf die Herzmuskulatur

<i>Organpräparat</i>	<i>IL 349 fc $\pm$ SEM (%) bei Endkonzentration</i>	<i>EC₅₀ (μmol/l)</i>
Atrium cordis dexter	$-83,17 \pm 5,50$	16,5
Musculus papillaris	$-30,46 \pm 5,07$	> 100

Die Testsubstanz zeigt eine starke negativ chronotrope Wirkung am rechten Vorhof und der EC_{50} -Wert wurde schon bei $16,5 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Der Kontrollwert betrug $226,25 \pm 10,68$ Schläge pro Minute, wobei bei jeder weiteren Zugabe der Testsubstanz die Schlagfrequenz stetig abnahm. Ab einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ wird eine extrem deutliche Abnahme sichtbar ($141,25 \pm 18,53$), welche sich in einem steilen Abfall des Graphen zeigte (siehe Abbildung 37). Gleich nach der Zugabe der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ kam es zum Absterben der Organe und diese Konzentration konnte nicht zur Berechnung genommen werden.

Beim Musculus papillaris kam es zu einer sehr schwachen Änderung der Kontraktionskraft.

Aus der Abbildung 35 wurde ersichtlich, dass sofort nach dem Zusetzen $1 \mu\text{mol/l}$ Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Jedoch ab nächster Konzentrationsstufe (ab $3 \mu\text{mol/l}$) kam es zu einem leichten Anstieg der Inotropie (von $2,20 \pm 0,36$ auf $2,41 \pm 0,37 \text{ mN}$), die aber ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ wieder abnahm. Bei einer Zugabe von $30 \mu\text{mol/l}$ erfolgte wieder ein Anstieg der Kontraktionskraft und bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ ($1,84 \pm 0,16 \text{ mN}$) nahm sie insgesamt um $-30,46 \pm 5,07 \%$ ab.

Die Testsubstanz IL 349 wirkt somit schwach negativ inotrop, aber eine EC_{50} wurde nicht erreicht.

4.3. Versuchsreihen mit IL349 in Kombination mit Glibenclamid

Wie bereits in Kapitel 2.3. und 3.2. beschrieben wurde, wurde ein K_{ATP} -Kanalb blocker zur Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus verwendet.

In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt acht Versuche an der Aorta und zwar mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Glibenclamid durchgeführt. Die ersten drei Versuche wurden mit $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid durchgeführt und bei den restlichen fünf wurden $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verwendet.

Dabei sollte untersucht werden, ob die Testsubstanz IL 349 die blockierte ATP-abhängige Kaliumkanäle öffnet und dadurch zu einer signifikanten Dilatation der Aorta descendens führt.

4.3.1. Versuch mit IL 349 in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Nach maximaler Vorkontraktion des Organs mit 90 mM KCl-Lösung wurden 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid ins Organbad injiziert. Nachdem 45 Minuten vergangen waren, wurden im zweiten Schritt 40 $\mu\text{mol/l}$ (= EC_{50} -Wert) Testsubstanz IL 349 hinzugefügt und die Änderung der Kontraktionskraft beobachtet.

Eine Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verursachte keine Veränderung der Kontraktionskraft der Aorta, wobei eine deutliche Dilatation durch die Zugabe von 40 $\mu\text{mol/l}$ IL 349 registriert wurde (von $10,35 \pm 1,88$ mN auf $7,97 \pm 1,41$ mN).

4.3.2. Versuch mit IL 349 in Kombination mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Bei diesen Versuchen wurde die Wirkung von IL 349 in Kombination mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid getestet. Nach der erreichten Plateauphase wurden zunächst 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und nach 45 Minuten 40 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz hinzugefügt.

Die Kontrollwert betrug hierbei $19,87 \pm 3,53$ mN und änderte sich deutlich nach der Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid (die Kontraktionskraft nahm bis $16,56 \pm 3,20$ mN ab). Durch die Zugabe von 40 $\mu\text{mol/l}$ IL 349 konnte die Aorta descendens sogar noch weiter dilatiert werden. Es kommt zu einer starken Veränderung bzw. Abnahme der Kontraktionskraft ($11,15 \pm 3,03$ mN).

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die dilatatorische Wirkung der Testsubstanz IL 349 zumindest teilweise durch die Öffnung der blockierten ATP-abhängigen Kaliumkanäle zustande kommen könnte.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die in-vitro Untersuchung von der Substanz **IL 349**, welche am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien, neu synthetisiert wurde.

Die verwendete Testsubstanz wurde in den Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ an fünf isolierten und anschließend präparierten Organen von Meerschweinchen getestet. Hierbei handelte es sich um folgende Organe: Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Musculus papillaris, Atrium cordis dexter und Ileum terminalis.

Am Atrium cordis dexter sollte auf eine negativ oder positiv chronotrope Wirkung geprüft werden, während beim Musculus papillaris der Einfluss der Testsubstanz IL 349 auf die Inotropie getestet wurde.

Um die Wirkung auf glattmuskuläre Organe aufzuzeigen, wurden weitere Versuche an der isolierten Aorta, Arteria pulmonalis und am isolierten terminalen Ileum durchgeführt. Hier wurde ein vasodilatatorischer bzw. spasmolytischer Effekt erwartet.

Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden pro Organ mindestens vier Versuche durchgeführt.

Auf die glattmuskulären Organe, Aorta und Arteria pulmonalis, zeigte die Testsubstanz eine starke vasodilatierende Wirkung, während der spasmolytische Effekt am Ileum terminalis schwächer ausgeprägt wurde.

Bei den Versuchen an der Aorta war eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft bereits ab der ersten verwendeten Konzentration ersichtlich, wobei der EC_{50} -Wert bei 36,7 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

Die erste signifikante Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis wurde erst nach dem Zusetzen von 30 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz IL 349 registriert. Ein EC_{50} -Wert konnte auch hier ermittelt werden und betrug 34,5 $\mu\text{mol/l}$.

Beim Ileum terminalis konnte eine stetige Abnahme der Kontraktionskraft festgestellt werden. Ein EC_{50} -Wert konnte hier aber nicht erreicht werden.

Die Testsubstanz zeigte eine starke negativ chronotrope Wirkung am Atrium cordis dexter, wobei der EC_{50} -Wert schon bei $16,5 \mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

Beim Musculus papillaris kam es zu einer schwachen negativ inotropen Wirkung und hier konnte keine EC_{50} ermittelt werden.

Da eine deutliche Wirkung an der isolierten Aorta descendens zu erkennen war, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein möglicher Wirkmechanismus getestet. Dazu wurde ein K_{ATP} -Kanalblocker, Glibenclamid, in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Aus allen durchgeführten Versuchen kann geschlossen werden, dass die dilatierende Wirkung der Testsubstanz IL 349 zumindest teilweise durch die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zustande kommen könnte.

6. Literaturverzeichnis

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y; (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*: 2783-840

Becker JW, Armstrong GO, Van der Merwe MJ, Labrechts MG, Vivier MA Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* 4: 79-85

Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT; (1989) Interaction of trans-resveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 55: 811-816

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

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

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

Elitsur Y, Moshier J A, Murthy R, Barbish A, Luk G D; (1992) Polyamine levels, ornithine decarboxylase (ODC) activity, and ODC-mRNA expression in normal and cancerous human colonocytes. *Life Sci* 50: 1417-1424

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

Frankel EN, Kanner J, Geerman JB, Parks E, Kinsella JE; (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K; (2005). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, 626-628

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

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

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

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

Kleine-Gunk B; (2007) Resveratrol – Schlüssel für ein langes Leben?. *Pharm Zeit* 29: 3381-3385

Löser C, Fölsch U R, Paprotny C, Creutzfeldt W; (1990) Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum, and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer* 65: 958-966

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M; (2001) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart Germany

Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C; (1999) Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old Darakchasava, an Ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol* 68: 71-76

R. Corder, W. Mullen, N. Q. Khan, S. C. Marks, E. G. Wood, M. J. Carrier, A. Crozier: Oenology: Red wine procyanidins and vascular health, *Nature* 444, 566 (30 November 2006)

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

Rotondo S., Rotilio D., Cerletti C. H., de Gaetano G.; (1996): Red wine, aspirin and platelet function. *Thromb. Haemost.* 76, 818-819

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

Soleas GJ, Diamandis EP and Goldberg DM; (1997) Wine as a biological fluid-history production and role in disease prevention. *J Clin Lab Analysis* 11: 287-313

Schröder J; (2009) Resveratrol - The enzyme reactions: Biosynthesis of resveratrol, chalcone, and quercetin. *Biologie Uni-Freiburg*

Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK; (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 126: 673-680

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

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK; (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32: 1377-1382

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

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

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW; (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23: 2369-2380

Zbikowska H. M., Olas B.; (2000): Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J. Physiol. Pharmacol.* 3, 513-520

7. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Danijela Jerkovic
Geburtsdatum:	23. Oktober 1985
Geburtsort:	Banja Luka (Bosnien und Herzegowina)
Staatsangehörigkeit:	Bosnien und Herzegowina
Familienstand:	ledig
Adresse:	Sensengasse 2b/611B, 1090 Wien

Ausbildung

2005 – 2012	Universität Wien - Österreich, Pharmazie
2004 – 2005	Vorstudienlehrgang, Deutschkurs
2000 – 2004	Gymnasium in Banja Luka (Bosnien und Herzegowina)
1992 – 2000	Grundschule in Banja Luka (Bosnien und Herzegowina)