



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Wirkung eines neu synthetisierten Resveratrollderivates (JB 18)
auf isolierte Präparate von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Wolfgang Richter
Matrikel-Nummer:	9426707
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 449
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik
Wien, im November 2008	

1. EINLEITUNG	5
1.1 GESCHICHTE DES RESVERATROL	5
1.2 Vorkommen von Resveratrol.....	6
1.3 Biosynthese von Resveratrol.....	7
1.4 Wirkung von Resveratrol	8
▪ Kardiovaskuläre Effekte.....	8
2. ZIEL DER ARBEIT	11
3. MATERIAL UND METHODIK	12
3.1 Versuchstiere	12
3.2 Isolierung der Präparate.....	13
3.2.1 Isolierung des rechten Vorhofes	13
3.2.2 Isolierung des Papillarmuskel.....	13
3.2.3 Isolierung der Arteria pulmonalis.....	14
3.2.4 Isolierung der Aorta.....	14
3.2.5 Isolierung des terminalen Ileums.....	14
3.2.6 Isolierung des Uterus	15
3.3 Physiologische Nährlösungen	16
3.3.1 Nährlösungen für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, das terminale Ileum und die Arteria pulmonalis.....	16
3.3.2 Nährlösung für die Aorta.....	17
3.3.3 Nährlösung für den Uterus.....	18
3.4 Testsubstanz.....	19
3.5 Versuchsanordnung	20
3.5.1 Apparatur I zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf verschiedene Organe des Meerschweinchens.....	20
3.4.2 Schematische Darstellung des Kraftwandlers und seine Registrierung	22

3.5.2	Apparatur II zur Untersuchung von Agonisten.....	23
3.5.3	Originalabbildungen der Versuchsanordnung	24
3.6	Versuchsablauf und Untersuchung der Testsubstanz JB18	26
3.6.1	Versuchspräparat rechter Vorhof.....	26
3.6.2	Versuchspräparat Papillarmuskel.....	26
3.6.3	Versuchspräparat terminales Ileum.....	27
4.5.4	Versuchspräparat Aorta	27
4.5.5	Versuchspräparat Arteria pulmonalis	28
4.5	Versuchsablauf und Untersuchung der Testsubstanz in Abhängigkeit von der Zugabe von Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin.....	29
4.5.1	Versuchspräparat Uterus.....	29
4.5.2	Versuchspräparat terminales Ileum.....	30
4.6	Messgrößen und Statistik.....	33
4.	ERGEBNISSE	34
4.1	Wirkung von JB 18 auf das terminale Ileum	34
4.2	Wirkung von JB 18 auf die isolierte Aorta.....	37
4.3	Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis	40
4.4	Die Wirkung von JB 18 auf den isolierten Papillarmuskel	43
4.4	Untersuchung der Testsubstanz JB 18 am rechten Vorhof	46
4.5	Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Histamin	49
4.6	Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Acetylcholin	56
4.7	Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid	65

4.7 Untersuchung der Testsubstanz JB 18 auf die Kontraktionskraft des Uterus unter dem Einfluss von Histamindihydrochlorid	73
5. DISKUSSION	77
5.1 Strukturvergleich der Testsubstanz JB 18 mit Resveratrol.....	78
5.2 Untersuchung der glatten Muskulatur	79
5.2.1 Untersuchung des terminalen Ileums	79
5.2.2 Untersuchung der Arteria pulmonalis	80
5.2.3 Untersuchung an der Aorta	80
5.2.4 Untersuchung am rechten Vorhof	81
5.2.5 Untersuchung am Papillarmuskel	81
5.3 Wirkung der Testsubstanz JB 18 in Kombination mit den Agonisten.....	82
5.3.1 Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid auf den Uterus	82
5.3.2 Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid, Acetylcholin und Phenylephrinhydrochlorid auf das terminale Ileum	82
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	84
8. CURRICULUM VITAE	86

1. Einleitung

1.1 Geschichte des Resveratrol

Resveratrol wurde erstmals im Jahre 1963 aus den Wurzeln des Grasgewächses *Polygonum cuspidatum* isoliert (Biba 2004).

In der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin wird diese Pflanze schon länger eingesetzt, um Erkrankungen der Blutgefäße, des Herzens, der Haut und der Leber zu behandeln.

1976 ist es erstmals gelungen Resveratrol in Weintrauben nachzuweisen.

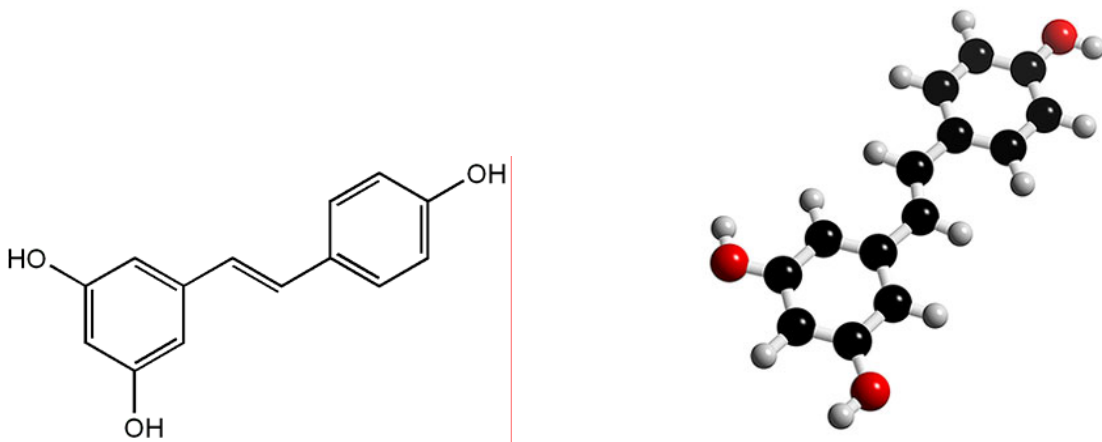
Resveratrol gehört zur Klasse der Flavonoide und ist ein natürlich vorkommendes Phytoalexin. Der Begriff Alexin stammt aus dem Griechischen und bedeutet sich schützen oder von sich weisen.

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

Chemisch gesehen handelt es sich bei Resveratrol um ein Stilbenderivat, genauer um ein 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilben.

Die Substanz ist verwandt mit dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol (Gehm et al. 1997).

Abbildung 1 Resveratrol



1.2 Vorkommen von Resveratrol

Stilbene finden sich in verschiedenen Pflanzenfamilien, so zum Beispiel in Preiselbeeren, Maulbeeren, Himbeeren und Erdnüssen.

Hauptvorkommen ist jedoch der Weinstock *Vitis Vinifera*, jene Kulturpflanze die schon seit Jahrtausenden kultiviert und zur Weinherstellung herangezogen wird.

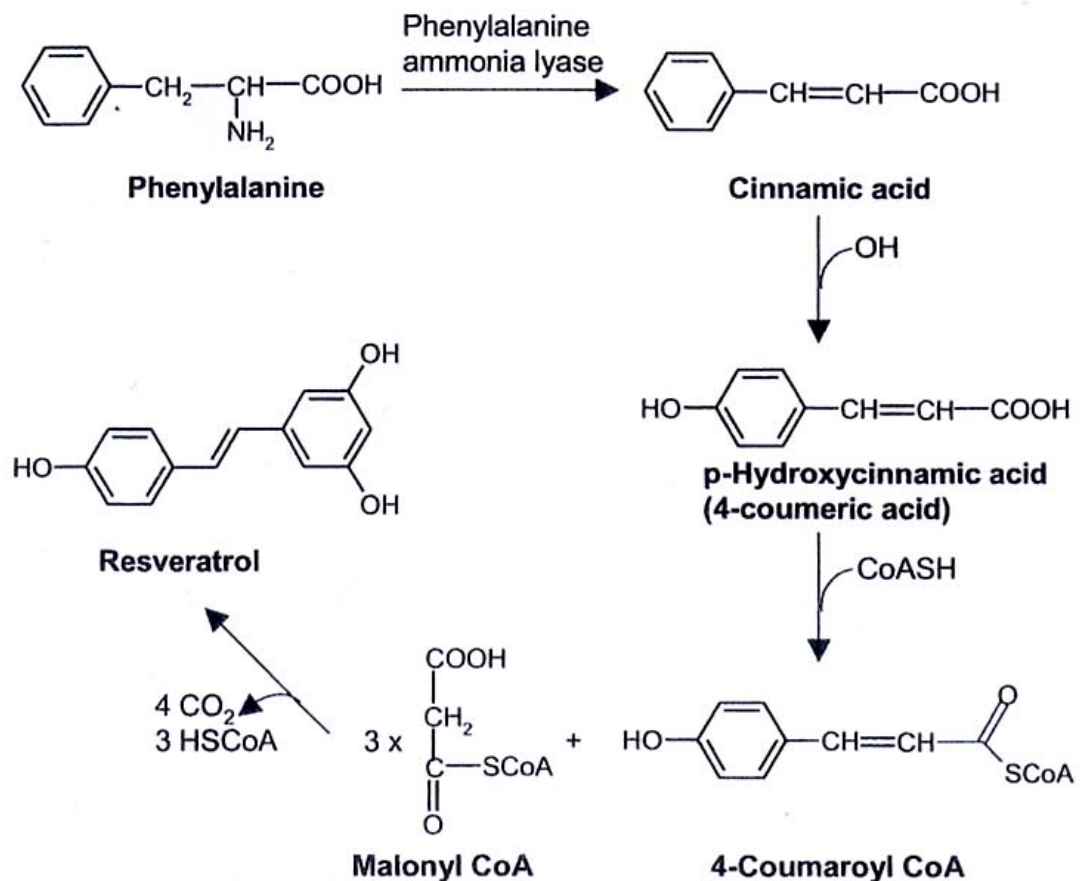
Polyphenole können dort in Samen, Reben und Wurzeln nachgewiesen werden, die höchste Konzentration liegt aber in den Schalen der Weintrauben. So konnte ein Zusammenhang zwischen Resveratrolgehalt und Dauer der Trauben im Fermentationsprozess hergestellt werden.

Im Weißwein ist die Konzentration von Resveratrol niedrig, da die Häute hier schon in einer frühen Produktionsphase der Weinherstellung entfernt werden. Auch Traubensaft, der ja nicht fermentiert wird, stellt keine bedeutende Resveratrolquelle dar.

1.3 Biosynthese von Resveratrol

Die Biosynthese von Resveratrol geht von der Aminosäure Phenylalanin aus. Im ersten Schritt kommt es durch Oxidation und anschließender Desaminierung zur Umwandlung zu Zimtsäure, die in der Folge enzymatisch zur p-Cumarinsäure hydroxyliert wird. Cumarinsäure wird mit Hilfe einer spezifischen CoA-Ligase zum Ester umgesetzt. Im letzten Schritt erfolgt die Kondensation von Cumaroyl CoA mit drei Malonyl CoA mittels Resveratrol-Synthetase zur Bildung von Resveratrol (Wu et al.2001).

Abbildung 2: Biosynthese von Resveratrol



1.4 Wirkung von Resveratrol

Seit der Entdeckung von Resveratrol im Rotwein wurden auch zahlreiche Studien über dessen positive biologischen Eigenschaften veröffentlicht. Da die Zahl der Wirkungen sehr groß ist und ständig wächst, soll im folgenden Abschnitt nur auf die bedeutendsten und am besten untersuchten Effekte eingegangen werden.

- **Die antioxidative Aktivität**

Resveratrol hat sich in vielen biologischen Studien als potentes Antioxidans erwiesen (Soleas et al. 2001). Resveratrol vermag in vitro viel wirksamer als α -Tocopherol, jedoch schwächer als Quercetin, die Kupfer-katalysierte Oxidation von humanen low-density Lipoproteinen zu unterbinden (Frankel et al. 1993). Aus diesem Grund wird nicht nur die kardioprotektive, sondern auch die antimutagene Wirkung von Resveratrol mit seiner antioxidativen Aktivität in Zusammenhang gebracht.

- **Kardiovaskuläre Effekte**

Die antioxidative Eigenschaft ist mit Sicherheit der wichtigste Mechanismus bei der kardioprotektiven Wirkung von Resveratrol. Diese unterbindet die LDL-Peroxidation und die somit verbundene Entstehung von atherosklerotischen Plaques, die die Gesundheit des Herzens und der Gefäße gefährden. Das Stilbenderivat Resveratrol vermag weiters bei Versuchen an Kaninchen die Hyperplasie der Gefäßwand nach vorangegangener Verletzung, sowie die damit verbundene Gefäßverengung zu verhindern (Zou et al. 2000).

Einen wesentlicher Faktor in der Reduktion koronarer Herzkrankheiten durch Resveratrol, scheint auch die in einigen Studien belegte Hemmung der

Plättchenaggregation darzustellen (Wu et al. 2001, Zibikowska und Olas 2000, Soleas et al. 1997, Rotondo et al. 1993).

Es wurde nachgewiesen, dass Resveratrol nicht nur Thrombin, sondern auch viele andere plättchenaktivierende Faktoren hemmt. Ethanol und Quercetin konnten hingegen jeweils nur einen Faktor (Thrombin bzw. 12-HETE) blockieren.

Die Beeinflussung von NO (Stickstoffmonoxid) ist ein ebenfalls viel diskutierter Effekt von Resveratrol im Zusammenhang mit seiner kardiovaskulären Aktivität, da NO einer der stärksten endogenen vasorelaxierenden Mediatoren ist. In aktuellen Publikationen wurde nachgewiesen, dass eine cholesterinreiche Ernährung zu einer Verringerung der NO-Konzentration führte, wobei Resveratrol diesen Effekt umkehren konnte (Zou et al. 2003).

Bei Versuchen an der Aorta von Ratten hat sich gezeigt, dass die relaxierende Wirkung zumindest zum Teil durch NO-vermittelte Mechanismen verursacht wird (Chen und Pace-Asciak 1996).

•Zellproliferation und Zellstoffwechsel

Und damit eine mögliche antimutagene, bzw. anticarcinogene Wirkung.

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

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

Bei einer Versuchsreihe an Mäusen, die in China durchgeführt wurde, bei denen die Wirkung von Resveratrol in Kombination mit 5 Fluorouracil (= 5 FU) bei Leberkrebs getestet wurde, zeigte sich, dass Resveratrol eine Metastasierung der Krebszellen aufhalten konnte (u et al. 2004).

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

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass trotz der vorliegenden zum Teil sehr beeindruckenden Ergebnisse von zu großem Optimismus abgesehen werden muss, da die Forschung sich einerseits auf in-vitro-Studien und Untersuchungen am Tiermodell beschränken, andererseits Untersuchungen hinsichtlich Bioverfügbarkeit und Metabolisierung noch nicht ausreichend und exakte Angaben erlauben bezüglich Dosierung und Pharmakokinetik.

Auch der Rotwein, als Hauptquelle des Resveratrol, wird momentan von zahlreichen Wissenschaftlern genauer untersucht. Obwohl der Rotwein und seine Inhaltsstoffe, besonders die Polyphenolfraction, eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben wird, stehen noch eindeutige Beweise der positiven Wirkung noch aus. Die negativen, gesundheitsschädlichen Auswirkungen von chronisch erhöhtem Alkoholenuss sind eindeutig erwiesen. Leberzirrhose und körperliche Abhängigkeit sind nur zwei der Folgen von chronischem Alkoholkonsum.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die vorliegende, neu synthetisierte Testsubstanz JB 18 im Vergleich mit der bereits relativ gut erforschten Substanz Resveratrol zu untersuchen.

Hierbei wurde vorerst der Einfluss von JB 18 auf die glatte Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum getestet, am Papilarmuskel und rechten Vorhof wurde eine eventuell positiv oder negativ chronotrope bzw. inotrope Wirkung untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Agonisten Acetylcholin, Histamin und Phenylephrin herangezogen, um einen möglichen Wirkmechanismus von JB 18 aufzuklären.

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Die Versuche dieser Diplomarbeit wurden mit verschiedenen isolierten Organen männlicher und weiblicher Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 250-600g durchgeführt. Die Tiere waren wenige Wochen alt und stammten aus dem Forschungsinstitut für Labortierkunde in Himberg / Niederösterreich.

Die verwendeten Versuchstiere wurden einen Tag vor der Versuchsdurchführung nüchtern gestellt, um einen konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des terminalen Ileums zu gewährleisten.

Die Tiere wurden durch einen gezielten Genickschlag getötet, um einen schnellen, schmerzlosen Tod zu sichern. Anschließend wurde das Herz, die Gefäße und der Darm entnommen, in eine bereitgestellte physiologische Nährlösung übergeführt, die zusätzlich noch mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) durchperlt wurde um eine weitere ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Nach Tötung der Tiere und Entnahme des Herzens und der thorakalen Gefäße wurde das Abdomen mit einer Schere geöffnet. Als erstes wurde das Caecum identifiziert, wobei genau darauf zu achten war, dieses weder zu stark zu dehnen, noch zu beschädigen. Anschließend wurde ein ca. 20 Zentimeter langes Stück des terminalen Ileums entnommen, und das dem jejunum nahegelegenen Ende mit einem Bindefaden markiert, um die beiden Enden nicht zu verwechseln. Bis zur weiteren Präparation wurden alle Organe in physiologischer Nährlösung aufbewahrt.

3.2 Isolierung der Präparate

3.2.1 Isolierung des rechten Vorhofes

Das Herz des Meerschweinchens wurde nach der Entnahme in eine mit physiologischer Nährlösung gefüllte Petrischale gelegt. Um einen Sauerstoffmangel zu verhindern wurde die Elektrolytlösung mit Oxymix durchperlt. Das Organ wurde nun mit Präpariernadeln an Spitze und Basis fixiert und der rechte Vorhof konnte so abgetrennt werden, wobei es wichtig war den Sinusknoten nicht zu verletzen. Am oberen und unteren Teil des Organs wurden Häkchen aus Silberdraht mittels Faden angebracht. Das fertige Präparat wurde in einer begasten Nährlösung aufbewahrt, damit ein Weiterschlagen des rechten Vorhofes gewährleistet werden konnte.

3.2.2 Isolierung des Papillarmuskel

Um zu den Papillarmuskeln zu gelangen wurde der rechte Ventrikel von der Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet, aufgeklappt und mit Präpariernadeln fixiert. Vorher wurden jedoch die Purkinjefasern, die durch ihre Spontanaktivität den Versuchsablauf möglicherweise negativ beeinträchtigt hätten, vom Muskel entfernt. Schließlich wurde am Ansatz der Papillarmuskelsehne mit einem Stück Bindefaden ein Silberdrahthäkchen befestigt, dann die Sehne durchtrennt und der Muskel vorsichtig entnommen, wobei wiederum zu beachten war, diesen weder zu überdehnen, noch zu beschädigen.

3.2.3 Isolierung der Arteria pulmonalis

Mit Hilfe einer Federschere wurde das Perikard sowie Teile der Lungen und Fettreste unter dem Mikroskop entfernt. Die Arteria pulmonalis wurde so nahe wie möglich am Herzen entnommen. Das Präparat wurde in einer Petrischale mit Nadeln am Kork befestigt und vom anhaftenden Fett- und Muskelgewebe befreit. Anschließend wurden 3-4 mm lange ringförmige Stücke abgeschnitten, die später in die Versuchsapparatur eingehängt werden konnten.

3.2.4 Isolierung der Aorta

Nach Entnahme des Herzens, wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet und die Aorta entlang des Rückrates vorsichtig herauspräpariert ohne die Aortenwand zu verletzen und in ein Becherglas mit physiologischer Nährlösung übergeführt. Die weitere Präparation erfolgte wieder unter dem Mikroskop in einer mit Nährlösung gefüllten und Kork ausgelegten Petrischale. Als erstes wurden vorsichtig Reste von anhaftendem Fett und Muskelgewebe mit einer Federschere abgetrennt, dann wurden Ringe von 2 bis 3 mm Breite aus der Aorta herausgeschnitten, wobei wieder darauf zu achten war, weder die Aorta zu dehnen noch in irgendeiner Form beschädigte Stücke für die Versuche zu nehmen. Die fertig präparierten Aortenringe wurden bis zur Einspannung in die Versuchsapparatur in einer mit Oxymix durchperlten Nährlösung aufbewahrt.

3.2.5 Isolierung des terminalen Ileums

Dem toten Meerschweinchen wurde der Bauchraum mit einer Schere aufgeschnitten und vorsichtig ungefähr 20 cm des vor dem Caecum gelegenen, terminalen Ileums entnommen. Ein Bindfaden markierte das jejunal gelegene Stück, um eine Verwechslung der Enden zu vermeiden. Dann wurde das Stück in eine begaste Nährlösung transferiert. Für jeden Versuch wurde ein Darmstück

(0,5-1cm) schräg abgeschnitten und in einer mit physiologischer Elektrolytlösung gefüllten und mit Kork ausgelegten Petrischale folgendermaßen weiterpräpariert. Die beiden Enden wurden mit Präpariernadeln fixiert und das am Darm anhaftende Mesenterium mit einer Schere vorsichtig entfernt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette musste der Ileumabschnitt durchgespült werden, um es vom Chymus zu reinigen. Dann wurden an beide Enden des gereinigten Darmstücks Silberdrahthäkchen gebunden, die mit Zwirn-faden befestigt wurden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Darmstück beidseitig offen blieb, um ein Einwirken der Testsubstanz von allen Seiten der Schleimhaut zu ermöglichen.

3.2.6 Isolierung des Uterus

Der Uterus wurde nach Öffnung des Bauchraumes entnommen und in eine entsprechende

De-Jalon's Nährlösung übergeführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop, wobei vom Y-förmigen Uterus nur die beiden Hörner, die durch ein Septum getrennt sind, verwendet wurden. Die Randstücke wurden aufgrund ihrer zu geringen Reaktivität verworfen, und die Uterushörner in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Anschließend wurden daran Silberdrahthäkchen befestigt.

Aufgrund der starken Aktivität bzw. Kontraktionskraft des Uterus wurden vor der Befestigung mit dem Binfaden die Häkchen direkt durch die Organwand gestochen, um ein Ausreißen der Häkchen zu verhindern.

3.3 Physiologische Nährlösungen

3.3.1 Nährlösungen für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, das terminale Ileum und die Arteria pulmonalis

Die Nährlösung wurde an jedem Versuchstag frisch zubereitet. Dazu wurden entsprechende Volumina an bereitgestellten Stocklösungen mit Aqua bidestillata aufgefüllt. Vor der Zugabe von CaCl_2 wurde die Lösung 10 Minuten lang mit Oxymix begast, um eine Ausfällung des Calciumsalzes zu verhindern. Auch während der Versuche wurde die Elektrolytlösung permanent mit Gas versorgt, um einen konstanten pH-Wert im physiologischen Bereich (pH 7,2-7,4) zu gewährleisten.

Tabelle 1 Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung für den rechten Vorhof, Papillarmuskel, Darm und Pulmonalarterie

Stocklösung	ml Stocklösung/l Tyrode	mmol / l
NaCl	33,60	114,90
KCl	35,00	4,73
NaHCO_3	83,70	24,90
MgSO_4	3,20	3,20
KH_2PO_4	1,18	1,18
CaCl_2	1,18	1,18
Glucose	1,98	10,00

3.3.2 Nährlösung für die Aorta

Die Herstellung dieser Lösung erfolgte in gleicher Weise wie es in Kapitel 3.3.1. beschrieben wurde. Die Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der in allen Aortenversuchen verwendeten Elektrolytlösung.

Tabelle 2 Zusammensetzung der Nährlösung für die Aorta

Stocklösung	mmol/l
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO ₃	11,90
MgSO ₄	5,80
KH ₂ PO ₄	1,40
CaCl ₂	1,60
Glucose	10,00

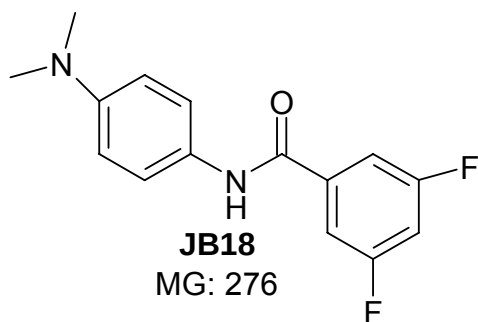
3.3.3 Nährlösung für den Uterus

Für den Uterus wurde eine De Jalon's Lösung verwendet, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall vor der Zugabe der Calciumchloridlösung, eine kürzere Begasung mit Oxymix ausreichend war.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Nährlösung für den Uterus

Stocklösung	mmol/l
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO ₃	11,90
MgSO ₄	5,80
KH ₂ PO ₄	1,40
CaCl ₂	1,60
Glucose	10,00

3.4 Testsubstanz

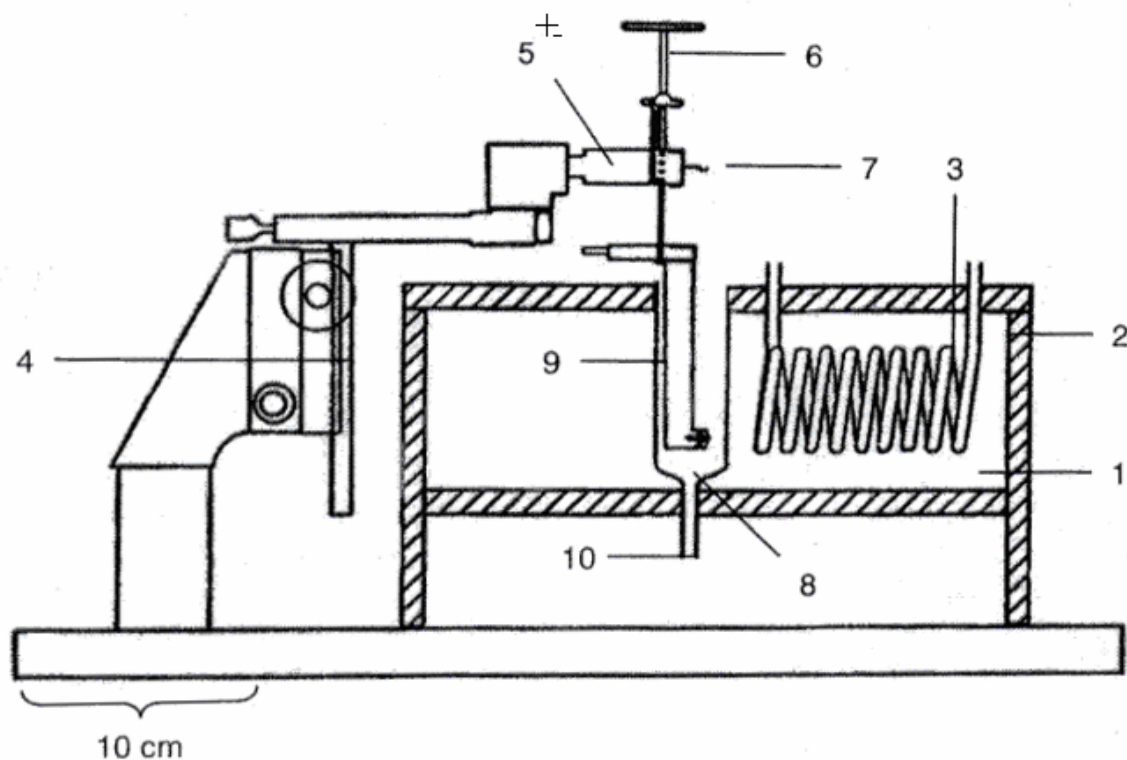


N-(4-Dimethylaminophenyl)-3,5-difluorbenzamid

3.5 Versuchsanordnung

3.5.1 Apparatur I zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf verschiedene Organe des Meerschweinchens

Abbildung 3 Versuchssapparatur I



Legende zu Abbildung 3:

1	Wasserbad	6	Feintrieb
2	Acrylglas	7	Aufhängevorrichtung für das Organ
3	Heizspirale	8	Organbad
4	Stativschlitten	9	Organhalterung
5	Kraftwandler	10	Gaszufuhr mit Fritte

Die Apparatur besteht aus einem Wasserbad, dessen Temperatur mit Hilfe eines Thermostats und Heizspirale konstant auf $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ beim rechten Vorhof und Papillarmuskel, bei Aorta, Arteria pulmonalis, Ileum und Uterus auf $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Das Organbad hat ein Volumen von 25 ml, über eine Glasfritte wurde die Nährlösung permanent mit Oxymix durchperlt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung, sowie den physiologischen pH-Wert zu garantieren.

Die Spülung bzw. der Wechsel der physiologischen Nährlösungen erfolgte per Hand mit einer Kunststoffspritze an die ein Gummischlauch befestigt war. Bei den Präparaten Ileum, Uterus und Vorhof wurde in die zuvor befestigten Silberdrahthäkchen ein Silberdraht eingehängt, welcher die Verbindung zum Kraftwandler darstellte.

Der Papillarmuskel wurde mit dem freien Ende in der Muskelkammer zwischen zwei Plexiglasplättchen eingespannt, Aorta und Arteria pulmonalis wurden ohne Häkchen direkt zwischen zwei Silberhäkchen eingespannt.

Mittels des Stativschlitten wurde eine problemloses Absenken bzw. Herausführen der Organhalterung in die, bzw. aus der Muskelkammer ermöglicht.

Der Kraftmessung unter isometrischen Bedingungen diente ein Kraftwandler, der die Stärke der Kontraktionen in Stromimpulse transformierte und ein Verstärker TransbridgeTM-4 Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) diente zur Messung der Kraft.

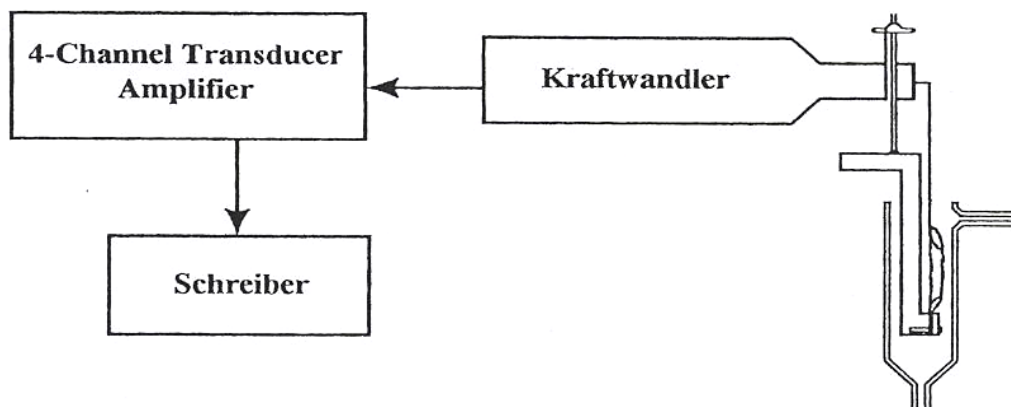
Aufgezeichnet wurden die Ergebnisse mit einem Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

3.4.2 Schematische Darstellung des Kraftwandlers und seine Registrierung

Das Prinzip beruht auf der Umwandlung des mechanischen Vorgangs in eine elektrische Größe über einen Wandler („Transducer“).

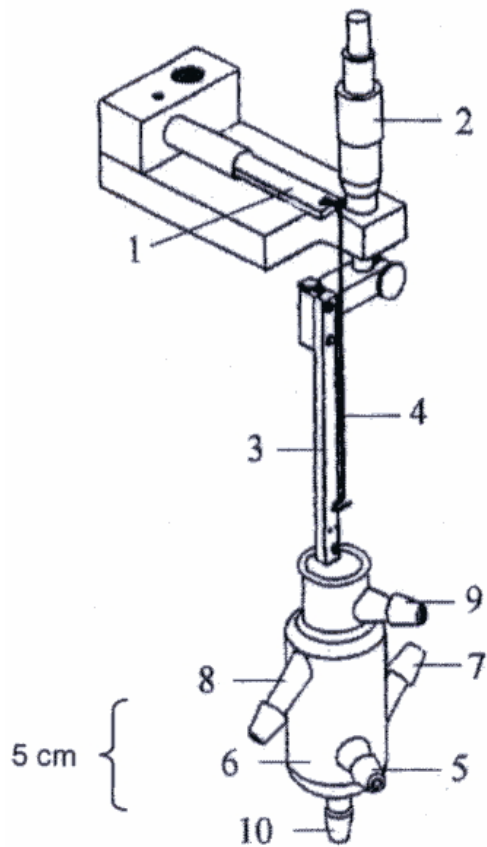
Verwendet wurde ein Widerstandswandler mit Dehnungsstreifen in Wheatstone'scher Brückenschaltung vom Typ AE 875 (Firma Aksjeselskapet, Horten, Norwegen). Durch die Dehnung wird der elektrische Widerstand des Messstreifens so verändert, dass ein Strom proportional zu den Dehnungsstreifen fließt (Ther 1965). Die nötige Exzitationsspannung für den Kraftwandler lieferten zwei 6 Volt Batterien. Die von den Muskelkontraktionen ausgelösten Signale verstärkte ein „4 Channel Transducer Amplifier“ (WPI, FL, USA). Die Kontraktionen wurde von einem Schreiber (Dual Channel Model BD 112 Flatbed Recorder, Firma Kipp & Zonen, Niederlande)

Abbildung 4 Kraftwandler



3.5.2 Apparatur II zur Untersuchung von Agonisten

Abbildung 5



Legende zu Abbildung 5

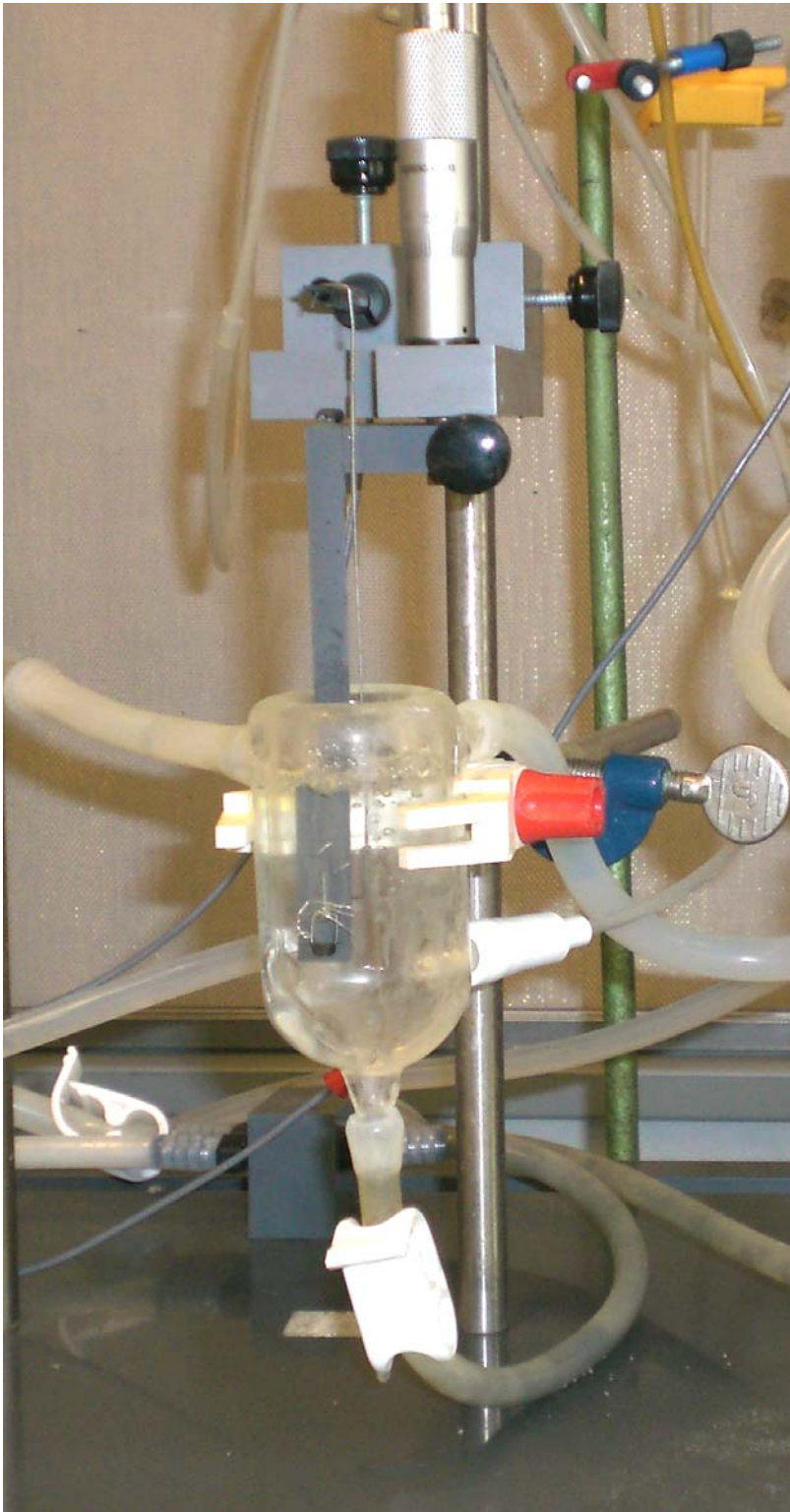
1	Kraftwandler	6	Organbad
2	Feintrieb	7	Zulauf Wasserbad
3	Organhalterung	8	Ablauf Wasserbad
4	Aufhängevorrichtung	9	Zulauf Nährlösung
5	Gaszufuhr	10	Ablauf Nährlösung

3.5.3 Originalabbildungen der Versuchsanordnung

Abbildung 6 Originalabbildung einer Versuchsanordnung



Abbildung 7 Organzelle



3.6 Versuchsablauf und Untersuchung der Testsubstanz JB18

3.6.1 Versuchspräparat rechter Vorhof

Der rechte Vorhof wurde in der Versuchsaapparatur eingespannt und in das Organbad abgesenkt. Anschließend musste eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt werden, welche während des Versuchs durch Regulation des Feintriebs konstant gehalten werden musste. Während der etwa 30minütigen Anpassungszeit wurde die Schlagfrequenz des Vorhofs beobachtet und abgewartet bis diese annähernd konstant war. Nach 45 Minuten Kontrollzeit wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. Mit dem Schreibgerät wurde die Schlagfrequenz bis zum Versuchsende alle 5 Minuten registriert.

3.6.2 Versuchspräparat Papillarmuskel

Das Präparat wurde wie beim Vorhof in der Versuchsaapparatur eingespannt und in das Organbad abgesenkt. Die Vorspannung betrug 3,92 mN und wurde während des Versuchs konstant gehalten. Die Papillarmuskelpräparate mussten durch elektrische Reize zur Kontraktion angeregt werden. Dies geschah über Silberchloridelektroden mit dem Reizgerät Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Isolator A360 (World Precision Instrument, Hamden, FL, USA). Während der 45 Minuten langen Kontrollphase wurde die Amplitude der Kontraktion auf Millimeterpapier gemessen. Nach dem Erreichen eines konstanten Wertes konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz JB 18 begonnen werden. Alle 5 Minuten wurde mit dem Schreiber die Amplitude von ca. 5 Kontraktionen gemessen und registriert.

Die Papillarmuskel wurden mit Rechteckimpulsen von 3 ms Dauer gereizt, die Frequenz betrug 1 Hz und die Reizstromstärke lag bei 10 % über der muskelabhängigen Reizschwelle.

3.6.3 Versuchspräparat terminales Ileum

Nach dem Einspannen des Darmpräparates und Absenken ins Bad wurde eine Vorspannung von 4,9 mN angelegt. Während der folgenden 30minütigen Anpassungsphase wurde immer wieder mit Hilfe des Feintriebs nachgespannt, bis der Grundtonus des Ileumteils annähernd konstant war. Stücke mit einer zu hohen Spontanaktivität mussten verworfen werden. Anschließend wurde das Darmstück mit Kaliumchlorid zur maximalen Kontraktion angeregt.

Dazu wurde die physiologische Nährlösung mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung ausgewechselt, die durch Lösen von 0,44 g KCl in 100 ml Ausgangstyrode hergestellt wurde. Unmittelbar vor der Zugabe von KCl begann die Aufzeichnung der Kontraktion mit dem Schreiber. Nach etwa 30-45 Minuten hatte sich die Wirkung von Kaliumchlorid auf das Darmstück voll entfaltet. Sobald ein Plateauwert erreicht war, der einer 100 %igen Kontraktion entsprach, konnte dieser als Kontrollwert bei der Auswertung verwendet werden. Hierauf wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. Die Registrierung der Kontraktionsänderung wurde bis Versuchende fortgesetzt.

4.5.4 Versuchspräparat Aorta

Das Aortastück wurde in der Versuchsanordnung so zwischen zwei Silberdrahthäkchen eingehängt, dass der Gefäßring quer gespannt werden konnte. Zuerst wurde die Halterung mit dem Gefäßstück in die mit Aorten – Nährlösung gefüllte und mit Oxymix durchperlte Kammer abgesenkt. Dann wurde eine Vorspannung von 19,6 mN (2g) angelegt und eine etwa 60minütige Anpassungszeit abgewartet, in der die Abweichungen von der Nulllinie mit dem Feintrieb korrigiert wurden. Die Temperatur der Nährlösung wurde mit Hilfe des Wasserbades auf 37 ± 1 °C konstant gehalten.

Anschließend wurde die Nährlösung gegen eine 90 mmolare KCl-Lösung ausgetauscht, um die maximale Kontraktion der glatten Muskulatur der Aorta zu erreichen. Nach Erreichen eines Plateauwertes, normalerweise nach ungefähr einer Stunde, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. Die Registrierung des Aortaverhaltens fing unmittelbar vor der Zugabe der KCl-Lösung an.

4.5.5 Versuchspräparat Arteria pulmonalis

Die Versuchsreihe an der Arteria pulmonalis wurden analog zu denen der Aorta durchgeführt. Die Vorspannung der Arteria pulmonalis betrug 9,81 mN (1g). Nach 30 Minuten Anpassungszeit, wurde KCl zugegeben. Nach Erreichen eines Plateauwertes wurde die Testsubstanz-Lösung alle 45 Minuten zugespritzt. Die Kontraktionsabnahme konnte wieder mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet werden.

4.5 *Versuchsablauf und Untersuchung der Testsubstanz in Abhängigkeit von der Zugabe von Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin.*

4.5.1 Versuchspräparat Uterus

Die Substanzstammlösung für die Durchführung der Untersuchungen der Testsubstanz und Histamin musste an jedem Tag frisch bereitete werden. Bei der Herstellung wurde ein Kammervolumen von 8 ml berücksichtigt, die Substanzeinwaage wurde so gewählt, dass eine Badkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Dazu wurden 3,76 mg der Testsubstanz in 500 μl DMSO gelöst und mit 150 ml Uterustyrode versetzt. Anschließend wurde eine 10 μmolare Histaminstammlösung vorbereitet, die in zwei weiteren Konzentrationen 3 und 1 $\mu\text{mol/l}$ verdünnt wurde. Die Stammlösung wurde mit 1,48 mg Histamin und 20 ml Tyrode hergestellt. Die 3 $\mu\text{mol/l}$ -Verdünnung bestand aus 6 ml der Histaminlösung und 14 ml Tyrode, die 1 $\mu\text{mol/l}$ -Verdünnung bestand aus 6,6 ml der 3 $\mu\text{mol/l}$ -Verdünnung und 13,4 ml Tyrode. Notwendig war noch eine Kontrolllösung, die dieselbe DMSO Menge wie die Substanzlösung enthalten musste, es wurden zu diesem Zweck 1,6 ml Dimethylsulfoxid in 500 ml Uterustyrode gelöst.

Das, wie in Abschnitt 3.2.6. isolierte und präparierte Uterusstück, wurde in das mit Uterustyrode gefüllte Organbad (Abb. 3) abgesenkt und mit einer Kraft von 4,9 mN zwischen zwei Silberhäkchen vorgespannt. Nach 30 Minuten Anpassungszeit wurde die Tyrode gegen 8 ml einer 60 mmolaren KCl-Lösung ausgetauscht, die 30 Minuten Einwirkungszeit hatte. Anschließend wurde das Organbad zweimal mit der Kontrolllösung gewaschen und mit 8ml derselben aufgefüllt. Dazu wurde die KCl-Lösung durch Öffnen der Kunststoffklemme am Ablassschlauch des Organbades abgelassen und die Kontrolllösung eingefüllt. Zu diesem Zeitpunkt konnte mit der Zugabe von den Histaminverdünnungen begonnen werden. Es wurde mit 0,25 ml der 10 $\mu\text{mol/l}$ konzentrierten Lösung angefangen. Die Registrierung der Änderung der Uteruskontraktion wurde unmittelbar vor dem

Einspritzen von Histamin mit dem Schreiber aufgezeichnet und nach den ersten Zeichen der Relaxation (nach 2-3 Minuten) unterbrochen. Das Organbad musste gleich anschließend zweimal mit Kontrolllösung ausgewaschen und wieder aufgefüllt werden, erst nach 10 Minuten konnte dieselbe Histaminkonzentration eingespritzt werden. Diese Vorgangsweise wurde für jede Histaminverdünnung dreimal wiederholt. Nach der Letzten, das heißt am Ende der Kontrollphase wurde das Organbad zweimal mit der Substanzlösung ausgewaschen und auf 8 ml aufgefüllt. Nach 45 Minuten Einwirkzeit wurde nach der vorher beschriebenen Vorgangsweise die Wirkung von Histamin und der Testsubstanz weiter untersucht.

4.5.2 Versuchspräparat terminales Ileum

Das Darmstück wurde in die Versuchsvorrichtung eingespannt und in das Organbad abgesenkt. Die Testsubstanzstammlösung musste auch in diesem Fall an jedem Versuchstag frisch hergestellt werden. Bei der Herstellung wurde ein Kammervolumen von 7 bzw. 14 ml berücksichtigt, die Substanzeinwaage wurde so gewählt, dass eine Badkonzentration von 3, 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Dazu wurden jeweils 0,19, 0,65, 1,96 mg der Testsubstanz in 20, 66,7 und 200 μl DMSO gelöst und mit 260 ml Tyrode versetzt. Neben der Wirkung von Histamin (Hst) wurde auch die von Acetylcholin (Ach) und Phenylephrin untersucht. Es wurden sechs Verdünnungen (3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 $\mu\text{mol/l}$) von Histamin und Acetylcholin hergestellt, während von Phenylephrin nur fünf Konzentrationen (10, 3, 1, 0,3, 0,1 $\mu\text{mol/l}$) gebraucht wurden.

Tabelle 4 Verdünnungsreihe von Histamin und Acetylcholinlösungen

Konzentration $\mu\text{mol/l}$	ml der vorherigen Verdünnung	ml Tyrode
3 μmol = 0,44 mg Hst = 0,42 mg Ach		28
1 μmol	9,33	18,67
0,3 μmol	8,40	19,60
0,1 μmol	9,33	18,67
0,03 μmol	8,40	19,60
0,01 μmol	9,33	18,67

Tabelle 5 Verdünnungsreihe von Phenylephrinlösung

Konzentration $\mu\text{mol/l}$	ml der vorherigen Verdünnung	ml Tyrode
10 μmol = 1,62 mg Phenylephrin		28
3 μmol	8,40	19,60
1 μmol	9,33	18,67
0,3 μmol	8,40	19,60
0,1 μmol	9,33	18,67

Die Kontrolllösung musste dieselbe Menge an DMSO enthalten wie die Substanzlösung, deshalb wurden jeweils 31, 103, 307 μl Dimethylsulfoxid in 400 ml Tyrode gelöst.

Der Versuchsablauf beim terminalen Ileum entsprach dem im Abschnitt 3.7.1. beschriebenen Ablauf. Nach der Anpassungszeit wurde das Organbad gleich zweimal mit Kontrolllösung ausgewaschen und anschließend aufgefüllt, es wurde

keine KCl-Lösung zugegeben. Jede Acetylcholin- und Phenylephrinverdünnung wurde nur einmal eingespritzt (0,5 ml). Nach der Einwirkung der letzten Verdünnung wurde das Organbad zweimal mit der Substanzlösung ausgewaschen und auf 14 ml aufgefüllt. Nach 45 Minuten konnte mit dem Einspritzen der Antagonistenlösungen angefangen werden.

Die Registrierung der Änderung der Kontraktionskraft begann kurz vor dem Einspritzen und wurde nach ca. 30 Sekunden beendet.

4.6 Messgrößen und Statistik

Bei den Präparaten von Aorta, terminalem Ileum und Arteria pulmonalis wurden auf den erhaltenden Kontraktionskurven die Abstände zu der definierten Nulllinie und den markierten Punkten auf der Kurve bei Substanzzugabe vermessen. Die Werte wurden mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert (bei 5 mV galt: 1 cm entspricht 0,98 mN), um den Wert in mN zu erhalten.

Die Kontraktionskraft der Papillarmuskel wurde in mN bestimmt, indem die auf Millimeterpapier aufgezeichnete Amplitude mit dem Lineal abgemessen wurde und der erhaltene Wert in cm mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert.

Die Auswertung der Werte des rechten Vorhofes erfolgte hinsichtlich der Schlagfrequenzänderung. Das Schreibgerät registrierte die Schlagfrequenz während einer Zeitspanne von 12 Sekunden, was bei einem Papiervorschub von 5 Millimeter / Sekunde einer Aufzeichnungsstrecke von 6 cm entsprach. Um die Zahl der Schläge des Vorhofes zu erhalten, wurden die Ausschläge auf dem Millimeterpapier abgezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert. Beim Uterus wurden die während der Wirkzeit aufgezeichneten Strecken mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert. Aus den Daten wurde die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz bzw. Änderung der Kontraktionskraft bezogen auf den Kontrollwert berechnet. Als Kontrollwert wurde der Mittelwert aus jenen Werten definiert, die am Ende der Kontrollphase vor der ersten Substanzzugabe, jeweils „steady state“ Bedingungen herrschten. Der so berechnete Kontrollwert wurde als 100 Prozent definiert. Die Messdaten aus einer Zahl von „n-Versuchen“ wurden als arithmetische Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardfehlern (SEM) dargestellt. Die EC_{50} ist jene Konzentration in $\mu\text{mol} / \text{l}$ bei der die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Ausgangswertes absinkt.

Die Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse wurde mit dem „ungepaarten Student-t-Test“ beurteilt, wobei die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $<1\%$ ($P < 0,01$) als signifikant galten, jene mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $<0,1$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Wirkung von JB 18 auf das terminale Ileum

Gemäß Kapitel 3.5.3. wurde die Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums an 7 Präparaten getestet. Der Darm wurde mit einer 60 mmol/l KCl-Lösung vorkontrahiert und anschließend wurde JB 18 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ in einem Abstand von 45 min. zugesetzt.

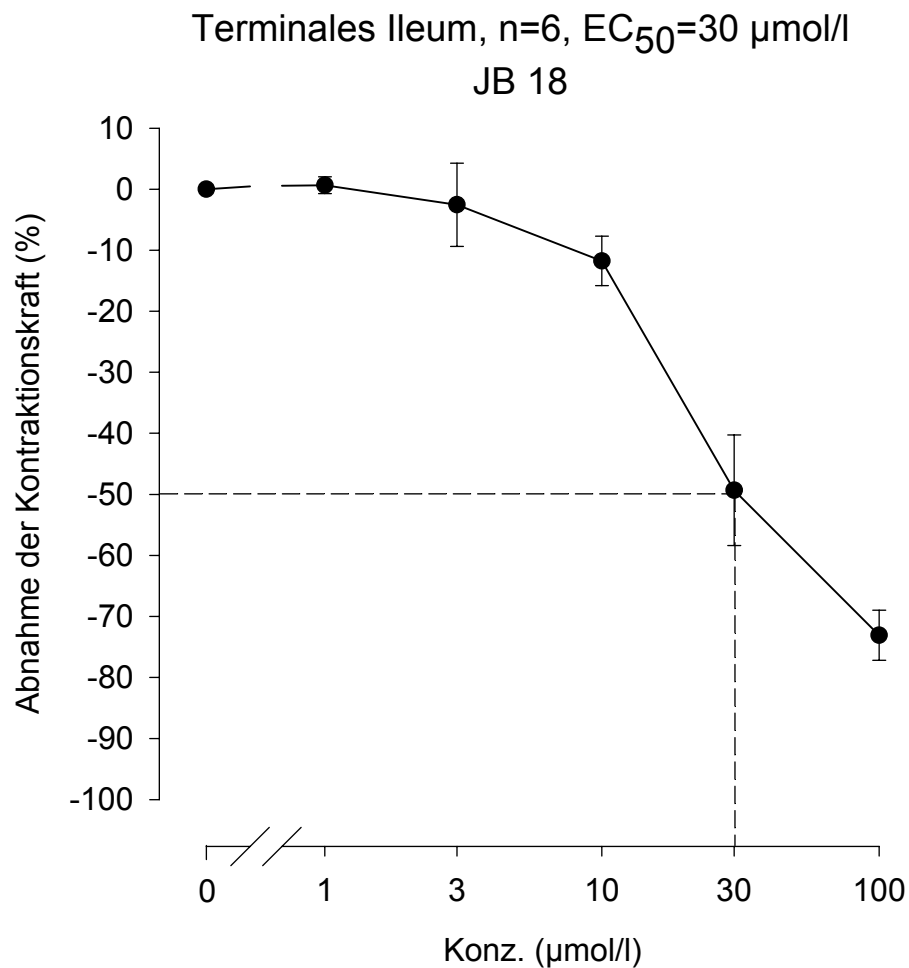
Tabelle 6 Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	11,06 $\pm$ 1,27	0,00 $\pm$ 0,00	6	--
1	11,12 $\pm$ 1,30	0,66 $\pm$ 1,38	6	n.s.
3	10,73 $\pm$ 1,25	-2,5 $\pm$ 6,83	6	n.s.
10	9,80 $\pm$ 1,24	-11,75 $\pm$ 4,08	6	0,05
30	5,71 $\pm$ 1,33	-49,32 $\pm$ 9,08	6	0,01
100	3,17 $\pm$ 0,85	-73,07 $\pm$ 4,11	6	0,01

f_c = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und in %;

SEM = Standardfehler in mN und in %

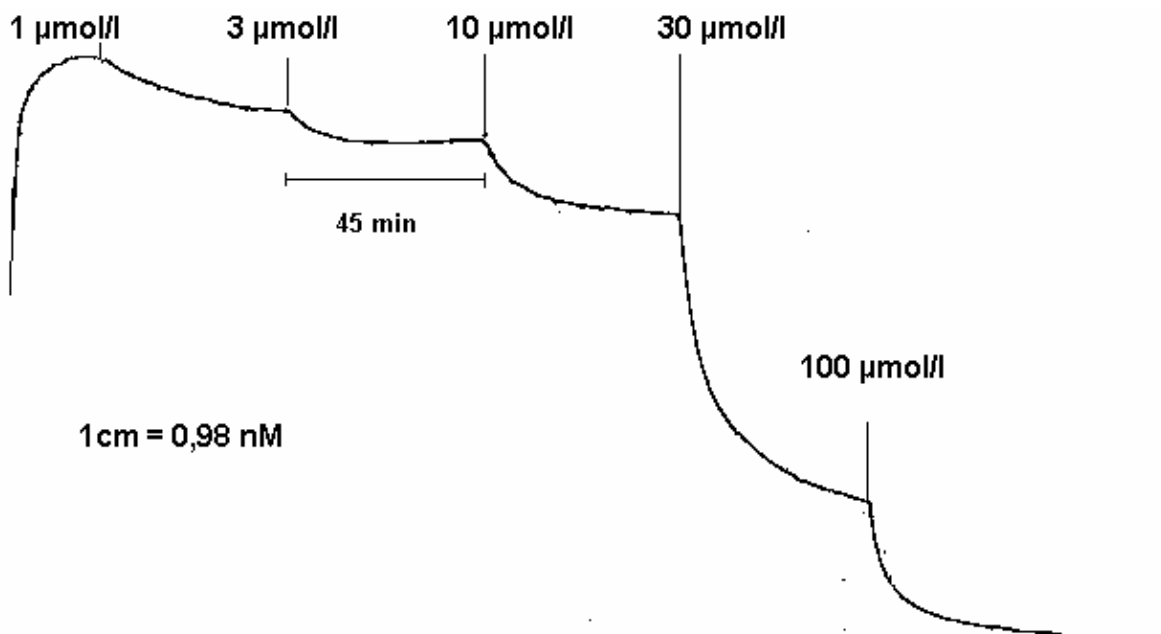
Abbildung 8 Konzentrations-Wirkungskurve von JB 18 am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 8 :

Abbildung 4 stellt die Kontraktionskraft des terminalen Ileums nach der kumulativen Zugabe von JB 18 dar. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme in %. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte; die Standardfehler werden als Balken dargestellt.

Abbildung 9 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 9:

Die Originalaufzeichnung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums durch die Einwirkung von JB 18 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 µmol/l. Der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

4.2 Wirkung von JB 18 auf die isolierte Aorta

Die Wirkung von JB 18 auf die Aorta wurde an 7 verschiedenen Präparaten getestet. Die Vorkontraktion des Organs erfolgte mit einer 90 mmol / l KCl-Lösung. Anschließend wurde die Testsubstanz in einem Abstand von 45 Minuten in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol} / \text{l}$ injiziert.

Während der Kontrollphase wurde als Mittelwert aus den 5 Versuchen eine Kontraktionskraft von $7,54 \pm 0,75 \text{ mN}$ ermittelt.

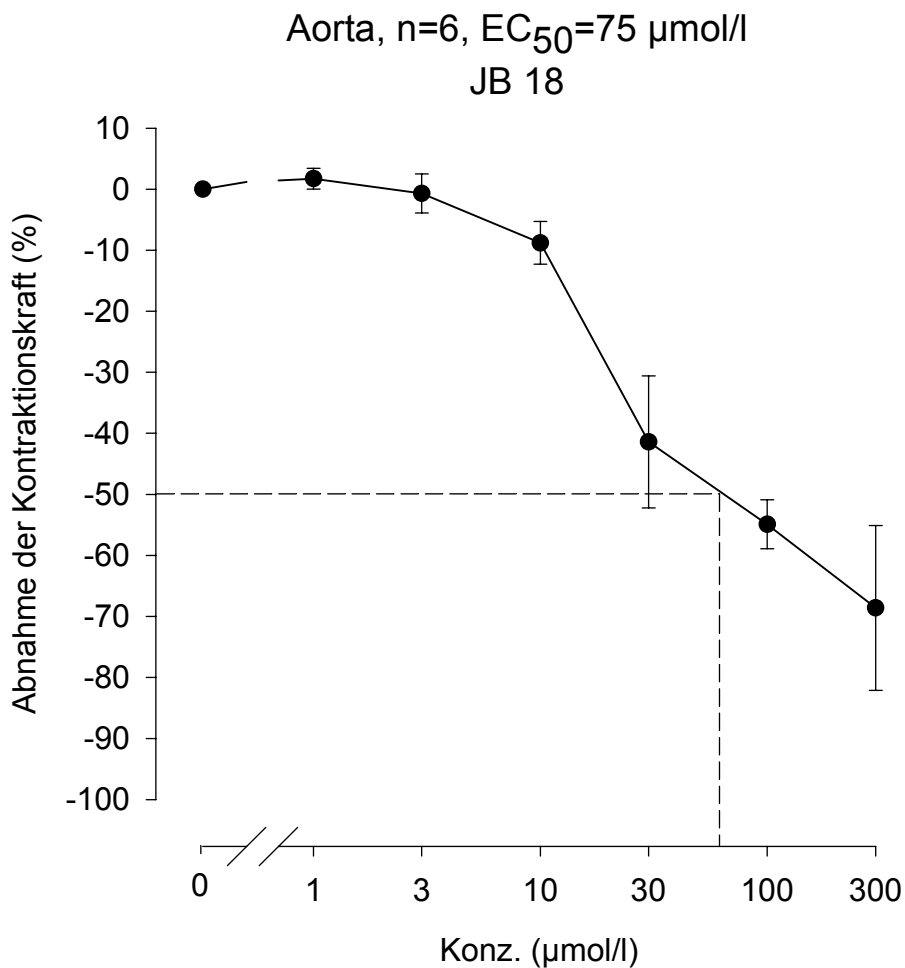
Tabelle 7 Wirkung von JB 18 auf die Aorta

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	$7,54 \pm 0,75$	$0,00 \pm 0,00$	6	--
1	$7,66 \pm 0,76$	$1,71 \pm 1,7$	6	n.s.
3	$7,43 \pm 0,74$	$-0,7 \pm 3,3$	6	n.s.
10	$6,8 \pm 0,7$	$-8,8 \pm 3,5$	6	n.s.
30	$16,4 \pm 11$	$-41,4 \pm 10,08$	6	0,01
100	$3,4 \pm 0,4$	$-54,9 \pm 4$	6	0,01
300	$31,4 \pm 13,5$	$-68,6 \pm 13,5$	2	0,01

f_c = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und in %;

SEM = Standardfehler in mN und in %

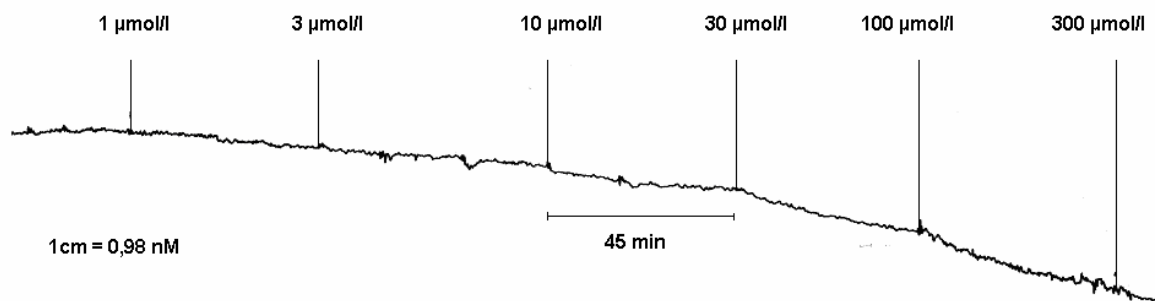
Abbildung 10 Konzentrations-Wirkungskurve von JB 18 an der Aorta



Legende zu Abbildung 10 :

Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung der isolierten Aorta nach der kumulativen Zugabe von JB 18. Dabei wurden auf der Abszisse die Konzentrationen von JB 18 in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die arithmetischen Mittelwerte wurden als Punkte dargestellt, ihre Standardfehler als Balken.

Abbildung 11 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta



Legende zu Abbildung 11:

Die Originalaufzeichnung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums durch die Einwirkung von JB 18 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$. Der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

4.3 Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

An der Arteria pulmonalis wurde die Wirkung von JB 18 auf deren Kontraktionskraft wiederum an 5 verschiedenen Präparaten getestet. Die einzelnen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ wurden alle 45 min. zugesetzt.

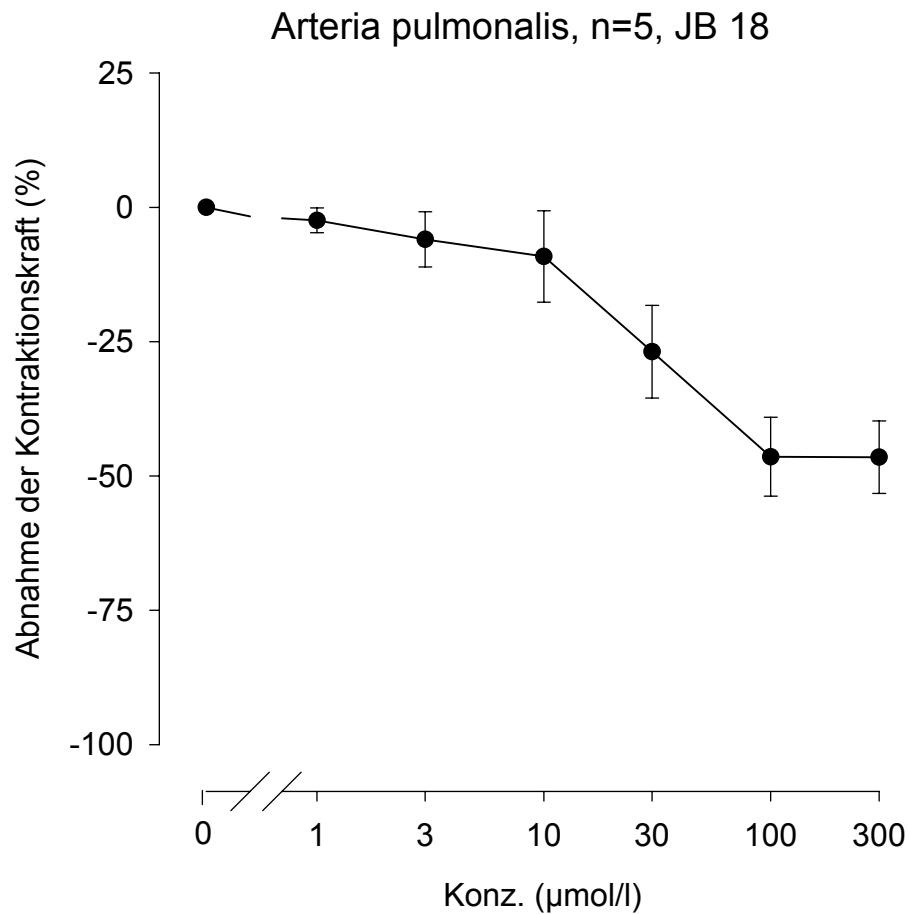
Tabelle 8 Wirkung von JB 18 auf die Arteria pulmonalis

JB18 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	11,96 $\pm$ 2,14	0,00 $\pm$ 0,00	5	--
1	11,48 $\pm$ 1,75	-2,44 $\pm$ 2,30	5	n.s.
3	10,83 $\pm$ 1,25	-5,98 $\pm$ 5,15	5	n.s.
10	10,13 $\pm$ 0,84	-9,71 $\pm$ 8,50	5	n.s.
30	8,04 $\pm$ 0,62	-26,88 $\pm$ 8,63	5	0,05
100	6,59 $\pm$ 1,37	-46,43 $\pm$ 7,35	5	0,01
300	7,27 $\pm$ 1,07	-46,53 $\pm$ 6,75	3	0,01

f_c = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und in %;

SEM = Standardfehler in mN und in %

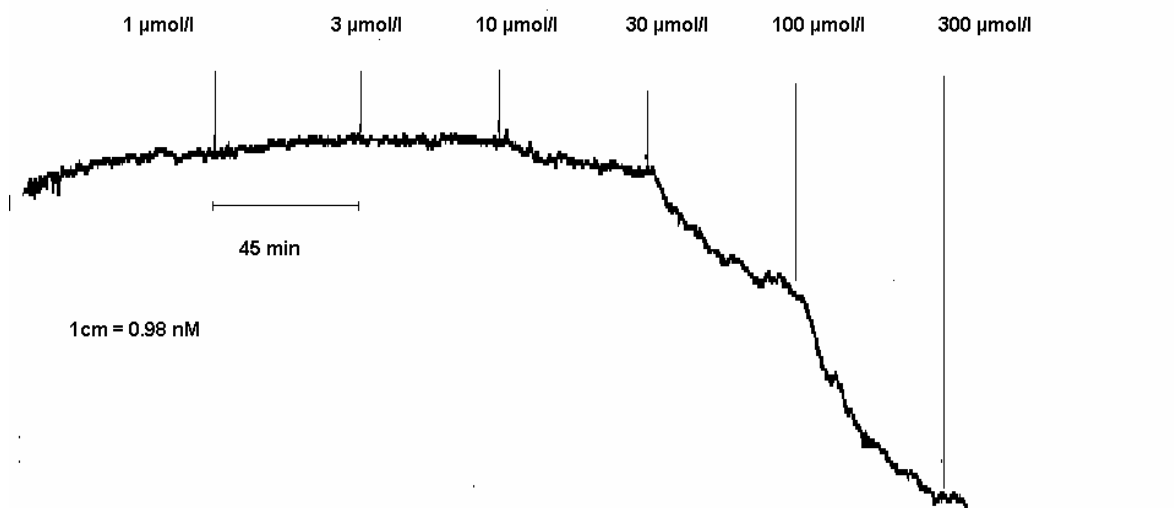
Abbildung 12 Konzentrations-Wirkungskurve von JB 18 an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 12:

Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung von JB 18 auf die Arteria pulmonalis. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz JB 18, die Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Arithmetischen Mittelwerte wurden als Kreise dargestellt, ihre Standardfehler als Balken.

Abbildung 13 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 9:

Die Originalaufzeichnung zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis durch die Einwirkung von JB 18 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 μmol / l. Die zeitlichen Abstände zwischen den Substanzzugaben betrugen 45 Minuten, die Pfeile markieren die Substanzzugabe.

4.4 Die Wirkung von JB 18 auf den isolierten Papillarmuskel

Die Untersuchung der Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln wurde an 5 Präparaten, wie in Kapitel 3.6.2. geschildert, durchgeführt. JB 18 wurde ebenfalls in Abständen von je 45 min. in den vorgeschriebenen Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol/l}$ kumulativ in das Organbad injiziert.

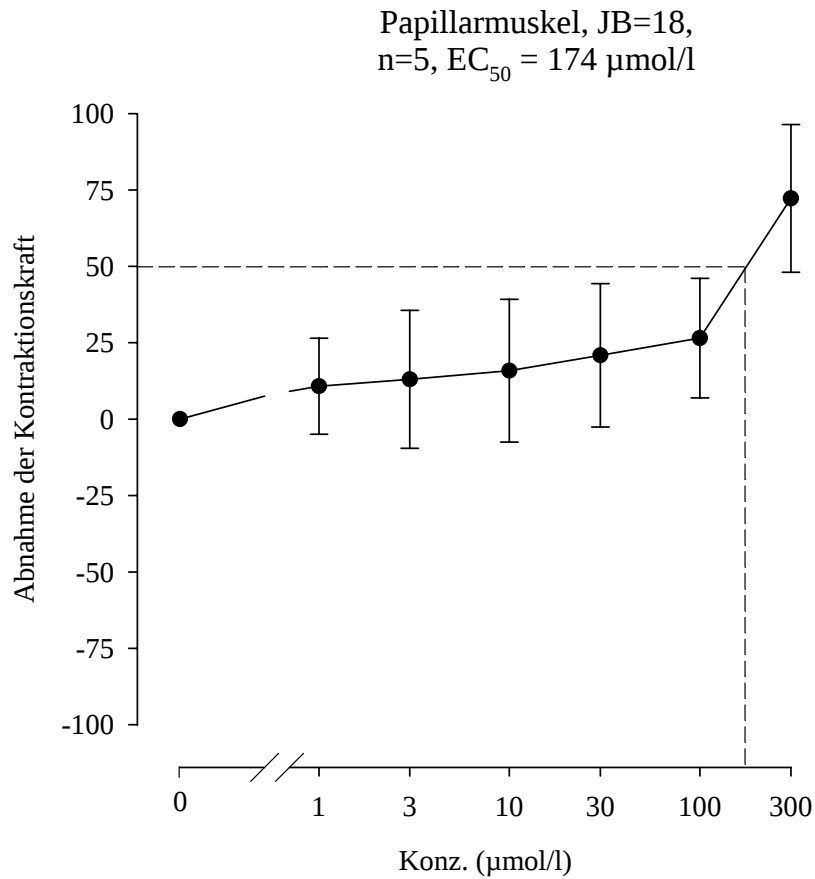
Tabelle 9 Wirkung von JB 18 auf den Papillarmuskel

J18 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	1,5 $\pm$ 0,38	0,00 $\pm$ 0,00	5	--
1	1,63 $\pm$ 0,44	10,77 $\pm$ 15,69	5	n.s.
3	1,74 $\pm$ 0,59	13,03 $\pm$ 22,57	5	n.s.
10	1,84 $\pm$ 0,67	15,85 $\pm$ 23,37	5	n.s.
30	1,97 $\pm$ 0,78	20,87 $\pm$ 23,48	5	n.s.
100	2,05 $\pm$ 0,76	26,51 $\pm$ 19,54	5	n.s.
300	3,4 $\pm$ 1,04	72,23 $\pm$ 24,16	2	0,05

f_c = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und in %;

SEM = Standardfehler in mN und in %

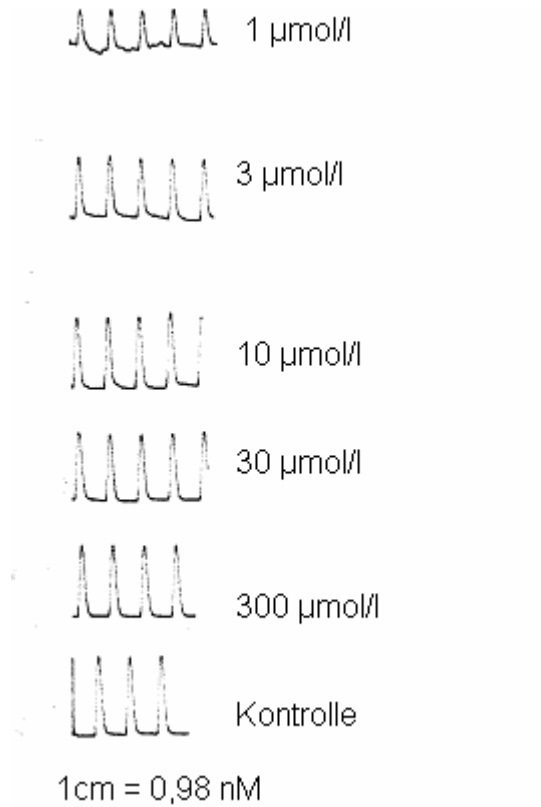
Abbildung 14 Konzentration-Wirkungskurve von JB 18 an isolierten Papillarmuskeln



Legende zu Abbildung 14

Die Abbildung zeigt die Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von JB 18 an isolierten Papillarmuskeln. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen von JB 18 in $\mu\text{mol/l}$, die Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Kreise auf der Kurve zeigen die arithmetischen Mittelwerte, die Balken ihre Standardabweichungen.

Abbildung 15 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels



Legende zu Abbildung 15 :

Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung der Amplitude und der Änderung nach der Zugabe der Substanz. Der Abstand zwischen 2 Substanzzugaben betrug 45 Minuten.

4.4 Untersuchung der Testsubstanz JB 18 am rechten Vorhof

Der Einfluss auf die Schlagfrequenz der Testsubstanz JB 18 am rechten Vorhof wurde an 6 verschiedenen Organen getestet. Bevor man die Substanz in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol} / \text{l}$ zusetzte, musste eine konstante Schlagfrequenz erreicht werden, nachdem das Organ mit einer Kraft von 10,4 mN vorgespannt wurde.

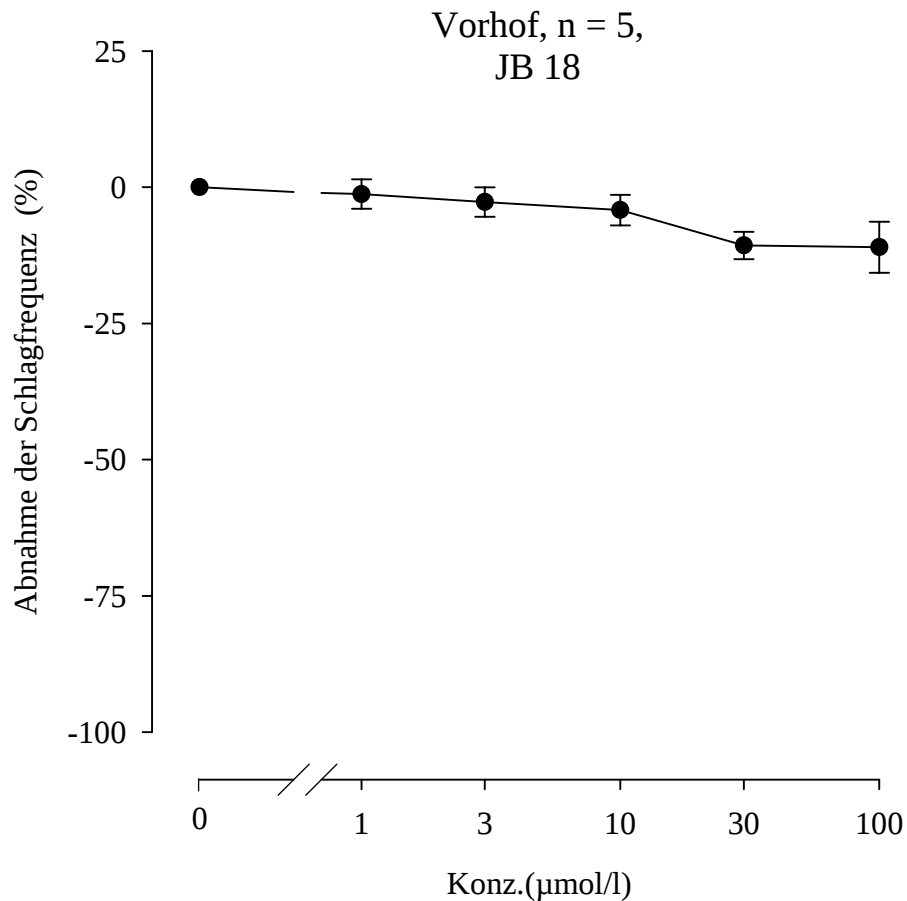
Tabelle 10 Wirkung von JB 18 auf den rechten Vorhof

JB 18($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0 (Kontrolle)	210 $\pm$ 21,79	0,00 $\pm$ 0,00	7	--
1	208,3 $\pm$ 26,82	-1.25 $\pm$ 2,69	7	n.s.
3	205 $\pm$ 25,66	-2,73 $\pm$ 2,69	7	n.s.
10	201,7 $\pm$ 24,55	-4,21 $\pm$ 2,89	7	n.s.
30	188,3 $\pm$ 24,04	-10,69 $\pm$ 2,52	7	n.s.
100	188,0 $\pm$ 22,72	-11,02 $\pm$ 4,68	5	n.s.

f_c = arithmetische Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und in %;

SEM = Standardfehler in mN und in %

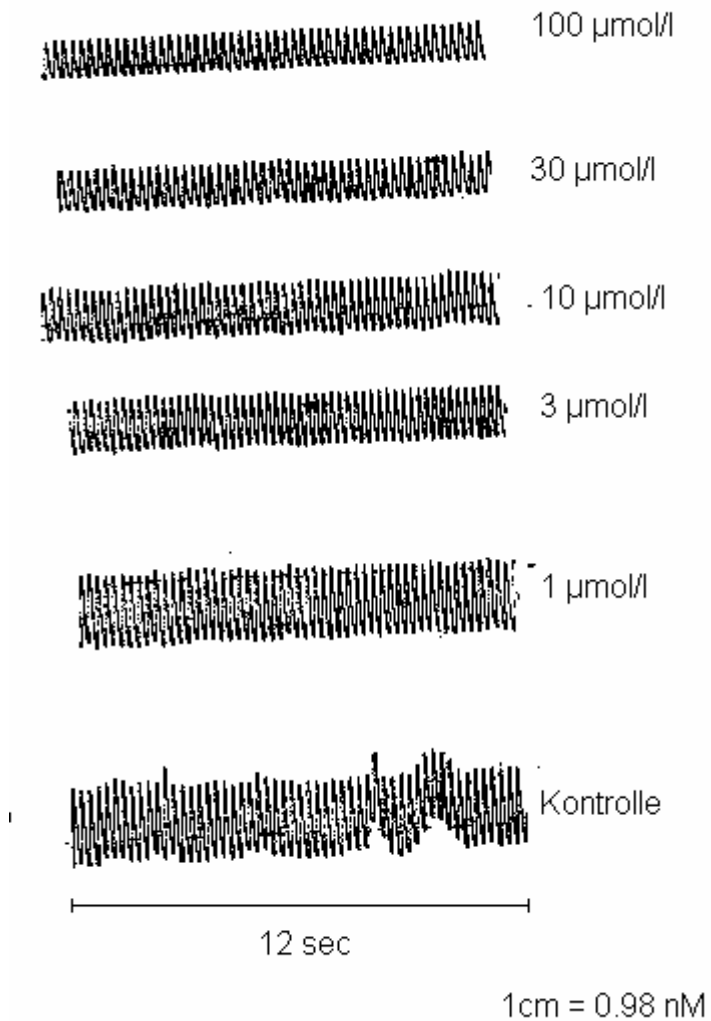
Abbildung 16 Konzentrations-Wirkungskurve von JB 18 an rechten Vorhöfen



Legende zu Abbildung 16 :

Die Graphik stellt die Wirkung von JB 18 auf die isolierten rechten Vorhöfe dar. Auf die Abszisse wurde linear die Abnahme der Schlagfrequenz in % aufgetragen, auf die Ordinate wurden die Konzentrationen der Testsubstanz als logarithmische Funktion aufgetragen. Die Punkte markieren die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz aus sieben Versuchen, die Balken ihre Standardfehler.

Abbildung 17 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 auf die Schlagfrequenz rechter Vorhöfe



Legende zu Abbildung 17 :

Die Abbildung zeigt die Änderung der Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe. JB 18 wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 µmol/l in 45-Minuten-Abständen zugesetzt.

4.5 Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Histamin

Die Wirkung von JB 18 wurde, wie im Kapitel 3.7.2. beschrieben, auch in Kombination mit Histamin (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 $\mu\text{mol/l}$) analysiert. Die Testsubstanz wurde in 3 Konzentrationen (3, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) jeweils an 3 Präparaten getestet.

Tabelle 11 Wirkung von Histaminhydrochlorid auf terminale Ilea Kontrolle 10 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	12,4 $\pm$ 4,95	3
0,03	20,51 $\pm$ 7,56	3
0,1	37,74 $\pm$ 7,47	3
0,3	70,53 $\pm$ 5,66	3
1	91,31 $\pm$ 9,05	3
3	16,1 $\pm$ 4,76	3

Tabelle 12 Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Histamin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	8,58 $\pm$ 3,07	3	n.s.
0,03	13,65 $\pm$ 5,27	3	n.s.
0,1	32,43 $\pm$ 10,67	3	n.s.
0,3	56,95 $\pm$ 10,03	3	n.s.
1	72,61 $\pm$ 12,67	3	n.s.
3	79,62 $\pm$ 13,34	3	n.s.

Tabelle 13 Wirkung von Histamindihydrochlorid auf terminale Ilea Kontrolle 30 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	1,11 $\pm$ 0,42	3
0,03	1,69 $\pm$ 0,49	3
0,1	3,02 $\pm$ 0,96	3
0,3	4,93 $\pm$ 1,37	3
1	8,48 $\pm$ 1,94	3
3	10,94 $\pm$ 2,63	3

Tabelle 14 Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Histamin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	0,87 $\pm$ 0,11	3	n.s
0,03	1,5 $\pm$ 0,14	3	n.s
0,1	3,39 $\pm$ 1,05	3	n.s
0,3	6,53 $\pm$ 2,06	3	n.s
1	8,46 $\pm$ 1,7	3	n.s
3	10,19 $\pm$ 2,66	3	n.s

Tabelle 15 Wirkung von Histaminhydrochlorid auf terminale Ileä Kontrolle 100 µmol / l

JB 18 (µmol/l) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	2,95±0,58	3
0,03	4,54±0,78	3
0,1	6,68±1,39	3
0,3	10,32±1,83	3
1	17,31±4,25	3
3	19.0±4,74	3

Tabelle 16 Wirkung von Histaminhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 100 µmol / l JB 18

JB 18 (µmol/l) & Histamin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	1,01±0,18	3	n.s
0,03	2,06±0,32	3	n.s
0,1	3,97±1,11	3	n.s
0,3	5,58±1,22	3	0,05
1	10.36±1,66	3	0,05
3	11,46±2,04	3	0,05

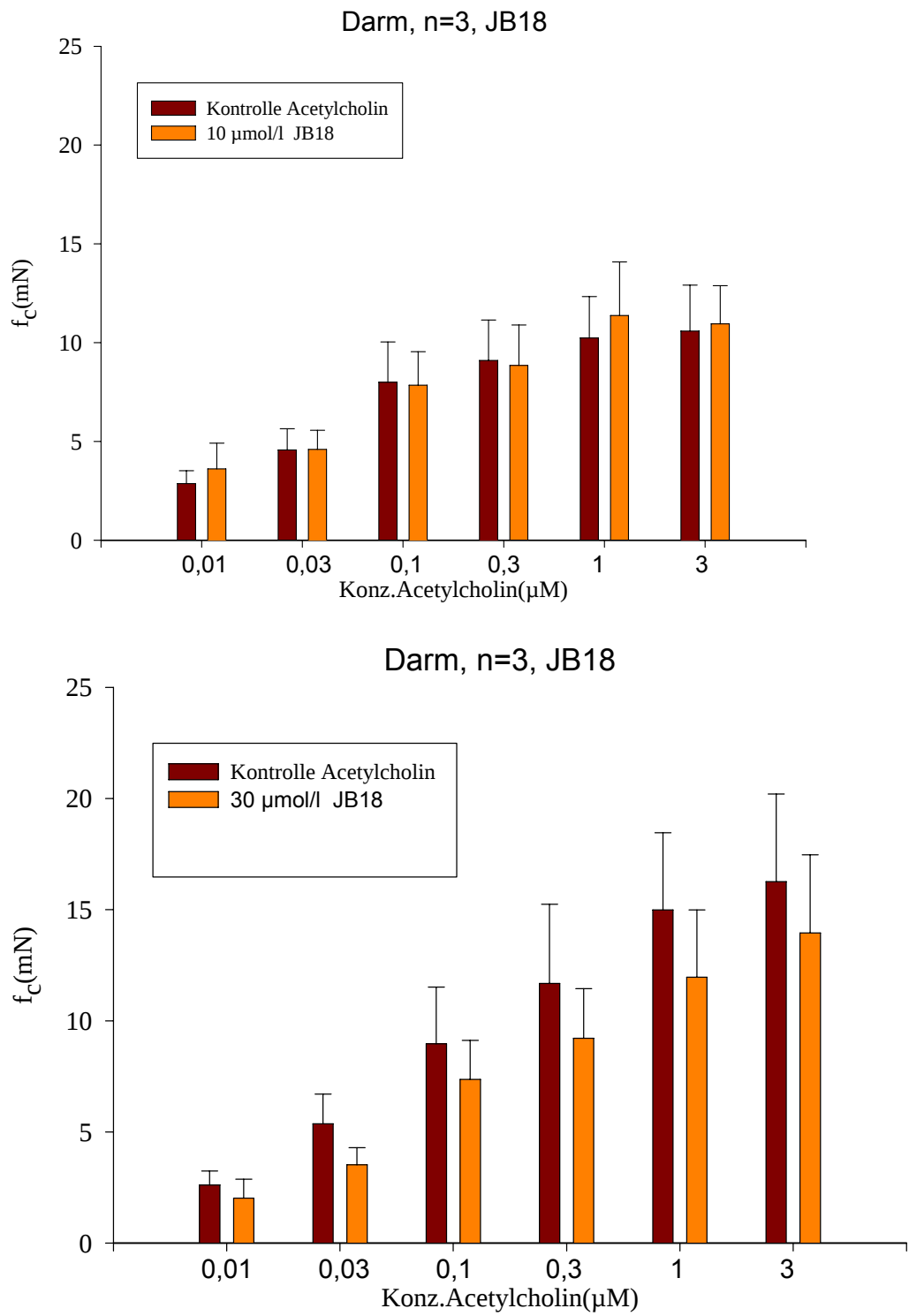
Legende zu den Tabellen 11,13 und 15:

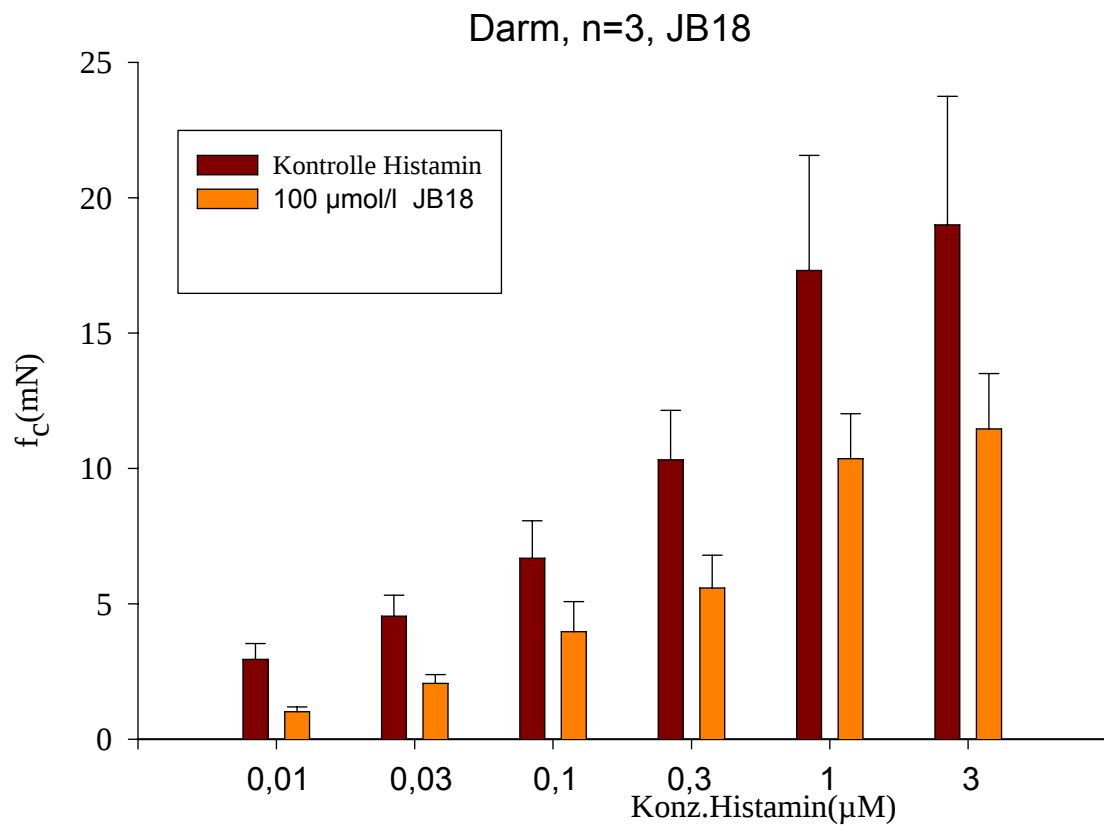
Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus drei Kontrollversuchen mit 10, 30 und 100 µmol/l Histaminhydrochlorid.

Legende zu den Tabellen 12,14 und 16:

Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Histaminhydrochlorid in Kombination mit JB 18 in den Konzentrationen 10, 30 und 100 µmol / l.

Abbildung 18 Graphische Darstellung der Wirkung von Histamindihydrochlorid in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ in Kombination mit JB 18 (in den Konzentrationen 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea

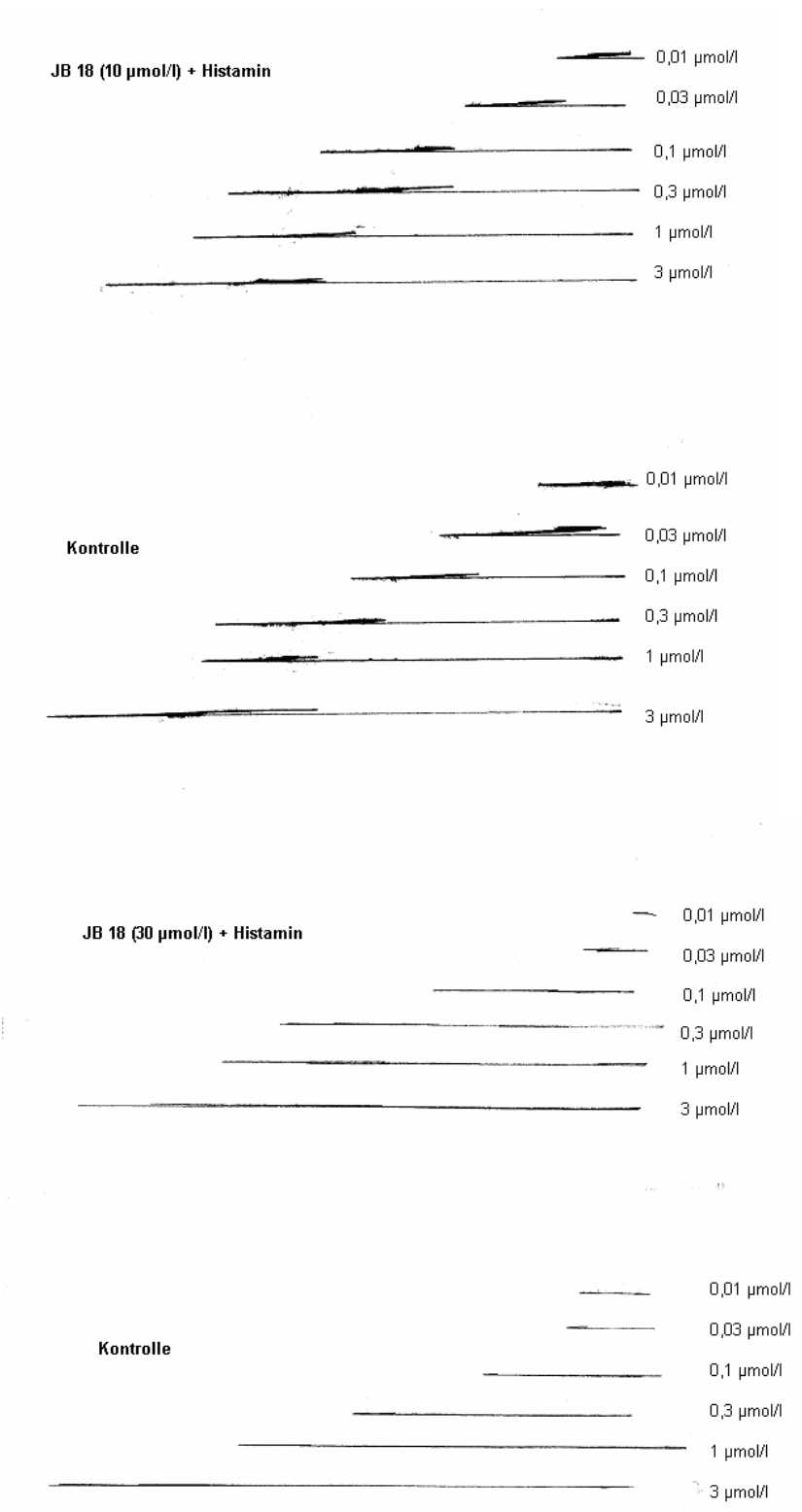


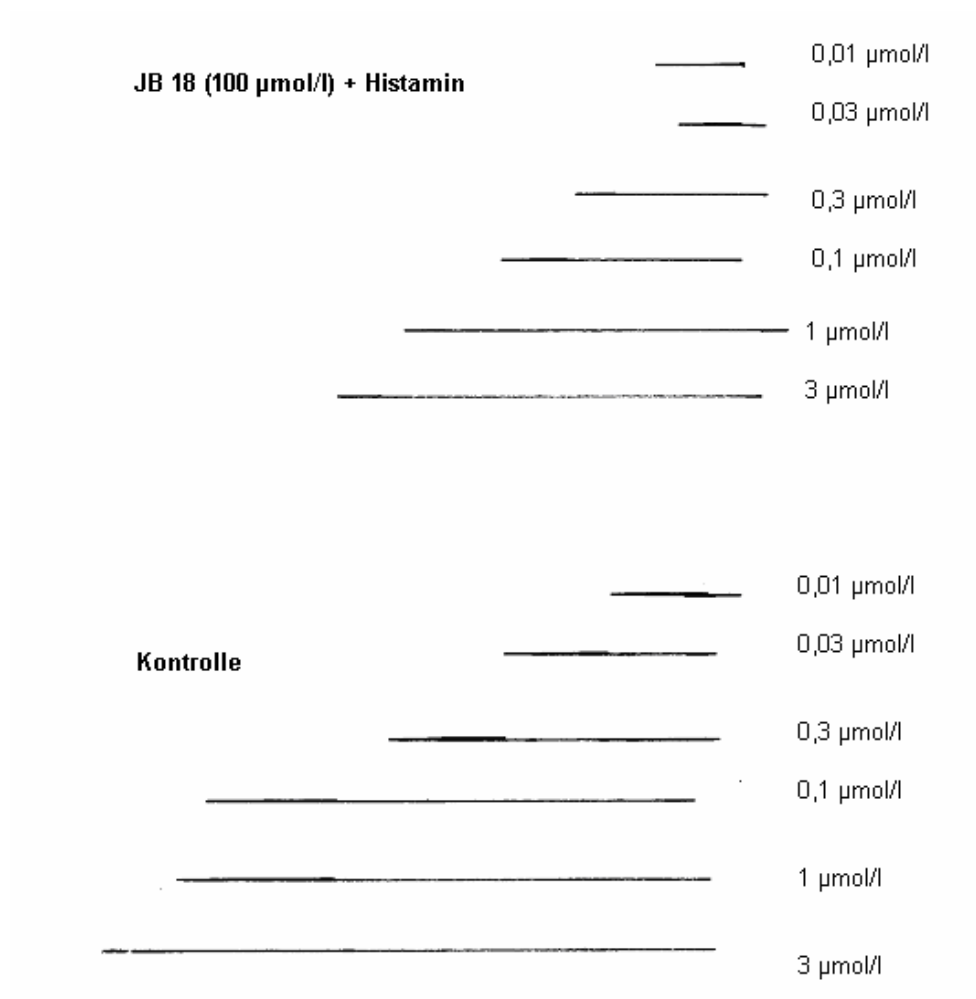


Legende zu Abbildung 18:

Auf die Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN aufgetragen auf die Abszisse die Konzentrationen von Histamindihydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen wurde als Balken dargestellt, ihre Standartfehler als strichförmige Verlängerungen.

Abbildung 19 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums





Legende zu Abbildung 19:

Kontrolle von Histamidihydrochlorid

Wirkung von Histamidihydrochlorid bei 10, 30 und 100 µmol/l JB 18

1cm = 0.98 nM

4.6 Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Acetylcholin

Die Wirkung von JB 18 wurde, wie im Kapitel 3.7.2. beschrieben, auch in Kombination mit Acetylcholin (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 $\mu\text{mol/l}$) analysiert. Die Testsubstanz wurde in 3 Konzentrationen (3, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) jeweils an 3 Präparaten getestet.

Tabelle 17 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf terminale Ileä Kontrolle 10 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	2,86 $\pm$ 0,66	3
0,03	4,57 $\pm$ 1,07	3
0,1	8,0 $\pm$ 2,03	3
0,3	9,1 $\pm$ 2,04	3
1	10,23 $\pm$ 2,10	3
3	10,58 $\pm$ 2,33	3

Tabelle 18 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Acetylcholin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	3,61 $\pm$ 1,30	3	n.s.
0,03	4,60 $\pm$ 0,96	3	n.s.
0,1	7,85 $\pm$ 1,69	3	n.s.
0,3	8,85 $\pm$ 2,04	3	n.s.
1	11,37 $\pm$ 2,71	3	n.s.
3	10,95 $\pm$ 1,93	3	n.s.

Tabelle 19 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf terminale Ilea Kontrolle 30 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	2,61 $\pm$ 0,63	3
0,03	5,36 $\pm$ 1,34	3
0,1	8,96 $\pm$ 2,55	3
0,3	11,69 $\pm$ 3,56	3
1	14,99 $\pm$ 3,47	3
3	16,26 $\pm$ 3,94	3

Tabelle 20 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Acetylcholin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	2,02 $\pm$ 0,85	3	n.s.
0,03	3,52 $\pm$ 0,77	3	n.s.
0,1	7,37 $\pm$ 1,76	3	n.s.
0,3	9,21 $\pm$ 2,24	3	n.s.
1	11,96 $\pm$ 3,03	3	n.s.
3	13,95 $\pm$ 3,52	3	n.s.

Tabelle 21 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf terminale Ileä Kontrolle 100 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,01	1,27 $\pm$ 0,3	3
0,03	3,12 $\pm$ 0,74	3
0,1	5,77 $\pm$ 1,61	3
0,3	7,72 $\pm$ 1,09	3
1	10,45 $\pm$ 1,5	3
3	11,66 $\pm$ 0,79	3

Tabelle 22 Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 100 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Acetylcholin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	1,09 $\pm$ 0,33	3	n.s.
0,03	2,36 $\pm$ 0,53	3	n.s.
0,1	5,03 $\pm$ 0,4	3	n.s.
0,3	7,78 $\pm$ 0,59	3	n.s.
1	9,34 $\pm$ 0,78	3	n.s.
3	10,47 $\pm$ 0,76	3	n.s.

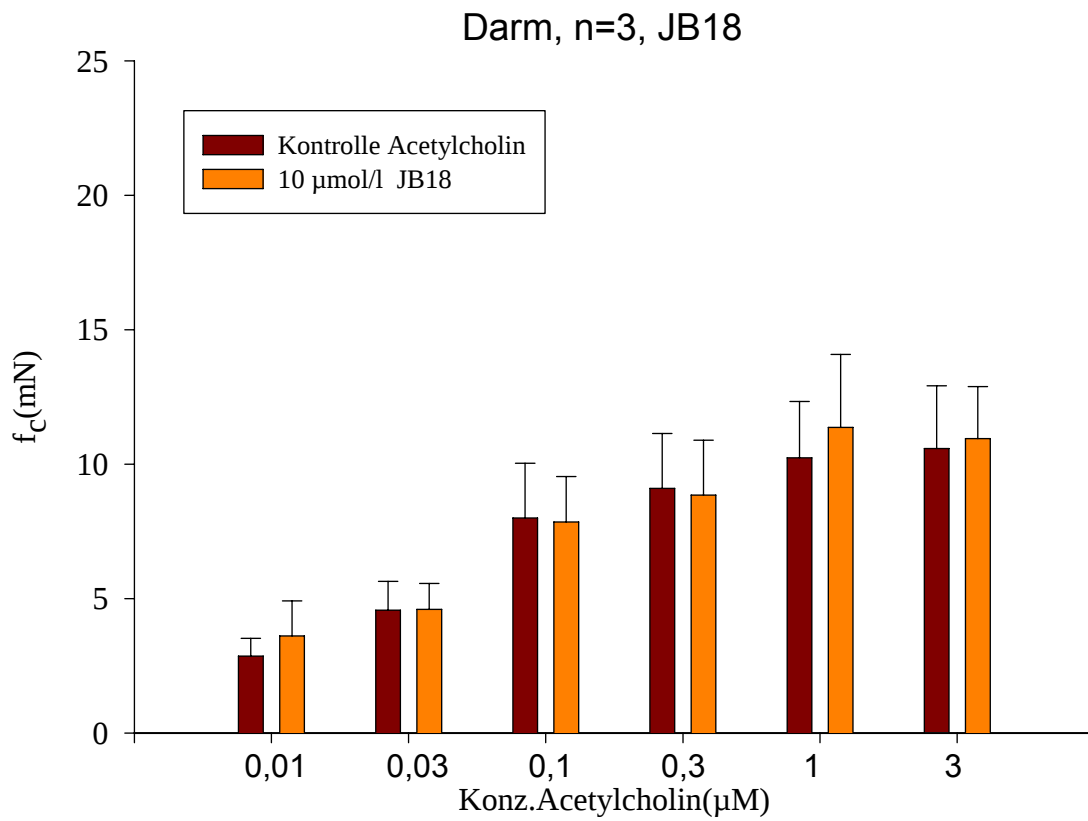
Legende zu den Tabellen 17, 19 und 21

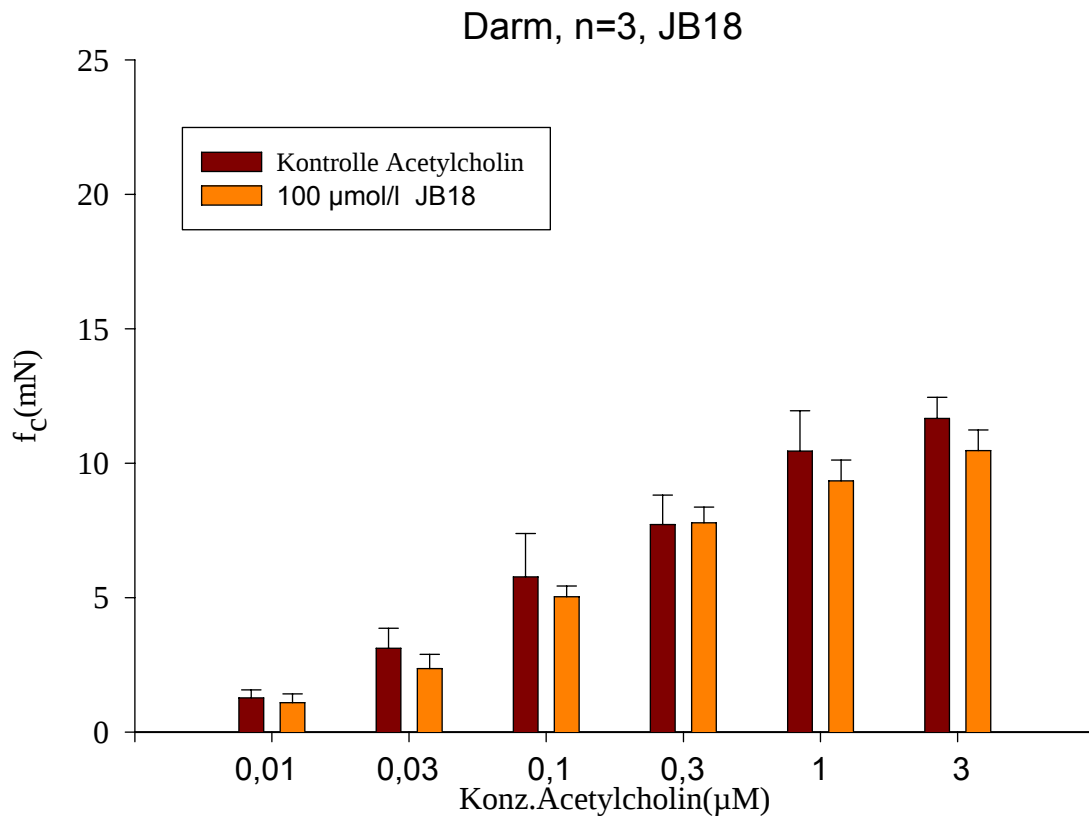
Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus drei Kontrollversuchen mit 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholinhydrochlorid.

Legende zu den Tabellen 18, 20 und 22

Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Acetylcholinhydrochlorid in Kombination mit JB 18 in den Konzentrationen 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$.

Abbildung 20 Graphische Darstellung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ in Kombination mit JB 18 (in den Konzentrationen 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.

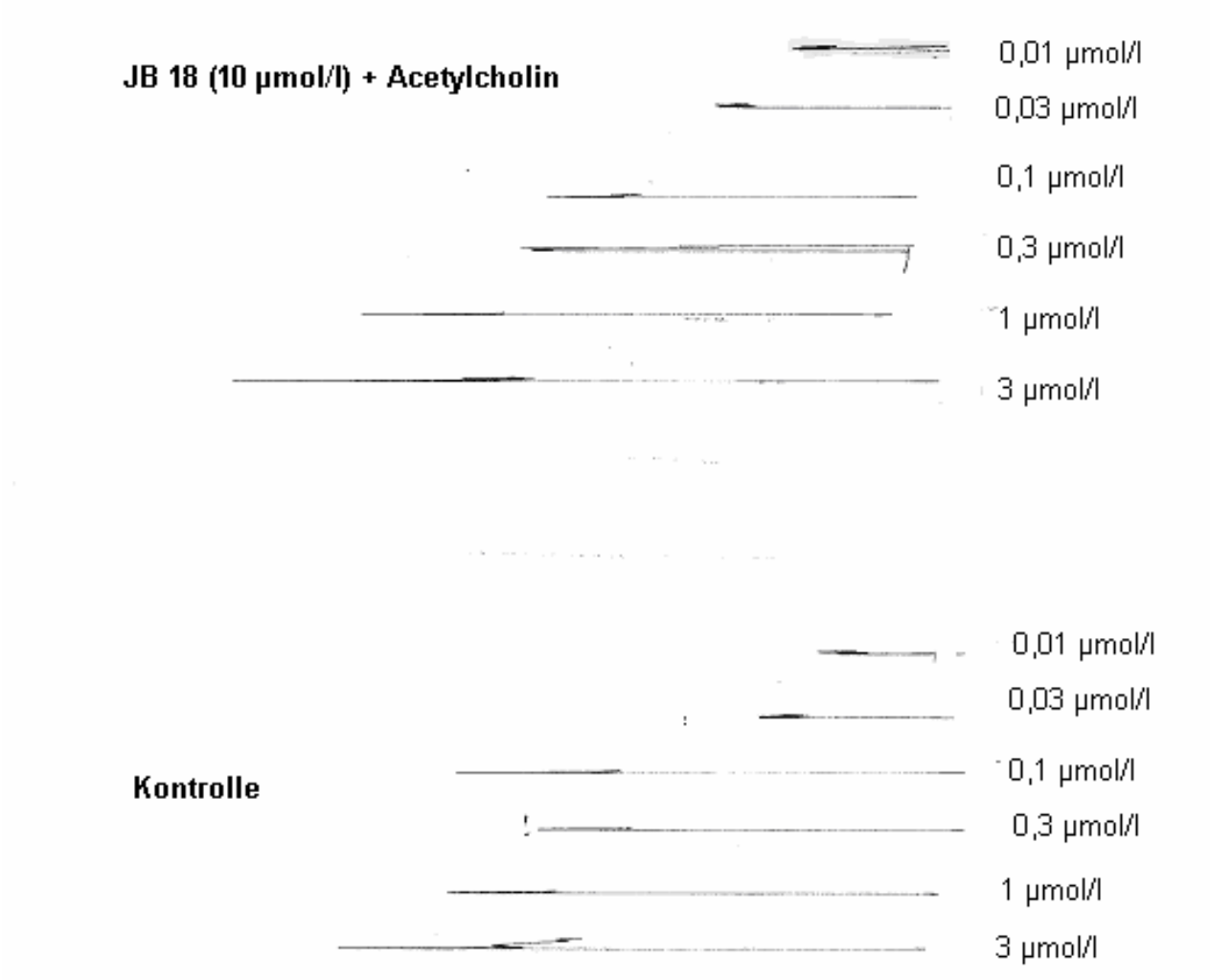


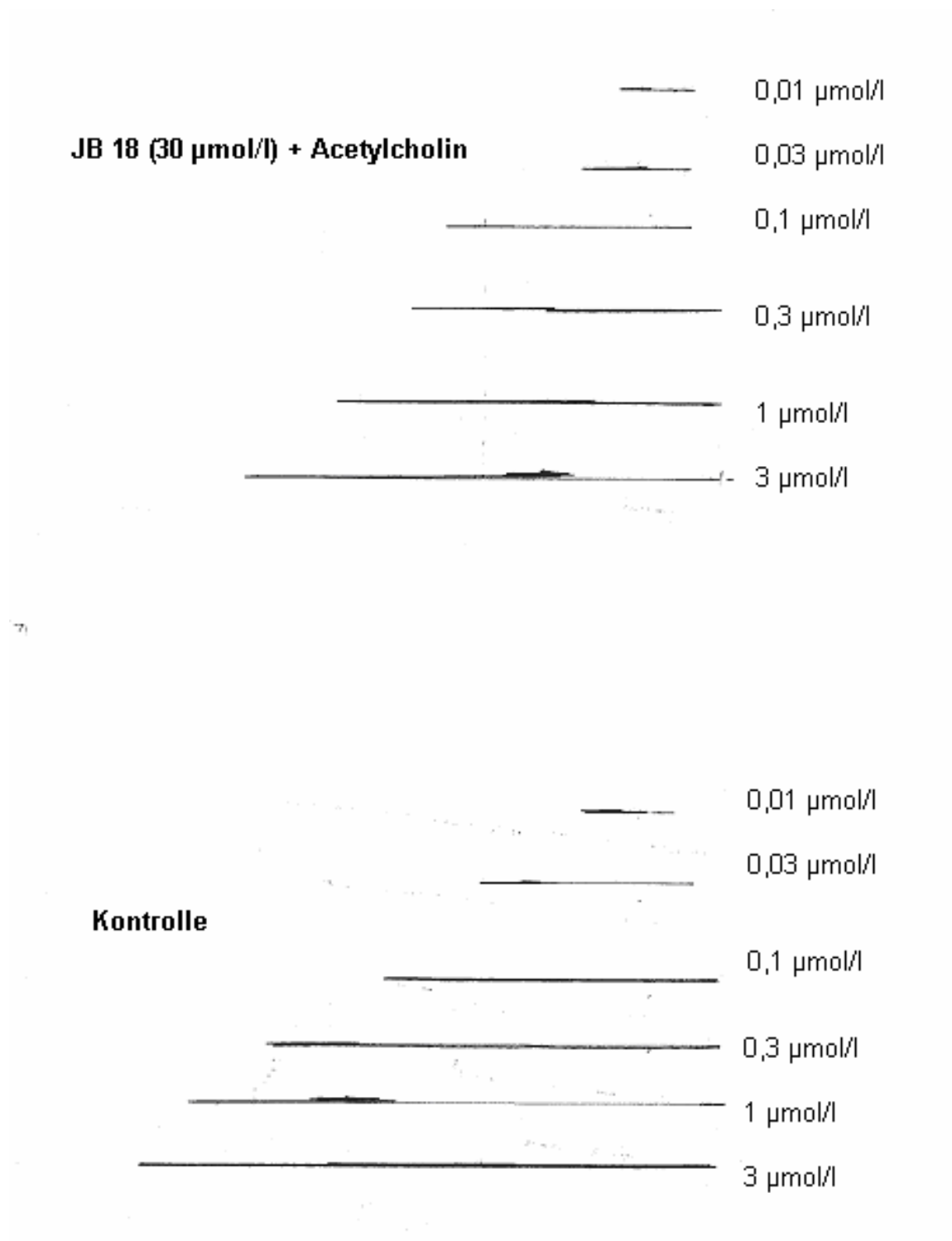


Legende zu Abbildung 20:

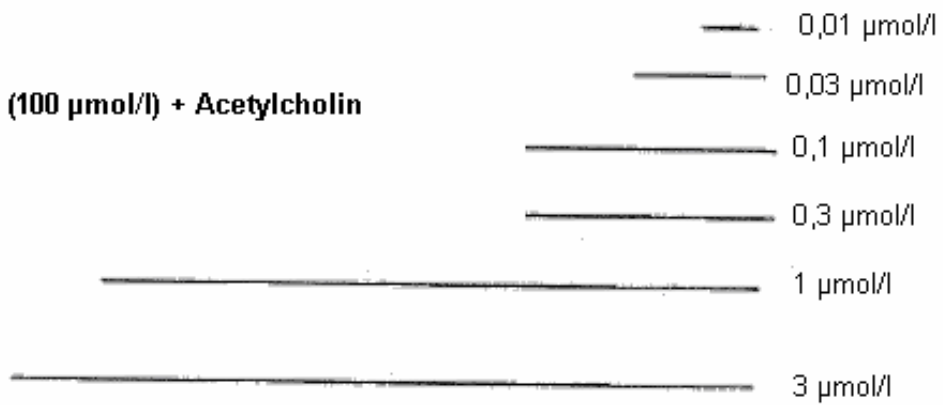
Auf die Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN aufgetragen auf die Abszisse die Konzentrationen von Acetylcholinhydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen wurde als Balken dargestellt, ihre Standardfehler als strichförmige Verlängerungen.

Abbildung 21 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 in Kombination mit Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

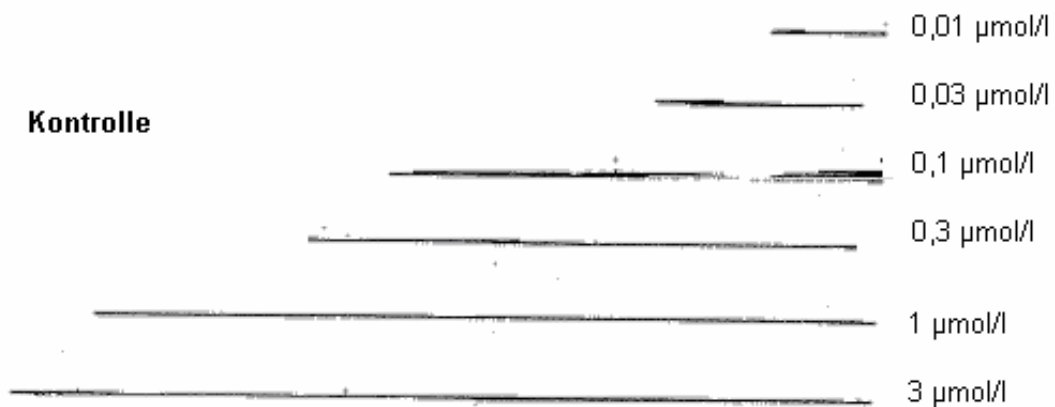




JB 18 (100 $\mu\text{mol/l}$) + Acetylcholin



Kontrolle



Legende zu Abbildung 21:

Kontrolle von Acetylcholinhydrochlorid

Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid bei 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

1cm = 0.98 nM

4.7 Wirkung von JB 18 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums unter Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid

Die Wirkung von JB 18 wurde, wie im Kapitel 3.7.2 beschrieben, auch in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid analysiert. Die Testsubstanz wurde in 3 Konzentrationen (10, 30 und 100 µmol/l) getestet und von Phenylephrinhydrochlorid wurden 5 Lösungen hergestellt (10, 3, 1, 0,3, 0,1 µmol/l).

Tabelle 23 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf terminale Ileä Kontrolle 10 µmol / l

JB 18 (µmol/l) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,1	0,68±0,39	3
0,3	0,95±0,38	3
1	1,86±0,84	3
3	2,96±1,49	3
10	4,95±2,52	3

Tabelle 24 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Phenylephrin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,1	0,26 $\pm$ 0,12	3	n.s.
0,3	0,43 $\pm$ 0,17	3	n.s.
1	0,85 $\pm$ 0,46	3	n.s.
3	1,52 $\pm$ 0,67	3	n.s.
10	3,17 $\pm$ 1,73	3	n.s.

Tabelle 25 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf terminale Ileä Kontrolle 30 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,1	3,07 $\pm$ 0,34	3
0,3	4,16 $\pm$ 0,52	3
1	6,04 $\pm$ 0,2	3
3	7,84 $\pm$ 0,28	3
10	9,15 $\pm$ 0,63	3

Tabelle 26 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB 18

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) & Phenylephrin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,1	1,25 $\pm$ 0,57	3	n.s.
0,3	1,73 $\pm$ 0,64	3	n.s.
1	2,55 $\pm$ 0,63	3	n.s.
3	5,32 $\pm$ 1,05	3	n.s.
10	7,71 $\pm$ 1,29	3	n.s.

Tabelle 27 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf terminale Ilea Kontrolle 100 $\mu\text{mol/l}$

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
0,1	3,46 $\pm$ 1,21	3
0,3	4,11 $\pm$ 1,09	3
1	4,45 $\pm$ 0,98	3
3	7,61 $\pm$ 0,62	3
10	9,63 $\pm$ 1,42	3

Tabelle 28 Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums mit 30 µmol / l JB 18

JB 18 (µmol/l) & Phenylephrin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,1	0,58±0,29	3	0,05
0,3	1,11±0,53	3	0,05
1	1,22±0,27	3	0,05
3	2,81±0,75	3	0,05
10	4,25±1,18	3	0,05

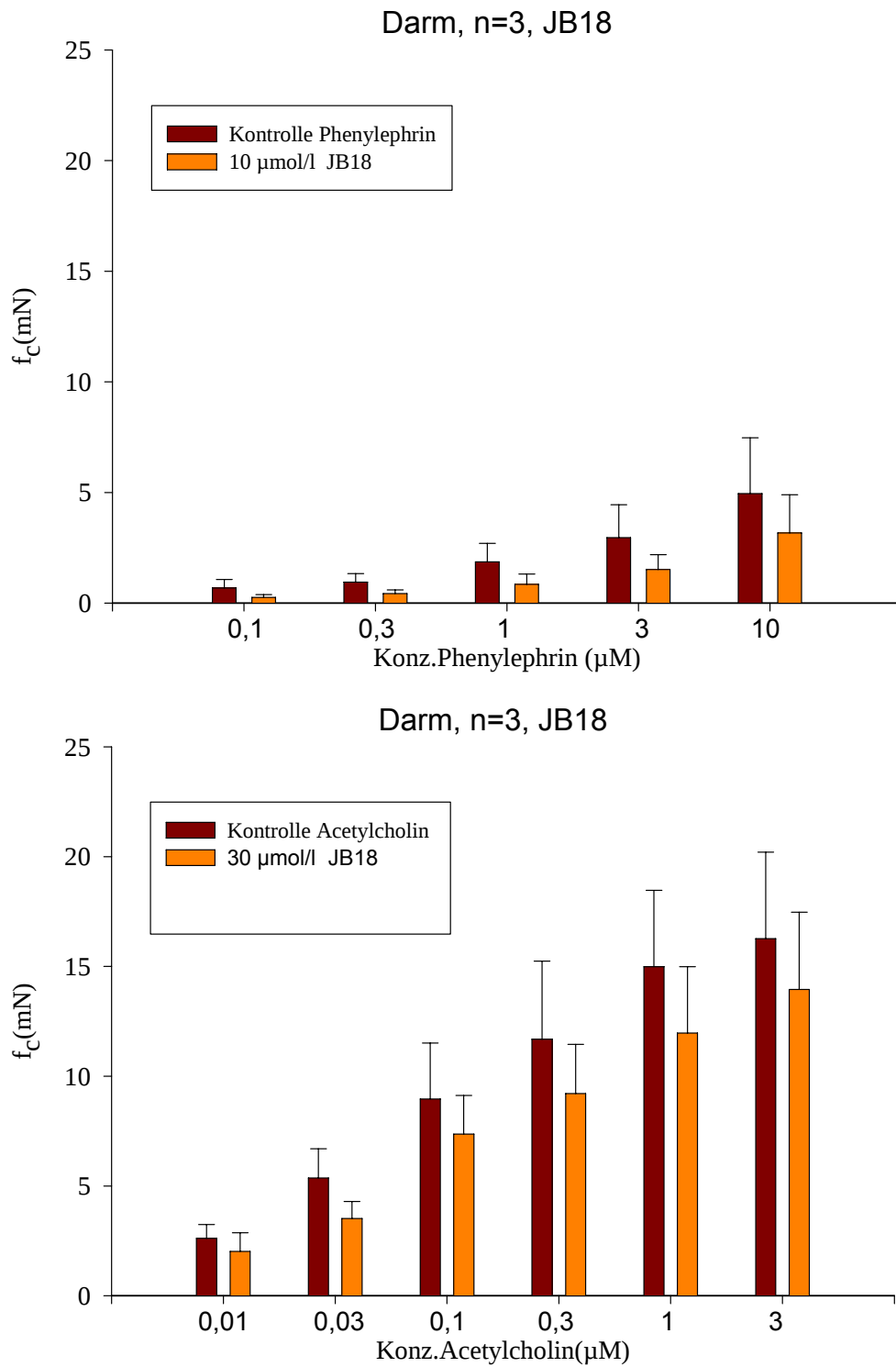
Legende zu den Tabellen 23, 25 und 27

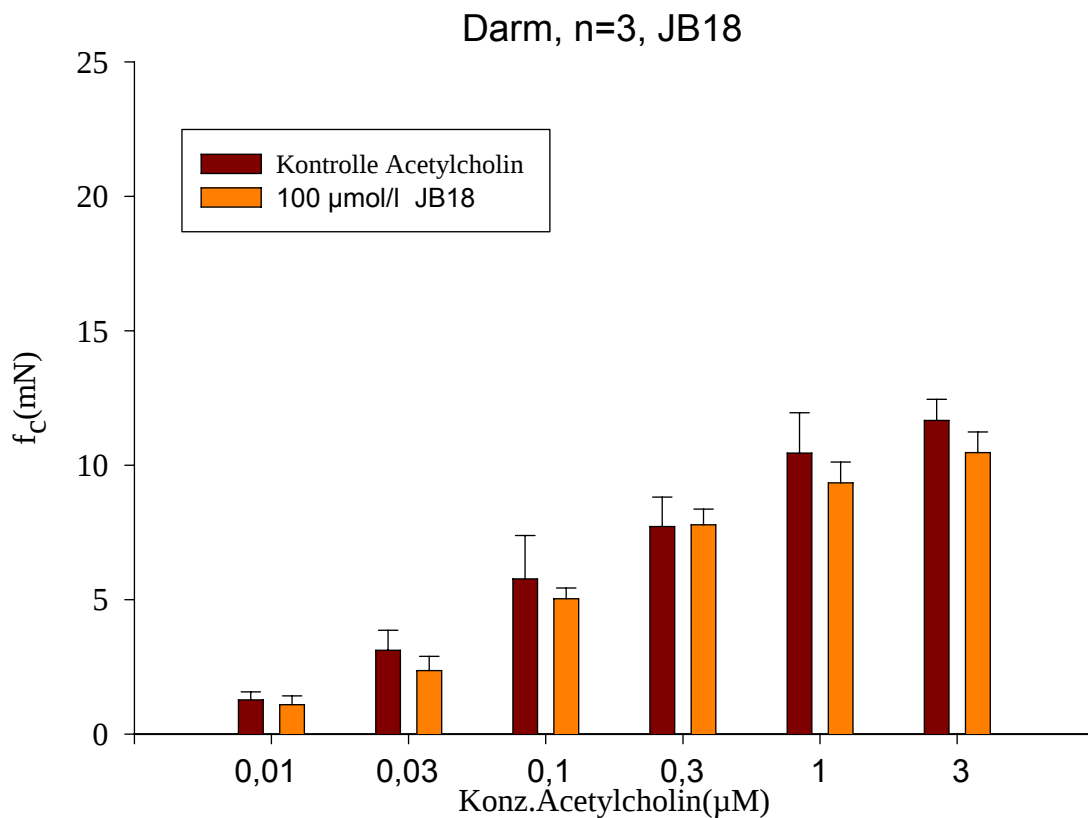
Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus drei Kontrollversuchen mit 10, 30 und 100 µmol/l Phenylephrinhydrochlorid.

Legende zu den Tabellen 24, 26 und 28

Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) aus den Versuchen mit Phenylephrinhydrochlorid in Kombination mit JB 18 in den Konzentrationen 10, 30 und 100 µmol / l.

Abbildung 22 Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid in den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ in Kombination mit JB 18 (in den Konzentrationen 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.

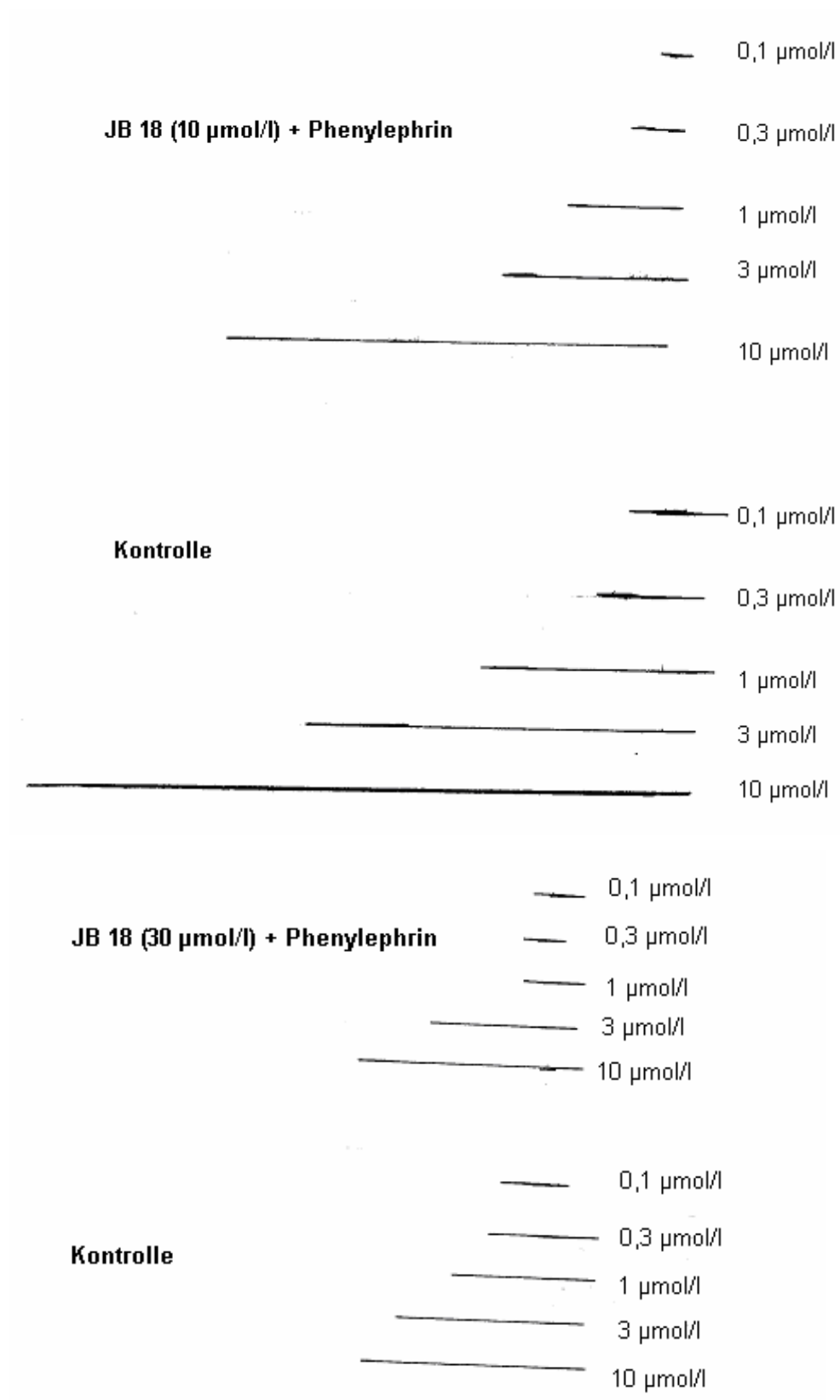


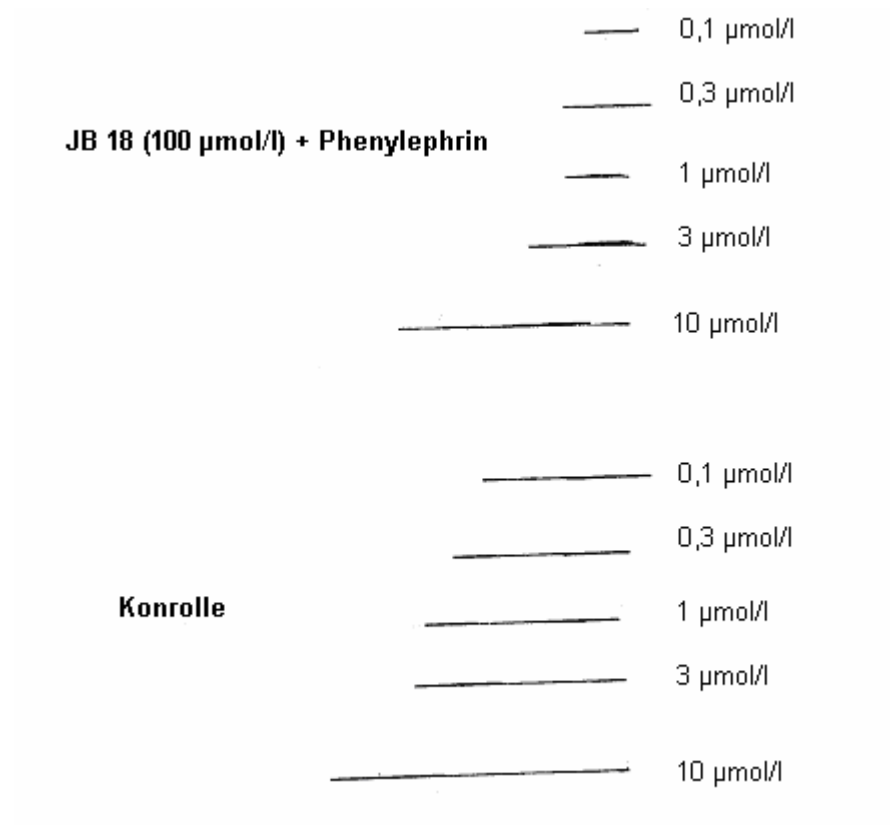


Legende zu Abbildung 22:

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

Abbildung 23 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums





Legende zu Abbildung 23:

Kontrolle von Phenylephrinhydrochlorid

Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid bei 10, 30 und 100 µmol/l JB 18

Die Einwirkzeit betrug jeweils 30 Sekunden.

1cm = 0.98 nM

4.7 Untersuchung der Testsubstanz JB 18 auf die Kontraktionskraft des Uterus unter dem Einfluss von Histamindihydrochlorid

Um die Wirkung auf die Kontraktionskraft des Uterus zu testen, wurde JB 18 in Konzentrationen von 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Der Agonist Histamindihydrochlorid wurde in den Konzentrationen 1, 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ injiziert, wobei jede Konzentration drei mal vermessen wurde.

Tabelle 29 Wirkung von JB 18 auf den Uterus in Gegenwart von Histamindihydrochlorid-Kontrolle

JB 18 ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche
1	21,16 $\pm$ 6,8	3
3	13,75 $\pm$ 3,56	3
10	8,11 $\pm$ 3,68	3

Legende zu Tabelle 29:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM), die bei den Kontrollen mit Histamindihydrochlorid ermittelt wurden.

Tabelle 30 Wirkung von JB 18 (30 µmol/l) auf den Uterus in Gegenwart von Histamindihydrochlorid

JB 18 (µmol/l) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
1	3,24±2,43	3	n.s.
3	10,69±12,13	3	n.s.
10	19,47±10,22	3	n.s.

Tabelle 31 Wirkung von JB 18 (100 µmol/l) auf den Uterus in Gegenwart von Histamindihydrochlorid

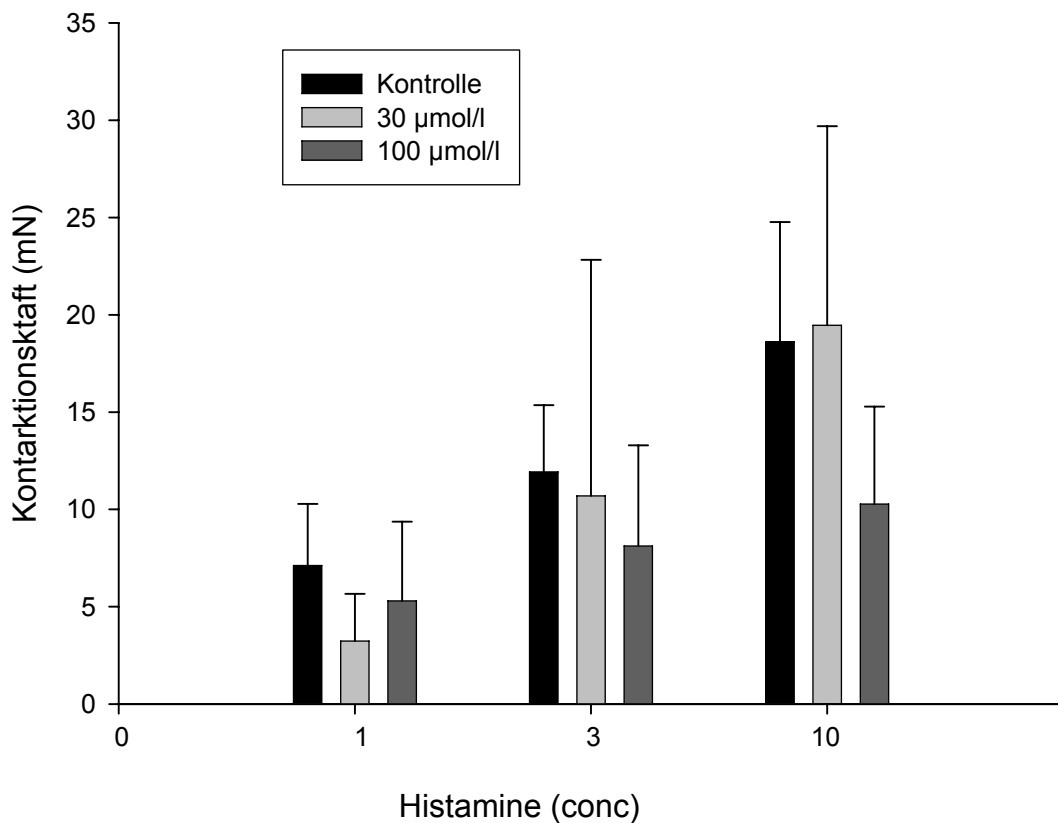
JB 18 (µmol/l) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
1	5,3±4,07	3	n.s.
3	8,13±5,16	3	n.s.
10	10,28±5,01	3	n.s.

Legende zu den Tabellen 30 und 31:

Die Tabellen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (SEM) aus den Versuchen mit Histamindihydrochlorid.

Abbildung 24 Graphische Darstellung der Wirkung von Histamindihydrochlorid in den Konzentrationen 1, 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kombination mit JB 18 (in den Konzentrationen 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft des Uterus

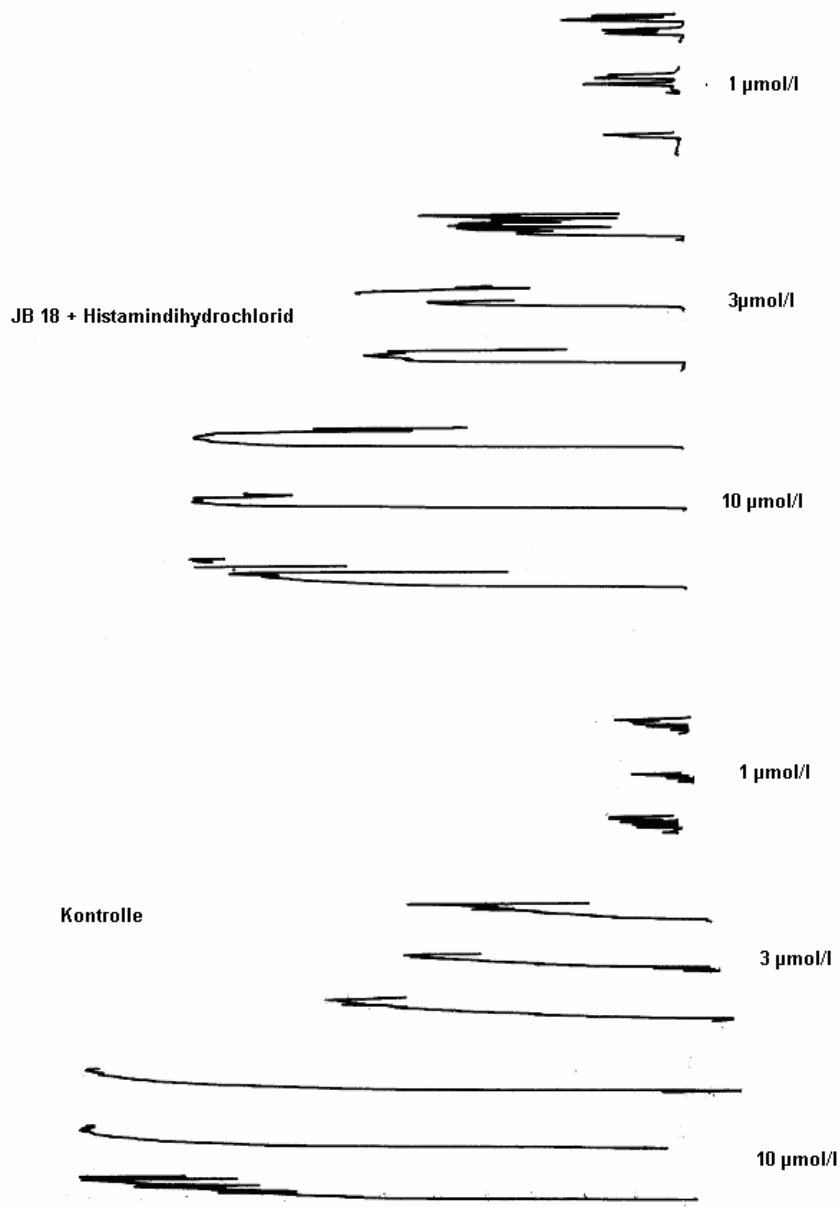
Uterus, JB 18



Legende zu Abbildung 24:

Die Abszisse trägt die Konzentration von Histamindihydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$, auf die Ordinate wurde die Kontraktionskraft in mN aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte wurden im Diagramm als Balken dargestellt, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen.

Abbildung 25 Originalaufzeichnung der Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft des Uterus



Legende zu Abbildung 25:

Die Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers. JB 18 wurde in einer Konzentration von 10 bzw. 30 $\mu\text{mol} / \text{l}$ injiziert, Histamindihydrochlorid in einer Konzentration von 1, 3 und 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$. Die Einwirkdauer betrug ca. 3 bis max. 4 Minuten.

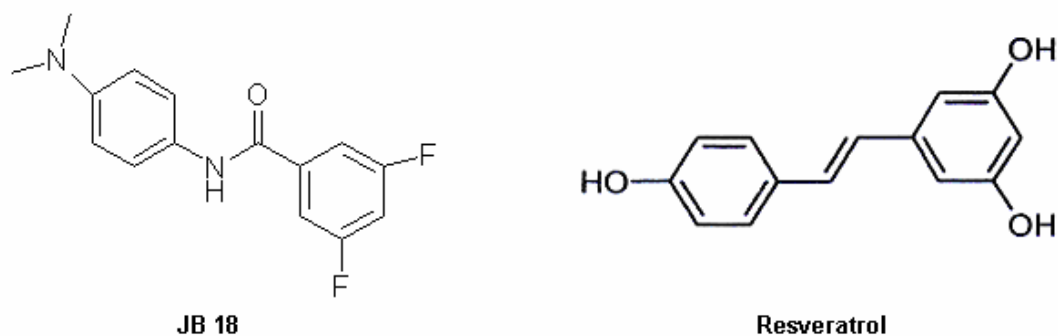
5. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung der Substanz JB 18 n folgenden isolierten Organen des Meerschweinchens getestet: rechter Vorhof, Papillarmuskel, terminales Ileum, Aorta und Arteria pulmonalis. Die Testsubstanz JB 18 wurde den Organen in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt (siehe Kapitel 3). Anschließend wurde die Wirkung von JB 18 n Kombination mit den Agonisten Histamindihydrochlorid, Acetylcholin und Phenylephrinhydrochlorid untersucht, wobei Acetylcholin und Phenylephrin am terminalen Ileum getestet wurde, Histamin an Ileum und Uterus.

Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem bereits gut erforschten Naturstoff Resveratrol verglichen.

5.1 Strukturvergleich der Testsubstanz JB 18 mit Resveratrol

Abbildung 26 Strukturvergleich von JB 18 mit Resveratrol



Bei Resveratrol handelt es sich um ein Stilbenderivat, das in den Positionen 3, 5 und 4' drei Hydroxylgruppen trägt, und einer transständigen Doppelbindung in einer Ethylenbrücke.

Bei JB 18 N-(4-Dimethylaminphenyl)-3,5-difluorbenzamid hingegen ist keine Stilbenstruktur vorhanden. Die Doppelbindung ist durch eine Aminogruppe und einen Sauerstoff ersetzt.

Des Weiteren hat JB 18 anstelle der Hydroxylgruppe des einen Phenylrings Eine Di-Methyl-Amino Gruppe.

Der andere Phenylring ist anstelle zweier Hydroxylgruppen mit zwei Fluoratomen substituiert.

5.2 Untersuchung der glatten Muskulatur

5.2.1 Untersuchung des terminalen Ileums

Die Testsubstanz JB 18 wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ am terminalen Ileum getestet und bewirkte eine Relaxation der glatten Muskulatur. Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erwies sich die Abnahme als signifikant.

Die EC_{50} wurde bei 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Bei Resveratrol wurde die EC_{50} bei 46,4 $\mu\text{mol/l}$ erreicht (Lötsch 2004).

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

Wu et al (2004) führte in China eine Untersuchung durch, in der Resveratrol in Kombination mit 5 Fluoruracil (= 5FU) bei Leberkrebs getestet wurde. Denn seit der Einführung von 5 FU hat sich die Prognose bei Leberkrebs zwar stark verbessert, Tatsache aber ist, dass auch bei 5 FU schwere Nebenwirkungen auftreten können. Für die Versuchsdurchführung wurde Resveratrol in DMSO gelöst, und die Mäuse wurden, nachdem ihnen Krebszellen implantiert wurden, in fünf verschiedene Gruppen aufgeteilt. Den Mäusen wurden zehn Tage lang einmal täglich Resveratrol injiziert, wobei die Dosis kontinuierlich gesteigert wurde. Am Ende der Versuchsreihe ergab sich, dass sowohl bei der Resveratrol-Gruppe, als auch bei der 5 FU-Gruppe der Lebertumor deutlich geschrumpft war, bei der Resveratrol-Gruppe jedoch die starken Nebenwirkungen ausblieben.

5.2.2 Untersuchung der Arteria pulmonalis

JB 18 bewirkte eine Relaxation der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis, die bei 10 $\mu\text{mol/l}$ signifikant wurde.

Es konnte keine EC_{50} erreicht werden.

Resveratrol zeigte eine Relaxation, die bei 100 $\mu\text{mol/l}$ statistisch signifikant wurde. Bei 126 $\mu\text{mol/l}$ wurde die EC_{50} erreicht (Lötsch 2004).

5.2.3 Untersuchung an der Aorta

Bei den Versuchen an der isolierten Aorta zeigte sich bei Einwirkung von JB 18 eine konzentrationsabhängige Relaxation der glatten Muskulatur.

Ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ begann die Kontraktionskraft langsam und ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ signifikant zu sinken.

Die EC_{50} lag bei 75 $\mu\text{mol/l}$.

Resveratrol hingegen wurde in den selben Konzentrationen getestet und bewirkte eine konzentrationsabhängige Relaxation der glatten Muskulatur, die sich ab einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ als statistisch signifikant erwies. Die EC_{50} wurde bei 145 $\mu\text{mol/l}$ erreicht (Lötsch 2004).

Tabelle 32 Wirkung von Resveratrol und JB 18 auf die glatte Muskulatur

Präparat	Resveratrol EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	JB18 EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	145	75
Arteria pulmonalis	126	--
Terminales Ileum	46,4	30

5.2.4 Untersuchung am rechten Vorhof

Die Untersuchung am Vorhof zeigte bei JB 18 in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, und 100 $\mu\text{mol/l}$ keine signifikante Wirkung auf die Schlagfrequenz.

Bei Resveratrol ergab sich zunächst eine leichte Zunahme der Kontraktion die dann ab einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ ebenso stark abzufallen begann, und bei 300 $\mu\text{mol/l}$ nur mehr 18 % des Kontrollwertes ausmachte (Lötsch 2004).

5.2.5 Untersuchung am Papillarmuskel

Bei der Auswertung der Ergebnisse von JB 18 auf elektrisch stimulierte Papillarmuskelpräparate zeigte sich eine schwach positiv inotrope Wirkung bis 100 $\mu\text{mol/l}$, ab einer Konzentration 300 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante positiv inotrope Wirkung.

Tabelle 33 Wirkung von Resveratrol und JB 18 auf die Herzmuskulatur

Präparat	Resveratrol EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	JB18 EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Papillarmuskel	--	174
Vorhof	--	--

5.3 Wirkung der Testsubstanz JB 18 in Kombination mit den Agonisten

5.3.1 Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid auf den Uterus

Histamindihydrochlorid wurde am Uterus in den Konzentrationen 1, 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ getestet.

JB 18 zeigte in Konzentrationen 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ keine signifikante Wirkung auf die Histam-induzierten Kontraktionen.

5.3.2 Wirkung von JB 18 in Kombination mit Histamindihydrochlorid, Acetylcholin und Phenylephrinhydrochlorid auf das terminale Ileum

Eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ JB 18 führte zu einer schwach antihisaminergen Wirkung.

In allen untersuchten Konzentrationen konnte bei JB 18 kein Effekt auf muskarinische Rezeptoren festgestellt werden, jedoch 100 $\mu\text{mol/l}$ JB 18 zeigte eine α -blockierende Wirkung.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es eine am Department für Medizinische Chemie neu synthetisierte, von Resveratrol abgeleitete Substanz hinsichtlich ihrer Wirkung an isolierten Organen des Meerschweinchens zu untersuchen. Sie wurde an der glatten Muskulatur der Aorta, Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums, als auch an der quergestreiften Muskulatur des rechten Vorhofs und des Papillarmuskels getestet.

Bei den Versuchen am rechten Vorhof konnte keine signifikante Wirkung festgestellt werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse von JB 18 auf elektrisch stimulierte Papillarmuskelpräparate zeigte sich eine schwach positiv inotrope Wirkung bis 100 $\mu\text{mol/l}$, ab einer Konzentration 300 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante positiv inotrope Wirkung.

Bei den Versuchen an der isolierten Aorta begann die Kontraktionskraft ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ langsam und ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ signifikant zu sinken.

Auch bei den Versuchsreihen am terminalen Ileum ergab sich eine Relaxation der glatten Muskulatur. Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erwies sich die Abnahme als signifikant.

Im weiteren Verlauf der Diplomarbeit wurde die Wirkung von JB 18 in Gegenwart mit den Agonisten Histamin, Phenylephrin und Acetylcholin untersucht, wobei Histamin sowohl am terminalen Ileum als auch am Uterus untersucht wurde, die anderen Agonisten nur am terminalen Ileum.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die spasmolytische und die vasodilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Aorta etwas stärker ausgeprägt ist als die des Resveratrols.

Auch die positiv inotropen Effekte auf den Papillarmuskels übertrafen die des Resveratrols, wobei EC_{50} bei 174 $\mu\text{mol/l}$ lag.

7. Literaturverzeichnis

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

Chen CK und Pace-Asciak CR (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Gen Pharmacol 27:363-366

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

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet 341:1103-110

Gehm BD, Mc. Andrews JM, Chien PY, Jameson JL, (1991) Resveratrol a polyphenolic compound found in grapes and wine is an agonist for the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 94: 14138

Lötsch V (2004) Diplomarbeit: Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivats (STPAR29A) auf verschiedene isolierte Präparate ovn Meerschweinchen. 47; 51; 55; 58; 62

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

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

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

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

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

8. Curriculum vitae

Name: Wolfgang Richter

Geburtsdatum: 12.06.1975

Geburtsort: Wien

Wohnort: Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

1981-1984 Volksschule

1984-1994 Gymnasium

seit 1996 Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien
Studium der Pharmazie