

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening von zwei neu synthetisierten, heterozyklischen Verbindungen (WHGMS174, SWS5) an isolierten Präparaten von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Maria Huber
Matrikel-Nummer:	0302409
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 449 Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Wien, April 2009

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik ganz herzlich bedanken für seine fachliche und außerordentlich freundliche Betreuung. Zu wissen, dass ich mich jederzeit mit meinen Fragen und Problemstellungen an ihn wenden konnte, und diese kompetent und rasch beantwortet wurden, hat mir die Arbeit sehr erleichtert und angenehmer gemacht.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Vorgängern Viktoria Windisch und Felix Lerch für die fachkundige Einführung im Labor und die nette Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich weiters bei Gerda Brunhofer und Walter Granig für das zur Verfügung stellen der Testsubstanzen.

Ganz besonders möchte ich mich schließlich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung während der gesamten Studienzeit bedanken. Sie haben mir dieses Studium nicht nur durch ihre finanzielle Hilfe ermöglicht, sie hatten auch immer ein offenes Ohr sowie tröstende und aufmunternde Worte für mich bereit, wenn das Studium stressig war.

Auch bei meinen Geschwistern möchte ich mich bedanken, dass sie meine Launen, die ich vor allem kurz vor Prüfungen hatte, geduldig und nicht nachtragend hingenommen haben.

Außerdem danke ich meinem Freund, der mich während des ganzen Studiums liebevoll unterstützt hat. Ich danke ihm dafür, dass er viel Verständnis, vor allem während der recht harten und zeitintensiven Prüfungsvorbereitungen, für mich aufgebracht hat.

Und natürlich möchte ich mich für die Hilfe bei so einigen computerbedingten Problemen, welche im Zuge dieser Diplomarbeit entstanden sind, bei meinem Freund und meinem Bruder bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Vasopressin.....	1
1.1.1 Vasopressinrezeptoren	1
1.1.2 Vasopressinanaloga	2
1.2 Schwefelwasserstoff (H ₂ S)	3
1.2.1 K _{ATP} -Kanal	4
1.2.1.1 Vorkommen und Aufbau	4
1.2.1.2 Agonisten und Antagonisten und deren Indikation	4
2. ZIELSETZUNG.....	5
3. MATERIAL UND METHODEN.....	6
3.1 Versuchstiere	6
3.2 Entnahme und Präparation der Organe.....	6
3.2.1 Atrium cordis dextrum	7
3.2.2 Musculus papillaris.....	7
3.2.3 Arteria pulmonalis	7
3.2.4 Ileum	8
3.2.5 Aorta	9
3.3 Physiologische Nährlösung	10
3.4 Versuchsanordnung	11
3.4.1 Versuchsassparatur A	12
3.4.2 Versuchsassparatur B.....	14
3.4.3 Kraftwandler.....	15
3.4.4 Amplifier und Schreiber.....	16
3.4.5 Begasung	16
3.4.6 Wasserbad.....	16
3.5 Versuchsabläufe	17
3.5.1 Versuchsablauf an der Aorta	17
3.5.2 Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis	18
3.5.3 Versuchsablauf am terminalen Ileum.....	18
3.5.4 Versuchsablauf am rechten Vorhof	19
3.5.5 Versuchsablauf am Papillarmuskel	20
3.6 Testsubstanzen	21
3.6.1 Testsubstanz WHGMS174	21
3.6.2 Testsubstanz SWS5.....	22
3.7 Auswertung und Statistik	23
3.7.1 Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum.....	23
3.7.2 Rechter Vorhof	23

3.7.3 Papillarmuskel	24
3.7.4 Statistik	24
4. ERGEBNISSE	25
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz WHGMS174	26
4.1.1 Vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz WHGMS174 an der isolierten Aorta	26
4.1.2 Vasodilatierende Wirkung von WHGMS174 an der isolierten Arteria pulmonalis	29
4.1.3 Spasmolytische Wirkung von WHGMS174 am isolierten terminalen Ileum	32
4.1.4 Wirkung von WHGMS174 auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium cordis dextrum	35
4.1.5 Wirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraft des isolierten Musculus papillaris	38
4.1.6 Auswirkung des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die isolierten Organe von Meerschweinchen	42
4.2. Ergebnisse der Testsubstanz SWS5	45
4.2.1 Vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz SWS5 an der isolierten Aorta	45
4.2.2 Vasodilatierende Wirkung von SWS5 an der isolierten Arteria pulmonalis	48
4.2.3 Spasmolytische Wirkung von SWS5 am isolierten terminalen Ileum	51
4.2.4 Wirkung von SWS5 auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium cordis dextrum	54
4.2.5 Wirkung von SWS5 auf die Kontraktionskraft des isolierten Musculus papillaris	57
5. DISKUSSION	60
5.1 Einfluss von WHGMS174 auf die isolierten Organe von Meerschweinchen	60
5.1.1 Wirkung von WHGMS174 auf glattmuskuläre Organe	60
5.1.1.1 Wirkung von WHGMS174 auf die Aorta	61
5.1.1.2 Wirkung von WHGMS174 auf die Arteria pulmonalis	61
5.1.1.3 Wirkung von WHGMS174 auf das terminale Ileum	61
5.1.2 Wirkung von WHGMS174 auf die Herzmuskulatur	62
5.1.2.1 Wirkung von WHGMS174 auf den rechten Vorhof	62
5.1.2.2 Wirkung von WHGMS174 auf den Papillarmuskel	62
5.2 Vergleich von WHGMS174 und anderen Thienothiazinen	63
5.3 Einfluss von SWS5 auf die isolierten Organe von Meerschweinchen	66
5.3.1 Wirkung von SWS5 auf glattmuskuläre Organe	66
5.3.1.1 Wirkung von SWS5 auf die Aorta	66
5.3.1.2 Wirkung von SWS5 auf die Arteria pulmonalis	66
5.3.1.3 Wirkung von SWS5 auf das terminale Ileum	67
5.3.2 Wirkung von SWS5 auf die Herzmuskulatur	68
5.3.2.1 Wirkung von SWS5 auf den rechten Vorhof	68
5.3.2.2 Wirkung von SWS5 auf den Papillarmuskel	68

5.4 Vergleich H ₂ S und SWS5	69
6. ZUSAMMENFASSUNG	71
7. LITERATURVERZEICHNIS	72

1. EINLEITUNG

1.1 Vasopressin

Vasopressin ist ein Peptidhormon welches vom Hypophysenhinterlappen gebildet und direkt in den Blutkreislauf abgegeben wird.

Die Synonyme ADH (Antidiuretisches Hormon) und Adiuretin beziehen sich auf die physiologische Aufgabe von Vasopressin und zwar die Harnkonzentrierung in der Niere zu fördern. Die Bezeichnung Vasopressin beruht auf der Eigenschaft in höheren Konzentrationen glatte Muskeln zu kontrahieren. Dadurch kommt es zu einem Blutdruckanstieg, zur Steigerung der Darmperistaltik und zu einer Erhöhung des Tonus in den Gallen- und Harnwegen. (Mutschler et al. 2001)

Es wurde nachgewiesen, dass Vasopressin eine Rolle bei pathophysiologischen Zuständen wie kongestiver Herzinsuffizienz, Leberzirrhose und renalen Erkrankungen spielt (Mah and Hofbauer 1987, Laszlo et al. 1991, Naitoh et al. 1994, Thibonnier et al. 2002).

Es konnte aufgezeigt werden, dass nicht peptidische Vasopressinantagonisten fähig sind den Wasserhaushalt, die Osmolarität und die Hämodynamik von Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz zu verbessern (Thibonnier 2003). Dieser neue therapeutische Ansatz brachte die Forscher dazu nicht peptidische Vasopressin Rezeptorantagonisten zu entwickeln. Diese hätten den Vorteil, dass man sie oral geben könnte.

Führende Moleküle unter den ersten nicht peptidischen Vasopressinantagonisten sind OPC-21268 (ein Tetrahydroquinolon Derivat) ein selektiver V_{1A} Antagonist (Yamamura et al. 1991) und OPC-31260 (ein Benzazepin Derivat) ein selektiver V_2 Antagonist (Yamamura et al. 1992).

1.1.1 Vasopressinrezeptoren

Bei Vasopressinrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Bis jetzt konnten vier Vasopressinrezeptorsubtypen V_{1A} , V_{1B} , V_2 und V_3 identifiziert werden (Birnbaumer et al. 1992, Lolait et al. 1992, Morel et al. 1992, De Keyzer et al. 1994, Sugimoto et al. 1994, Thibonnier et al. 1994).

V_{1A} Rezeptorsubtypen befinden sich zum Beispiel in vaskulären glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Hepatozyten und Thrombozyten. Dies wurde durch Radioligandbindende Experimente ermittelt (Thibonnier and Roberts 1985, Phillips et al. 1990, Howl et al. 1991, Serradeil-Le Gal et al. 1995). V_{1B} Rezeptorsubtypen wurden im Hypophysenvorderlappen, in den B-Zellen des Pankreas und der adrenalen Medulla nachgewiesen (Jard et al. 1986, Lee et al. 1995; Grazzini et al. 1996). V_2 Rezeptorsubtypen befinden sich in der Leber (Guillon et al. 1982, Jans et al. 1989).

Der antidiuretische Effekt wird über V_2 Rezeptoren vermittelt, zur vasokonstriktorischen Wirkung kommt es erst bei höheren Konzentrationen von Vasopressin durch die Stimulierung von V_1 Rezeptoren. Dieser Effekt beruht auf einer Stimulierung der Phospholipase C und einer Erhöhung des intrazellulären freien Calciums. (Forth et al. 2001)

1.1.2 Vasopressinanaloga

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurde Adiuretin (Argipressin; Pitressin®) vor allem als Antidiuretikum bei Diabetes insipidus sowie infolge des vasokonstriktorischen Effekts bei Ösophagusvarizenblutungen angewandt. (Mutschler et al. 2001)

Da Vasopressin eine Halbwertszeit von nur ca. 1 Minute aufweist, kam es zur Entwicklung von Vasopressinanaloga. Außerdem konnten durch gezielte Modifikationen an bestimmten Positionen des Moleküls die Partialwirkungen dissoziiert werden. (Forth et al. 2001)

Tabelle 1: Vasopressinanaloga mit ihren Indikationen und Dosierungen
laut Austria Codex

INN	Handels- name	Rezeptor- Selektivität	Indikation	Applikations- art	Dosis
Terlipressin	Glycylpres- sin®	V ₁	Ösophagus- varizen	i.v.	20 µg/kg KG
Desmopressin	Minirin®	V ₂	Diabetes insipidus, Enuresis nocturna, Nykturie, Hämophilie A	oral sublingual nasal i.v., i.m., s.c.	0,1-0,4mg/d 120-720 µg/d 10-20 µg/d 1-4µg/d
	Nocutil®		Enuresis nocturna, Diabetes insipidus	oral nasal	0,1-0,4mg /d 10-20µg/d
	Octostim®		Hämophilie A	nasal i.v., s.c.	300µg 0,3-0,4µg/kg KG

1.2 Schwefelwasserstoff (H₂S)

Schwefelwasserstoff wird normalerweise als toxisches Gas betrachtet. Es wird aber auch endogen durch den Cysteinmetabolismus gebildet.

In Anlehnung an andere endogene Gasmoleküle wie Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid (Wang et al. 1997a,b) wurde die Hypothese aufgestellt, dass Schwefelwasserstoff eine physiologische Rolle bei der Regulation des kardiovaskulären Systems eine Rolle spielt.

Hosoki et al. (1997) zeigte auf, dass H₂S Aortapräparate von Ratten in vitro relaxiert. Zhao et al. (2001) konnte nachweisen, dass H₂S ein endogener vasorelaxierender Faktor ist, welcher K_{ATP}-Kanäle aktiviert und es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials bei vaskulären glatten Muskelzellen kommt.

1.2.1 K_{ATP}-Kanal

1.2.1.1 Vorkommen und Aufbau

ATP-sensitive K⁺-Kanäle wurden zuerst im Herzen nachgewiesen. Sie befinden sich jedoch noch in vielen anderen Geweben und Zelltypen wie in den B-Zellen des Pankreas, im Gehirn, im Skelett, in glatten Muskelzellen und in der Leber (Seino und Miki 2003).

Der K_{ATP}-Kanal ist ein Heterooctamer, welches aus 2 Subeinheiten besteht. Und zwar aus der porenbildenden Untereinheit Kir6.x (Kir6.1 oder Kir6.2) und der regulierenden Untereinheit dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR (SUR1 oder SUR2) (Seino und Miki 2003).

1.2.1.2 Agonisten und Antagonisten und deren Indikation

Gesteuert wird dieser K_{ATP}-Kanal - wie der Name schon sagt - durch Adenosintriphosphat (ATP), indem er bei ATP-Anstieg geschlossen wird. Dieser Mechanismus spielt vor allem bei der Insulinfreisetzung eine Rolle.

Exogene Substanzen wie Sulfonylharnstoffe hemmen ebenfalls K_{ATP}-Kanäle vor allem in den B-Zellen des Pankreas und werden somit zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II eingesetzt.

Weitere Wirkstoffe wie Minoxidil und Diazoxid steigern die Öffnungswahrscheinlichkeit ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Sie bewirken dadurch eine Zunahme des Membran-Ruhepotentials (Hyperpolarisation) und als Folge davon einen verringerten Einstrom von Calciumionen durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Die auf diese Weise verringerte intrazelluläre Calciumionen-Konzentration führt vor allem in Arteriolen zur Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur und damit zur Blutdrucksenkung.

Indiziert ist Minoxidil oral bei Hochdruckpatienten, bei denen andere Antihypertonika, auch in Kombinationen, nicht ausreichend wirksam sind. Diazoxid wird ebenfalls bei therapieresistenten Hochdruckformen eingesetzt und bei hypertonen Blutdruckkrisen (Mutschler et al. 2001).

2. ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von den Substanzen WHGMS174 und SWS5, welche an der Universität Wien am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie synthetisiert wurden, an isolierten Meerschweinchenorganen untersucht.

Um die Wirkung auf glattmuskuläre Organe aufzuzeigen, wurden die Versuche an der isolierten Aorta, der isolierten Arteria pulmonalis und am isolierten terminalen Ileum durchgeführt und um den Einfluss auf die Herzmuskulatur zu untersuchen wurden weitere Versuche am isolierten rechten Vorhof sowie am isolierten Papillarmuskel gemacht.

Um die folgenden Experimente erfolgreich durchführen zu können, war es notwendig die exakten Präpariertechniken der entsprechenden Organe sowie die korrekte Handhabung der benötigten Versuchsaapparaturen zu erlernen.

Ziel dieser Diplomarbeit war es nun herauszufinden, ob die Testsubstanzen einen Einfluss auf die Kontraktionskraftabnahme glattmuskulärer Organpräparate haben und, ob sie negativ oder positiv chronotrope bzw. inotrope Wirkungen am rechten Vorhof bzw. am Papillarmuskel hervorrufen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Zur Feststellung der Wirkung von den Testsubstanzen WHGMS174 und SWS5 auf die glatte Muskulatur und die Herzmuskulatur wurde als Versuchstier das Meerschweinchen gewählt, da sich dieses besonders gut eignet, weil es sich in der Charakteristik der Ionenkanäle vom Menschen wenig unterscheidet. Die Versuche wurden an wenigen Wochen alten männlichen und weiblichen Meerschweinchen mit einem Gewicht von 300 bis 600 g durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus dem Department für Toxikologie und Labortierzucht in Dobra Voda (Universität in Bratislava).

Die Meerschweinchen wurden am Versuchstag durch einen gezielten Genickschlag getötet, wodurch ein schneller und schmerzfreier Tod garantiert werden konnte. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet, zuerst wurde das Herz entnommen, danach das Ileum und zuletzt wurde die Aorta herauspräpariert. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu garantieren, wurden die Organe gleich nach der Entnahme, während der Lagerung bis zur endgültigen Präparation und auch natürlich während der Versuche mit einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ (Oxymix) angereichert.

3.2 Entnahme und Präparation der Organe

Die Untersuchungen wurden an der isolierten Aorta, an der Arteria pulmonalis, am terminalen Ileum, am rechten Vorhof und am Papillarmuskel durchgeführt und somit war es nötig diese fünf Organe zu isolieren und zu präparieren.

Abbildung 1: Sezierbesteck



3.2.1 Atrium cordis dextrum

Nach der Tötung des Meerschweinchens wurde der Bauchraum geöffnet und zuerst das Herz entnommen. Das Herz wurde unter dem Mikroskop von den umliegenden Teilen des Bindegewebes und der Lunge befreit und dann an der Spitze und an der Basis mit Präpariernadeln am Korkboden der Petrischale befestigt. Auch hier ist es wichtig, dass die Nährlösung in der Petrischale mit dem Gasgemisch versorgt wird. Die beiden Vorhöfe wurden von den Herzkammern getrennt. Da sich der für die folgenden Versuche benötigte Sinusknoten im rechten Vorhof befindet, wurden an den Enden vom rechten Vorhof Silberdrahthäkchen mittels Bindfaden befestigt. Wobei darauf zu achten ist, dass die Enden mittels jeweils andersfärbiger Fäden gekennzeichnet werden um ein korrektes Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen.

3.2.2 Musculus papillaris

Nachdem der rechte Vorhof abgetrennt worden war, wurde das Herz über die Aorta pulmonalis entlang des Septums aufgeschnitten, und somit die Öffnung der rechten Herzkammer ermöglicht, welche nach dem Auseinanderklappen mit Präpariernadeln am Korkboden der Petrischale fixiert wurde. Da die spontane Aktivität der Purkinje Fasern die Untersuchung stören könnten, wurden diese noch entfernt. Danach wurde am Ansatz jedes Muskels ein Silberdrahthaken mit Hilfe eines Bindfadens fixiert und der Muskel wurde sorgfältig herauspräpariert. Anschließend wurden die isolierten Papillarmuskeln in mit O₂/CO₂ Gemisch begaster Nährlösung aufbewahrt.

3.2.3 Arteria pulmonalis

Zur Isolierung der Arteria pulmonalis wurde das bereits in Nährlösung mit Oxymix begaste Herz herangezogen. Die Arteria pulmonalis wurde ganz nahe am Herzen abgetrennt. Im Gegensatz zur Aorta, von welcher rund 2 - 3 cm isoliert werden, ist die Arteria pulmonalis meist knapp 1 cm lang, da sie sich schon bald in eine rechte und linke Arterie aufgabelt. Das so erhaltene Stück Arteria pulmonalis wurde an den zwei Enden am Korkboden einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale mit zwei

Präpariernadeln befestigt und konnte so mit Hilfe einer Pinzette und einer Federschere von überschüssigem Fett- und Muskelgewebe befreit werden. Anschließend wurden 2 – 3 mm große Ringe herunter geschnitten, welche in begaster Nährlösung gehalten wurden bis sie in die jeweilige Apparatur eingespannt wurden.

3.2.4 Ileum

Nach der Entnahme des Herzens wurde jener Teil des Darms entnommen, der vor dem Caecum lag. Das rund 20 cm lange terminale Ileum wurde am jejunalen Ende markiert, indem ein Faden daran fest gemacht wurde. Da der Darm sehr empfindlich auf fehlenden Sauerstoff reagiert, wurde das Darmstück gleich nach der Entnahme aus dem toten Meerschweinchen in begaster Nährlösung aufbewahrt.

Für den Versuch wurde ein rund 2 cm langes Stück herunter geschnitten und mit Hilfe einer Pasteurpipette vom Darminhalt befreit. Danach wurde das Darmstück in der Petrischale, welche mit Kork ausgekleidet war, mittels einer Nadel befestigt. Hier ist zu beachten, dass die Nadel nicht zuviel vom Darmgewebe zerstört und wird somit soweit wie möglich am jeweiligen Ende am äußeren Rand befestigt. Sowohl am jejunalen als auch am caecalen Ende wurde ein Silberdrahthaken mit Hilfe eines Bindfadens festgebunden. Um die Befestigung am Korkboden zu erleichtern, ist es ratsam den Darm leicht schräg abzuschneiden, da er sich sehr leicht zusammenrollt. Damit beim Einspannen in die Apparatur klar ist, welches Ende das jejunale und welches das caecale ist, wird jeweils ein roter und ein schwarzer Faden verwendet. Außerdem ist es ganz wichtig, dass die beiden Öffnungen vorhanden bleiben oder nicht durch Chymus verstopft sind, um das Durchströmen der Substanz zu gewährleisten.

Abbildung 2: *Präparat vom terminalen Ileum*



3.2.5 Aorta

Nachdem der Bauchraum geöffnet wurde, das Herz und das terminale Ileum herausgenommen und in Tyrodelösung aufbewahrt wurden, konnte mit der Entnahme der Aorta begonnen werden. Hierfür war es nötig den Brustkorb noch weiter zu öffnen und die Lunge und das Zwerchfell zu entfernen. Danach konnte man die am Rückgrat angewachsene Aorta entfernen, indem man sie am oberen Ende durchtrennt, dieses Ende mit einer Pinzette leicht anhebt und dann die Aorta entlang des Rückgrats herunter schneidet. Dies muss jedoch ganz vorsichtig vor sich gehen, da die Aorta nicht durch die Schere verletzt werden darf und außerdem sollte eine zu starke Dehnung der Aorta vermieden werden, da es ansonsten zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse kommen kann.

Das nun isolierte 2 - 3 cm lange Aortenstück wurde in eine Petrischale, welche mit Korkboden ausgestattet war, überführt und mit dünnen Nadeln an beiden Enden befestigt. Mit Hilfe einer Pinzette und einer Federschere wurde die Aorta von anhaftenden Fett- und Muskelgewebe befreit. Danach konnte die Aorta in 2 - 3 mm dicke Ringe geschnitten werden, welche bis zur Verwendung in Tyrode-Lösung aufbewahrt wurden, wobei es wieder wichtig war, die Sauerstoffversorgung durch Oxymix zu gewährleisten.

Abbildung 3: *Präparate von der Aorta*



3.3 Physiologische Nährlösung

Die im Kapitel 3.2 angeführten Organe wurden gleich nach der Isolierung sowie während der Präparation, nach der Präparation und auch zu Beginn jeder Versuchsreihe in physiologischer Nährlösung (Tyrode) aufbewahrt.

Diese Nährlösung wurde nach Reiter (1967) hergestellt und entspricht einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Tabelle 2: Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g / 5 l	33,60	114,90
KCl	50,33 g / 5 l	35,00	4,73
NaHCO ₃	125,00 g / 5 l	83,70	24,90
MgSO ₄	147,02 g / 5 l	3,20	1,18
KH ₂ PO ₄	62,00 g / 250 ml	1,18	1,18
CaCl ₂	34 g / 250 ml	1,18	3,20
Glucose	Reinsubstanz	1,98	10,00

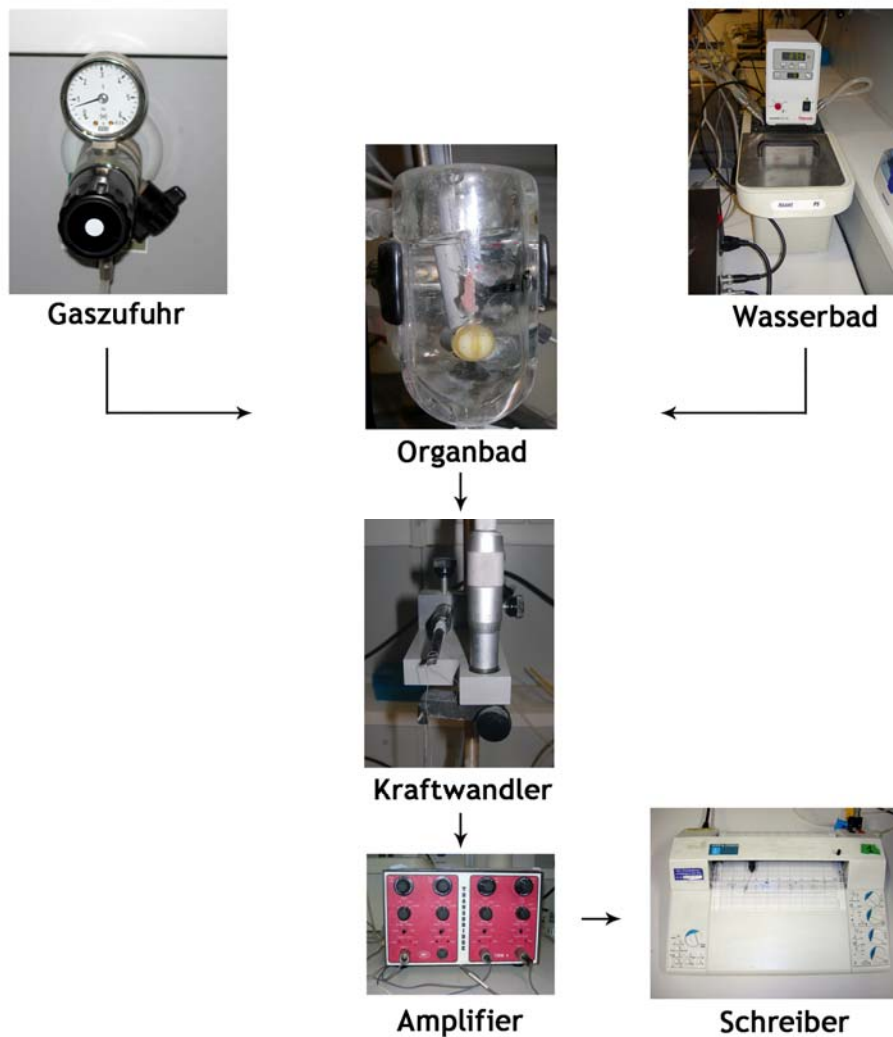
Die Tyrode wurde an jedem Versuchstag frisch zubereitet, indem zuerst die Lösungen von NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und KH₂PO₄ in einem 2 l Kolben vermischt wurden. Danach wurde die Glucose hinzu gegeben und mit destilliertem Wasser fast bis zum Flaschenhals aufgefüllt und gut geschüttelt bis die Glucose völlig gelöst war. Nun wurde dieser Kolben für rund 20 Minuten mit Oxymix (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Anschließend wurde tropfenweise die CaCl₂-Lösung hinzu pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass keine Trübung durch Bildung schwerlöslicher Calciumsalze auftrat. Zuletzt wurde die Tyrode mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Volumen von 2 l aufgefüllt.

3.4 Versuchsanordnung

Zur Untersuchung der Testsubstanz an den isolierten Organen von Meerschweinchen wurde der Papillarmuskel in der Apparatur A (siehe Abbildung 5) und die restlichen vier isolierten Organpräparate in der Apparatur B (siehe Abbildung 7) eingespannt. Durch den Kraftwandler wurde ein elektrisches Signal an den Amplifier weitergegeben, welcher dieses Signal verstärkte.

Mit Hilfe eines Schreibers erfolgte die Aufzeichnung der Versuchsergebnisse auf Millimeterpapier.

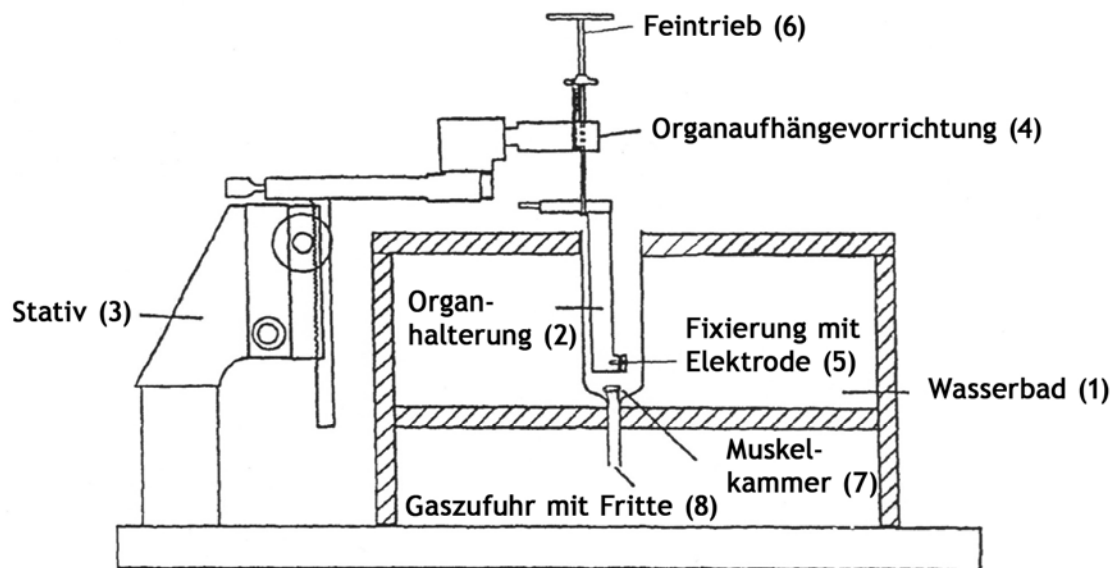
Abbildung 4: Überblick über die Versuchsanordnung



3.4.1 Versuchsapparatur A

Für die Untersuchungen am Papillarmuskel wurde die Versuchsapparatur A verwendet.

Abbildung 5: schematische Darstellung der Versuchsapparatur A

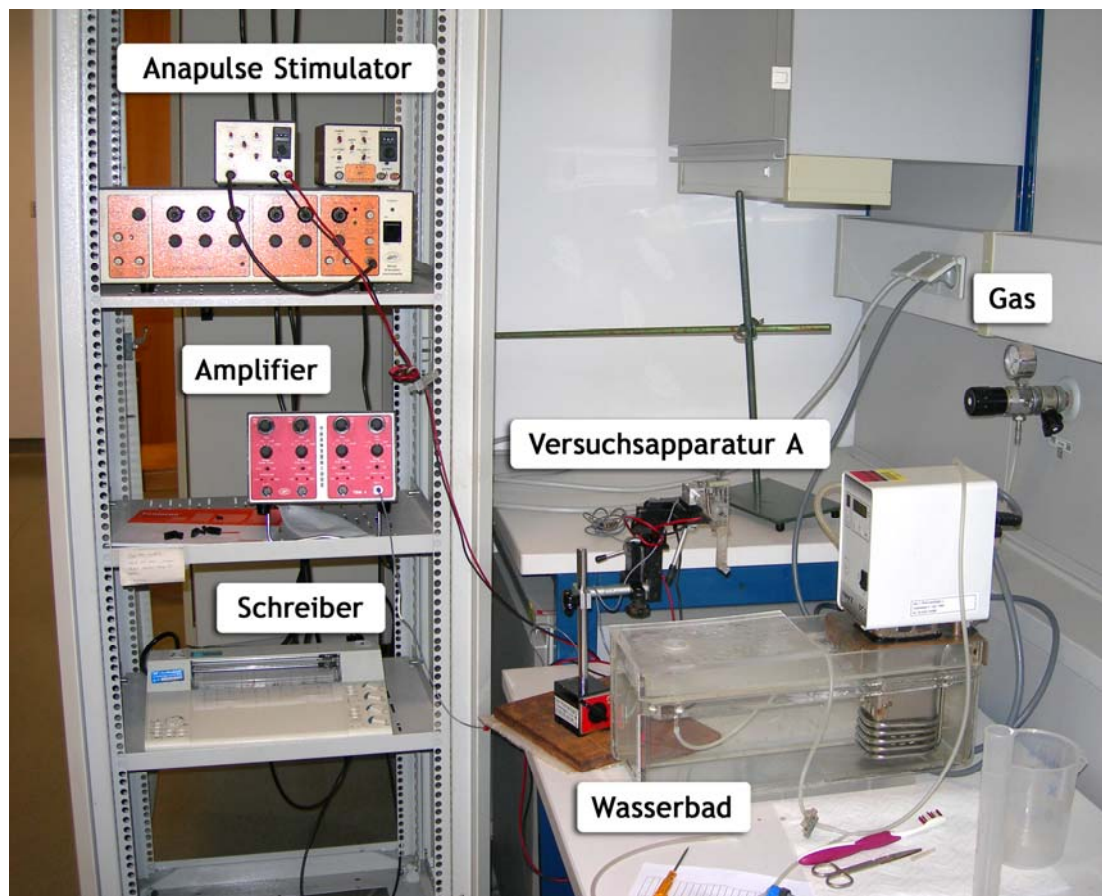


Die Muskelkammer (7), welche vom Wasserbad (1) umgeben ist, weist ein Volumen von 27 ml auf. Diese Kammer wurde mit 25 ml physiologischer Nährlösung befüllt und während der ganzen Dauer des Versuches von unten über eine Glasfritte (8) mit Oxymix begast. Die bereits mit Silberdrahthaken präparierten Papillarmuskeln wurden an der Aufhängevorrichtung am Silberdraht (2) befestigt. Der Draht stellt die Verbindung zum Kraftwandler dar, durch den die Kontraktionen der Organe in elektrische Impulse umgewandelt werden. Die jeweils freien Enden der Präparate wurden befestigt, indem sie zwischen zwei Plexiglasscheiben eingeklemmt wurden. Hier war es wichtig darauf zu achten, dass der Papillarmuskel die aus Silberchlorid bestehende Elektrode (5) berührte, durch welche der Papillarmuskel gereizt wurde. Und durch genau jene Elektrode unterscheidet sich die Versuchsapparatur A vor allem von der Versuchsapparatur B. Da der Papillarmuskel im Gegensatz zum

Vorhof elektrisch stimuliert werden muss kann der Versuch an Papillarmuskeln nur in dieser Versuchsanordnung durchgeführt werden.

Die Reizung erfolgte mittels eines Anapulse Stimulators (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA). Der somit eingespannte Papillarmuskel konnte mittels Stativschlitten (3) in die mit Nährlösung gefüllte Muskelkammer eingetaucht werden bis das Versuchsobjekt vollständig mit Tyrode umspült wurde.

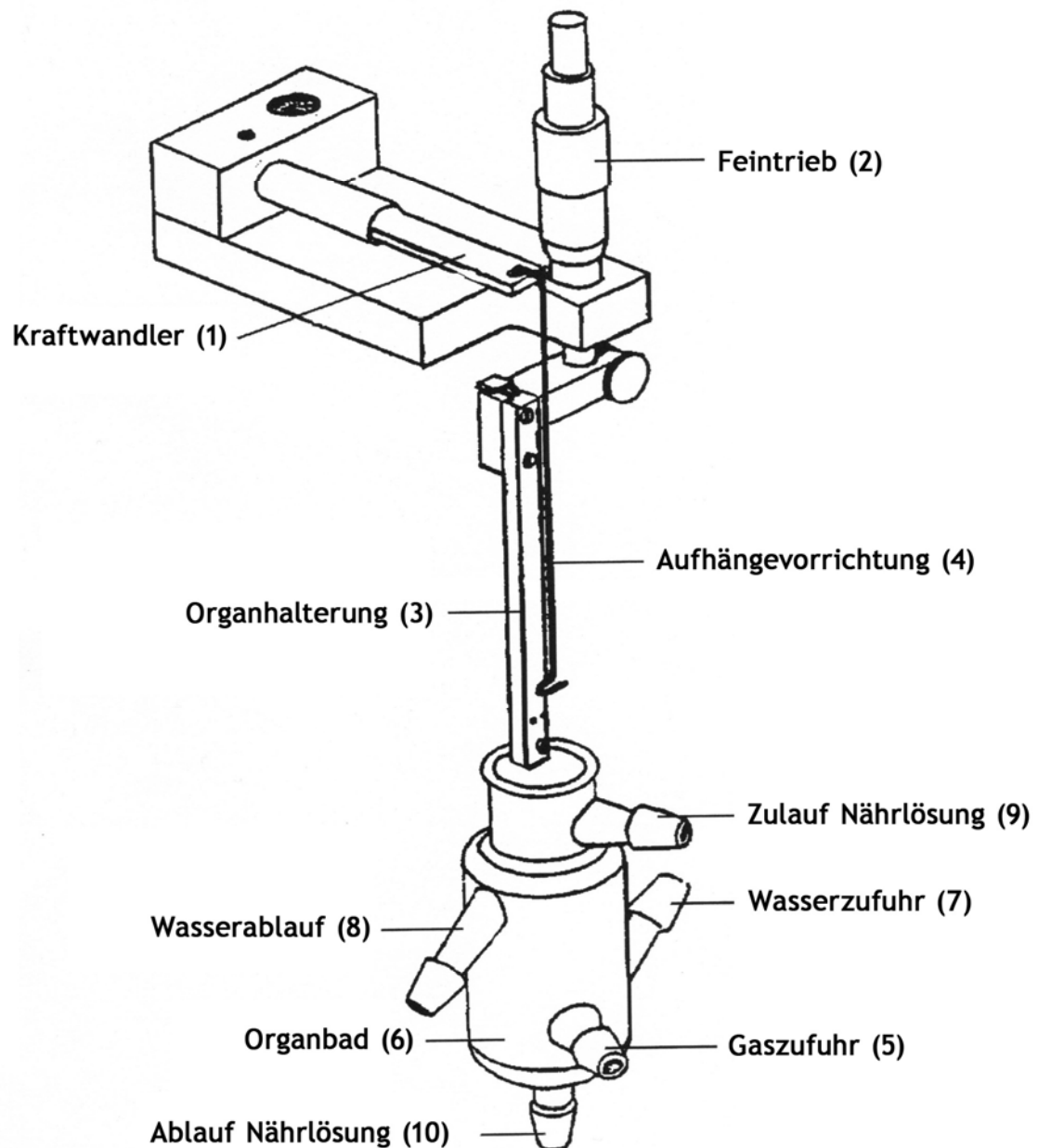
Abbildung 6: Originalabbildung der Versuchsanordnung A



3.4.2 Versuchsanordnung B

Mit Hilfe der Versuchsanordnung B wurden die Versuchsreihen an der Aorta, der Arteria pulmonalis, am terminalen Ileum und am rechten Vorhof durchgeführt. Diese Versuchsanordnung funktioniert nach einem sehr ähnlichen Prinzip wie die in Kapitel 3.4.1 beschriebene Apparatur A.

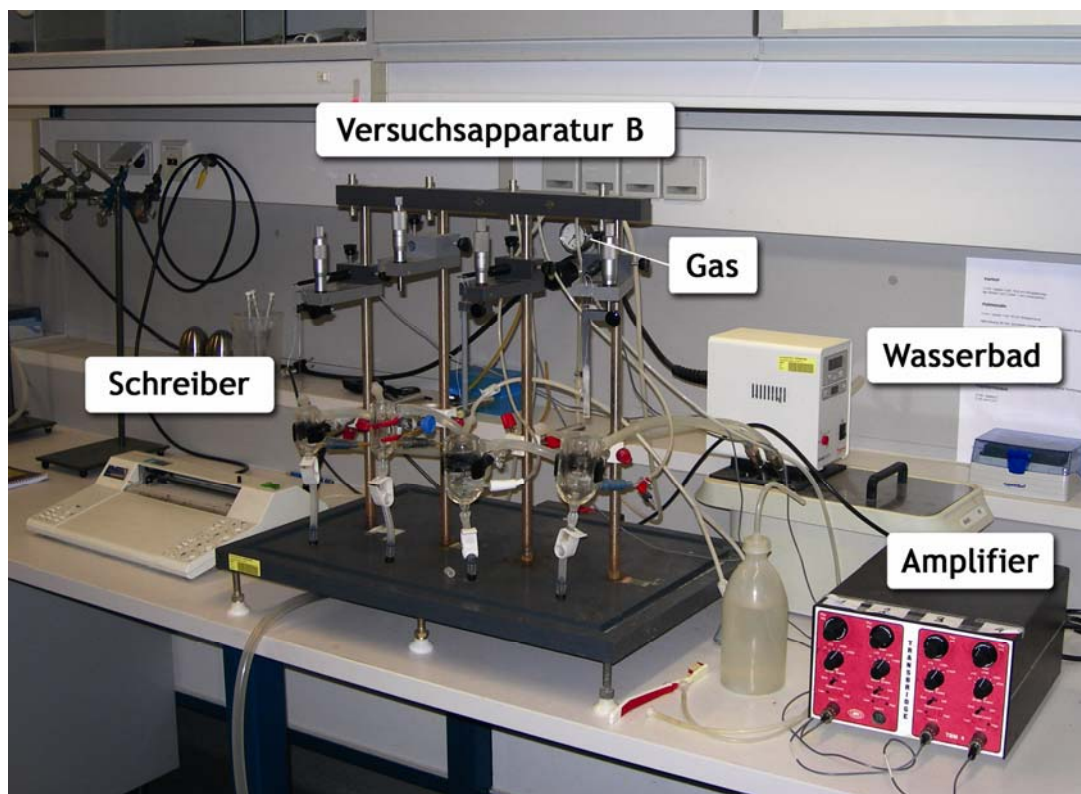
Abbildung 7: schematische Darstellung der Versuchsanordnung B



Das Organbad (6) wurde zu Beginn der Versuche mit Nährlösung befüllt. Die isolierten Organe werden entweder wie das terminale Ileum oder der rechte Vorhof mit den schon vorher befestigten Silberhaken an der Aufhängevorrichtung (4) eingehakt oder Präparate wie die Aorta und die Arteria pulmonalis werden direkt zwischen zwei Silberdrähten eingespannt.

Dies sollte so schnell wie möglich zu Stande kommen, da die Präparate so bald als möglich in die begaste Nährlösung hinunter gelassen werden sollten, da die Präparate somit mit der Gasmischung (5) versorgt werden.

Abbildung 8: *Originalabbildung der Versuchsanordnung B*



3.4.3 Kraftwandler

Der Kraftwandler (Transbridge™ der Firma World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) misst die mechanische Energie (Kontraktionskraft).

Über einen Wandler wird der mechanische Vorgang in eine elektrische Größe umgewandelt. Durch die Änderung der Dehnung kommt es zur Änderung des elektrischen Widerstandes im Dehnungsstreifen und damit zur proportionalen Änderung des Stromflusses.

3.4.4 Amplifier und Schreiber

Die Signale, welche durch Kontraktionen der isolierten Organe ausgelöst wurden, wurden über einen Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, WPI, FL, USA) zum Schreiber (Flatbed Recorder BD 112, Firma Kipp & Zonen, Holland) weitergeleitet und von diesem registriert.

3.4.5 Begasung

Während der gesamten Versuchsdauer wurde in die Muskelkammer der Apparatur A und auch in die Organbäder der Apparatur B über Schläuche, an deren Enden Glasfritten befestigt waren, ein Gasgemisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂ (Oxymix) eingeleitet.

Das Begasen war notwendig um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und um einen physiologischen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 sicher zu stellen. Außerdem wurde dadurch dafür gesorgt, dass eine gleichmäßige Verteilung der eingespritzten Substanz erfolgte.

3.4.6 Wasserbad

Während der Durchführung der Versuche war es wichtig die Temperatur konstant zu halten. Dies wurde durch die Verwendung von Wasserbädern und Thermostaten gewährleistet.

Um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen sollte das Wasserbad der Apparatur A zur Untersuchung der Papillarmuskelkontraktionskraft eine Temperatur von 35 ± 1 °C aufweisen und bei allen anderen Versuchen sollte die Temperatur auf 37 ± 1 °C konstant gehalten werden.

3.5 Versuchsabläufe

In diesem Kapitel wird auf die Durchführung der Versuche und die jeweiligen Versuchsbedingungen an den isolierten Organen näher eingegangen.

3.5.1 Versuchsablauf an der Aorta

Die ringförmigen Aortapräparate wurden in die Aufhängevorrichtung der Apparatur B eingespannt, wobei darauf zu achten ist, dass die Aorta nicht durch die Enden der Drähte beschädigt wird oder zu sehr gedehnt wird. Sobald das Präparat nun nicht allzu stark gespannt eingehängt wurde, wurde es in das Organbad hinuntergelassen. Dieses hatte schon die Versuchstemperatur von $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht und wurde schon längere Zeit begast.

Zunächst wurde der Schreiber eingeschalten und der Nullpunkt gestellt, danach wurde der Amplifier aufgedreht und mit jenem wieder der sich dadurch verstellte Nullpunkt am Schreiber nachjustiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Feintriebs das Organ vorgespannt bei 10 mV um 19,6 mN, der sich dadurch wieder verschobene Nullpunkt am Millimeterpapier wurde mit Hilfe des Amplifiers wieder nachgestellt.

Nun, nachdem die isolierte Aorta eingespannt und vorgespannt wurde, folgte eine zwanzig Minuten dauernde Anpassungszeit an die gegebenen Versuchsbedingungen. Etwaige Abweichungen vom Nullpunkt durch Veränderungen der Kontraktionskraft während dieser Zeit wurden mittels Feintrieb nachkorrigiert.

Nach erfolgter Anpassungszeit wurde die im Organbad befindliche Nährlösung durch eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt und die Aufzeichnung gestartet. Die KCl-Lösung wurde durch Lösen von 0,67 g KCl in 100 ml Nährlösung hergestellt. Die zugesetzte KCl-Lösung bewirkte eine gesteigerte Kontraktion der Aorta. Da sich die Aorta in den ersten Minuten sehr rasch kontrahiert, letztendlich aber mindestens eine dreiviertel Stunde beanspruchte um eine konstante Kontraktionskraft zu erreichen, ergab sich am Millimeterpapier eine Kurvenform.

Wurde dieses Plateau, welches mit 100 % definiert wurde, erreicht, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Die jeweilige Testsubstanz wurde nach dem in der Tabelle 4 angeführten Pipettierschema zugegeben.

Die Substanzzugabe erfolgte bei allen Präparaten mit Hilfe einer Kolbenhubpipette. Dabei war es wichtig, die Testsubstanz immer an derselben Stelle zu injizieren und außerdem musste darauf geachtet werden, dass die Präparate, sowie die Drähte oder der Kraftwandler nicht berührt wurden, da es ansonsten zu falschen Aufzeichnungen kommen kann.

3.5.2 Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Der Versuch an der Arteria pulmonalis entsprach jenem an der Aorta. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Vorspannung mittels Feintrieb 9,81 mN bei 5 mV betrug.

3.5.3 Versuchsablauf am terminalen Ileum

Das isolierte und präparierte Ileumstück wurde mit Hilfe der zwei daran befindlichen Silberdrahthaken an der Aufhängevorrichtung eingespannt. Dabei musste man darauf achten, dass das mit verschiedenen farbigen Fäden markierte jejunale Ende oben an der Apparatur befestigt wurde. Außerdem war es wiederum bedeutsam, den Darm nicht allzu sehr zu dehnen und somit hing er zunächst etwas lockerer in der Apparatur. Nun wurde das eingespannte Ileum ins begaste, temperierte Organbad hinunter gelassen.

Anschließend wurde wie schon in Kapitel 3.5.1 beschrieben der Schreiber und der Amplifier in Betrieb genommen und das Präparat auf 4,9 mN bei 5 mV vorgespannt. Danach kam es zu einer Gewöhnungsphase von mindestens 20 Minuten, wobei eventuell auftretende Abweichungen vom Nullpunkt mittels Stellschraube nachjustiert wurden.

Um den Effekt einer Zunahme der Kontraktionskraft zu erzielen wurde die Nährlösung abgelassen und eine 60 mmolare KCl-Lösung zugesetzt. Die KCl-Lösung wurde durch Lösen von 0,45 g KCl in 100 ml Nährlösung hergestellt. Der

Kurvenverlauf sieht hier etwas anders aus als bei der Aorta oder der Pulmonalis. Es kam nämlich zuerst zu einer in Sekunden schnellen auftretenden starken Kontraktion, welche aber genau so schnell wieder um nahezu ein Drittel abnahm. So pendelte sich der Darm zunächst stärker und dann immer langsamer ein, bis sich eine konstante Kontraktion einstellte.

Nach dem Erreichen des konstanten Plateaus wurde die Testsubstanz in den jeweiligen Konzentrationen in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten zugespritzt.

3.5.4 Versuchsablauf am rechten Vorhof

Zuerst wurde das mit zwei Silberdrahthaken versehene Präparat an der Aufhängevorrichtung nicht allzu gespannt eingehängt und in die Nährlösung gebracht.

Damit der eingespannte Vorhof nicht zu lange ohne Begasung und Nährlösung auskommen musste, wurde er dementsprechend schnell eingespannt.

Eine elektrische Reizung ist in dem Fall nicht notwendig, da er wie erwähnt spontan schlägt. Nachdem der Schreiber und der Amplifier wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben in Betrieb genommen wurden, wurde eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt.

Es folgte eine Gewöhnungsphase von 30 Minuten, in welcher schon mit der Aufzeichnung der Schlagfrequenz begonnen wurde. Im Gegensatz zu den Aufzeichnungen von der Aorta, der Arteria pulmonalis und dem Ileum wurde die Aufzeichnung nicht ständig durchgeführt, sondern es wurden alle 5 Minuten für 12 Sekunden die Schläge aufgezeichnet. Die Amplitude war hier nicht ausschlaggebend, es wurden die Schläge pro Minute ermittelt indem man die gezählten Schläge in 12 Sekunden mit 5 multiplizierte.

Nach dieser Kontrollphase wurde mit der Substanzzugabe nach dem Pipettierschema laut Tabelle 4 begonnen. Die Erhöhung der Konzentration von der Testsubstanz im Organbad erfolgte in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten.

Die Aufzeichnungen wurden wieder alle 5 Minuten für 12 Sekunden lang durchgeführt.

3.5.5 Versuchsablauf am Papillarmuskel

Der isolierte und präparierte Papillarmuskel wurde wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben in der Versuchsanordnung A fixiert. Danach konnte er in die mit Nährstofflösung befüllte und begaste Muskelkammer eingesenkt werden.

Der Schreiber und der Amplifier wurden gestartet und eine Vorspannung von 3,92 mN wurde mittels Feintrieb angelegt. Diese Spannung musste im Laufe des Versuches immer wieder nachgestellt werden, damit eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung verhindert wurde (Reiter 1967).

Da dem Papillarmuskel die spontan schlagenden Purkinjefasern entfernt wurden war eine elektrische Stimulation nötig. Diese elektrische Reizung wurde mit Hilfe des Reizgerätes Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) und über eine Silberchloridelektrode ermöglicht. Nachdem eine 10 Minuten dauernde Anpassungszeit erfolgte wurde das Präparat mit Rechteckimpulsen von 3 ms⁻¹ Länge bei einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Die Stromstärke lag etwa 10 % über der minimalen Reizschwelle und wurde deshalb so niedrig gehalten, da höhere Stromstärken ein Entleeren der Katecholaminspeicher des Muskels induzierten, was in Folge zu einer Verfälschung der Versuchungsergebnisse führen würde (Furchgott R. F. et al. 1959).

Danach erfolgte eine mindesten 45 Minuten lange Kontrollphase. Während dieser Zeit wurden alle 5 Minuten Aufzeichnungen von 5 bis 6 Amplituden durchgeführt, solange bis konstante Amplituden erreicht wurden.

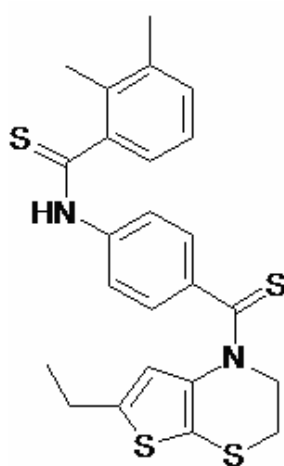
Nun konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten begonnen werden. Es wurden weiterhin alle 5 Minuten Aufzeichnungen von 5 bis 6 Amplituden gemacht.

3.6 Testsubstanzen

Die Testsubstanzen, welche zur Durchführung der Versuchsreihen an isolierten Meerschweinchenorganen herangezogen wurden, wurden am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien neu synthetisiert und von Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt.

3.6.1 Testsubstanz WHGMS174

Abbildung 9: *Strukturformel von WHGMS174*



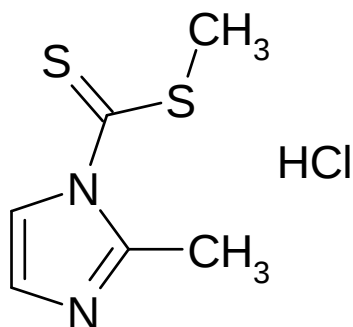
MG = 468,73

Nomenklatur:

N1-{4-[(6-ethyl-2,3-dihydro-1H-thieno[2,3-b][1,4]thiazin-1-yl)carbothionyl]phenyl}-
2,3-dimethyl-1-benzocarbothioamid

3.6.2 Testsubstanz SWS5

Abbildung 10: Strukturformel von SWS5



MG = 208,77

Nomenklatur:

Methyl 2-Methyl-1H-1-imidazolcarbodithioat Hydrochloride

Die jeweilige Stammlösung wurde an jedem Versuchstag frisch zubereitet, indem die kristallinen Substanzen in 100 µl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst wurden. Die Einwaage wurde so berechnet, dass durch Zugabe der letzten Konzentrationsstufe eine Konzentration von 100 µmol/l erreicht wurde. Unter Berücksichtigung der Organbadgröße wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

Tabelle 3: Stammlösungen

Stammlösung	Volumen Organbad in ml	Einwaage der Testsubstanz (100 µmol/l)/Organbad
Stammlösung Ia WHGMS174	25	1,17 mg
Stammlösung Ib WHGMS174	8	0,37 mg
Stammlösung IIa SWS5	25	0,52 mg
Stammlösung IIb SWS5	8	0,17 mg

Bei den Versuchsreihen an den isolierten Organen erfolgte nach folgendem Schema die Substanzzugabe. Nach der Erreichung der konstanten Kontrollphase wurde 1 µl der jeweiligen Stammlösung ins Organbad injiziert. Es folgte alle 45 Minuten eine

weitere Substanzzugabe und zwar von 2; 7; 20 und 70 µl. Dadurch kam es zu Konzentrationen von 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l im Organbad.

Tabelle 4: *Pipettierschema*

Zugegebene Menge	Endkonzentration/Organbad
1 µl	1 µmol/l
2 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

3.7 Auswertung und Statistik

3.7.1 Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

Um die Abnahme der Kontraktionskraft der isolierten Organe zu ermitteln, wurde wie schon erwähnt das Organ zur maximalen Kontraktion mittels KCl-Lösung gebracht. Der ermittelte Abstand in cm von der Nulllinie bis zum erreichten Plateau bzw. den weiteren Messpunkten wurde mit dem Eichfaktor der Apparatur 0,98 multipliziert um die genauen Messwerte in mN zu ermitteln. Die Abnahme der Kontraktionskraft (f_c) konnte somit auch in Prozent ermittelt werden.

In Kapitel 4.1.6 wird auf den Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die isolierten Organe und die Einbeziehung in die Berechnung näher eingegangen.

3.7.2 Rechter Vorhof

Als Messgröße bei den Versuchsreihen am rechten Vorhof wurde die Schlagfrequenz (Schläge/Minute) herangezogen. Für 12 Sekunden lang wurden die Schläge am Schreiber aufgezeichnet, abgezählt und mit 5 multipliziert und erhielt somit die Anzahl der Schläge pro Minute. Eine Erhöhung oder Erniedrigung der Schlagfrequenz bei einer Steigerung der Substanzkonzentration wies auf einen positiven oder negativen chronotropen Effekt hin.

3.7.3 Papillarmuskel

Die Versuchsreihen am Papillarmuskel waren darauf ausgerichtet die Kontraktionskraft (f_c) zu ermitteln. Die 5 bis 6 aufgezeichneten Amplituden wurden mit Hilfe eines Lineals abgemessen und ein Durchschnittswert ermittelt, welcher mit dem Eichfaktor der Versuchsanordnung multipliziert wurde. Durch Ermittlung des Kontrollwerts und der weiteren Messpunkte konnte auf eine positiv oder negativ inotrope Wirkung geschlossen werden.

3.7.4 Statistik

Die wie in den Kapiteln 3.7.1 bis 3.7.3 ermittelten Messdaten der einzelnen Versuche wurden für die statistische Auswertung herangezogen.

Sie dienten zur Berechnung der arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehlern (SEM). Die Änderung der Kontraktionskraft (f_c) sowie die Schlagfrequenz (f) wurde sowohl in mN bzw. Schläge/min als auch in Prozent ermittelt.

Außerdem wurden die Messergebnisse noch mit Hilfe des gepaarten Student-t-Tests hinsichtlich ihrer Signifikanz beurteilt. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) und $< 1\%$ ($P < 0,01$) wurden als signifikante Werte eingestuft und Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant.

4. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse zeigen die Wirkung von den Testsubstanzen WHGMS174 und SWS5 auf die einzelnen isolierten Organe der Meerschweinchen auf.

Untersucht wurde die Wirkung an der Aorta, der Arteria pulmonalis, am Ileum, am rechten Vorhof und am Papillarmuskel. Nachdem das jeweilige isolierte Organ ein konstantes Plateau erreicht hatte, wurde die Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 4) kumulativ alle 45 Minuten ins Organbad injiziert.

Nach der Auswertung der Änderung der Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz in den verschiedenen Konzentrationsstufen wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve mit Hilfe des Programms Sigma Plot graphisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Graphik konnte der eventuell erreichte EC_{50} Wert ermittelt werden. Darunter wird jene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ verstanden, bei welcher die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes abgesunken ist.

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz WHGMS174

4.1.1 Vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz WHGMS174 an der isolierten Aorta

Sechs Versuche wurden unternommen um die Wirkung von WHGMS174 auf die Aorta aufzuzeigen. Um die Aorta vorzukontrahieren wurde eine KCl-Lösung (90 mmolar) zugegeben. Nachdem eine Gewöhnungsphase an diese Lösung von mindestens 45 Minuten erfolgte, wurde die Testsubstanz WHGMS174 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ im Abstand von 45 Minuten in das Organbad pipettiert.

Mittels Schreiber wurde der Einfluss auf die Vasodilatation der Aorta als Kurve dargestellt.

Anhand der Kontrolle wurde der Mittelwert aus den sechs Versuchen mit $15,79 \pm 4,97$ mN definiert und dieser Wert wurde als 100 % festgelegt. Die Testsubstanz führte erst bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer geringen Vasodilatation von nur 24,29 %. Es wurde somit keine EC_{50} erreicht.

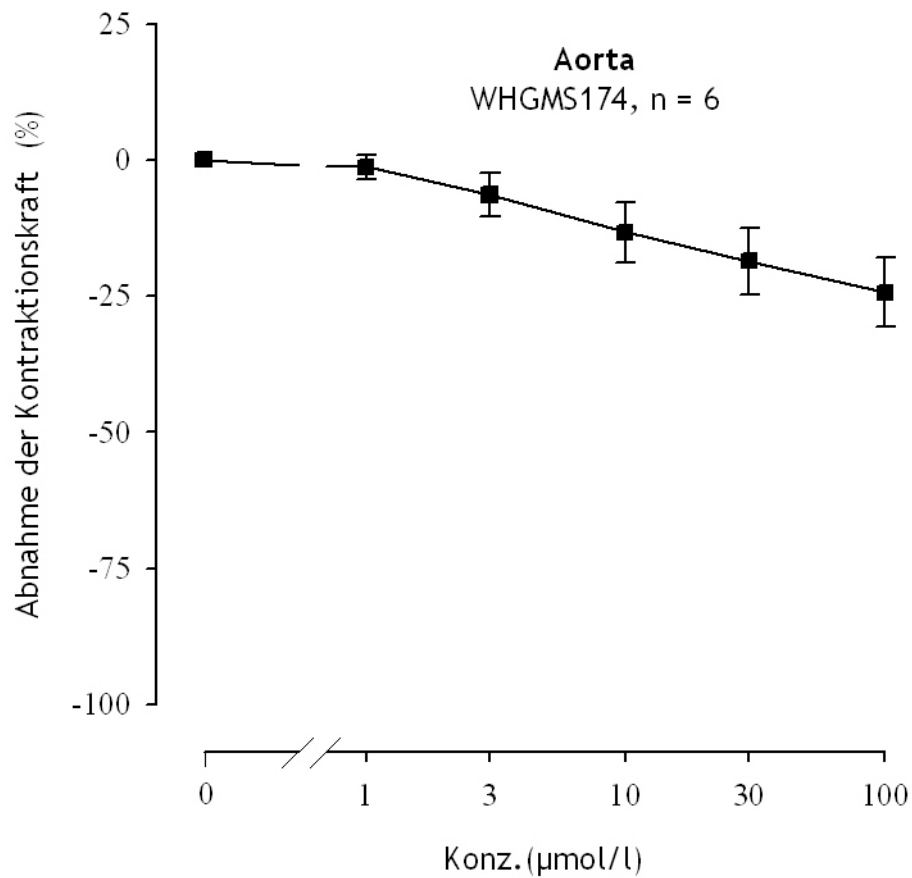
Tabelle 5: Wirkung von WHGMS174 auf die Aorta

WHGMS174 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$15,79 \pm 4,97$	$00,00 \pm 0,00$	6	-
1	$15,61 \pm 4,93$	$-01,29 \pm 2,27$	6	n.s.
3	$14,88 \pm 4,80$	$-06,39 \pm 3,96$	6	n.s.
10	$14,18 \pm 5,00$	$-13,30 \pm 5,47$	6	n.s.
30	$13,69 \pm 5,13$	$-18,54 \pm 6,11$	6	0,05
100	$12,91 \pm 5,10$	$-24,91 \pm 6,45$	6	0,01

Legende zu Tabelle 5:

Die Tabelle zeigt die Wirkung von WHGMS174, indem die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) mit ihren Standardfehlern (SEM) aus sechs Versuchen angegeben werden. Die Abnahme der Kontraktionskraft ist sowohl in mN als auch in Prozent berechnet und bezieht sich immer auf den Kontrollwert.

Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve von WHGMS174 an der Aorta



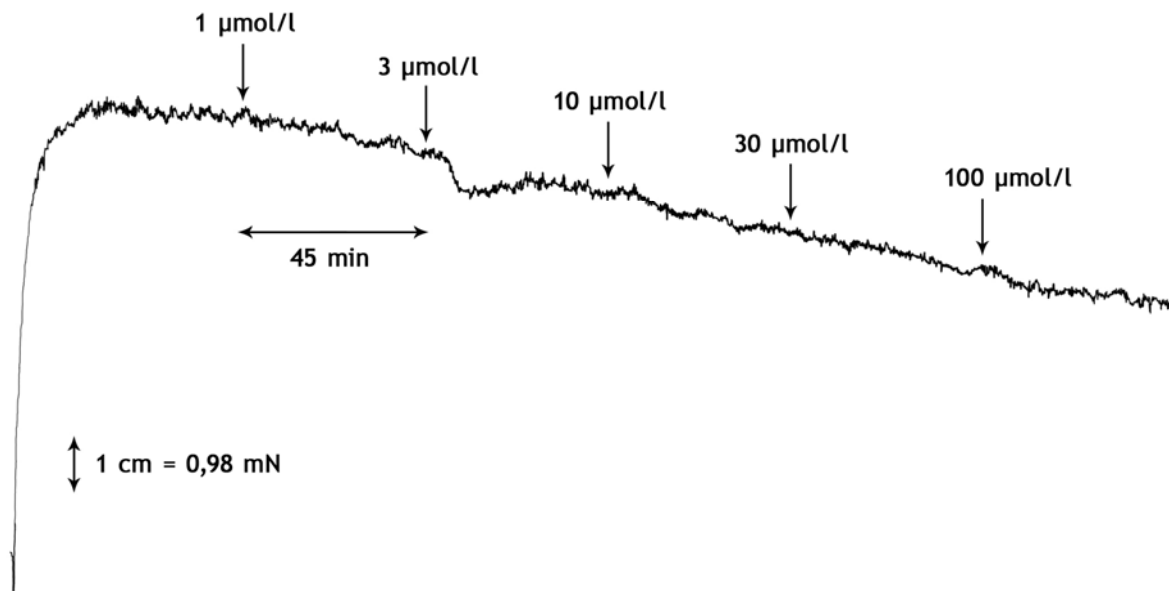
Legende zur Abbildung 11:

In der Abbildung wird die Kontraktionskraftabnahme der Substanz WHGMS174 in den Konzentrationen von 1 - 100 $\mu\text{mol/l}$ graphisch dargestellt.

Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von WHGMS174 in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der Ordinate die Kontraktionsabnahme in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte ($n=6$), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Abbildung 12: *Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraftabnahme der isolierten Aorta*



Legende zur Abbildung 12:

In der Abbildung wird eine stetige leichte Kontraktionskraftabnahme aufgezeigt. Alle 45 Minuten bei Konzentrationen von 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l wurde die Wirkung auf die Aorta berechnet.

4.1.2 Vasodilatierende Wirkung von WHGMS174 an der isolierten Arteria pulmonalis

Die Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis von WHGMS174 wurde durch fünf Versuche aufgezeigt. WHGMS174 wurde in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ getestet.

Nachdem das Präparat einen konstanten Kontrollwert in der KCl-Lösung (90 mmolar) erreicht hatte, wurden die verschiedenen Konzentrationen kumulativ alle 45 Minuten hinzu gegeben.

Mittels Schreiber wurde die Wirkung von WHGMS174 auf die Vasodilatation der Arteria pulmonalis als Kurve dargestellt.

Anhand der fünf Versuche wurde der arithmetische Mittelwert der Kontrollwerte ermittelt. Dieser beträgt $14,82 \pm 1,54$ mN und wird als 100 % festgelegt. Die Testsubstanz führte erst bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Vasodilatation von nur 23,86 % und somit wurde keine EC_{50} erreicht.

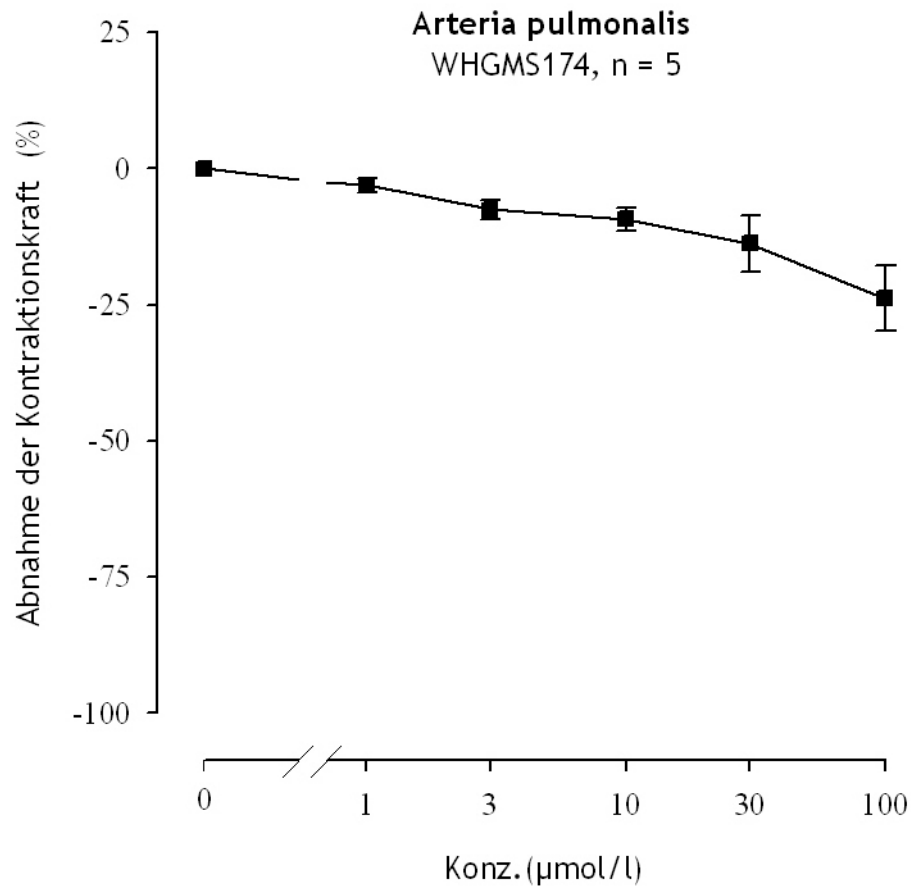
Tabelle 6: *Wirkung von WHGMS174 auf die Arteria pulmonalis*

WHGMS174 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$14,82 \pm 1,54$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$14,40 \pm 1,62$	$-03,03 \pm 1,31$	5	n.s.
3	$13,73 \pm 1,59$	$-07,55 \pm 1,83$	5	0,01
10	$13,54 \pm 1,71$	$-09,27 \pm 2,08$	5	0,01
30	$12,42 \pm 1,87$	$-13,71 \pm 5,14$	5	0,05
100	$11,45 \pm 1,96$	$-23,86 \pm 5,98$	5	0,001

Legende zur Tabelle 6:

Anhand der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft f_c und deren Standardfehler SEM aus fünf Versuchen an der Arteria pulmonalis ersichtlich. Die Kontraktionskraft ist sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

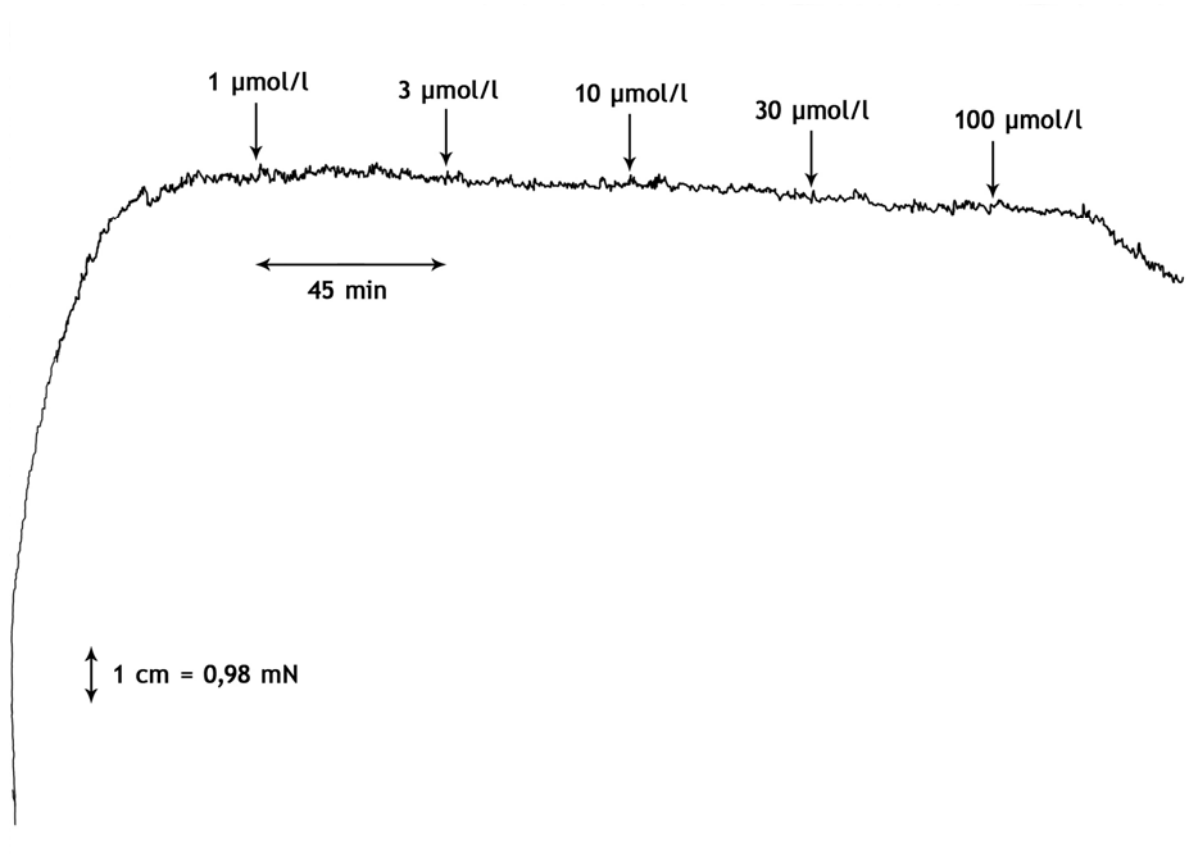
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von WHGMS174 an der Arteria pulmonalis



Legende zur Abbildung 13:

In der Abbildung wird die Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis nach kumulativer Zugabe von WHGMS174 dargestellt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von WHGMS174 in μmol/l aufgetragen und auf der Ordinate die Kontraktionskraftabnahme in Prozent. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte (n=5), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Abbildung 14: *Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraftabnahme der isolierten Arteria pulmonalis*



Legende zur Abbildung 14:

Die Abbildung zeigt eine Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf die Arteria pulmonalis. Durch den Einfluss der Testsubstanz ist eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft bei ansteigender Konzentration ersichtlich. Der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben betrug jeweils 45 Minuten.

4.1.3 Spasmolytische Wirkung von WHGMS174 am isolierten terminalen Ileum

Die Wirkung von WHGMS174 wurde in fünf Versuchen an den isolierten terminalen Ilea überprüft. Das Präparat wurde in die entsprechende Apparatur eingespannt und vorgespannt. Nach einer Anpassungszeit von mindestens 45 Minuten an die Tyrode-Lösung wurde diese durch eine 60 mmolare KCl-Lösung ausgewechselt und eine konstante Kontrolllinie abgewartet. Nachdem nun das Präparat durch die KCl-Lösung zur Kontraktion gebracht wurde, wurden alle 45 Minuten verschiedene Konzentrationen kumulativ injiziert.

Mittels Schreiber wurde die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums als Kurve dargestellt.

Der Kontrollwert aus den fünf Versuchen betrug im Mittel $13,04 \pm 2,42$ mN.

Es wurde eine EC_{50} bei einer Konzentration von $18,55 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

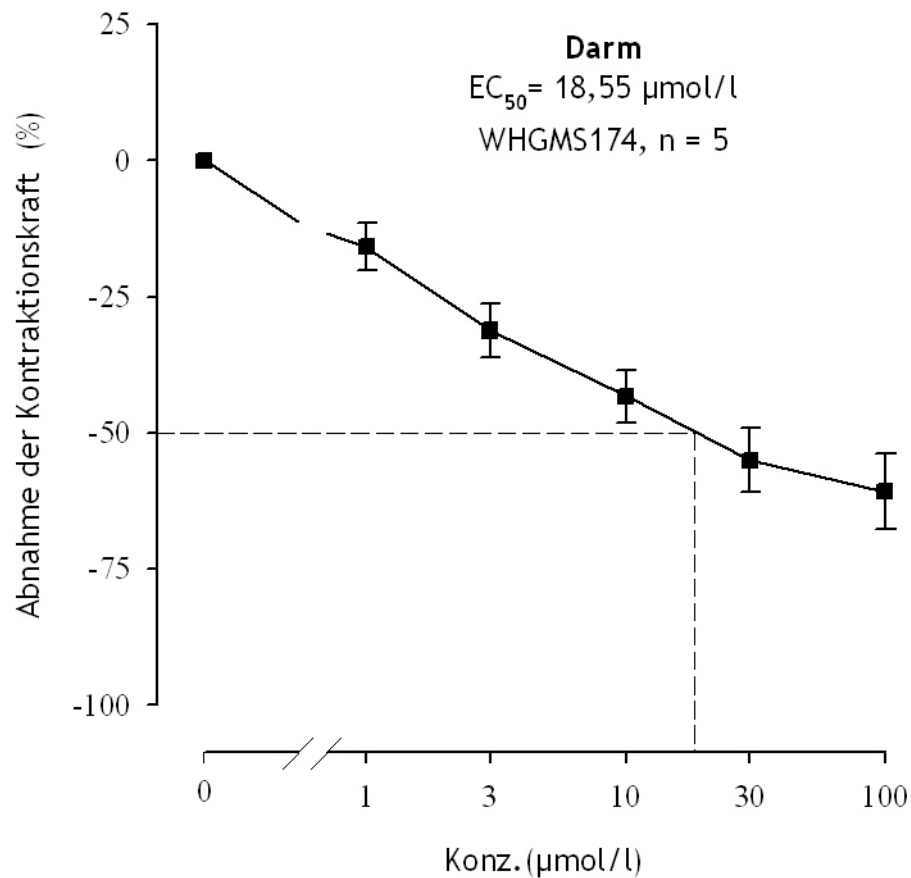
Tabelle 7: Wirkung von WHGMS174 auf das terminale Ileum

WHGMS174 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$13,04 \pm 2,42$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$11,31 \pm 2,78$	$-15,87 \pm 4,37$	5	0,01
3	$09,31 \pm 2,48$	$-31,21 \pm 5,02$	5	0,001
10	$07,58 \pm 1,98$	$-43,33 \pm 4,87$	5	0,001
30	$06,03 \pm 1,76$	$-55,05 \pm 5,84$	5	0,001
100	$05,29 \pm 1,72$	$-60,78 \pm 6,95$	5	0,001

Legende zur Tabelle 7:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft f_c von WHGMS174 auf das isolierte terminale Ileum. In fünf Versuchen wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in mN und in Prozent berechnet.

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von WHGMS174 am terminalen Ileum

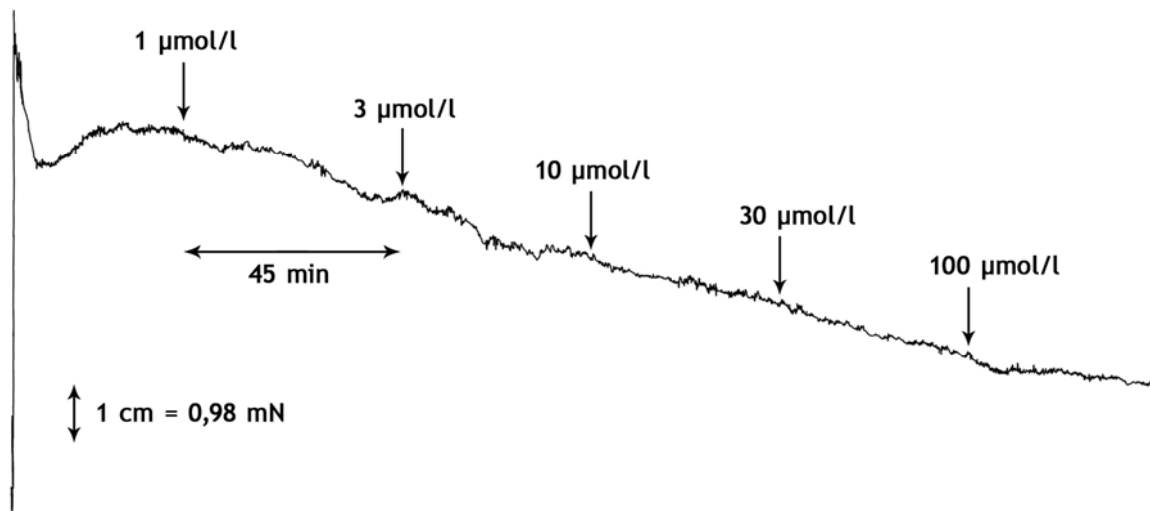


Legende zur Abbildung 15:

Anhand der Abbildung ist die konzentrationsabhängige Wirkung von WHGMS am terminalen Ileum ersichtlich. Die Kurve wurde erstellt, indem auf der Abszisse die Konzentrationen von WHGMS174 in $\mu\text{mol/l}$ angegeben wurden und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte ($n=5$), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Die strichlinierte Linie entspricht der EC_{50} bei einer Substanzkonzentration von $18,55 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 16: *Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraftabnahme des isolierten terminalen Ileums*



Legende zur Abbildung 16:

Die Originalabbildung zeigt den Effekt von WHGMS174 auf das terminale Ileum. Durch die Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz wird hier eine Abnahme der Kontraktion bei steigender Zunahme der Konzentration ersichtlich.

4.1.4 Wirkung von WHGMS174 auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium cordis dextrum

In fünf Versuchen wurde die Auswirkung von WHGMS174 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes ausgeforscht. Der in Tyrode-Lösung spontan schlagende Vorhof wurde in die Apparatur eingespannt und vorgespannt. Nach einer 30minütigen Kontrollphase wurde die Testsubstanz in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l zugegeben. Die jeweilige Konzentrationszugabe erfolgte alle 45 Minuten.

WHGMS174 hatte in dem Konzentrationsbereich von 1-100 µmol/l keinen signifikanten Einfluss auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes.

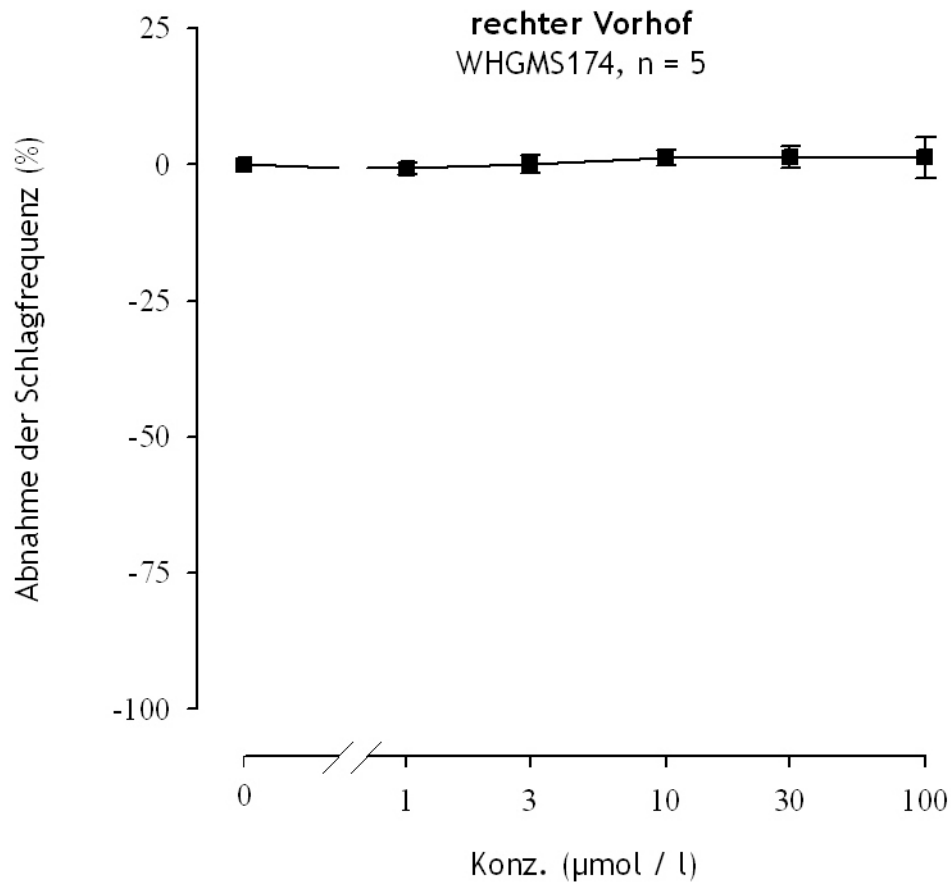
Tabelle 8: *Wirkung von WHGMS174 auf das Atrium cordis dextrum*

WHGMS174 [mol/l]	f ± SEM [x/min]	f ± SEM [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	195 ± 17,98	00,00 ± 0,00	5	-
1	193 ± 16,32	-00,74 ± 1,06	5	n.s.
3	195 ± 17,39	+00,13 ± 1,66	5	n.s.
10	196 ± 18,12	+01,20 ± 1,43	5	n.s.
30	196 ± 17,35	+01,38 ± 2,06	5	n.s.
100	195 ± 15,89	+01,26 ± 3,68	5	n.s.

Legende zur Tabelle 8:

Die Tabelle führt die arithmetischen Mittelwerte mit deren Standardfehlern an, welche aus fünf Versuchen ermittelt wurden. Die Schlagfrequenz f wird in Schlägen pro Minute und in Prozent angegeben.

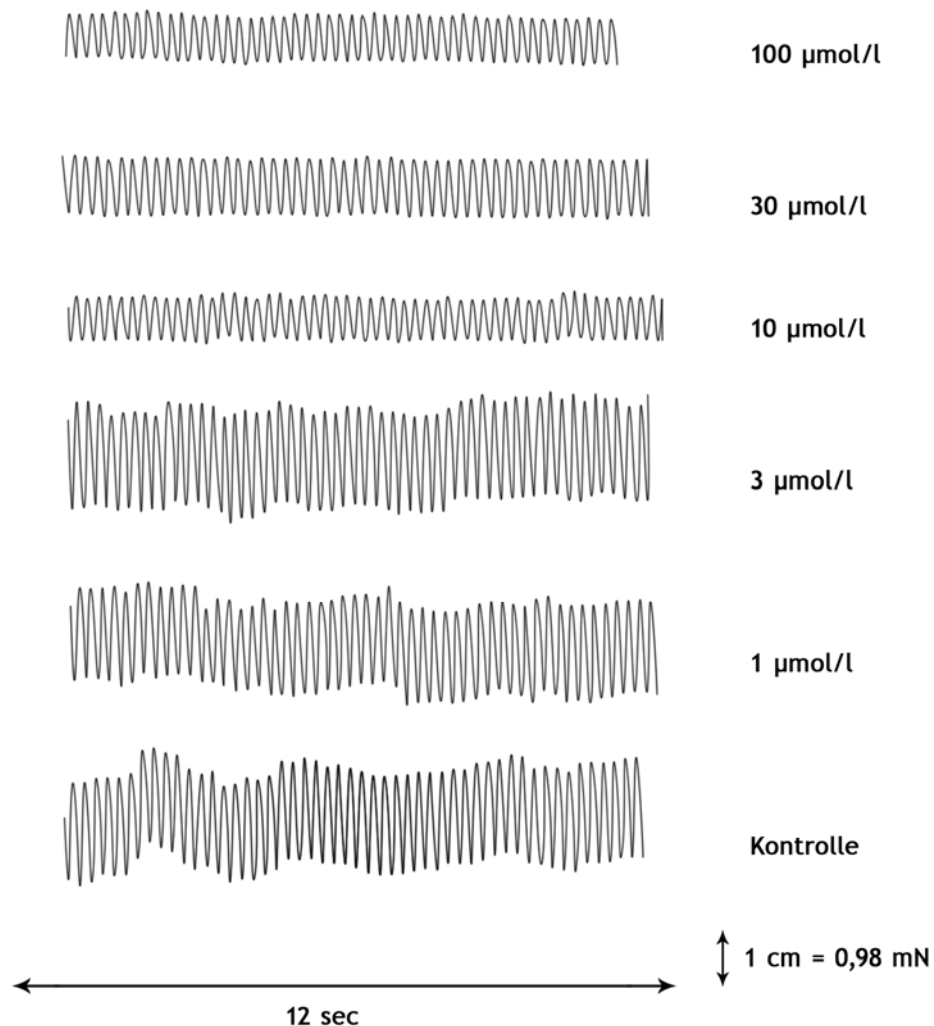
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von WHGMS174 am rechten Vorhof



Legende zur Abbildung 17:

Die Graphik beschreibt die Wirkung von WHGMS174 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes. Die Abszisse enthält die logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen und die Ordinate die lineare Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte (n=5), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Abbildung 18: *Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes*



Legende zur Abbildung 18:

Die Abbildung zeigt die Schlagfrequenz eines rechten Vorhofes nachdem WHGMS174 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l injiziert wurde. Der Abstand zwischen den Substanzzugaben betrug 45 Minuten. Die Schläge wurden alle fünf Minuten 12 Sekunden lang aufgezeichnet.

4.1.5 Wirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraft des isolierten Musculus papillaris

Zur Untersuchung der Auswirkung von WHGMS174 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels wurden sieben Versuche durchgeführt.

Der Papillarmuskel wurde in die entsprechende Versuchsanordnung eingespannt und vorgespannt. Im Gegensatz zum rechten Vorhof, welcher spontan schlägt, muss der Papillarmuskel durch Stromschläge stimuliert werden um die Kontraktilität aufrecht zu erhalten. Sobald eine stabile Kontrollphase erreicht wurde, wurde die Testsubstanz alle 45 Minuten in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ ins Organbad zugegeben.

Die Wirkung auf den isolierten Papillarmuskel wurde mittels Schreiber aufgezeichnet.

Als Durchschnitt der Kontrollmessungen ergab sich ein Wert von $8,37 \pm 1,09 \text{ mN}$, welcher als 100 % definiert wurde. Die Kontraktionskraft nahm durch Zugabe von WHGMS174 in den Konzentrationen 1; 3; und 10 $\mu\text{mol/l}$ nicht signifikant zu, bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer leichten Zunahme der Kontraktionskraft. Der Versuch endete jedoch bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ bei einer durchschnittlichen Kontraktionskraft von $0,63 \pm 3,36 \%$.

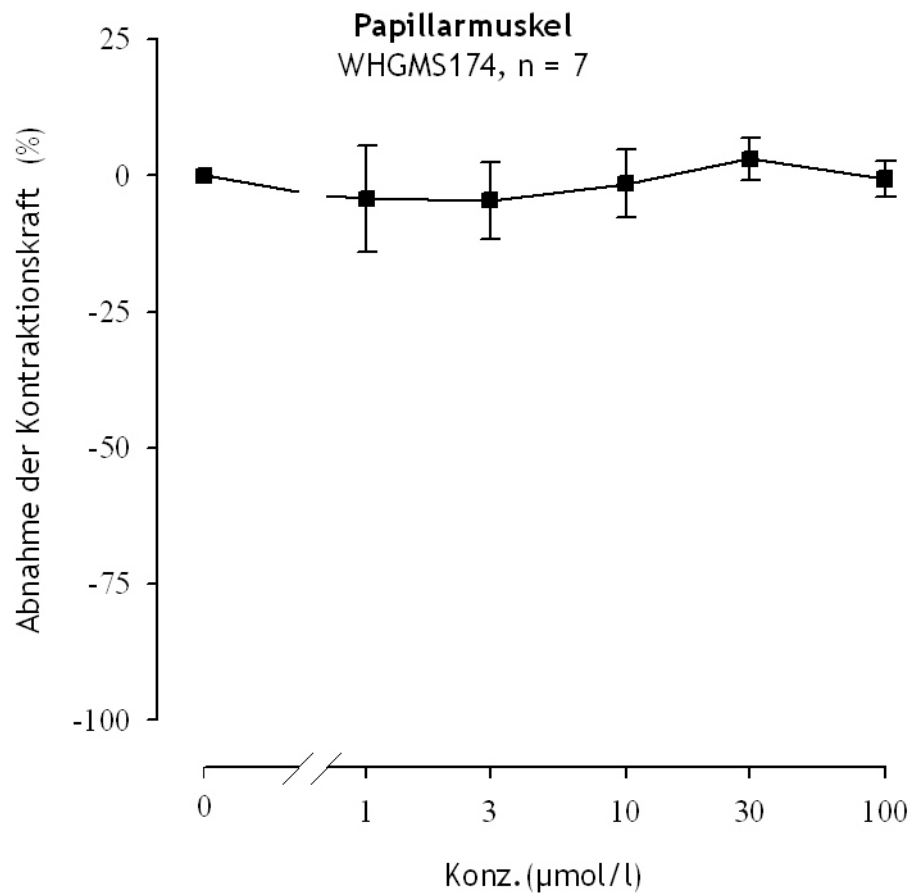
Tabelle 9: *Wirkung von WHGMS174 auf den Papillarmuskel*

WHGMS174 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit p
Kontrolle	8,37 ± 1,09	0,00 ± 0,00	7	-
1	7,68 ± 0,97	-4,28 ± 9,80	7	n.s.
3	7,70 ± 0,77	-4,52 ± 7,06	7	n.s.
10	7,96 ± 0,77	-1,47 ± 6,19	7	n.s.
30	8,99 ± 0,80	+3,08 ± 3,86	7	n.s.
100	8,13 ± 0,86	-0,63 ± 3,36	7	n.s.

Legende zur Tabelle 9:

In der Tabelle sind von sieben Versuchen die durchschnittlichen Werte der Kontraktionskraft (f_c) und deren Standardabweichungen (SEM) sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

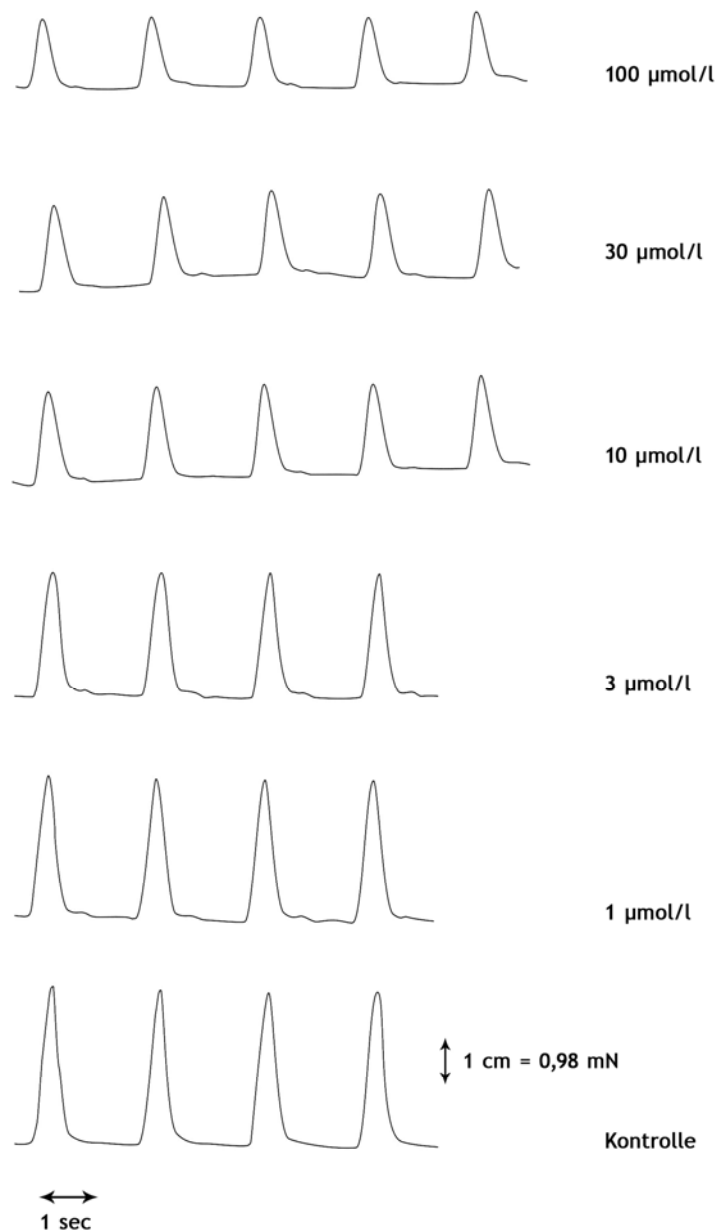
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von WHGMS174 auf den Papillarmuskel



Legende zur Abbildung 19:

Die Graphik beschreibt den Effekt von WHGMS174 bei steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels. Die Konzentrationen der Substanz in µmol/l wurden auf der Abszisse, die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent auf der Ordinate aufgetragen. Die Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten (n=7), die Länge der Balken den dazu gehörigen Standardabweichungen.

Abbildung 20: *Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGMS174 auf den Papillarmuskel*



Legende zur Abbildung 20:

Durch die Zugabe der Testsubstanz in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten in den verschiedenen Konzentrationen wurde durch den Detektor die Auswirkung auf die Kontraktionsamplitude festgehalten.

4.1.6 Auswirkung des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die isolierten Organe von Meerschweinchen

Die Testsubstanz WHGMS174 wurde vor jedem Versuch in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, welches selbst eine Wirkung auf die isolierten Organe auslöst. Somit wurde bei der Berechnung der Kontraktionskraft der Einfluss des Lösungsmittels miteinbezogen.

Es wurden Untersuchungen mit dem Lösungsmittel DMSO an den isolierten Organen gemacht, welche nach dem gleichen Schema wie in Punkt 3.5.1 – 3.5.5 angegeben durchgeführt wurden.

Die Versuche ergaben, dass das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Kontraktilität der Aorta, der Arteria pulmonalis, das Ileum und auf den Papillarmuskel hat. Es zeigte jedoch keine Auswirkungen auf die Schlagfrequenz des Vorhofes.

Tabelle 10: *Wirkung von DMSO auf die Aorta*

DMSO [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	09,78 $\pm$ 2,14	0,00 $\pm$ 0,00	4	n.s.
1	10,00 $\pm$ 2,23	1,84 $\pm$ 0,95	4	n.s.
3	10,00 $\pm$ 2,21	1,93 $\pm$ 0,91	4	n.s.
10	09,95 $\pm$ 2,20	1,51 $\pm$ 1,38	4	n.s.
30	09,92 $\pm$ 2,20	1,09 $\pm$ 2,46	4	n.s.
100	09,83 $\pm$ 2,15	0,34 $\pm$ 2,57	4	n.s.

Legende zur Tabelle 10:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c), berechnet in mN und in Prozent, von DMSO auf die isolierte Aorta.

Durch das Lösungsmittel DMSO wird die Kontraktionskraft der Aorta verstärkt, jedoch in einem geringen Ausmaß von rund 1,3 % bei Konzentrationen von 1 - 100 $\mu\text{mol/l}$ DMSO. Um den reinen Effekt von WHGMS174 anführen zu können wurde der Effekt von reinem DMSO subtrahiert.

Tabelle 11: *Wirkung von DMSO auf die Arteria pulmonalis*

DMSO [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	8,43 $\pm$ 1,03	0,00 $\pm$ 0,00	3	n.s.
1	8,62 $\pm$ 0,93	2,72 $\pm$ 1,72	3	n.s.
3	8,71 $\pm$ 0,85	4,01 $\pm$ 3,05	3	n.s.
10	8,69 $\pm$ 0,96	3,39 $\pm$ 1,38	3	n.s.
30	8,72 $\pm$ 0,96	3,74 $\pm$ 1,24	3	n.s.
100	8,66 $\pm$ 1,00	2,91 $\pm$ 1,03	3	n.s.

Legende zur Tabelle 11:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c), berechnet in mN und in Prozent, von DMSO auf die isolierte Arteria pulmonalis.

Auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis hat das Lösungsmittel einen etwas höheren Einfluss als auf die Aorta. Da die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis durch DMSO zunimmt, wurde der Effekt bei der Berechnung von WHGMS174 berücksichtigt und somit abgezogen.

Tabelle 12: *Wirkung von DMSO auf das terminale Ileum*

DMSO [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	20,73 $\pm$ 3,56	00,00 $\pm$ 0,00	4	n.s.
1	20,48 $\pm$ 3,65	-01,51 $\pm$ 0,64	4	n.s.
3	19,99 $\pm$ 3,88	-04,65 $\pm$ 24,05	4	n.s.
10	19,31 $\pm$ 4,08	-08,66 $\pm$ 4,03	4	n.s.
30	18,74 $\pm$ 4,11	-11,59 $\pm$ 4,21	4	n.s.
100	17,18 $\pm$ 3,92	-19,35 $\pm$ 4,32	4	0,05

Legende zur Tabelle 12:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c), berechnet in mN und in Prozent, von DMSO auf das isolierte terminale Ileum.

In der Tabelle 12 ist ersichtlich, dass bei steigender Konzentration von DMSO die Kontraktionskraft des terminalen Ileums abnimmt. Um die wahre Wirkung von WHGMS174 angeben zu können, muss der Einfluss von DMSO auf das terminale Ileum in der Berechnung berücksichtigt werden.

Tabelle 13: *Wirkung von DMSO auf den Papillarmuskel*

DMSO [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	0,47 ± 0,06	00,00 ± 0,00	3	n.s.
1	0,46 ± 0,08	-03,70 ± 3,70	3	n.s.
3	0,43 ± 0,07	-10,42 ± 3,84	3	n.s.
10	0,36 ± 0,05	-23,76 ± 0,82	3	n.s.
30	0,29 ± 0,03	-37,40 ± 2,32	3	0,05
100	0,25 ± 0,03	-45,95 ± 2,99	3	0,05

Legende zur Tabelle 13:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c), berechnet in mN und in Prozent, von DMSO auf den isolierten Papillarmuskel.

Sehr starke Auswirkungen hat das Lösungsmittel auf den Papillarmuskel, da wie in Tabelle 13 aufgezeigt eine Konzentration von 10 µmol/l zu einer Dilatation von 23,76 ± 0,82 % führt und bei einer Endkonzentration von 100 µmol/l schon nahezu die Hälfte der Kontraktionskraft zurückgegangen ist.

4.2. Ergebnisse der Testsubstanz SWS5

4.2.1 Vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz SWS5 an der isolierten Aorta

Die Versuchsbedingungen und Versuchsabläufe wurden genauso wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben angewendet. Um die Wirkung von SWS5 auf die isolierte Aorta aufzuzeigen wurden sechs Versuche unternommen.

Der Kontrollwert betrug im Mittel $13,88 \pm 1,08$ mN, welcher als 100 % festgelegt wurde. Am Ende der Versuche bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ hatten sich die durch KCL-Lösung (90 mmolar) vorkontrahierten Aorten wieder völlig dilatiert. Eine EC_{50} wurde schon bei einer Konzentration von $6,3 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

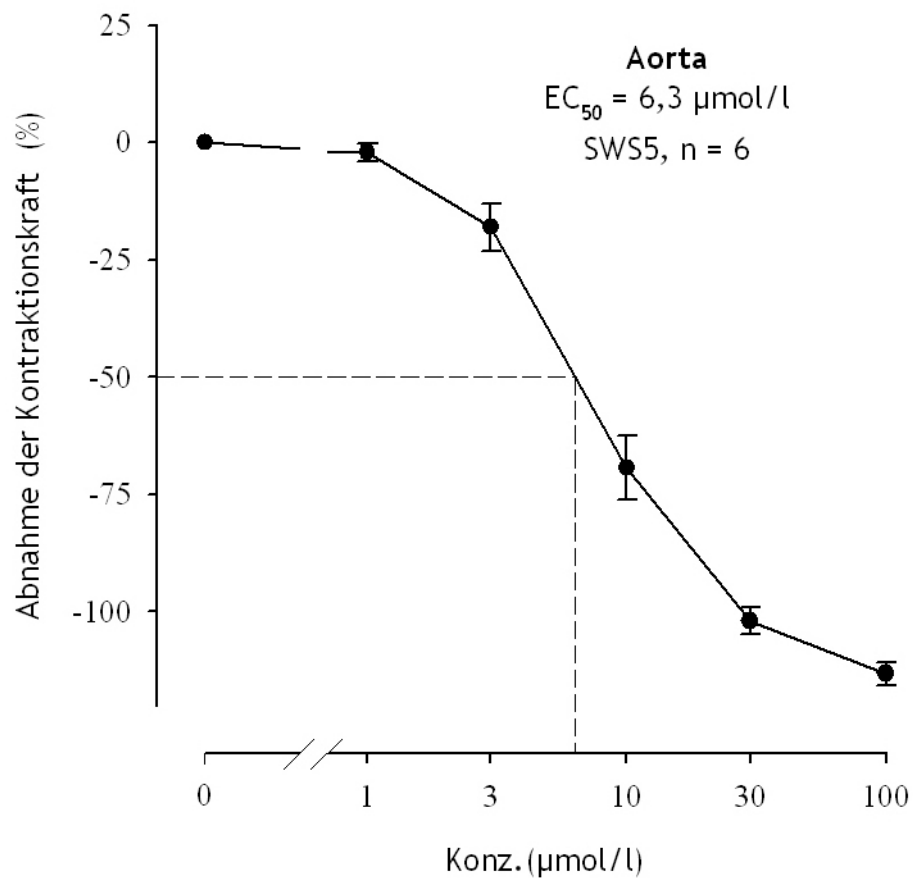
Tabelle 14: *Wirkung von SWS5 auf die Aorta*

SWS5 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$13,88 \pm 1,08$	$00,00 \pm 0,00$	6	-
1	$13,63 \pm 1,17$	$-02,09 \pm 2,34$	6	n.s.
3	$11,42 \pm 1,24$	$-18,02 \pm 5,94$	6	0,01
10	$04,82 \pm 1,01$	$-69,30 \pm 7,20$	6	0,001
30	$-0,02 \pm 0,35$	$-102,00 \pm 2,86$	6	0,001
100	$-1,78 \pm 0,31$	$-113,23 \pm 3,12$	6	0,001

Legende zu Tabelle 14:

Anhand der Tabelle ist ersichtlich, dass aus sechs Versuchen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und deren Standardabweichungen (SEM) berechnet wurden. Die Abnahme Kontraktionskraft wurde für die Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und $100 \mu\text{mol/l}$ sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS5 an der Aorta

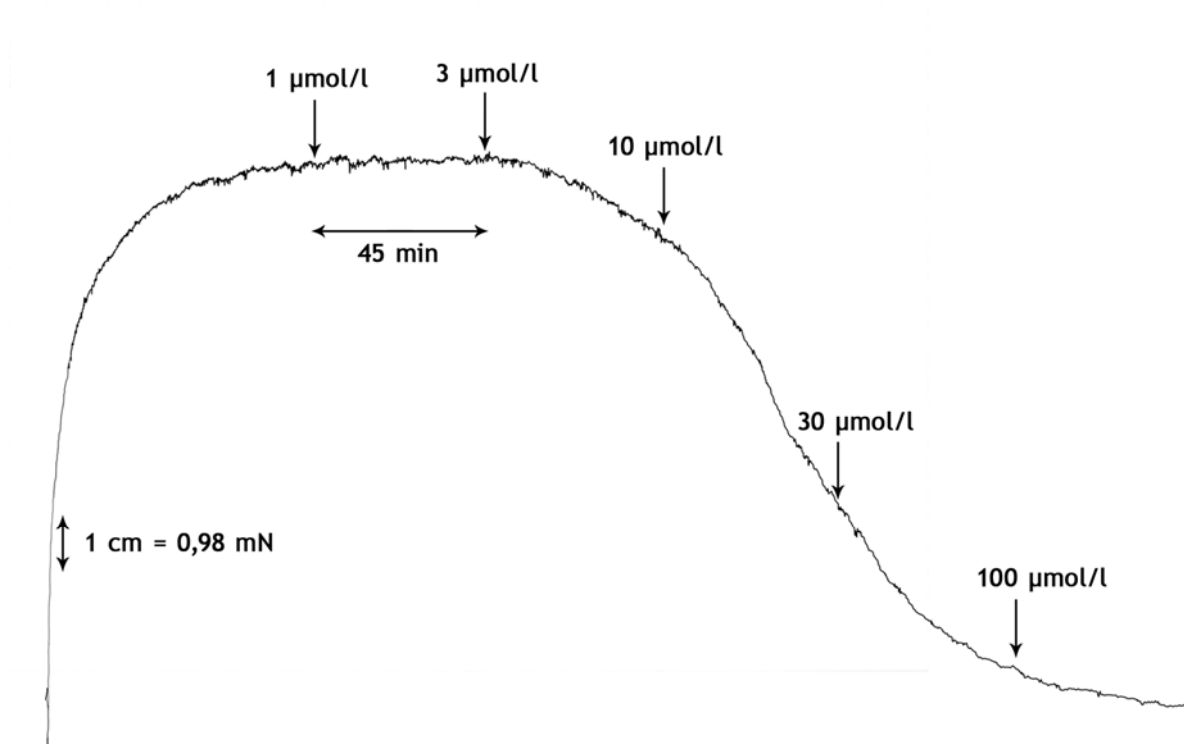


Legende zur Abbildung 21:

Die Graphik zeigt eine stetige und rasche Abnahme der Kontraktionskraft bei steigender Konzentration von SWS5. Die einzelnen Konzentrationsstufen von SWS5 sind in $\mu\text{mol/l}$ auf der x-Achse und die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte ($n=6$), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Die strichlinierte Linie entspricht der EC_{50} bei einer Substanzkonzentration von $6,3 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 22: *Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS5 auf die Kontraktionskraftabnahme der isolierten Aorta*



Legende zur Abbildung 22:

Die Kurve beschreibt den Einfluss auf die Aorta von der Testsubstanz SWS5 bei steigender Konzentration durch Substanzzugabe nach jeweils 45 Minuten. Gut ersichtlich ist hier, dass vor allem kurz nachdem die Konzentration von 3 auf 10 µmol/l erhöht wurde die Vasodilatation stark zunimmt.

4.2.2 Vasodilatierende Wirkung von SWS5 an der isolierten Arteria pulmonalis

Um die Wirkung von SWS5 auf die Arteria pulmonalis festzustellen, wurde genauso vorgegangen wie bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

Nach fünf Präparaten wurde ein durchschnittlicher Wert von $16,35 \pm 0,66$ mN ermittelt, welcher als 100 % festgelegt wurde. Die Kontraktionskraft nahm auf nahezu null Prozent ab. Es wurde ein EC_{50} Wert bei $11,2 \mu\text{mol/l}$ ermittelt.

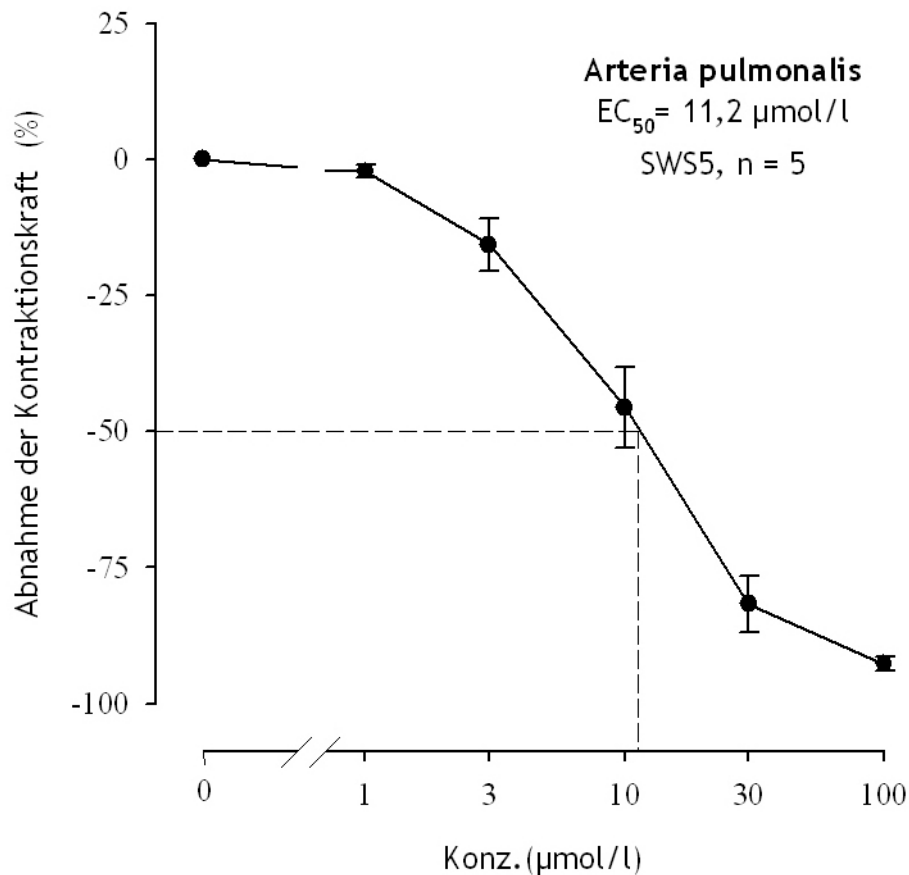
Tabelle 15: *Wirkung von SWS5 auf die Arteria pulmonalis*

SWS5 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$16,35 \pm 0,66$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$16,01 \pm 0,77$	$-02,21 \pm 1,21$	5	n.s.
3	$13,87 \pm 1,23$	$-15,66 \pm 4,86$	5	0,01
10	$09,03 \pm 1,56$	$-45,59 \pm 7,50$	5	0,001
30	$03,05 \pm 0,96$	$-81,69 \pm 5,14$	5	0,001
100	$00,44 \pm 0,54$	$-92,75 \pm 1,29$	5	0,001

Legende zur Tabelle 15:

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft f_c von SWS5 auf die isolierte Arteria pulmonalis. In fünf Versuchen wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in mN und in Prozent berechnet.

Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS5 auf die Arteria pulmonalis

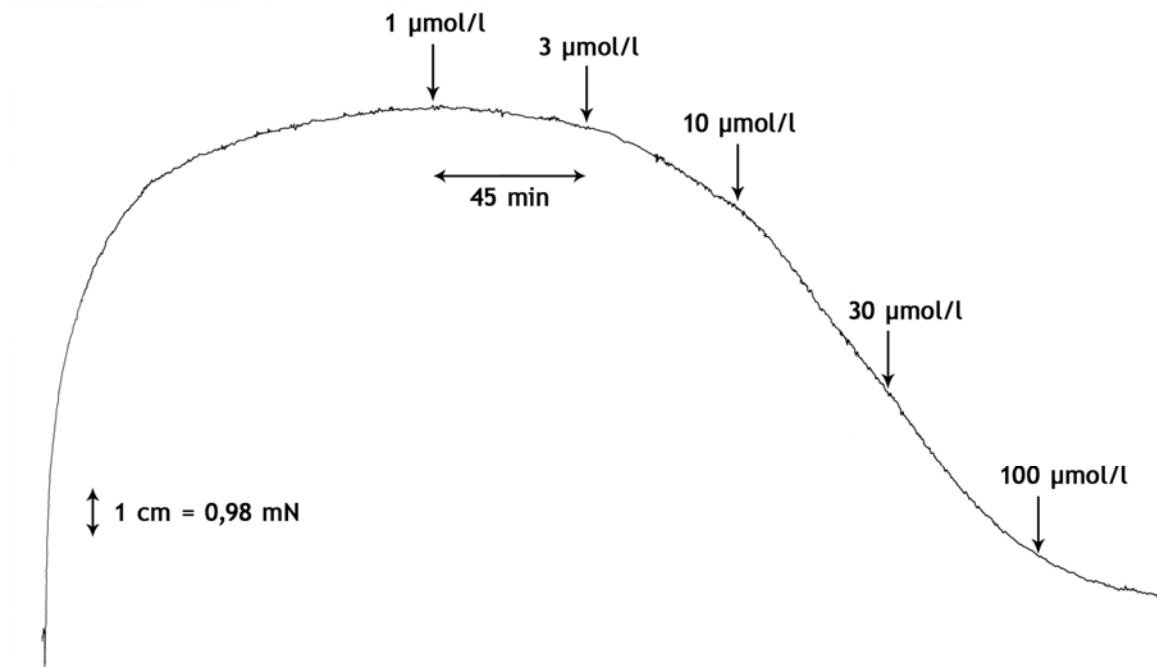


Legende zur Abbildung 23:

Die Kurve zeigt die starke Abnahme der Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis nach kumulativer Zugabe von SWS5. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen der Probe in $\mu\text{mol/l}$ und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angegeben. Die Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten ($n=5$), die Länge der Balken den dazu gehörigen Standardfehlern.

Die strichlinierte Linie entspricht der EC_{50} bei einer Konzentration von SWS5 von 11,2 $\mu\text{mol/l}$.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS5 auf die Arteria pulmonalis



Legende zur Abbildung 24:

Die Aufzeichnung durch den Schreiber zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft durch den Einfluss von SWS5 in den Konzentrationen 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l. Die Substanz wurde in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten in das Organbad injiziert.

4.2.3 Spasmolytische Wirkung von SWS5 am isolierten terminalen Ileum

Um die Änderung der Kontraktionskraft auf das terminale Ileum durch SWS5 aufzuzeigen, wurde vorgegangen wie bereits in Punkt 5.1.3 beschrieben.

Es wurden sechs Präparate verwendet um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen.

Als Durchschnitt der Kontrollmessungen ergab sich ein Wert von $17,15 \pm 2,53$ mN, welcher als 100 % definiert wurde. Ähnlich der Wirkung auf die Aorta und die Arteria pulmonalis von SWS5 nimmt auch die Kontraktionskraft des terminalen Ileums auf nahezu null Prozent ab. Es wurde ein EC_{50} Wert bei einer Konzentration von $9,5 \mu\text{mol/l}$ ermittelt.

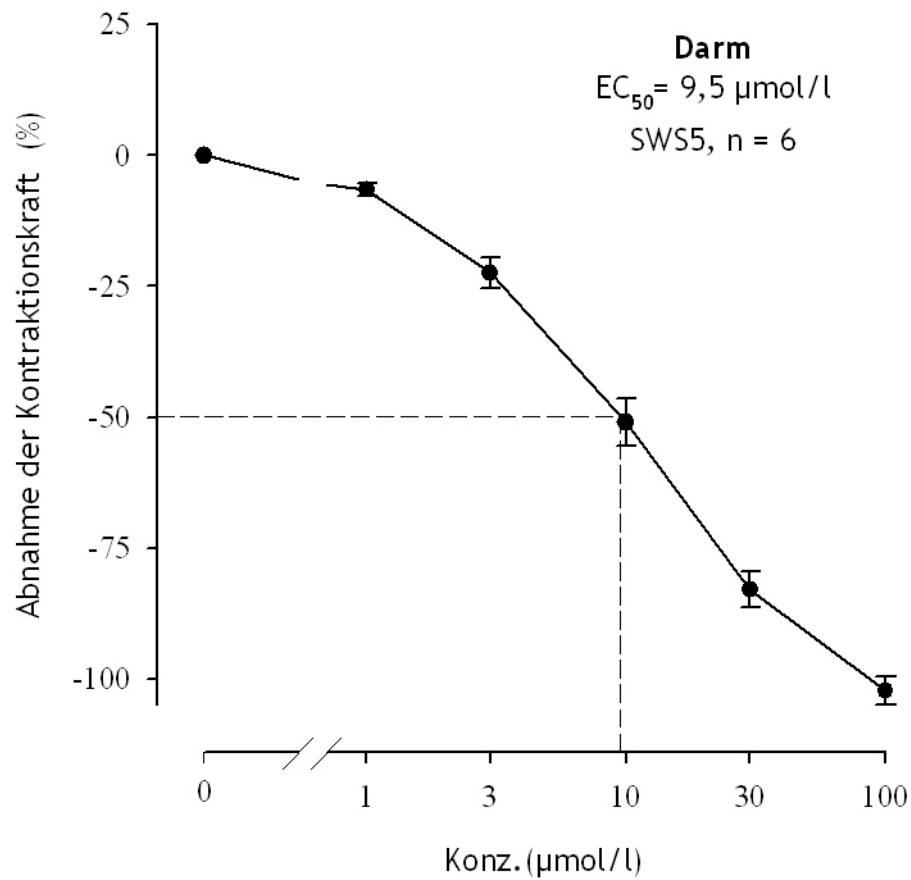
Tabelle 16: *Wirkung von SWS5 auf das terminale Ileum*

SWS5 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$17,15 \pm 2,53$	$00,00 \pm 0,00$	6	-
1	$16,00 \pm 2,37$	$-06,54 \pm 1,25$	6	0,01
3	$13,51 \pm 2,36$	$-22,46 \pm 3,00$	6	0,001
10	$08,81 \pm 1,96$	$-50,98 \pm 4,59$	6	0,001
30	$03,04 \pm 0,66$	$-82,90 \pm 3,39$	6	0,001
100	$-0,42 \pm 0,47$	$-102,27 \pm 2,64$	6	0,001

Legende zur Tabelle 16:

Die Tabelle präsentiert die erhaltenen arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) aus sechs durchgeführten Versuchen. Diese durchschnittlichen Werte der Kontraktionskraft (f_c) wird in mN und auch in Prozent angegeben.

Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS5 am terminalen Ileum

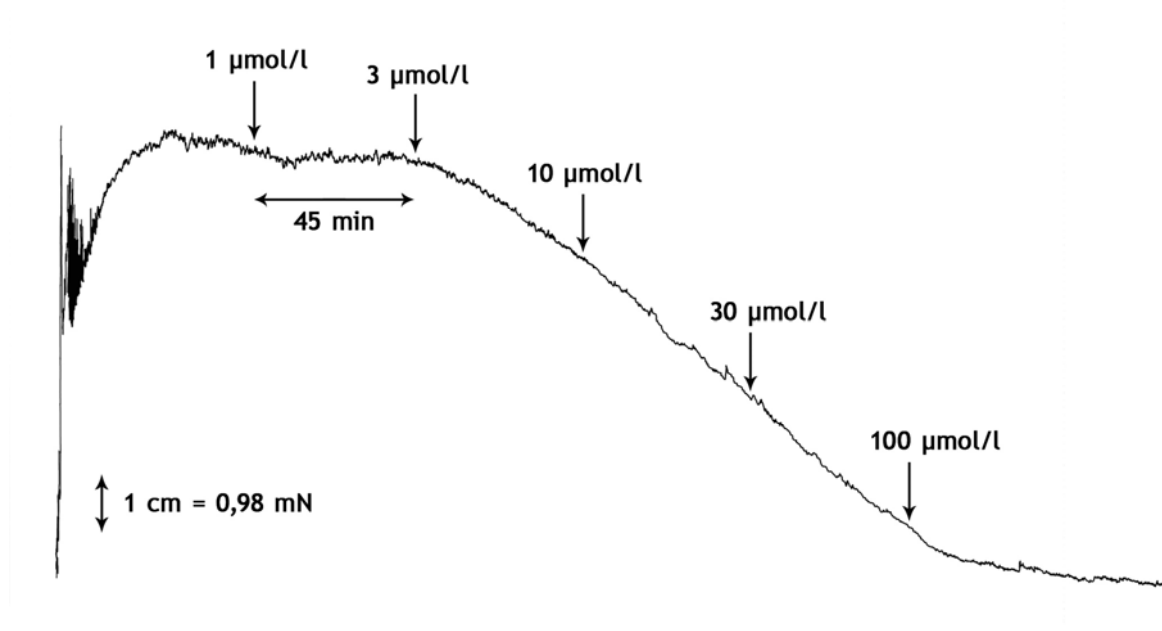


Legende zur Abbildung 25:

Die Graphik zeigt die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft terminaler Ilea bei kumulativer Substanzzugabe. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte ($n=6$), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Die strichlinierte Linie entspricht der EC_{50} bei einer Substanzkonzentration von 9,5 $\mu\text{mol/l}$.

Abbildung 26: *Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS5 auf den isolierten terminalen Ileums*



Legende zur Abbildung 26:

Die Originalkurve zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft bei kumulativer Substanzzugabe in Konzentrationen von 1; 3; 10; 30 und 100 µmol/l. Die Zugabe der Konzentrationen erfolgte in einem Abstand von 45 Minuten.

4.2.4 Wirkung von SWS5 auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium cordis dextrum

Die Versuchsanordnung wird wie bereits in Kapitel 3.5.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden fünf Versuche durchgeführt um die Wirkung auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes zu ermitteln.

Nach 30 Minuten Kontrollphase wurde ein durchschnittlicher Wert von $205 \pm 3,87$ Schlägen/Minute ermittelt. Dieser Wert wird als 100 % festgelegt.

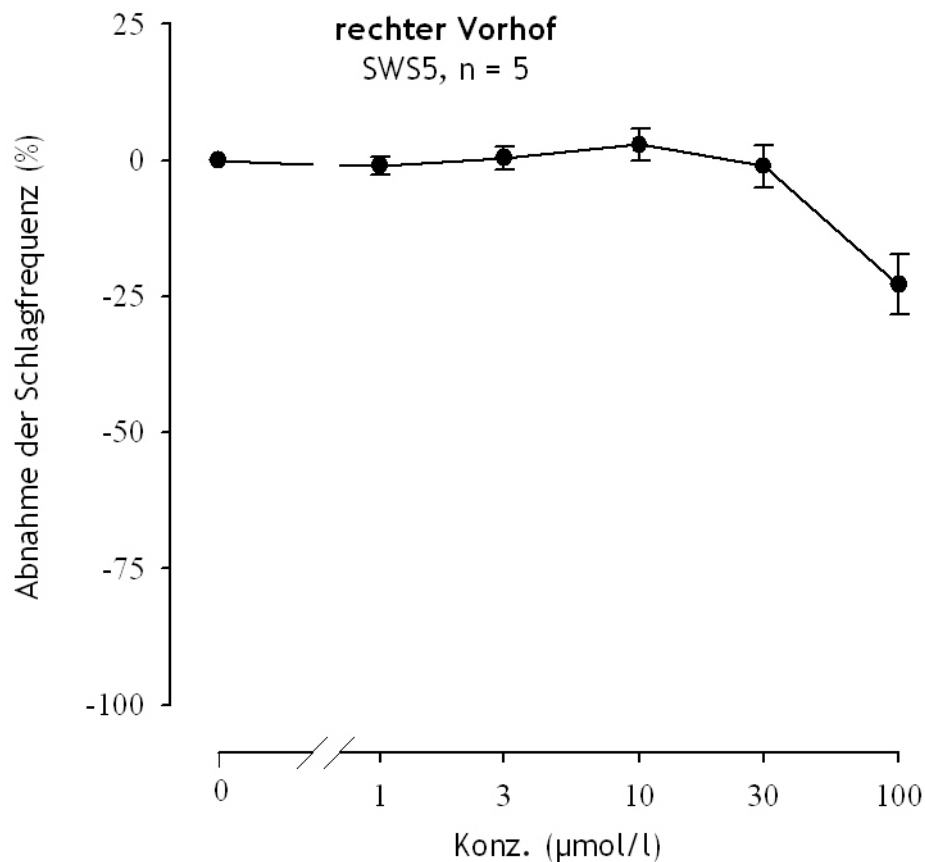
Tabelle 17: *Wirkung von SWS5 auf das Artrium cordis dextrum*

SWS5 [mol/l]	f ± SEM [x/min]	f ± SEM [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$205 \pm 3,87$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$203 \pm 5,61$	$-01,00 \pm 1,70$	5	n.s.
3	$206 \pm 6,60$	$+00,44 \pm 2,14$	5	n.s.
10	$211 \pm 7,97$	$+02,86 \pm 2,85$	5	n.s.
30	$203 \pm 9,70$	$-01,06 \pm 3,87$	5	n.s.
100	$158 \pm 11,14$	$-22,88 \pm 5,52$	5	0,01

Legende zur Tabelle 17:

In der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichungen (SEM) aus fünf Präparaten. Die Schlagfrequenz f wird in Schlägen pro Minute und in Prozent angegeben.

Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS5 am rechten Vorhof



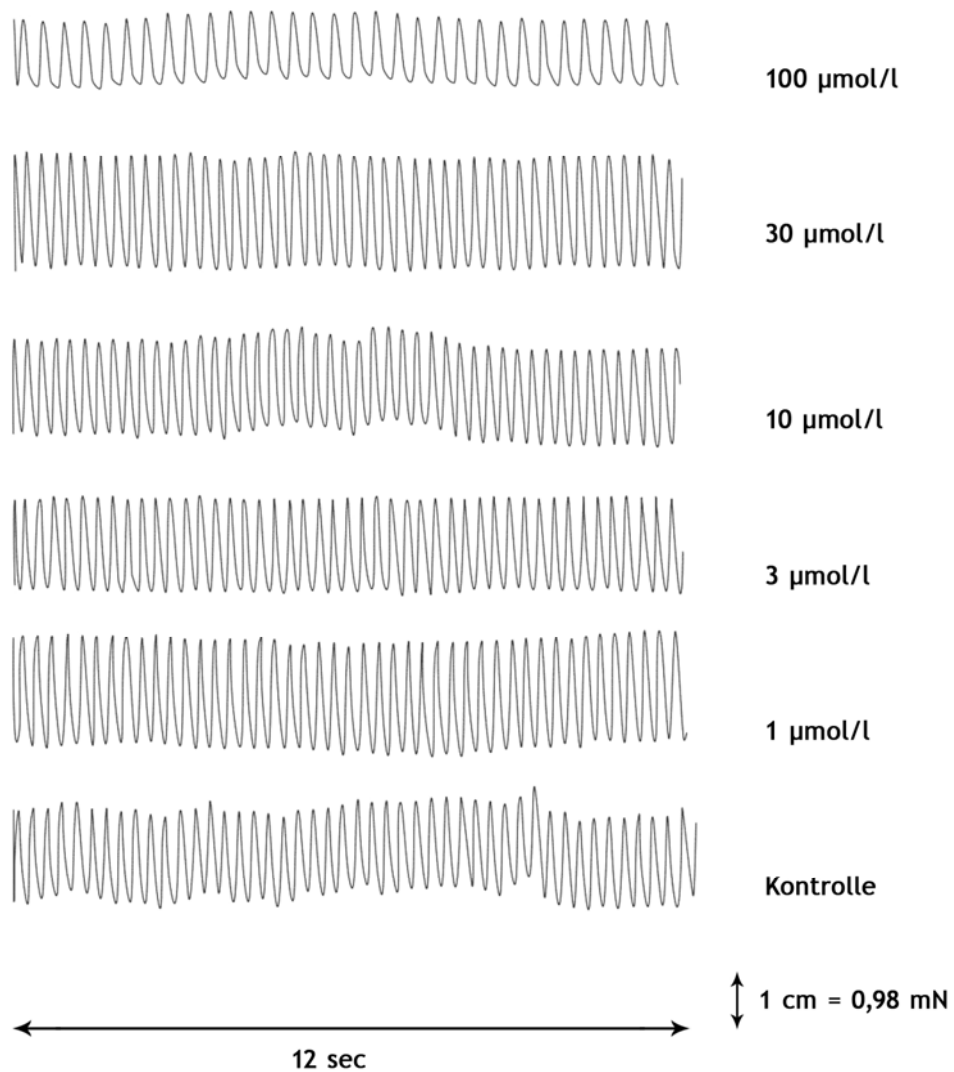
Legende zur Abbildung 27:

Die Konzentrations-Wirkungskurve beschreibt eine nahezu gleich bleibende Schlagfrequenz bei Konzentrationen von 1 – 30 $\mu\text{mol/l}$. Erst bei Konzentrationen über 30 $\mu\text{mol/l}$ nimmt die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes etwas stärker ab, jedoch wird keine EC_{50} erreicht.

Die Abszisse enthält die logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ und die Ordinate die lineare Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte ($n=5$), die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen dar.

Abbildung 28: *Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS5 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes*



Legende zur Abbildung 28:

Die Originalabbildung zeigt die Schlagfrequenz, welche der rechte Vorhof nach 45 Minuten nach jeweiliger Konzentrationszugabe aufweist.

4.2.5 Wirkung von SWS5 auf die Kontraktionskraft des isolierten Musculus papillaris

Zur Untersuchung der Auswirkung von SWS5 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels wurden sechs Versuche durchgeführt. Die Versuchsbedingungen und Versuchsabläufe wurden genauso wie bereits in Kapitel 3.5.5 beschrieben angewendet.

Die durchschnittliche Kontraktionskraft der sechs Papillarmuskeln am Ende der Kontrollphase betrug $10,28 \pm 2,63$ mN. Nach einer etwas stärkeren Zunahme von nahezu einem fünftel der Kontraktionskraft bei einer Konzentration von über 10 $\mu\text{mol/l}$ fällt die Kontraktionskraft fast wieder bis zum Kontrollwert.

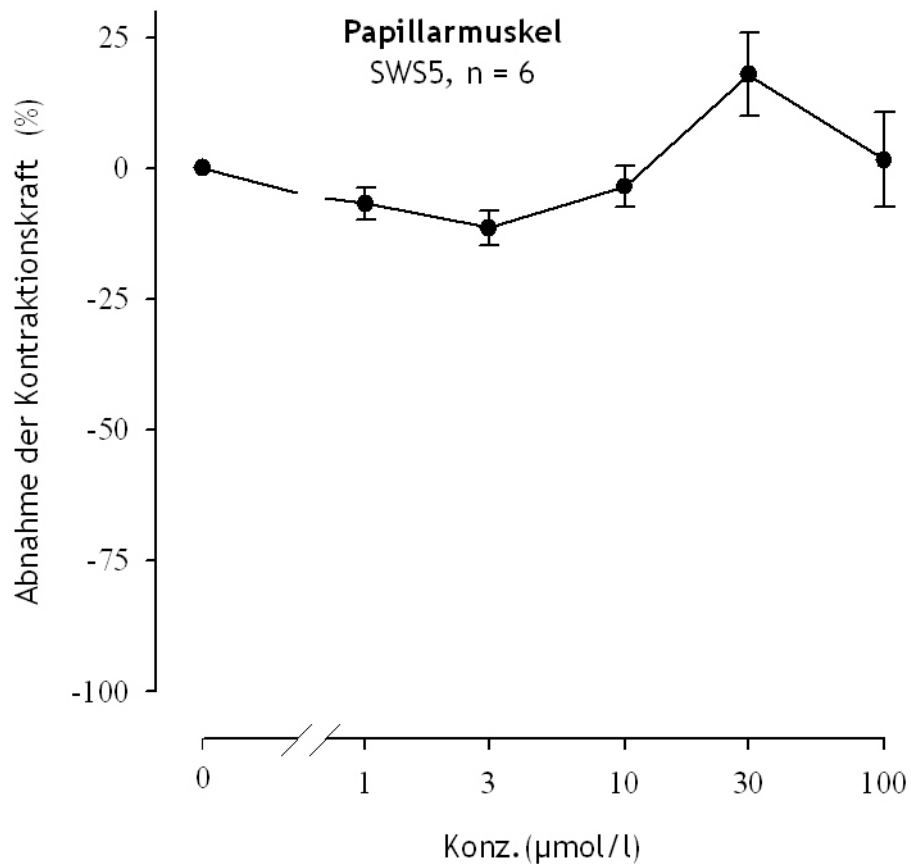
Tabelle 18: *Wirkung von SWS5 auf den Papillarmuskel*

SWS5 [mol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$10,28 \pm 2,63$	$00,00 \pm 0,00$	6	-
1	$09,46 \pm 2,30$	$-06,75 \pm 3,04$	6	n.s.
3	$08,98 \pm 2,18$	$-11,46 \pm 3,33$	6	0,01
10	$09,91 \pm 2,51$	$-03,52 \pm 3,94$	6	n.s.
30	$12,27 \pm 3,37$	$+17,84 \pm 7,99$	6	n.s.
100	$09,58 \pm 2,23$	$+01,53 \pm 9,04$	6	n.s.

Legende zur Tabelle 18:

In der Tabelle sind von sechs Versuchen die durchschnittlichen Werte der Kontraktionskraft (f_c) und deren Standardabweichungen (SEM) sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

Abbildung 29: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS5 auf den Papillarmuskel

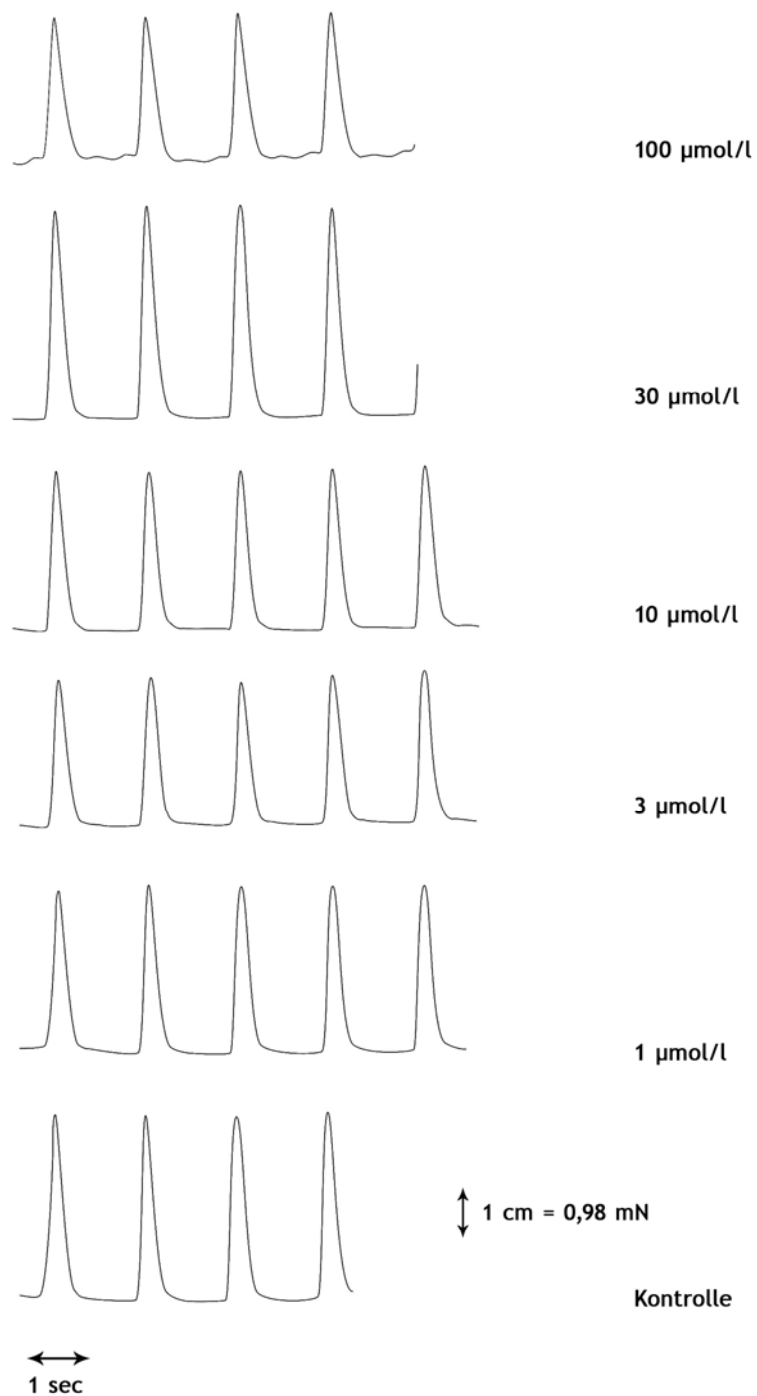


Legende zur Abbildung 29:

Die Graphik beschreibt den Effekt von SWS5 bei steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels. Die Konzentrationen der Substanz in $\mu\text{mol/l}$ wurden auf der Abszisse, die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.

Die Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten ($n=6$), die Länge der Balken den dazu gehörigen Standardfehlern.

Abbildung 30: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS5 auf den Papillarmuskel



Legende zur Abbildung 30:

Durch die Zugabe der Testsubstanz in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten in den verschiedenen Konzentrationen wurde durch den Detektor die Auswirkung auf die Kontraktionsamplitude festgehalten.

5. DISKUSSION

Die Aufgabe dieser Diplomarbeit bestand darin, die Wirkung hinsichtlich der Kontraktionskraft der Aorta, der Arteria pulmonalis, des terminalen Ileums und des Papillarmuskels sowie der Schlagfrequenzänderung des rechten Vorhofes zu untersuchen.

In den nächsten Kapiteln wird genauer unterschieden im Hinblick auf der Wirkung auf glattemuskuläre Organe und der Wirkung auf die Herzmuskulatur.

5.1 Einfluss von WHGMS174 auf die isolierten Organe von Meerschweinchen

5.1.1 Wirkung von WHGMS174 auf glattemuskuläre Organe

Tabelle 19: *Wirkung von WHGMS174 auf die glatte Muskulatur*

Organpräparat	WHGMS174 Kontraktionskraft f_c (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	$-24,91 \pm 6,45$	-
Arteria pulmonalis	$-23,86 \pm 5,98$	-
terminales Ileum	$-60,78 \pm 6,95$	18,55

In der Tabelle 19 gut ersichtlich ist die Wirkung von WHGMS174 auf Organe mit glatter Muskulatur. Am Ende der Versuchsreihen an den Aorten und den Arterien pulmonalis verringerte die Testsubstanz die Kontraktionskraft um nur rund ein Viertel und somit konnte bis zu der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ keine EC_{50} erreicht werden. Hingegen hatte die Substanz einen Effekt auf das terminale Ileum, die EC_{50} wurde bei einer Konzentration von 18,55 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt.

5.1.1.1 Wirkung von WHGMS174 auf die Aorta

Die durchgeführten Versuchsreihen mit der Testsubstanz WHGMS174 an der isolierten Aorta ergaben bei kumulativer Substanzzugabe eine stetig leichte Abnahme der Kontraktionskraft bis zu einer Abnahme von $24,29 \pm 6,45 \%$ bei $100 \mu\text{mol/l}$. Obwohl die Abnahme der Kontraktilität in allen durchgeführten Versuchen deutlich zu sehen war, konnte keine EC_{50} erreicht werden.

5.1.1.2 Wirkung von WHGMS174 auf die Arteria pulmonalis

Nach dem sich das jeweilige Präparat durch Zugabe der KCl-Lösung maximal kontrahiert hatte und aus den sechs Versuchen ein durchschnittlicher Kontrollwert ermittelt wurde, konnte nach Zugabe der ersten Konzentrationsstufe von $1 \mu\text{mol/l}$ ein geringer Effekt von $3,03 \pm 1,31 \%$ auf die Kontraktionskraftabnahme erzielt werden. Bei jeder weiteren Konzentrationsstufe von 3; 10; 30 und $100 \mu\text{mol/l}$ nahm die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis kontinuierlich ab. Jedoch betrug die Abnahme im Endeffekt nur $23,86 \pm 5,98 \%$. Bei diesen Versuchsreihen konnte eine EC_{50} nicht erreicht werden.

5.1.1.3 Wirkung von WHGMS174 auf das terminale Ileum

Im Vergleich zu den anderen vier getesteten isolierten Organen war der Einfluss von WHGMS174 auf die Wirkung am terminalen Ileum viel ausgeprägter. Schon nach bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ ließ die Kontraktionskraft um $31,21 \pm 5,02 \%$ nach. Diese Wirkung konnte nicht bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ an der Aorta oder der Arteria pulmonalis erreicht werden. Die Versuche endeten bei einer durchschnittlichen Abnahme der Kontraktion von $60,78 \pm 6,95 \%$.

Durch Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurve konnte eine EC_{50} von $18,55 \mu\text{mol/l}$ graphisch ermittelt werden.

5.1.2 Wirkung von WHGMS174 auf die Herzmuskulatur

Tabelle 20: *Wirkung von WHGMS174 auf die Herzmuskulatur*

Organpräparat	WHGMS174 Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
rechter Vorhof	+1,26 ± 3,68	-
Papillarmuskel	-0,63 ± 3,36	-

Durch die Versuche am rechten Vorhof und am Papillarmuskel wurde keine signifikante Änderung der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz gegen Ende der Versuche bei einer Konzentration von 100 µmol/l festgestellt.

Es wurde sowohl am rechten Vorhof als auch am Papillarmuskel keine EC₅₀ erreicht.

5.1.2.1 Wirkung von WHGMS174 auf den rechten Vorhof

Die Versuchsreihen am rechten Vorhof zeigen ganz deutlich, dass die Testsubstanz WHGMS174 nahezu keine Wirkung auf die Schlagfrequenz hat, denn der maximale Effekt, welcher erzielt werden konnte, war ein positiv chronotroper Effekt von 1,38 ± 2,06 % bei 30 µmol/l. Eine EC₅₀ konnte somit bei weitem nicht erreicht werden.

5.1.2.2 Wirkung von WHGMS174 auf den Papillarmuskel

Durch die Untersuchungen am Papillarmuskel wurde ebenfalls nur eine sehr geringe Wirkung auf die Kontraktionskraft nachgewiesen. Bei der ersten Substanzzugabe von 1 µmol/l nahm die Kontraktionskraft nur um 4,28 ± 9,80 % ab. Durch schrittweise Erhöhung der Substanzkonzentration näherte sich die Kontraktionskraft wieder dem Ausgangswert und bei der Konzentrationsstufe von 30 µmol/l stieg die Kontraktilität des Papillarmuskels um 3,08 ± 3,86 %, worauf sie jedoch bei der nächsten und letzten Konzentrationsstufe von 100 µmol/l wieder näher an den Kontrollwert herunter sank. Und somit wurde kein EC₅₀ Wert erreicht.

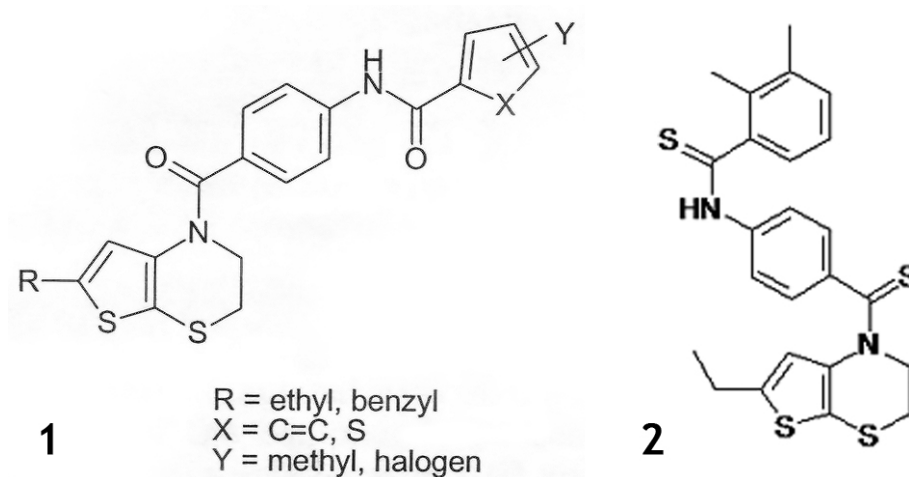
5.2 Vergleich von WHGMS174 und anderen Thienothiazinen

Galanski et al. (2005) untersuchte neu synthetisierte Substanzen mit einer Thienothiazinstruktur hinsichtlich ihrer Wirkung auf isolierte Meerschweinchenpräparate und untersuchte ihr Potential als Vasopressinrezeptorantagonisten.

Die Testsubstanz WHGMS174 weist ebenfalls eine Thienothiazinstruktur auf.

In der Abbildung 31 ist ersichtlich, dass sich WHGMS174 von denen in der oben angeführten Studie untersuchten Substanzen in der Grundstruktur unterscheidet. Und zwar wurden die zwei Sauerstoffgruppen durch Schwefelreste ersetzt.

Abbildung 31: Grundstruktur der auf der Thienothiazinstruktur basierenden Substanzen (1) und die Testsubstanz WHGMS174 (2)



Die Ergebnisse der Studie Galanski et al. (2005) zeigten, dass die untersuchten Substanzen, von welchen die Grundstruktur in Abbildung 31 ersichtlich ist, einen stärker ausgeprägten Effekt auf die glattemuskulären Präparate aufzeigten, als auf die Herzmuskulatur.

Die Versuchsaapparaturen, sowie die Versuchsbedingungen und Versuchabläufe waren identisch mit jenen in Kapitel 3 vorgestellten Methoden und Materialien.

Alle untersuchten Substanzen zeigten eine Steigerung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels, jedoch war diese nicht sehr ausgeprägt. Sie hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Chronotropie des rechten Vorhofs (Galanski et al. 2005).

Die untersuchte Substanz WHGMS174 hatte wie in Kapitel 5.1.2 ersichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Herzmuskulatur.

Galanski et al. (2005) untersuchte den Effekt der Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln in Anwesenheit von Vasopressin. Vasopressin zeigte einen zeitabhängigen Effekt auf Papillarmuskeln. Vasopressin in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 3$) bewirkte einen negativ inotropen Effekt während der ersten 1,5 Minuten und führte zu einer Änderung des Effekts nach 2 Minuten indem es eine positiv inotrope Wirkung herbeiführte. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Fujisawa und Iijima (Fujisawa et al. 1999). Hier wurde ermittelt, dass Vasopressin in Konzentrationen von 0,3 und 3 $\mu\text{mol/l}$ zu Beginn einen negativ inotropen Effekt gefolgt von einem positiven inotropen Effekt herbeiführt.

In Anwesenheit von Vasopressin (3 $\mu\text{mol/l}$) wurden die Testsubstanzen in den Konzentrationen von 1 oder 10 $\mu\text{mol/l}$ hinsichtlich ihrer Kontraktionskraft auf den Papillarmuskel untersucht und es wurde ermittelt, dass der zeitabhängige Effekt von Vasopressin durch die Testsubstanzen antagonisiert wurde (Galanski et al. 2005).

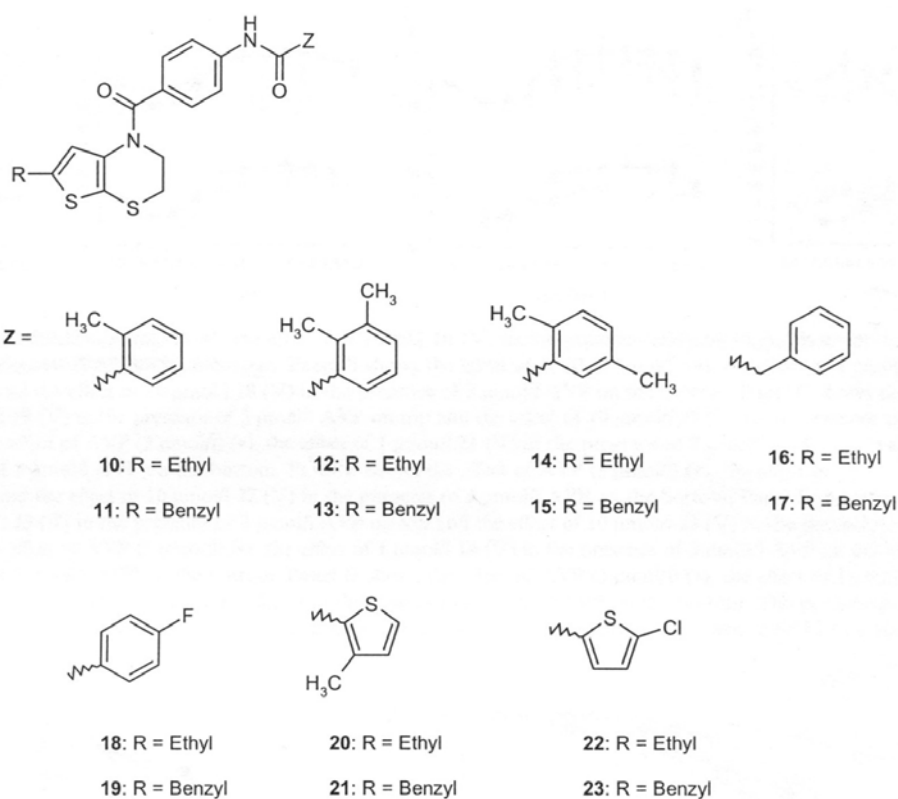
Wie oben erwähnt hatten die Substanzen einen stärker ausgeprägten Einfluss auf die Aorta, die Arteria pulmonalis und das Ileum als auf den Papillarmuskel und den Vorhof. Im Hinblick auf die glattemuskulären Organe zeigten die getesteten Substanzen den stärksten Effekt auf die Kontraktionskraftabnahme des terminalen Ileums. Erklärbar wäre dieses Ergebnis durch einen Unterschied der Rezeptorendichte zwischen vaskulären glatten Muskelzellen und glatten Muskelzellen des terminalen Ileums (Galanski et al. 2005).

Tabelle 21: Wirkung von Substanzen mit Thienothiazin Struktur auf glattmuskuläre Organe

Testsubstanzen	Aorta - EC ₅₀	Arteria pulmonalis - EC ₅₀	Ileum - EC ₅₀
Nr. 14	84,00 µmol/l	30,00 µmol/l	7,70 µmol/l
Nr. 16	22,90 µmol/l	14,40 µmol/l	1,50 µmol/l
Nr. 19	86,75 µmol/l	-	15,15 µmol/l
Nr. 23	92,00 µmol/l	100,00 µmol/l	23,30 µmol/l
WHGMS174	-	-	18,55 µmol/l

In der Tabelle 21 ist ersichtlich, dass diese getesteten Substanzen einen stark ausgeprägten Effekt auf das terminale Ileum aufweisen.

Abbildung 32: Strukturformeln der Testsubstanzen



5.3 Einfluss von SWS5 auf die isolierten Organe von Meerschweinchen

5.3.1 Wirkung von SWS5 auf glattmuskuläre Organe

Tabelle 22: *Wirkung von SWS5 auf die glatte Muskulatur*

Organpräparat	SWS5 Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Aorta	-113,23 ± 3,12	6,3
Arteria pulmonalis	-92,75 ± 1,29	11,2
terminales Ileum	-102,27 ± 2,64	9,5

Wird der Vergleich der Wirkung auf die Organe der glatten Muskulatur angestellt, ist ersichtlich, dass die EC₅₀ bei allen drei isolierten Organen im Durchschnitt bei 9,0 µmol/l erreicht wird und die Abnahme der Kontraktion am Ende der Versuche bis zum Ausgangswert stattgefunden hat.

5.3.1.1 Wirkung von SWS5 auf die Aorta

Bei der ersten Konzentrationsstufe von 1 µmol/l wies die Substanz SWS5 nur einen vernachlässigbaren Wert von $2,09 \pm 1,91$ % Kontraktionskraftabnahme auf, durch weitere Substanzzugabe von 3 µmol/l sank die Kontraktionskraft rasant auf $18,03 \pm 5,04$ %. Bei einer Konzentration von 6,3 µmol/l wurde der EC₅₀ erreicht. Durch weitere Erhöhung der Konzentration sank die Kontraktilität noch sehr rasch ab, gegen Ende der Versuche sank sie zwar noch immer, jedoch um einiges langsamer.

5.3.1.2 Wirkung von SWS5 auf die Arteria pulmonalis

Die Versuchsreihen von SWS5 an der Arteria pulmonalis sind denen an der Aorta sehr ähnlich. Im Konzentrationsbereich von 3 - 30 µmol/l hat SWS5 einen sehr starken Einfluss auf die Abnahme der Kontraktionskraft, bei Konzentrationen davor und danach hingegen ist zwar eine Wirkung ersichtlich, jedoch nicht mehr so ausgeprägt. Eine EC₅₀ wurde bei einer Konzentration von 11,2 µmol/l erreicht. Am

Ende der Versuche bei 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde ein durchschnittlicher Wert von $92,75 \pm 1,29 \%$ Kontraktionskraftabnahme erreicht.

5.3.1.3 Wirkung von SWS5 auf das terminale Ileum

Im Rahmen Untersuchungen der Wirkung von SWS5 auf die glatte Muskulatur erzielte auch das dritte untersuchte Organ, das terminale Ileum, einen ausgeprägten Effekt. Die Konzentrations-Wirkungskurve glich wieder sehr stark jener an der Aorta und auch jener an der Pulmonalis. Bei einer Zugabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ sank die Kontraktionskraft zwar nur um $6,54 \pm 1,25 \%$, bis zu der Konzentration von 9,5 $\mu\text{mol/l}$ konnte jedoch schon der EC_{50} Wert erreicht werden. Bei einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ sank die Kontraktionskraft nahe dem Ausgangswert auf $102,27 \pm 2,64 \%$ ab.

5.3.2 Wirkung von SWS5 auf die Herzmuskulatur

Tabelle 23: *Wirkung von SWS5 auf die Herzmuskulatur*

Organpräparat	SWS5 Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
rechter Vorhof	-22,88 ± 5,52	-
Papillarmuskel	+1,53 ± 9,04	-

Der Einfluss von SWS5 auf die Herzmuskulatur ist im Gegensatz zum Einfluss auf die glatte Muskulatur nicht so stark. Es konnte nur am rechten Vorhof eine Abnahme der Schlagfrequenz um knapp ein Viertel erreicht werden, jedoch zeigte sich nahezu keine Wirkung auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels bei 100 µmol/l.

5.3.2.1 Wirkung von SWS5 auf den rechten Vorhof

In einem Konzentrationsbereich von 1-30 µmol/l beeinflusste die Testsubstanz SWS5 kaum die Schlagfrequenz eines isolierten rechten Vorhofes, da die Schlagfrequenz während dieses Konzentrationsbereich um den Kontrollwert mit maximal rund 3 % abwich. Durch die Zugabe der letzten Konzentrationsstufe von 100 µmol/l konnte letztendlich noch eine Kontraktionskraftabnahme auf $22,88 \pm 5,52$ % erreicht werden.

5.3.2.2 Wirkung von SWS5 auf den Papillarmuskel

Bei Konzentrationen von 1 – 3 µmol/l nimmt die Kontraktionskraft des Papillarmuskels ab und zwar bis zu einem durchschnittlichen Wert von $11,46 \pm 3,33$ %. Durch Erhöhung der Substanzkonzentration nimmt die Kontraktionskraft sogar wieder zu und zwar um $17,84 \pm 7,99$ % bei 30 µmol/l. Wird die Konzentration nun nochmals erhöht, geht die Kontraktionskraft wieder zurück auf $1,53 \pm 9,04$ % und erreicht somit nahezu wieder den Kontrollwert.

5.4 Vergleich H₂S und SWS5

Zhao et al. (2001) untersuchte Schwefelwasserstoff hinsichtlich kardiovaskulärer Effekte sowohl in vivo als auch in vitro.

Die Versuche an anästhesierten Ratten zeigten, dass eine intravenöse Bolusinjektion von H₂S (2,8 and 14 µmol/kg KG) keine Änderung der Herzfrequenz bewirkt.

Jedoch bewirkte diese Bolusinjektion eine vorübergehende Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Versuche mit Pinacidil (2,8 µmol/kg KG), einem K_{ATP}-Kanal-Öffner führten ebenfalls zu einer Steigerung des Blutdrucks. Wird vor der H₂S Bolusinjektion Glibenclamid, ein K_{ATP}-Kanal-Blocker, verabreicht, wird der Effekt von H₂S antagonisiert.

Diese in vivo Ergebnisse deuten darauf hin, dass der blutdrucksenkende Effekt von H₂S wahrscheinlich durch eine Relaxation von Blutgefäßen durch Öffnung von K_{ATP}-Kanälen herbeigeführt wurde. Die kurze Dauer des blutdrucksenkenden Effekts könnte auf die Plünderung von H₂S durch Metalloproteinen, Proteinen mit Disulfidstruktur, Thio-S-methyl-Transferase und Hämverbindungen zurückzuführen sein. Auch die Gabe von H₂S als Bolusinjektion erklärt teilweise den vorübergehenden Effekt. Der Effekt von Pinacidil war ebenfalls vorübergehend.

Weiters zeigen die Ergebnisse, dass der in vivo blutdrucksenkende Effekt von H₂S durch spezifische Wirkung an vaskulären glatten Muskelzellen zustande kommt, da die Herzfrequenz nicht signifikant beeinflusst wurde.

Die Studie zeigte, dass H₂S relaxierend auf isolierte Aortapräparate wirkt bei Konzentrationen von 18 und 60 µmol/l, wobei die Aorta mit Phenylephrin vokontrahiert wurde (Zhao et al. 2001).

Untersuchungen ergaben, dass der H₂S Blutplasmaspiegel bei Wistar Ratten ~ 10 µmol beträgt (Mason et al. 1978). Zhao et al. (2001) ermittelte einen H₂S Blutplasmaspiegel bei SD Ratten von ca. 50 µmol. Es ist bekannt, dass die Konzentration im Gewebe höher ist als im Blut. Die Konzentration von H₂S im Gehirn beträgt rund 50 – 160 µmol (Hosoki et al. 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass H₂S eine Vasorelaxation hervorruft und dies innerhalb eines physiologisch relevanten Konzentrationsbereichs.

Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass, ähnlich wie NO und CO, H₂S ein weiterer intrinsischer gasförmiger vasoaktiver Faktor ist.

Zhao et al. (2001) untersuchte auch die Wirkung von H₂S auf mit KCl-Lösung vorkontrahierte Aorten. H₂S führte zu einer starken Relaxation (maximale vaskuläre Relaxation bei 60 µmol: 90 ± 8,2 %) bei Aortapräparaten, welche mit 20 mmolarer KCl-Lösung vorkontrahiert wurden, zeigten jedoch eine geringe Wirkung (maximale vaskuläre Relaxation bei 60 µmol: 19 ± 3,9 %) an Aorten, welche mit 100 mmolarer KCl-Lösung vorkontrahiert wurden.

Die Testsubstanz SWS5 konnte folgende Ergebnisse erzielen. 100 µmol/l der Testsubstanz bewirkten eine maximale Relaxation an der Aorta von 113,23 ± 3,12 % bei einer Vorkontrahierung mit 90 mmolarer KCl-Lösung. Bei Vergleich mit den oben angeführten Ergebnisse von Zhao et al. (2001) könnte man darauf schließen, dass nicht nur H₂S zur Relaxation führt.

Außerdem fand Zhao et al. (2001) heraus, dass die H₂S induzierte Vasorelaxation hauptsächlich durch die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen in vaskulären glatten Muskelzellen und teilweise auch durch K⁺ Leitfähigkeit in Endothelzellen zu Stande kommt. Im Gegensatz dazu ist für die NO und CO induzierte Vasorelaxation eine Aktivierung des cGMP-Mechanismus wichtig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Diplomarbeit war die Testsubstanzen WHGMS174 und SWS5 hinsichtlich ihrer Wirkung auf isolierte Organe von Meerschweinchen zu untersuchen.

Die Versuche wurden an der Aorta, der Arteria pulmonalis, am terminalen Ileum, am rechten Vorhof und am Papillarmuskel durchgeführt und dadurch das Ausmaß der Kontraktionskraftabnahme sowie der Schlagfrequenz ermittelt.

Die Testsubstanz WHGMS174 hatte nahezu keinen Einfluss auf die Kontraktionskraft und die Schlagfrequenz der Herzmuskeln, denn sowohl der Papillarmuskel als auch der rechte Vorhof zeigten keine Veränderungen bei Konzentrationen bis zu 100 $\mu\text{mol/l}$.

An der glatten Muskulatur der untersuchten Organe, und zwar der Aorta, der Arteria pulmonalis und dem terminalen Ileum, konnte nur am terminalen Ileum ein EC_{50} Wert von 18,55 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden, während an der Aorta und der Arteria pulmonalis bei einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ die Kontraktionskraftabnahme nur rund ein Viertel betrug.

Die zweite getestete Substanz SWS5 wies schwach negativ chronotrope Effekte am rechten Vorhof auf und hatte nahezu keinen Einfluss auf die Ionotropie des Papillarmuskels.

Hingegen konnten an der glatten Muskulatur durchwegs dilatierende Effekte aufgezeigt werden. Bei Versuchen an allen drei Organen wurde ein EC_{50} Wert von durchschnittlich 9,0 μmol erreicht, außerdem nahm die Kontraktion bis zum Ende der Versuche bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ fast bis zum Ausgangswert wieder ab.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Austria-Codex Fachinformation (2008). Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft mbH Wien

Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, Ishido M, Barberis C, Antaramian A, Brabet P, Rosenthal W (1992) Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357: 333-335

De Keyser Y, Auzan C, Lenne F, Beljod C, Thibonnier M, Bertagna X, Clauser E, (1994) Cloning and characterization of the human V₃ pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett* 356: 215-220

Forth W, Henschler d, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer

Fujisawa s, Iijima T (1999) On the inotropic actions of arginine vasopressin in ventricular muscle of the guinea pig heart. *Jpn J Pharmacol* 81: 309-312

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

Galanski ME, Erker T, Handler N, Lemmens-Gruber R, Kamyar M, Studenik CR (2005) Studies on the chemistry of thienoanellated O,N- and S,N-containing heterocycles. Part 30: Synthesis and pharmacological properties of thieno [2,3-*b*][1,4]thiazines with potential vasopressin receptor antagonistic activity. *Bioorg Med Chemistry* 14: 826-836

Grazzini E, Lodboerer AM, Perez-Martin A, Joubert D, Guillon G (1996) Molecular and functional characterization of V_{1b} vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology* 137: 3906-3914

Guillon G, Butlen D, Cantau B, Barth T, Jard S (1982) Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla: relation to adenylate cyclase activation. *Eur J Pharmacol* 85: 291-304

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulphide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 527-531

Howl J, Ismail T, Strain AJ, Kirk CJ, Anderson D, Wheatley M (1991) Characterization of the human liver vasopressin receptor. *Biochem J* 276: 189-195

Jans DA, Peters R, Zsigo J, Fahrenholz F (1989) The adenylate cyclase-coupled vasopressin V₂-Receptor is highly laterally mobile in membranes of LLC-PK1 renal epithelial cells at physiological temperature. *EMBO J* 8: 2481-2488

Jard S, Gaillard RC, Guillon G, Marie J Schoeneberg P, Muller AF, Manning M, Sawyer WH, (1986) Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol Pharmacol* 30: 171-177

Laszlo FA, Laszlo Jr F, De Wied D (1991) Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev* 43: 73-108

Lee CR, Watkins ML, Patterson JH, Gattis W, O'Connor CM, Gheoghiade M, Adams Jr KF (1995) Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am Heart J* 146: 9-18

Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ (1992) Cloning and characterization of a vasopressin V₂ receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357: 336-339

Mah SC, Hofbauer KG (1987) Antagonists of arginine-vasopressin: experimental and clinical applications. *Drugs Future* 12: 1055-1070

Mason J, Cardin CJ, Dennehy A (1978) The role of sulphide and sulphide oxidation in the copper molybdenum antagonism in rats and guinea pigs. *Res Veter Sci* 24: 104-108

Morel A, O'Carroll AM, Brownstein, MJ, Lolait SJ (1992) Molecular cloning and expression of a rat V_{1a} arginine vasopressin receptor. *Nature* 356: 523-526

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, (2001) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Arakawa K, Ichihara A, Nakamoto H, Oka K, Yamamura Y, Saruta T (1997) Effects of oral AVP receptor antagonists OPC-21286 and OPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. *Am J Physiol* 267: H2245-H2254

Phillips PA, Abrahams JM, Kelly JM, Mooser V, Trinder D, Johnston CI (1990) Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V₁ and V₂ selective ligands. *Endocrinology* 126:1487-1484

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

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81: 133-176

Serradeil-Le Gal C, Herbert JM, Delisee C, Schaeffer P, Raufaste D, Garcia C, Dol F, Marty E, Maffrand JP, LeFur G (1995) Effect of SR49059, a vasopressin V_{1a} antagonist, on human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268: 404-410

Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H (1994) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V_{1b} vasopressin receptor. *J Biol Chem* 269: 27088-27092

Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M (2002) Molecular pharmacology and modelling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res* 139: 179-196

Thibonnier M (2003) Vasopressin receptor antagonists in heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 3: 683-687

Thibonnier M, Roberts JM (1985) Characterization of human platelet vasopressin receptors. *J Clin Invest* 76: 1857-1764

Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E (1994) Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V_{1a} vasopressin receptor. *J Biol Chem* 269: 3304-3310

Wang R, Wang ZZ, Wu L (1997a) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 121: 927-934

Wang R, Wu L, Wang ZZ (1997b) The direct effect of carbon monoxide on K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 434: 285-291

Yamamura Y, Ogawa H, Chihara T, Kondo K, Onogawa T, Nakamura S, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi T (1991) OPC-21268, an orally effective, nonpeptide vasopressin V₁ receptor antagonist. *Science* 252: 572-74

Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T (1992) Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V₂ receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 105: 787-791

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *The EMBO Journal* Vol. 20 No. 21: PP 6008-6016

Curriculum vitae

Name: Maria Huber

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 19.02.1984
Geburtsort: Hainburg/Donau
Wohnort: Römerstr.2, 2465 Höflein
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Hermann (Polizist) und
Maria (Buchhalterin) Huber

Ausbildung:

1990-1994 Volksschule, Göttlesbrunn
1994-1998 Hauptschule, Bruck/Leitha
1998-2003 Handelsakademie, Bruck/Leitha
Okt. 2003 Beginn des Pharmaziestudiums an der
Universität Wien
Sept. 2008 Beginn der Diplomarbeit am Department
für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Wien