



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

WIRKUNG VON ZWEI NEU SYNTHETISIERTEN STILBENDERIVATEN
(KJ5 UND KJ16) AUF DIE GLATTE MUSKULATUR UND
HERZMUSKULATUR VON MEERSCHWEINCHEN

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Nicolas Ruhm
Matrikel-Nummer:	9706612
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie (A449)
Betreuerin / Betreuer:	Ao.Univ.- Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, im Mai 2009

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für seine Unterstützung und freundliche Betreuung während meiner Diplomarbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Pakiza Rawnduzi und Herrn Peter Höflich bedanken, die einen reibungslosen Ablauf im Labor ermöglichten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie.

Wer kämpft kann verlieren,
wer nicht kämpft, hat schon verloren
Bertolt Brecht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Ziel dieser Diplomarbeit	5
1.2 Resveratrol	6
1.2.1 Vorkommen und Geschichte von Resveratrol.....	6
1.2.2 Wirkung von Resveratrol.....	8
1.2.3 Biosynthese von Resveratrol	9
2 Material und Methodik	10
2.1 Testsubstanzen.....	10
2.2 Versuchstiere.....	12
2.3 Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode) und Begasung.....	13
2.4 Versuchsanordnung und Apparaturen	14
2.4.1 Versuchsapparatur I	15
2.4.2 Versuchsapparatur II	17
2.4.3 Kraftwandler.....	19
2.4.4 Gasversorgung.....	20
2.5 Isolierung und Präparation der Organe.....	21
2.5.1 Entnahme des Herzens und Isolierung der Arteria pulmonalis.....	21
2.5.2 Isolierung des Atrium dexter	21
2.5.3 Isolierung der Musculi papillares.....	22
2.5.4 Isolierung des Ileum terminalis	22
2.5.5 Isolierung und Präparation der Aorta.....	23
2.6 Durchführung der Versuche	24
2.6.1 Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis	24
2.6.2 Versuchsablauf bei Aorta	25
2.6.3 Versuchsablauf bei terminalem Ileum	26
2.6.4 Versuchsablauf bei Atrium dexter.....	27
2.6.5 Versuchsablauf bei Musculi papillares	27
2.7 Auswertung der Ergebnisse.....	29
2.7.1 Atrium dexter	29
2.7.2 Musculi papillares.....	29
2.7.3 Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis.....	29

3. Ergebnisse	31
3.1 Testsubstanz KJ5.....	31
3.1.1 Wirkung auf Arteria pulmonalis	31
3.1.2 Wirkung auf die isolierte Aorta	34
3.1.3 Wirkung von KJ5 auf Ileum terminalis.....	37
3.1.4 Wirkung auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium dexter	40
3.1.5 Wirkung von KJ5 auf Musculi papillares.....	43
3.2 Testsubstanz KJ16.....	47
3.2.1 Wirkung auf die Arteria pulmonalis	47
3.2.2 Wirkung auf die isolierte Aorta	50
3.2.3 Wirkung von KJ16 auf Ileum terminalis.....	53
3.2.4 Wirkung auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium dexter	56
3.2.5 Wirkung von KJ16 auf Musculi papillares.....	59
3.3 Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf isolierte Organe.....	62
3.3.1 DMSO- Wirkung auf die Arteria pulmonalis	62
3.3.2 DMSO- Wirkung auf Aorta.....	63
3.3.3 DMSO- Wirkung auf Ileum terminalis	64
3.3.4 DMSO- Wirkung auf Musculi papillares	65
4. Diskussion.....	66
4.1 Vergleich der beiden Testsubstanzen an isolierten Organen	67
4.1.1 Vergleich bei Arteria pulmonalis	67
4.1.2 Vergleich bei isolierter Aorta.....	67
4.1.3 Vergleich bei Ileum terminalis.....	68
4.1.4 Vergleich bei Atrium dexter	68
4.1.5 Vergleich bei Musculi papillares.....	68
4.2 Die beiden Testsubstanzen im Vergleich mit Resveratrol.....	69
5. Zusammenfassung.....	71
6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Curriculum vitae	75

1. Einleitung

1.1 Ziel dieser Diplomarbeit

Ziel dieser Diplomarbeit war es, zwei neu synthetisierte Stilbenderivate (KJ5, KJ16), auf ihre Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen. Die beiden Testsubstanzen wurden am Institut für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert.

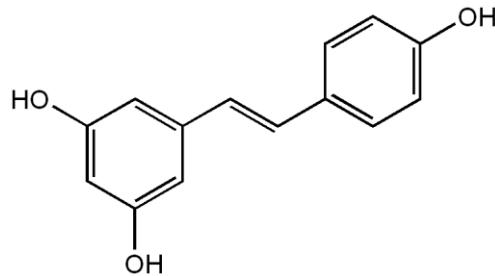
Bei den Testreihen wurden erstens die möglichen inotropen und chronotropen Wirkungen der beiden Testsubstanzen an Herzmuskelpräparaten getestet, zweitens wurde der Einfluss der beiden Substanzen auf die glatte Muskulatur überprüft.

Bei den Herzmuskelpräparaten handelte es sich um isolierte Papillarmuskeln und um isolierte Vorhöfe.

Um die Wirkung auf die glatte Muskulatur zu testen, wurden die beiden Testsubstanzen an isolierter Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis getestet.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend ausgewertet und mit den vorhandenen Werten der Leitsubstanz Resveratrol verglichen.

1.2 Resveratrol



(3,4',5-trihydroxystilben)

Abbildung 1: Strukturformel von Resveratrol

Resveratrol ist ein Sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, genauer gesagt ein Flavonoid aus der Gruppe der Polyphenole. Resveratrol wirkt biologisch als Phytoalexin. Phytoalexine sind antibiotische Stoffe, die zum pflanzeigenen Immunsystem gehören. Resveratrol wird von Pflanzen besonders dann in hoher Konzentration gebildet, wenn extreme äußere Bedingungen auf diese einwirken. Dabei kann es sich z.B. um Pilzinfektionen, extreme Trockenheit oder um erhöhte UV-Strahlung handeln (Celotti et al. 1996).

Chemisch gesehen handelt es sich um einen Stilbengrundkörper, der zusätzlich drei Hydroxylgruppen aufweist. Die beiden Phenylreste sind trans-ständig über eine Ethylenbrücke verbunden.

1.2.1 Vorkommen und Geschichte von Resveratrol

Resveratrol wird in hohen Konzentrationen in der Schale der roten Weintraube, aber auch in der Himbeere, Maulbeere, Erdnüssen und anderen Pflanzen, wie bestimmten Knötericharten gefunden.

Die wichtigste Pflanze jedoch ist *Vitis vinifera* aus der Familie der Vitaceae. Resveratrol konnte in den Reben, Wurzeln und Samen nachgewiesen werden, die höchste Konzentration wurde jedoch in den Schalen der Trauben gefunden (5-10 mg/ 100g Weintrauben, Celotti et al. 1996).

Rotwein war schon in der Antike als gesundheitsförderndes Getränk bekannt. Hippokrates (460 - 370 v. Chr.) empfahl die Gabe von Wein als Beruhigungs- und Schlafmittel, als Stärkungsmittel für Genesende und als Schmerzmedikation bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In der indischen Ayurveda-Medizin wurde bereits vor mehr als 2000 Jahren der fermentierte Saft von roten Trauben zur Behandlung von Herzerkrankungen verwendet. Ein Grund für die gefäßschützende Wirkung von Rotwein: der Inhaltsstoff Resveratrol. Dieser wurde erstmals 1963 im Japanischen Knöterich (*Polygonum cuspidatum*) isoliert und identifiziert. Diese Pflanze wurde in der japanischen Medizin zur Behandlung von Entzündungen und Herzerkrankungen eingesetzt. In Weintrauben wurde Resveratrol erstmals 1976 nachgewiesen. Vor 20 Jahren tauchte zum ersten Mal der Begriff des "Französischen Paradoxon" auf. Hinter diesem Phänomen steckt die Tatsache, dass die Franzosen - vor allem die Südfranzosen - trotz reichhaltiger und fettreicher Ernährung bis zu 40% weniger kardiovaskulären Erkrankungen entwickeln, als andere vergleichbare Zivilisationsgesellschaften. Eine Erklärung wurde rasch gefunden: Es ist der hohe Rotweinkonsum der Franzosen, der sich gefäßschützend auswirkt. In den letzten Jahren zeichnete sich immer mehr ab, dass Resveratrol eine besondere Rolle bei der Erklärung dieses Phänomens spielt (Aggarwal, B. B 2004).

1.2.2 Wirkung von Resveratrol

Die wissenschaftlichen Studien der letzten drei Jahrzehnte belegen herz- und gefäßschützende, krebshemmende, antioxidative, keimtötende und entzündungshemmende Eigenschaften von Resveratrol.

Die physiologischen Wirkungen von Resveratrol umfassen ein breites Spektrum. Präventiv und therapeutisch besitzt Resveratrol eine breite Anwendung und wird

- zum Zellschutz sowie bei
- Arteriosklerose,
- Krebserkrankungen,
- Demenz,
- Osteoporose und
- anderen degenerativen Erkrankungen

eingesetzt.

Antioxidativer Schutz

Wie auch andere Polyphenole besitzt auch Resveratrol eine starke antioxidative Wirkung (Soleas et al. 2001).

Gefäßschutz

Auch der Gefäßschutz beruht auf der antioxidativen Eigenschaft von Resveratrol. Es verhindert die durch Kupfer katalysierte LDL- Oxidation während die HDL- Oxidation steigt und verhindert damit die Entstehung von arteriosklerotischem Plaque. Resveratrol verhindert die Zusammenballung der Thrombozyten, was ebenfalls eine gefäßprotektive Eigenschaft darstellt (Zibikowska und Olas 2000, Soleas et al. 1997, Rotondo et al. 1993).

Antikanzerogene Wirkungen

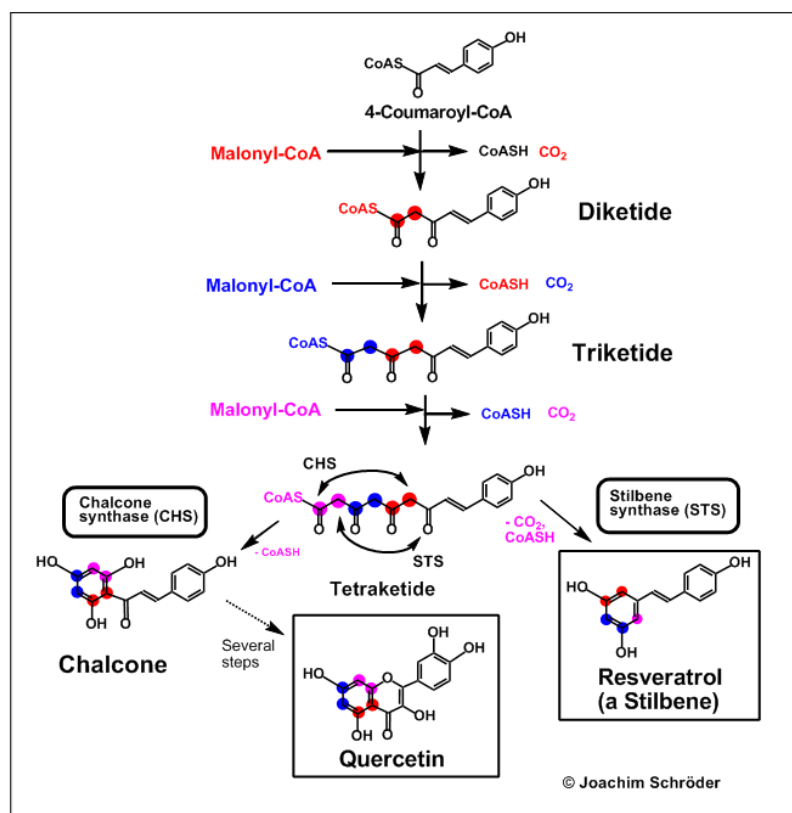
Resveratrol verhindert das Überleben von Krebszellen, indem es ein bestimmtes Protein, das so genannte „NF-kB“ (Nuclear factor kappa B) hemmt, das für das Überleben von Krebszellen verantwortlich ist.

1.2.3 Biosynthese von Resveratrol

Zwar kommen die Substrate für die Synthese des Resveratrol in allen Pflanzen vor, dennoch sind nicht alle Pflanzen befähigt Resveratrol zu synthetisieren. Der einfache Grund dafür ist, dass ein ganz spezielles Enzym dafür notwendig ist, nämlich die Resveratrolsynthase.

Die Biosynthese von Resveratrol verläuft über den Shikimisäure- Weg. Ausgangsprodukt für die Biosynthese ist die Aminosäure Phenylalanin, die in allen Pflanzen vorkommt. Diese wird über einige Zwischenschritte in die p- Coumarsäure umgewandelt. Im nächsten Schritt reagiert das Enzym Resveratrolsynthase mit 4-Coumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA und bildet Resveratrol (Schröder et al. 1988, Austin et al. 2004).

Abbildung 2: Biosynthese von Resveratrol

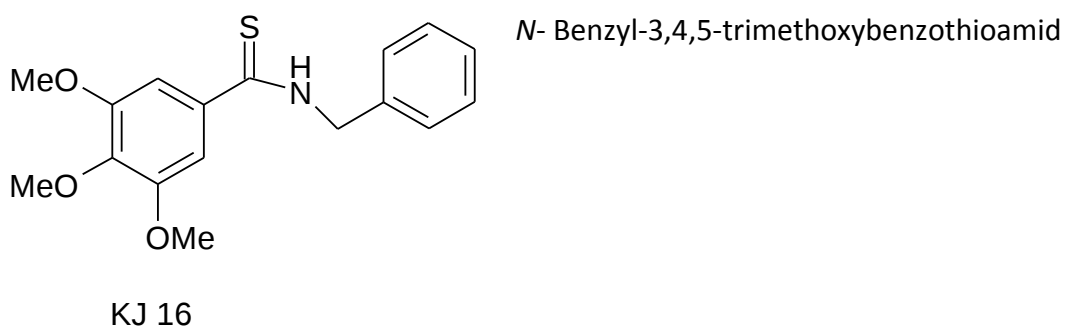
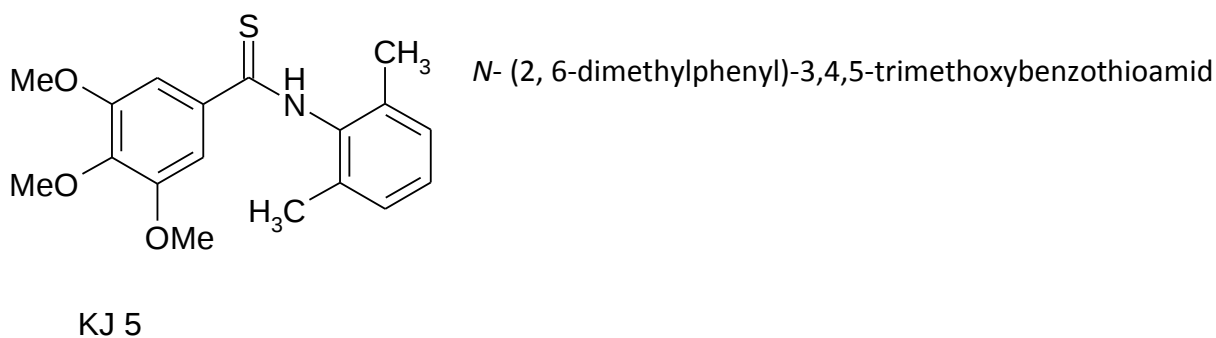


2 Material und Methodik

2.1 Testsubstanzen

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Wirkung der Substanzen KJ5 und KJ16, bei denen es sich um neu synthetisierte Verbindungen handelt und Derivate des Naturstoffs Resveratrol darstellen. Diese beiden Substanzen wurden am Department für Medizinische und Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien unter der Leitung von Hr. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert und für die Versuche im Rahmen dieser Diplomarbeit zur Verfügung gestellt.

Abbildung 3: Strukturformeln der Testsubstanzen KJ5 und KJ16



Es wurden täglich Stammlösungen der beiden Testsubstanzen durch lösen in DMSO(Dimethylsulfoxid) frisch bereitet. Durch kumulative Zugabe der Substanzen musste eine maximale Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht werden.

Dazu wurde die berechnete Menge Testsubstanz mittels Finnmikropipette zugetropft. Die zu erreichenden Konzentrationen im Organbad betrugen 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$. In Konstanten Intervallen von 45 Minuten wurde die Konzentration erhöht um „steady state“ Bedingungen zu erreichen.

Tabelle 1: Substanzeinwaage

Substanzeinwaage			
Substanz	Molare Masse M	25 ml Organbad	8ml Organbad
KJ 5	331 g/l	0,87 mg	0,26 mg
KJ 16	317g/l	0.79mg	0.25mg

2.2 Versuchstiere

Für die praktische Durchführung der Untersuchungen wurden Meerschweinchen aus dem Institut für Labortierkunde und –Genetik in Himberg, Österreich (Stamm DH), und Tiere aus der Versuchstierzüchtung in Dobro Voda (Slowakei, Stamm DH bzw. TRIK) herangezogen.

Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet, deren Körpergewicht im Durchschnitt 200-500g betrugen und ein Alter von nur wenigen Wochen aufwiesen.

Da im Rahmen dieser Diplomarbeit ausschließlich isolierte Organe von Meerschweinchen für die Versuche verwendet wurden, wurde das Tier, nachdem es schon am Vortag, zwecks Gewährleistung eines konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des Darms, nüchtern gestellt worden war, am Morgen durch einen gezielten Genickbruch getötet. Dieser Vorgang wurde nur durch geübtes Fachpersonal durchgeführt.

Besonders wichtig war es, im Anschluss als erstes das Herz, um einen möglichen Sauerstoffmangel und dadurch bedingte Schädigung zu vermeiden, möglichst rasch zu entnehmen und es, wie auch die anderen Organe, in einer Elektrolytlösung, die zusätzlich noch mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) durch perlt wurde, aufzubewahren.

Abbildung 4: Versuchstier während der Öffnung des Thorax



2.3 Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode) und Begasung

Um die weitere Funktion und das Überleben der isolierten Organe gewährleisten zu können, war es notwendig, diese, sowohl für die Dauer der Lagerung, als auch für die der Bearbeitung, in geeigneter, mit Oxymix begasten, Nährlösung aufzubewahren.

Zur Begasung der Lösung wurde Carbogen, bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂, verwendet.

Diese Elektrolytlösung wurde täglich morgens frisch vorbereitet und ihre Zubereitung stellte eine Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Versuche dar. Diese Elektrolytlösung wurde nach der Vorschrift von Reiter (Reiter 1967) zubereitet und entsprach somit einer modifizierten Krebs- Henseleit Lösung.

Tabelle 2: Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung

Stocklösung	mmol/l
NaCl	114.90
KCl	4.73
NaHCO ₃	24.90
MgSO ₄	3.29
KH ₂ PO ₄	1.18
CaCl ₂	1.18
Glucose	10.00

Die Tyrode wurde für jeden Versuchstag am jeweiligen Morgen frisch zubereitet, dazu wurden die oben genannten Stocklösungen, mit Ausnahme von CaCl₂, in der entsprechenden Menge in einen Rundkolben gefüllt und dieser anschließend mit Aqua bidestillata auf etwa $\frac{3}{4}$ des gewünschten Volumens ergänzt. Danach musste 20 Minuten mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) begast werden, dann erst konnte die CaCl₂- Lösung langsam tropfenweise, unter anhaltender Begasung, um die Bildung schwerlöslicher Calciumsalze und damit eintretende Trübung zu vermeiden, zugegeben werden. War trotz dieser Reihenfolge eine Trübung festzustellen, musste die Tyrode verworfen werden und neu angefertigt werden. Nach diesem Schritt wurde mit Aqua bidestillata bis zur Markierung aufgefüllt.

Mit der so bereiteten Tyrode wurden die zuvor mit Aqua bidestillata gereinigten Organbäder gespült und befüllt. Sie diente aber auch zum Transport und zur Aufbewahrung der einzelnen Organe.

2.4 Versuchsanordnung und Apparaturen

Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Rahmen dieser Diplomarbeit bei den Organversuchen sicherzustellen, war die Bereitstellung von konstanten physiologischen Bedingungen, in Hinblick auf die Sauerstoffversorgung, die Temperatur und den pH- Wert, unumgänglich.

Damit diese konstanten Bedingungen eingehalten werden konnten, fanden zwei spezielle Versuchsassparaturen, im weiteren Verlauf Apparatur I und Apparatur II genannt, Verwendung. Bei beiden Apparaturen handelte es sich um Organbäder mit Aufhängevorrichtungen für Organe unterschiedlichen Typs.

Bei diesen besagten Apparaturen handelte es sich um Glasbehältnisse, welche mit $35 \pm 1 \text{ C}^\circ$ (-für Musculi papillares) beziehungsweise $37 \pm 1 \text{ C}^\circ$ (für Arteria pulmonalis, Aorta, Ileum und Atrium) temperiertem Aqua bidestillata umspült wurden.

Diese beiden Apparaturen konnten bei allen Versuchen eingesetzt werden, mit der Einschränkung, dass sich für Testreihen, die den Papillarmuskel betrafen, nur Apparatur I als geeignet erwies.

2.4.1 Versuchsaapparatur I

Bei dieser Apparatur handelte es sich um eine, aus Acrylglas bestehende, mit Aqua destillata befüllte Wanne, in die das Organbad von oben eingetaucht wurde. Ein transparentes System hatte den Vorteil, dass man während eines Versuchs mögliche Fehlerquellen lokalisieren und rasch beheben konnte. Um den jeweiligen physiologischen Ansprüchen der Präparate gerecht zu werden, wurde die Badetemperatur, mittels Thermostat („HAAKE“ von Thermo Fisher Scientific) und Heizspirale für Versuche am Papillarmuskel auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ und für alle anderen auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt.

Das Organbad selbst wurde mit Tyrode befüllt und von unten mit Oxymin durch-perlt, um optimale Sauerstoffversorgung und damit auch konstante physiologische Bedingungen gewährleisten zu können.

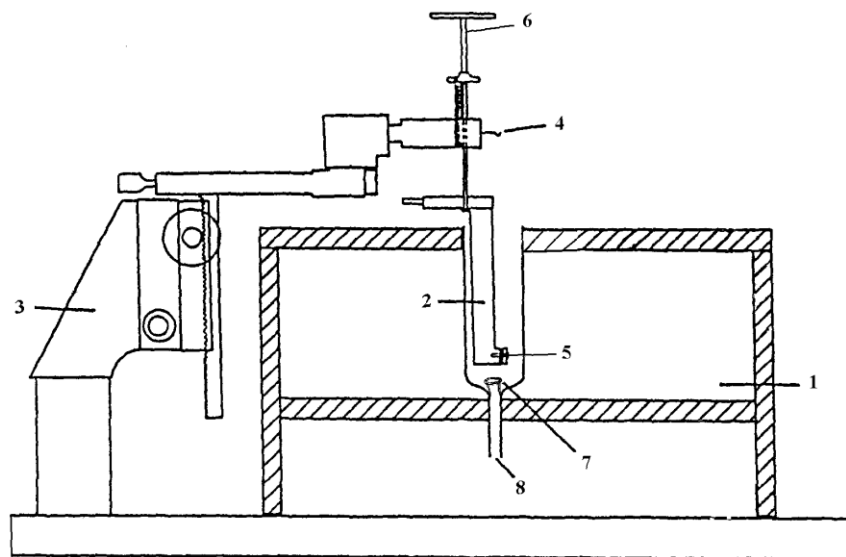
Je nach Präparat unterschied sich der Versuchsaufbau nur in Art und Weise der Befestigung geringfügig.

In die Organkammer ragte eine Aufhängevorrichtung mit Organhalterung und einer Elektrode am unteren Ende. Die Aufhängevorrichtung war an einem Stativ angebracht, das mit Grob- und Feintrieb versehen war. Damit konnte das Organ in die Kammer abgesenkt werden und die notwendige Vorspannung erreicht werden. An der Aufhängevorrichtung war ein Silberdraht befestigt, welcher den mit einem Silberhaken versehenen Papillarmuskel hielt und mit dem Stativ verbunden war. Das freie Ende des Papillarmuskels wurde an eine Platinelektrode mittels Kunststoff-Schraubklemme befestigt.

Sobald das Präparat so fixiert worden war, konnte man es mit dem Stativschlitten bequem und einfach in die Muskelkammer absenken, und nun musste nur noch mittels Feintrieb die, je nach Organ unterschiedliche, nötige Vorspannung eingestellt werden, um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Der Kraftwandler, welcher das eigentliche Messinstrument darstellte, befand sich als oberer Teil der Organhalterung oben auf dem Stativ, und hatte die Aufgabe die Kontraktionen des Präparats in Stromimpulse zu transformieren. Diese wurden zu einem Verstärker Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) geleitet, welcher zur Messung der Kraft unter isometrischen Bedingungen diente. Die Ergebnisse wurden als Linien bzw. Ausschläge auf einen Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual-Channel; Firma Kipp & Zonen, NL) übertragen.

Abbildung 5: Versuchsapparatur I; Darstellung des Querschnitts der Apparatur



1 Wasserbad

2 Organhalterung

3 Steher

4 Kraftwandler

5 Organeinhängevorrichtung

6 Mikrometer

7 Fritte mit Gaszufuhr

8 Gaszuleitung

2.4.2 Versuchsaapparatur II

Mit dieser Apparatur wurden die Versuche mit den Organen Atrium, Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis durchgeführt.

Die Hauptunterschiede zu der eben besprochenen Apparatur I bestanden in der Ausführung des Organbades und der Befestigungseinheit der Organhalterung.

Bei Apparatur II handelte es sich nicht, wie vorher, um eine auf dem Labortisch stehende Acrylwanne, sondern um eine Muskelkammer aus doppelwandigem Glas, zwischen deren Wänden temperiertes Aqua bidestillata zirkulierte, das über Schlauchanschlüsse zu- und abfloss.

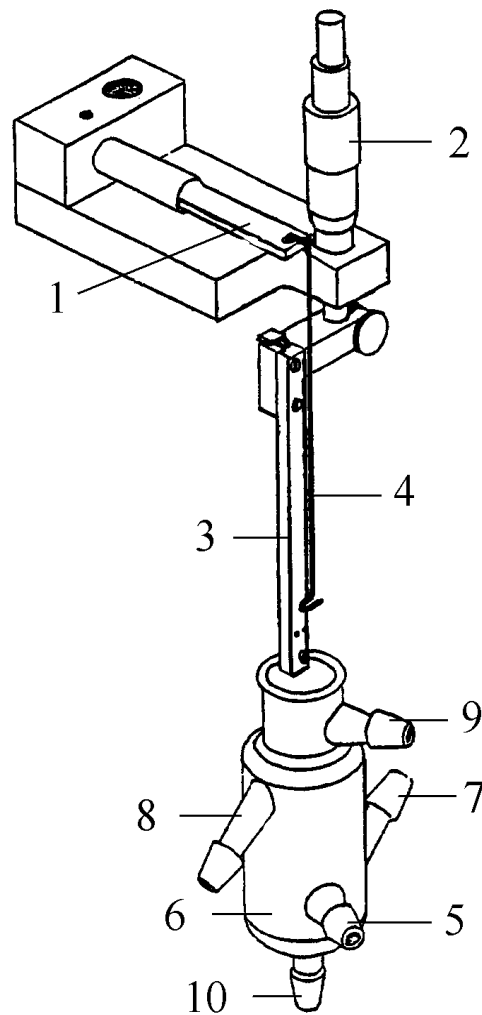
Das mittels Stativklappen am Rahmen befestigte Organbad wurde durch einen seitlich gelegenen Zugang mit Oxyg. begast und hatte zur leichteren Handhabung einen, sich am Boden befindenden -Abfluss, der durch Quetschklemmen verschlossen werden konnte. Dies ermöglichte ein erheblich erleichtertes Wechseln der Tyrode oder auch das Durchspülen der Präparate.

Zur Organaufhängung standen ein Silberdraht am Steg, sowie ein zweiter, mit der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers verbundener, Befestigungsdraht zur Verfügung.

Auch hier war beim Einbringen der Präparate darauf zu achten, diese weder zu lange unversorgt zu lassen, noch sie durch Zug oder Druck zu beschädigen. Nach so erfolgter zügiger Befestigung senkte man die Versuchsobjekte, so dass sie vollständig bedeckt waren, in die Nährlösung ein und konnte nun über das Mikrometer die spezifische Vorspannung einstellen. Dies war Voraussetzung für das Erreichen der Kontraktionsmaxima.

Die Übertragung und Aufzeichnung der Ergebnisse erfolgten analog zur Apparatur I.

Abbildung 6: Versuchsanordnung II



1 Kraftwandler

2 Mikrometer

3 Organhalterung

4 Aufhängevorrichtung

5 Gaszufuhr

6 Organbad

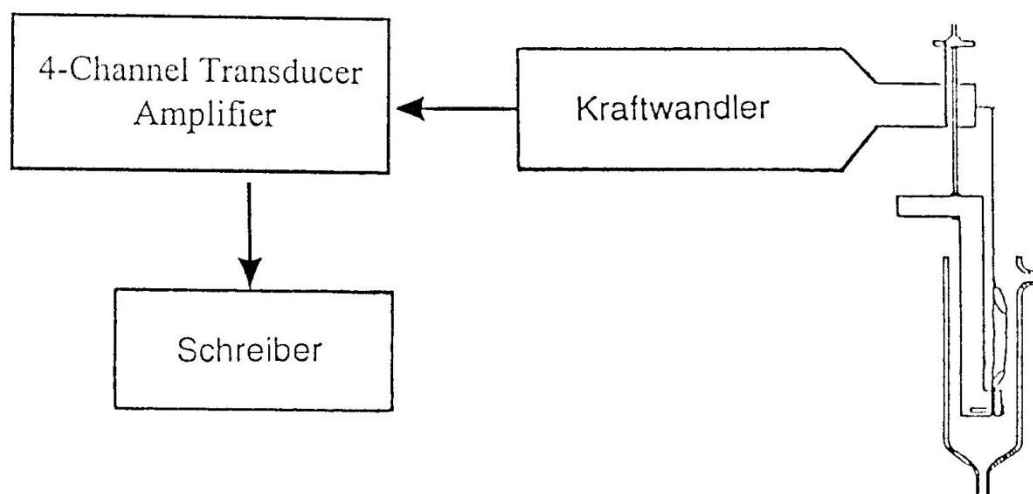
2.4.3 Kraftwandler

Der Kraftwandler sorgte mit Hilfe eines Transducers samt Verstärker (AE875 Aksjeselkapet Mikro-Elektronik, Horten, Norwegen) für die Umwandlung eines mechanischen Reizes in eine elektrische Kennzahl.

So wurde die Konzentrationsänderung des laufenden Versuchs mit einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 dual Chanel, Kipp & Zonen, Netherlands) auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

Zum besseren Verständnis der Signalgewinnungskaskade dient nachfolgende Abbildung.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



2.4.4 Gasversorgung

Die Gasversorgung wurde über eine zentrale Gasleitstelle geregelt, welche eine gleichbleibende Intensität und Gasqualität ermöglichte. Von den einzelnen Ventilen an den Arbeitsplätzen im Laboratorium führten Plastikschläuche zu den Versuchsaapparaturen, die am Ende mit einer Fritte, zwecks feiner Zerstäubung des Gasstroms im Organbad, versehen waren. Um die ausströmende Gasmenge regulieren und dem Bedarf anpassen zu können, wurden Schraubklemmen an den Schläuchen angebracht.

Zur Verwendung kam ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ mit der Bezeichnung Oxymix.

Die Begasung mit diesem Gemisch musste über die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten werden, um folgende Parameter zu gewährleisten:

- ausreichende Sauerstoffversorgung der isolierten Organe
- Einhaltung und Aufrechterhaltung des physiologischen pH- Wertes von 7.2-7.4 im Organbad
- optimale, homogene Verteilung der Testsubstanz in der, das Präparat umgebenden, Tyrode.

Auf Grund der Wichtigkeit der konstanten Carbogenversorgung wurde bei Apparatur I ein transparentes Wasserbad gewählt, um die Gaszufuhr ins Organbad jederzeit kontrollieren zu können.

2.5 Isolierung und Präparation der Organe

Die folgende Reihenfolge der angeführten Organe spiegelt den zeitlichen Ablauf der Entnahme wieder und wurde stets beibehalten, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten.

2.5.1 Entnahme des Herzens und Isolierung der Arteria pulmonalis

Sofort nach der Tötung des Tieres wurde der Brustraum geöffnet und das noch schlagende Herz entnommen und sofort in eine mit Oxymix durch-perlte Elektrolytlösung übergeführt. Dann wurde das Herz vorsichtig mit Daumen und Zeigefinger massiert, um noch das vorhandene Blut im Organ zu entfernen, damit dieses nicht gerinnen konnte. Nach diesem Prozedere konnte nun mit der eigentlichen Präparation begonnen werden.

Dazu wurde das Organ in eine zuvor vorbereitete Petrischale, welche mit einem Korkboden ausgelegt, als Randbegrenzung mit einem Plastikschauch versehen und mit Elektrolytlösung befüllt war, -überführt. Unter kontinuierlicher Begasung wurde nun das Herz unter einem Mikroskop präpariert. Als verwendete Instrumente dienten Pinzetten, Federgriff-Mikroscheren, als auch Präpariernadeln um das Organ in der Petrischale zu fixieren.

Der zu entnehmende Teil der Arteria pulmonalis wurde so nah wie möglich am Truncus pulmonalis des Herzens abgetrennt und in mehreren Arbeitsschritten von Fett- und Muskelgewebe gesäubert und bis zu ihrer weiteren Verwendung in Bechergläsern mit Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

2.5.2 Isolierung des Atrium dexter

Sobald überschüssiges Fett- und Muskelgewebe entfernt worden war, konnte mit der Isolierung des Atriums dexter begonnen werden. Dazu wurde das Perikard vorsichtig geöffnet, um den Sinusknoten nicht zu beeinträchtigen. Eine zu starke Überdehnung des Herzgewebes war zu vermeiden. Anschließend wurde das Atrium dexter entnommen.

In einer mit Elektrolytlösung befüllten und begasten Petrischale wurde der Atrium an der unteren Spitze und am oberen Ende, wo Fettgewebe zur Befestigung nicht entfernt wurde, mittels Präpariernadeln fixiert. An diesen beiden Stellen wurden mittels Bindfaden Haken aus Silberdraht befestigt. Diese dienten in weiterer Folge der Befestigung im Organbad.

Der fertig präparierte Atrium wurde bis Versuchsbeginn in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

2.5.3 Isolierung der Musculi papillares

Unter dem Mikroskop wurden die, wie oben erklärt, von den Vorhöfen getrennten, Kammern nun entlang des Septums hin zur Spitze aufgeschnitten, aufgeklappt und mit Stecknadeln fixiert. Die nun sichtbaren Papillarmuskeln wurden nun von Purkinje-Fasern befreit, um die Gefahr einer störenden Aktivierung ihrer Schrittmachertätigkeit zu eliminieren. Im darauffolgenden Schritt wurde mit einem Bindfaden ein Silberhäkchen an den Ansatz der Papillarmuskelsehne fixiert und anschließend die Sehne durchtrennt und die Papillarmuskeln vorsichtig herausgelöst. Verwendet wurden nur Muskeln ab einem Durchmesser von 0,87 Millimeter (Koch-Weser 1963). Danach folgte wieder die obligatorische Aufbewahrung in einer begasten Elektrolytlösung bis zu ihrer Verwendung.

2.5.4 Isolierung des Ileum terminalis

Nach der Entnahme des Herzens wurde der Bauchraum behutsam weiter geöffnet, um den Darm freizulegen. Dieser wurde mit den Händen herausgezogen und bei Bedarf von überschüssigem Mesenterium befreit. Dabei durfte unter keinen Umständen das Gewebe verletzt werden. Hatte man nun das untere Ende des Darms, nahe dem Caecum vor dem Bereich des Dickdarms lokalisiert, wurde ein circa 20 cm langer Abschnitt mit unterschiedlich färbigen Bindfäden abgeschnürt und dann mit einer Schere extrahiert. Dieser Teil des Ileums wurde bis zur weiteren Verwendung in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

Die eigentliche Präparation des Ileum terminalis fand wieder unter einem Mikroskop, in einer mit Elektrolytlösung befüllten und begasten Petrischale statt. Dazu wurde ein etwa 5cm langes Teilstück vom unteren Ende des zuvor extrahierten Darms abgetrennt und in der Petrischale mittels Präpariernadeln fixiert. Im nächsten Schritt wurde dieses Teilstück mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und einer Elektrolytlösung gereinigt. War der Darminhalt vollständig entfernt konnte nun eventuell anhaftendes Fettgewebe entfernt werden.

Wichtig dabei war, die glatte Muskulatur des Dünndarms nicht durch übermäßiges Dehnen zu verletzen.

Dann wurden vom Ileum terminalis ca. 1cm lange Stücke mit einer Federgriff-Mikroschere abgetrennt, wobei der jeweils obere Teil des Darmes mit Präpariernadeln fixiert wurde. An den beiden so entstandenen Enden wurden mittels unterschiedlich färbigen Bindfäden Silberhaken befestigt, die als spätere Halterung in den Organbädern dienen sollten. Dabei durfte das Lumen nicht verschlossen werden, um auch ein luminales Zirkulieren zu ermöglichen. Die fertig präparierten Dünndarmpräparate wurden bis zu Versuchsbeginn in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

2.5.5 Isolierung und Präparation der Aorta

Nach Entnahme der anderen Organe konnte man nun mit der Isolierung der Aorta beginnen. Da man für die Versuche nicht den Aortenbogen, sondern das oberhalb des Herzens gelegene Aortenteilstück benötigte, war eine totale Öffnung des Brustkorbs unumgänglich. Dazu wurde der Brustkorb mit Hilfe einer Schere vollständig geöffnet, danach wurden noch anhaftende Lungengewebsreste sowie bereits geronnenes Blut heraus gespült und das Zwerchfell eingeschnitten. Im nächsten Schritt wurde die Wirbelsäule nach vorne gedrückt, um den Zugang zu der direkt an dieser gelegenen Aorta zu erleichtern. Dann wurde die Aorta am cranialen Ende mit einer Pinzette fixiert und mit einer Feder-Mikroschere caudal abgelöst. Überdehnungen und Verletzungen des Organs waren zu vermeiden. Das extrahierte Organ wurde anschließend in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

Die weiteren Schritte der Präparation, wie die Reinigung von noch vorhandenem Fettgewebe, sowie gestocktem Blut und das Trennen in jeweils 2 bis 3 Millimeter breite, ringförmige Segmente, erfolgten unter einer Lupe in begaster Elektrolytlösung. Sowohl bei der Isolierung, als auch bei der Präparation war darauf zu achten, dass das Präparat weder zu stark gedehnt noch mit dem Präparationsbesteck verletzt worden war. Deshalb wurden alle Segmente auf Löcher und Einschnitte kontrolliert, bevor die Aorta-Ringe in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt wurden.

Abbildung 8: Ringförmig geschnittene Aortensegmente



2.6 Durchführung der Versuche

Die Versuche wurden jeden Tag mit gleichbleibender Methodik und unter identen Bedingungen durchgeführt (Reiter 1967). Dafür standen im Labor acht Organbäder zur Verfügung. Täglich wurde eine frische Elektrolytlösung hergestellt und je ein Versuchstier zur Organentnahme verwendet. Ebenso erfolgte die Präparation der einzelnen Organe jeweils vor Beginn der Versuche auf die gleiche Art und Weise.

2.6.1 Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis

Zuerst wurde das Organbad mit Aqua bidestillata gründlich gereinigt und anschließend mit Elektrolytlösung zweimal gespült und dann mit Elektrolytlösung befüllt und begast. Gleichzeitig wurde das Wasserbad auf die benötigte Temperatur von $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

Hatte man die notwendigen Vorraussetzungen geschaffen, konnte mit der Einbringung des Organs begonnen werden. Dazu wurde ein, -wie in Abschnitt 2.3.1 erwähntes präpariertes Teilstück der Arteria pulmonalis zügig in das Organbad transferiert. Dieses wurde zwischen dem Silberdraht der Aufhängevorrichtung und dem unteren Ende der Organhalterung, ähnlich einem Gummiring, eingespannt. Hier war sehr wichtig, dass das Organ weder zu lang mit Oxy mix unterversorgt war, noch beim Einspannen zu stark gedehnt wurde. Denn dies führte meist zu irreversiblen Schäden am Organ.

Nun konnte die Organhalterung mitsamt dem fixierten Präparat in die, mit Krebs-Henseleit-Tyrode befüllte, Kammer abgesenkt werden, bis sich das Organ etwa 1cm unter der Oberfläche befand.

Danach erfolgte der Vorgang des Vorspannens: Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual Chanel, Kipp & Zonen, Netherlands) und Verstärker („Transbridge™“ Verstärker 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) wurden eingeschaltet und mittels Positionswahlschalter die Nulllinie definiert. Anschließend wurde mit dem Feintrieb der Organhalterung die Vorspannung von 9.81mN bzw. 1g eingestellt, was einer Größenordnung von 10 cm am Schreiber entsprach, um die Kontraktionskraftmaxima erreichen zu können.

Dann erfolgte eine 20 minütige Anpassungsphase.

Nach dieser Zeitspanne konnte mit der Vorkontraktion begonnen werden.

Um eine Vorkontraktion auszulösen, und die darauf möglichen Veränderungen der Kontraktionskraft durch kumulative Zugabe der Testsubstanz, messen zu können, wurde die

Nährlösung im Organbad durch 25 ml Kaliumchlorid- Lösung (0.67g KCL in 100ml Elektrolytlösung) ersetzt. Praktisch zeitgleich wurde der Schreiber, eingestellt auf 5 mV / speed 1 (mm / min) bei 10 cm mittels „record on“ und „pen down“ zur Aufzeichnung aktiviert. Ab hier wurde der Versuch auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Die Arterie wurde nun durch die Kaliumchlorid- Lösung kontrahiert. War die maximale Kontraktion erreicht, die konnte man am Schreiber durch ein Plateau erkennen, konnte mit der kumulativen Zugabe der gelösten Testsubstanz begonnen werden.

Begonnen wurde mit der niedrigsten Konzentrationsstufe, wobei in Abständen von 45 Minuten jeweils die nächst höhere Konzentration zugesetzt wurde. Die Zugabe erfolgte mit Finnpietten.

Für eine ordentliche Aufzeichnung der Verlaufskurve war es wichtig darauf zu achten, weder die Organhalterung, noch den Formwandler während des Versuches versehentlich (zum Beispiel beim Zugeben der Testsubstanz mit der Finnpipette) zu berühren, da das zu fehlerhaften Ausschlägen in der Dokumentation geführt hätte.

Ziel war es Veränderungen der Kontraktionskraft, die durch die Testsubstanz bedingt worden war, zu erfassen.

2.6.2 Versuchsablauf bei Aorta

Auch hier musste selbstverständlich vor Beginn des Versuches sichergestellt werden, dass weder Verunreinigungen, noch fehlende Voraussetzungen einen ordnungsgemäßen Versuchsablauf behinderten. Entsprachen alle den notwendigen Ansprüchen, konnte mit dem Versuch begonnen werden.

Das Aorten stück, wie unter 2.3.5 besprochen isoliert und präpariert, wurde rasch in das Organbad eingebracht, das zuvor mit Elektrolytlösung auf 25 ml aufgefüllt, temperiert und begast wurde. Die Fixierung im Organbad entsprach der von Arteria pulmonalis. Auch hier galt natürlich, dass das Organ ohne Verletzungen und ohne unnötige Zeitverzögerung in das Organbad eingebracht werden musste.

War nun die Aorta richtig positioniert verlief die Anpassungsphase, die Kontraktion mit Kaliumchlorid- Lösung, die Aufzeichnung und die Substanzzugabe analog, wie bei Arteria pulmonalis.

2.6.3 Versuchsablauf bei terminalem Ileum

Mit dem Versuch konnte begonnen werden, sobald die Voraussetzungen, wie bei Arteria pulmonalis und Aorta besprochen wurden, vorherrschten.

Die, wie unter 2.3.4 beschrieben, präparierten Teilsegment des terminalen Ileum wurden vorsichtig so in die Versuchsanordnung eingebracht, dass das jejunale Ende nach oben und das caecale Ende nach unten wiesen und beide offen blieben, um eine Durchspülung des Lumens während des späteren Versuchsablaufs zu gewährleisten.

Im Anschluss wurde der Schreiber und Verstärker aktiviert um dann mittels des Feintriebs eine Vorspannung von 4.9mN (entsprechend 0.5g) angelegt, was einen Unterschied zu den beiden zuvor besprochenen Organen darstellte.

In der nun folgenden, 20 minütigen Anpassungszeit konnte über den Feintrieb die Spannung, wenn nötig, immer wieder nachjustiert werden.

Sobald sich eine konstant bleibende Peristaltik des Ileums eingestellt hatte, die deutlich an einem ruhig bleibenden Schreiberarm zu erkennen war, konnte auch hier die Aufzeichnung des Versuchs begonnen und mit einer 25 ml Kalium- Chlorid- Lösung, diese besaß im Gegensatz zu Arteria pulmonalis / Aorta eine andere Konzentration (0.45g KCl in 100ml Elektrolytlösung), kontrahiert werden.

Hierbei kam es nach Austausch der Tyrode gegen die KCl- Lösung zu einer sofortigen Kontraktion des Präparats, die am Anfang der Aufzeichnung deutlich als Ausschlag zu erkennen war. Im Anschluss daran sank die Konzentrationskraft etwas ab, um dann wieder auf ein Maximum, gekennzeichnet durch ein Plateau, anzusteigen.

Wurde dieses erreicht konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz im Abstand von jeweils 45 Minuten Einwirkzeit begonnen werden.

2.6.4 Versuchsablauf bei Atrium dexter

Um die Funktionsfähigkeit des Organs aufrecht zu erhalten, wurde der Vorhof ohne weitere Verzögerungen sofort nach der Präparation in die Organhalterung eingespannt und in das, optimal vorbereitete, Organbad abgesenkt.

Nach Inbetriebnahme von Schreiber und Verstärker wurde eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt, um während des Versuchs die maximale Kontraktionskraft zu erreichen. Aufgrund der Plastizität des Organs war es notwendig während des gesamten Versuchsablaufes diese immer wieder nachzukorrigieren.

Im Anschluss an eine 60 minütige Anpassungszeit folgte die so genannte Kontrollphase, in der in 5- Minuten Abständen die Schlagfrequenz aufgezeichnet wurde, um nach dem Erreichen einer Konstanz mit der Substanzzugabe beginnen zu können. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Rahmen der kumulativen Zugabe alle 5 Minuten aufgezeichnet und in Abständen von jeweils 45 Minuten die nächst höhere Konzentration eingebracht.

Die Messung und damit die Aufzeichnung der Schlagfrequenz erfolgte über 6cm des Millimeterpapiers mit 5mm/s Papiervorschub des Schreibers.

2.6.5 Versuchsablauf bei Musculi papillares

Der, nun an einem Ende mit einem Häkchen versehene, Papillarmuskel wurde in der Apparatur I fixiert, die wiederum optimale Bedingungen bot, indem man den am Präparat befestigten Haken mit dem Silberdraht erfasste und das andere, freie Ende mittels einer kleinen Kunststoffplatte über einen Schraubmechanismus festklemmte, um so den Kontakt mit der Silber-Kathode herzustellen.

Nach diesem Vorgang wurde die Vorrichtung in das Organbad (auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiert) eingebracht und eine Vorspannung von 3,92mN angelegt, welche es während des gesamten Versuchsablaufs behutsam nach zu justieren galt, um eine scheinbare Abnahme der Kontraktionskraft durch Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Da der Papillarmuskel im Gegensatz zu den, durch den Sinusknoten autonom schlagenden, Vorhofpräparaten, eben dieses Verhalten nicht ohne Impulsgabe von außen aufwies, musste er durch gezielte elektrische Reizung zur Kontraktion angeregt werden. Diese erfolgte mit Hilfe des Reizgerät Accupulser A310 (World Precision Instrument Hamden, FL, USA).

Im Anschluss an eine Anpassungszeit, die teilweise 1-2 Stunden dauern konnte, wurde das Präparat mittels Rechteckimpulsen von 3ms Dauer bei einer Frequenz von 1Hz und einer 10% über der minimalen Reizschwelle liegenden Stromstärke angeregt. Zur Gewährleistung regelmäßiger Kontraktionen war die Stromstärke so gering wie möglich zu wählen, um auch etwaige Verfälschungen der Ergebnisse durch völlige Entleerung der Catecholaminspeicher zu verhindern (Furchgott et al. 1959)

In der nun folgenden Kontrollphase, die sich über in etwa 45 Minuten erstreckte, wurden alle 10 Minuten drei aufeinander folgende Kontraktionsamplituden aufgezeichnet, um sobald sich eine Konstanz der Amplituden eingestellt hatte, mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz in 45- Minuten-Abständen, sowie der Aufzeichnung 3er Ausschläge alle 5 Minuten beginnen zu können.

2.7 Auswertung der Ergebnisse

2.7.1 Atrium dexter

Bei der Auswertung der Versuche am rechten Vorhof wurde die Schlagfrequenz dieses autonomen Zentrums als Messgröße herangezogen; diese wurde durch den Schreiber (Papiervorschub 5mm/s) über eine Dauer von 12 Sekunden, entsprechend einer Aufzeichnungsstrecke von 6 Zentimeter, dokumentiert und in Folge nach händischem Abzählen der Ausschläge mit dem Faktor 5 multipliziert, um so die Anzahl der Kontraktionen pro Minute zu erhalten. Dieser Wert vor der kumulativen Zugabe der Testsubstanz stellte den Kontrollwert und damit 100% dar.

2.7.2 Musculi papillares

Untersucht wurde die Kontraktionskraft und in mN gemessen. Dazu wurde jeweils nach 5 Minuten die Kontraktionsamplitude aufgezeichnet und mit einem Lineal vermessen. Das Messergebnis wurde mit dem Eichfaktor der Versuchsanordnung multipliziert und statistisch erfasst.

2.7.3 Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis

Die Aufzeichnungen der Versuche an Arteria pulmonalis, Aorta und terminalem Ileum, also von Präparaten deren Kontraktionskraft und deren Veränderung dokumentiert wurden, stellten eine Kurve dar. Um zu verwertbaren Daten zu gelangen wurde nun mittels Lineal der Abstand zwischen Nulllinie und jenem Punkt der Plateaeinstellung, dem so genannten steady state, gemessen und als 100% angenommen; von da ab wurde bei jeder Substanzzugabe deren Zeitpunkt auf dem Graphen markiert und als Endergebnis der jeweils vorhergegangenen Kontraktionsstufe angenommen. Diese, im Rahmen der alle 45 Minuten stattfindenden kumulativen Substanzzugabe, gewonnenen Werte, wurden nun mit dem Eichfaktor multipliziert um auf Ergebnisse in mN zurückgreifen zu können.

Um Verfälschungen der Ergebnisse durch den Eigeneffekt des Lösungsmittels DMSO auszuschließen, wurde dessen Wirkung in Form von Blindversuchen, also der kumulativen Zugabe des reinen Lösungsmittels (ohne Substanz), ermittelt und in die Berechnung der Daten miteinbezogen.

Von den so erhaltenen Messwerten wurden arithmetischer Mittelwert samt Standardfehler (SEM) errechnet, um diese nun in Konzentrations-Wirkungskurven darstellen und auf graphischem Wege hier die EC_{50} - Werte ermitteln zu können.

Unter Verwendung des gepaarten Student-t-Tests wurden die Messergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz beurteilt. Es wurden die Messwerte in mN und nicht in Prozent verwendet, da bei letzteren der Vergleichswert keine Streuung aufweist und somit eine höhere Signifikanz vorgetäuscht worden wäre. Zusätzlich war die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit P nötig, die angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, einen Wert der Grundgesamtheit irrtümlich als nicht zu ihr gehörig anzunehmen (Sachs 19939).

Bei $P < 0.05$ (5%) bzw. $P < 0.01\%$ (1%) wurden die Werte als signifikant bezeichnet, bei $P < 0.001$ (0.1%) als hochsignifikant.

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms „Sigma Plot 8.0“ ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Testsubstanz KJ5

3.1.1 Wirkung auf Arteria pulmonalis

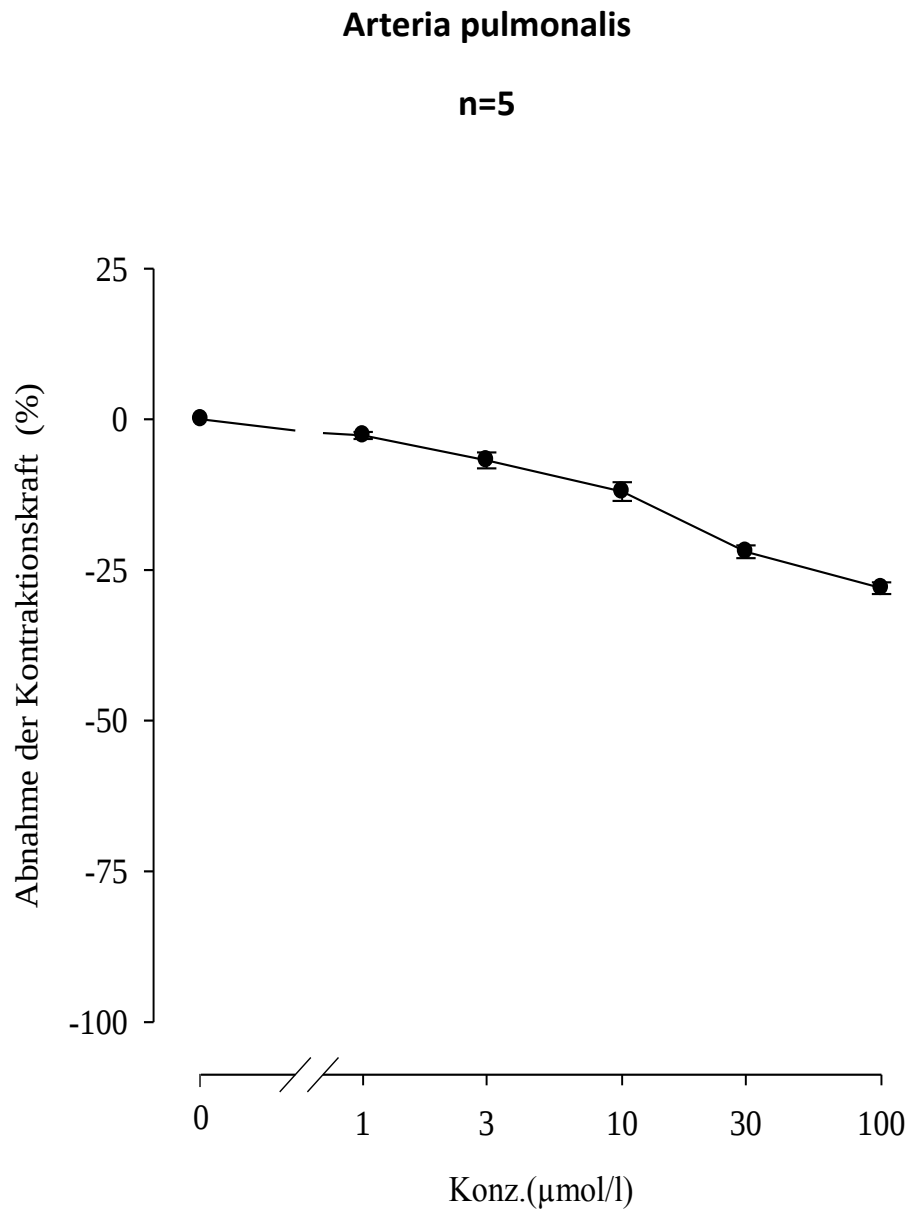
Die Versuche wurden, - wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 5 Versuchen ergab sich ein Mittelwert der Kontrolle, welcher mit 12.55 ± 0.84 mN zu 100 % der Kontraktionskraft entsprach.

Tabelle 3: Wirkung von KJ5 auf Arteria pulmonalis

KJ5 ($\mu\text{mol/l}$)	$fc \pm \text{SEM}$ (mN)	$fc \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	12.55 ± 0.84	0 ± 0	5	----
1	12.19 ± 0.74	-2.69 ± 0.57	5	n.s.
3	11.65 ± 0.61	-6.82 ± 1.32	5	n.s.
10	10.99 ± 0.54	-11.99 ± 1.56	5	n.s.
30	9.77 ± 0.58	-21.97 ± 1.05	5	0.05
100	9.03 ± 0.63	-28.02 ± 0.97	5	0.05

Legende zu Tabelle 3:

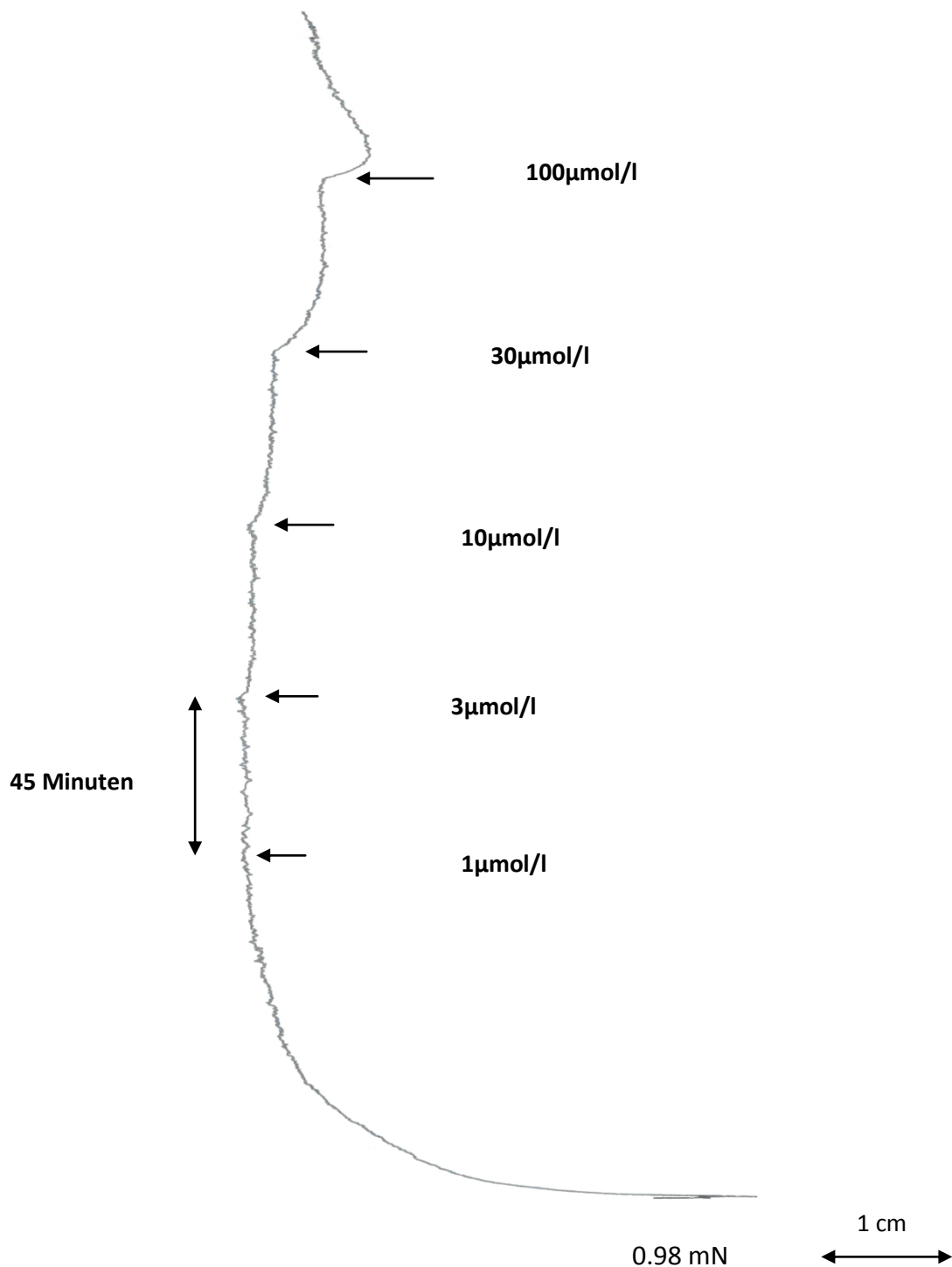
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve von KJ5 an Arteria pulmonalis**Legende zu Abbildung 9:**

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft der Arteria pulmonalis bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ5.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l.

Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 10: Vasodilatierende Wirkung von KJ5 bei Arteria pumlonalis**Legende zu Abbildung 10:**

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ5. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.1.2 Wirkung auf die isolierte Aorta

Das Organ wurde zunächst mit KCL-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit der Testsubstanz KJ5 in verschiedenen Konzentrationen beschickt.

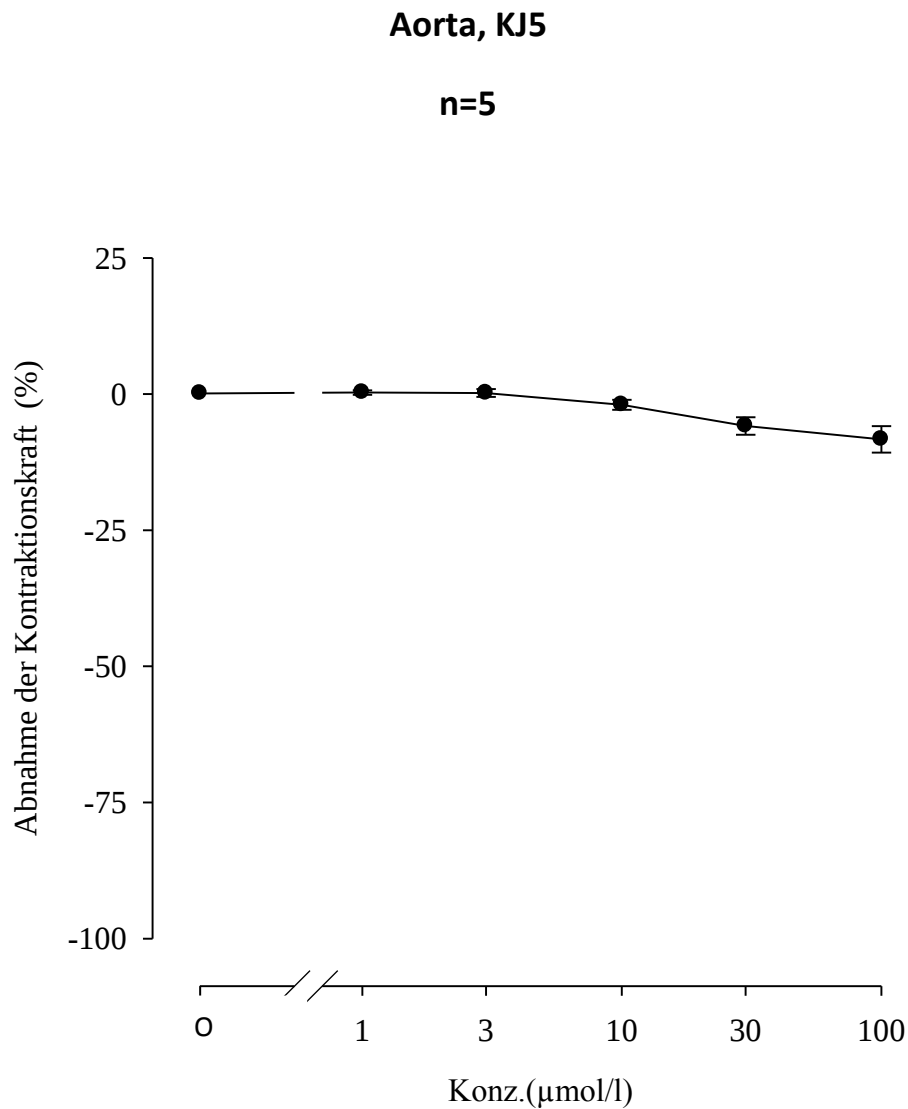
Nach 5 Versuchen wurde der Mittelwert des Kontrollwertes errechnet und die weiteren Ergebnisse zu diesem in Relation gesetzt. Der Kontrollwert betrug $8,59 \pm 0.43$ mN.

Tabelle 4: Wirkung von KJ5 auf die Aorta

KJ5 ($\mu\text{mol/l}$)	$fc \pm \text{SEM}$ (mN)	$fc \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	8.59 ± 0.43	0 ± 0	5	----
1	8.61 ± 0.43	0.28 ± 0.40	5	n.s.
3	8.60 ± 0.42	0.19 ± 0.72	5	n.s.
10	8.43 ± 0.45	-1.97 ± 0.93	5	n.s.
30	8.09 ± 0.45	-5.87 ± 1.60	5	n.s.
100	7.90 ± 0.54	-8.32 ± 2.42	5	n.s.

Legende zu Tabelle 4:

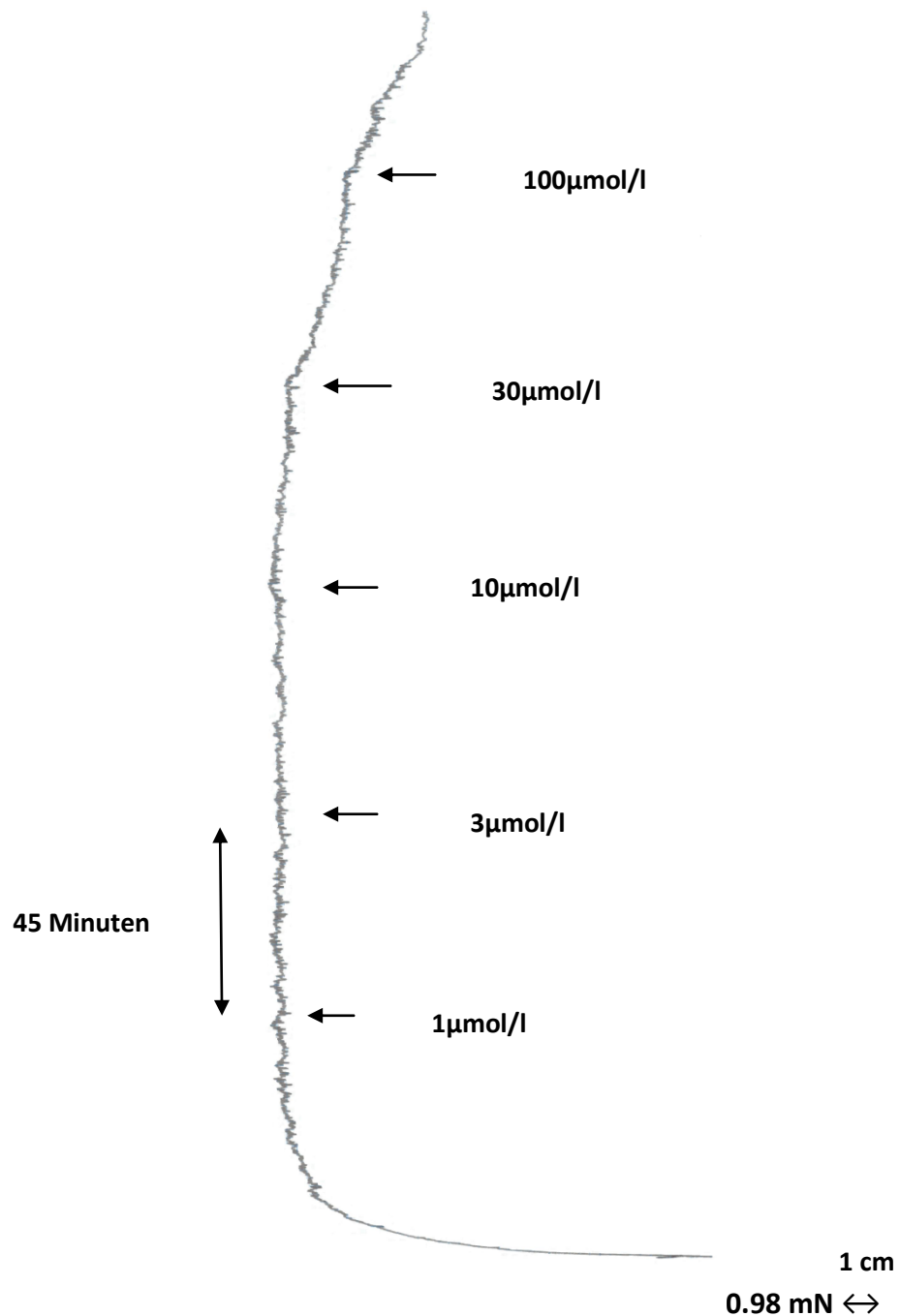
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve von KJ5 bei der Aorta**Legende zu Abbildung 11:**

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft der Aorta bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ5.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung der Testsubstanz KJ5 auf die isolierte Aorta.



Legende zu Abbildung 12:

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ5. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.1.3 Wirkung von KJ5 auf Ileum terminalis

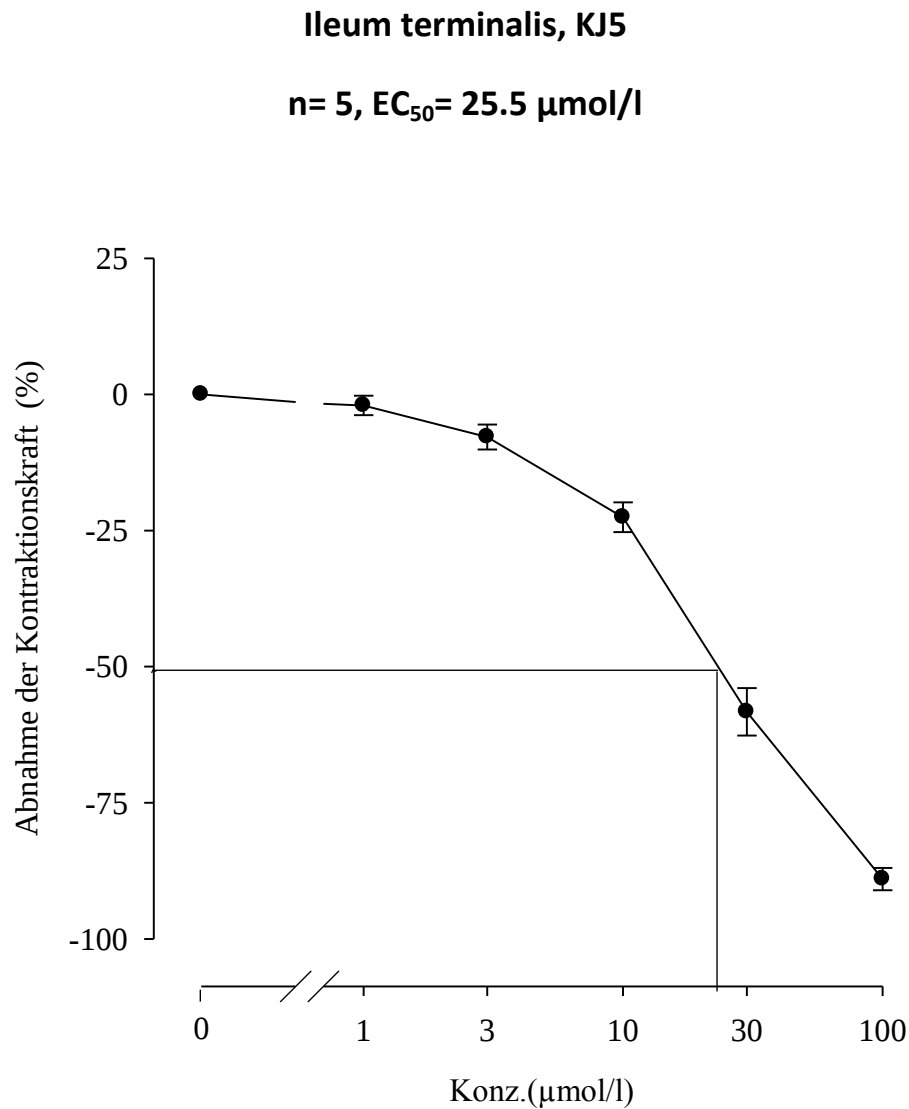
Das Organ wurde zunächst mit KCL-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit der Testsubstanz KJ5 in verschiedenen Konzentrationen beschickt. Der Kontrollwert beträgt 15.26 ± 2.45 mN. Bereits ab der ersten Konzentration ist eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktion zu erkennen. Ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ wird eine extrem deutliche Abnahme sichtbar, welche sich in einem steilen Abfall des Graphen und einem errechneten EC_{50} -Wert von $25.5\mu\text{mol/l}$ zeigte.

Tabelle 5: Wirkung von KJ5 auf Ileum terminalis

KJ5 ($\mu\text{mol/l}$)	$\text{fc} \pm \text{SEM}$ (mN)	$\text{fc} \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	15.26 ± 2.45	0 ± 0	5	----
1	15.12 ± 2.69	-2.03 ± 1.78	5	n.s.
3	14.22 ± 2.54	-7.83 ± 2.28	5	n.s.
10	11.90 ± 2.09	-22.56 ± 2.74	5	0.05
30	6.15 ± 0.90	-58.30 ± 4.35	5	0.01
100	1.79 ± 0.53	-89.02 ± 2.05	5	0.01

Legende zu Tabelle 5:

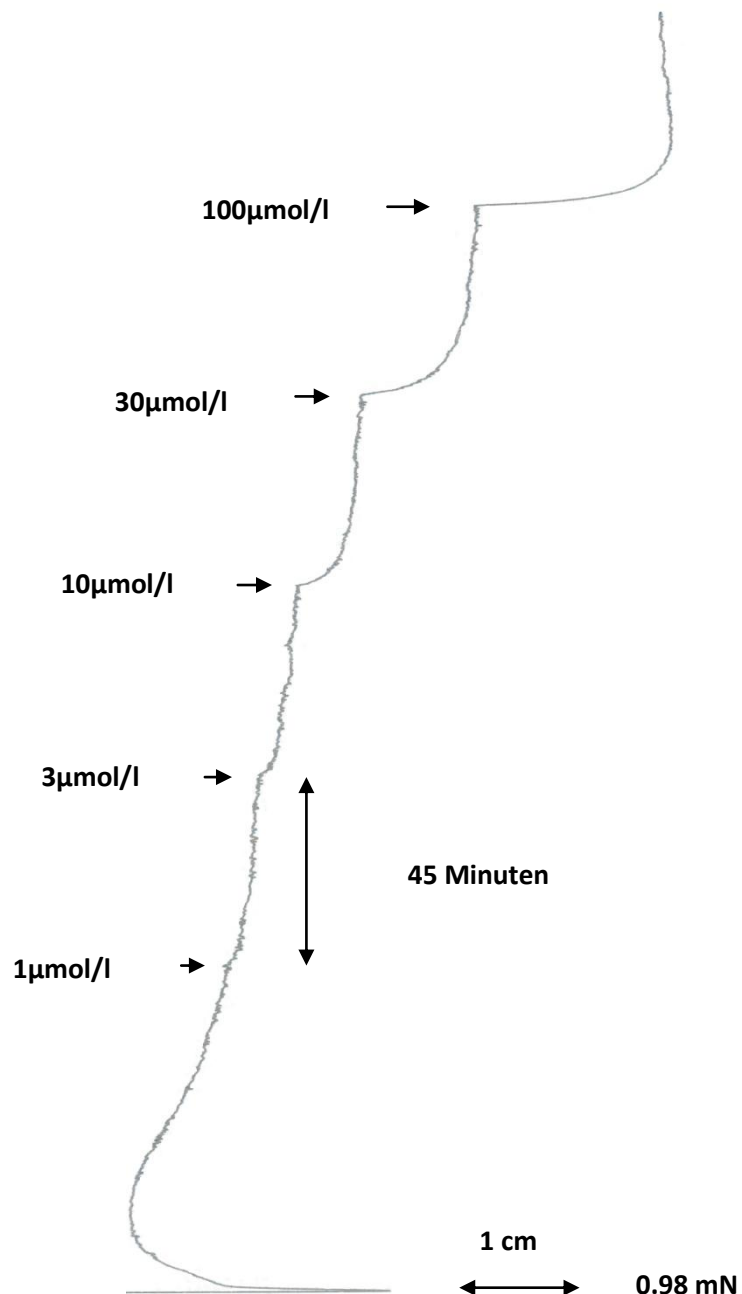
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 13: Konzentrations- Wirkungskurve von KJ5 bei Ileum terminalis**Legende zu Abbildung 13:**

Der Graph zeigt die Veränderung des Muskeltonus bei Ileum terminalis bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ5.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt

Abbildung 14: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz KJ5 auf das terminale Ileum



Legende zu Abbildung 14:

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ5. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.1.4 Wirkung auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium dexter

Bei den Versuchsreihen an den spontan schlagenden Vorhöfen ergab sich ein Kontrollwert (100%) von 231 ± 4 Schlägen/min. Erst ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ war eine Abnahme der Schlagfrequenz zu beobachten. Jedoch ein EC_{50} -Wert war nicht zu erreichen.

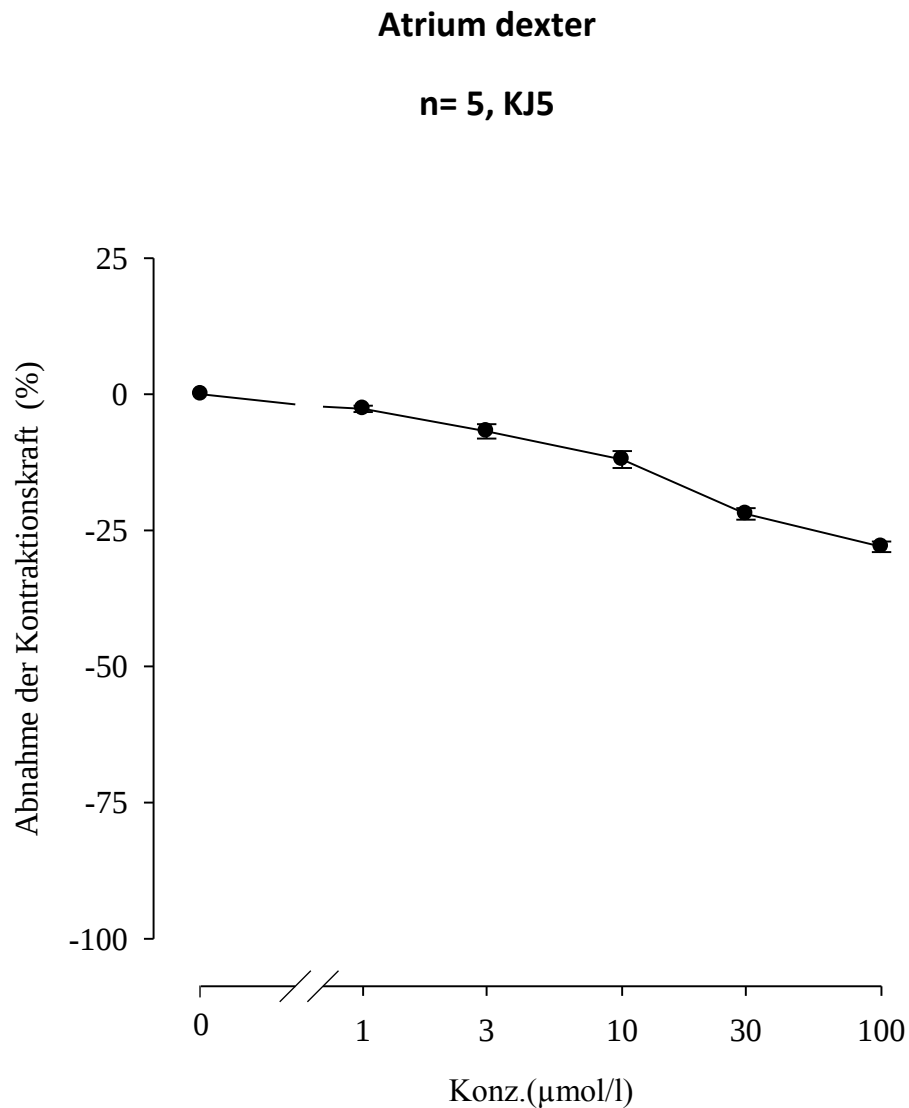
Tabelle 6: Wirkung von KJ5 auf die Schlagfrequenz des Atrium dexter

KJ5 ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	231 ± 4	0 ± 0	5	----
1	218 ± 9.16	-5.78 ± 2.58	5	n.s.
3	219 ± 11.44	-5.40 ± 3.65	5	n.s.
10	216 ± 10.65	-6.64 ± 3.48	5	n.s.
30	186 ± 12.49	-19.71 ± 4.70	5	0.05
100	178 ± 12.51	-23.07 ± 4.87	5	0.05

Legende zu Tabelle 6:

Anhand der Tabelle werden die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des Sinusknoten pro Minute, die entsprechenden Standardfehler (SEM), sowohl in Schlägen/min, als auch in %, sowie die Konzentrationsstufen der Testsubstanz ($\mu\text{mol/l}$) und die Anzahl der Versuche (n) ersichtlich.

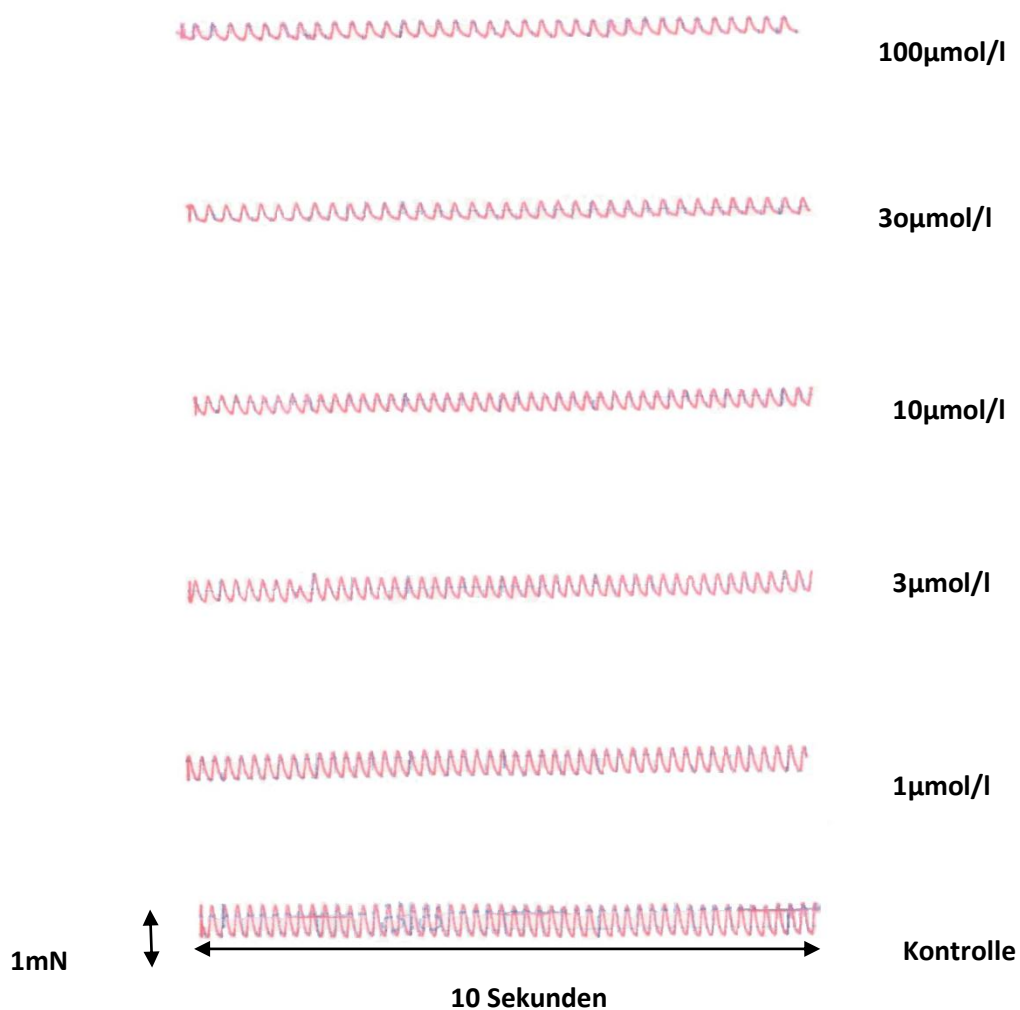
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von KJ5 auf den Atrium dexter



Legende zu Abbildung 15:

Der Graph zeigt die Veränderung der Schlagfrequenz des Atrium dexter bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ5. Die Abszisse zeigt die Änderung der Schlagkraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ5 auf die Schlagfrequenz von Atrium dexter



Legende zu Abbildung 16:

Die Originalaufzeichnung zeigt eine Abnahme der Schlagfrequenz unter kumulativer Konzentrationserhöhung der Testsubstanz KJ5 in Abständen von 45 Minuten.

3.1.5 Wirkung von KJ5 auf Musculi papillares

Bei diesen Versuchen wurde eine mögliche Veränderung der Kontraktionskraft untersucht. Es wurde auf eine Änderung der Inotropie nach Zugabe von KJ5 getestet und diese dokumentiert. Der gesamte Ablauf wurde wieder mittels Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Die erhaltenen Werte wurden durch vermessen, wobei 1 cm 0,981 mN entsprachen und mit einem Eichfaktor multipliziert.

Aus 4 Versuchen wurden die Mittelwerte der Kontrollwerte errechnet und als Standard festgelegt. Aus dieser Versuchsreihe wurde ersichtlich, dass die Testsubstanz KJ5 ab einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ zu einer Abnahme der Kontraktionskraft führt. Jedoch ab einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ kam es zu einem Anstieg der Kontraktionskraft, die aber ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ wieder abflachte. Bei einer Zugabe von $30\mu\text{mol/l}$ erfolgte wieder ein Anstieg der Kontraktionskraft, dieser Effekt wurde auch bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ beobachtet, deshalb wurde entschieden auch einen Test mit $300\mu\text{mol/l}$ durchzuführen. Dieser Versuch führte neuerlich zu einem Anstieg der Kontraktionskraft.

Wirkung von KJ5 auf Musculi papillares

Tabelle 7: Wirkung von KJ5 auf die Konzentrationskraft von Musculi papillares

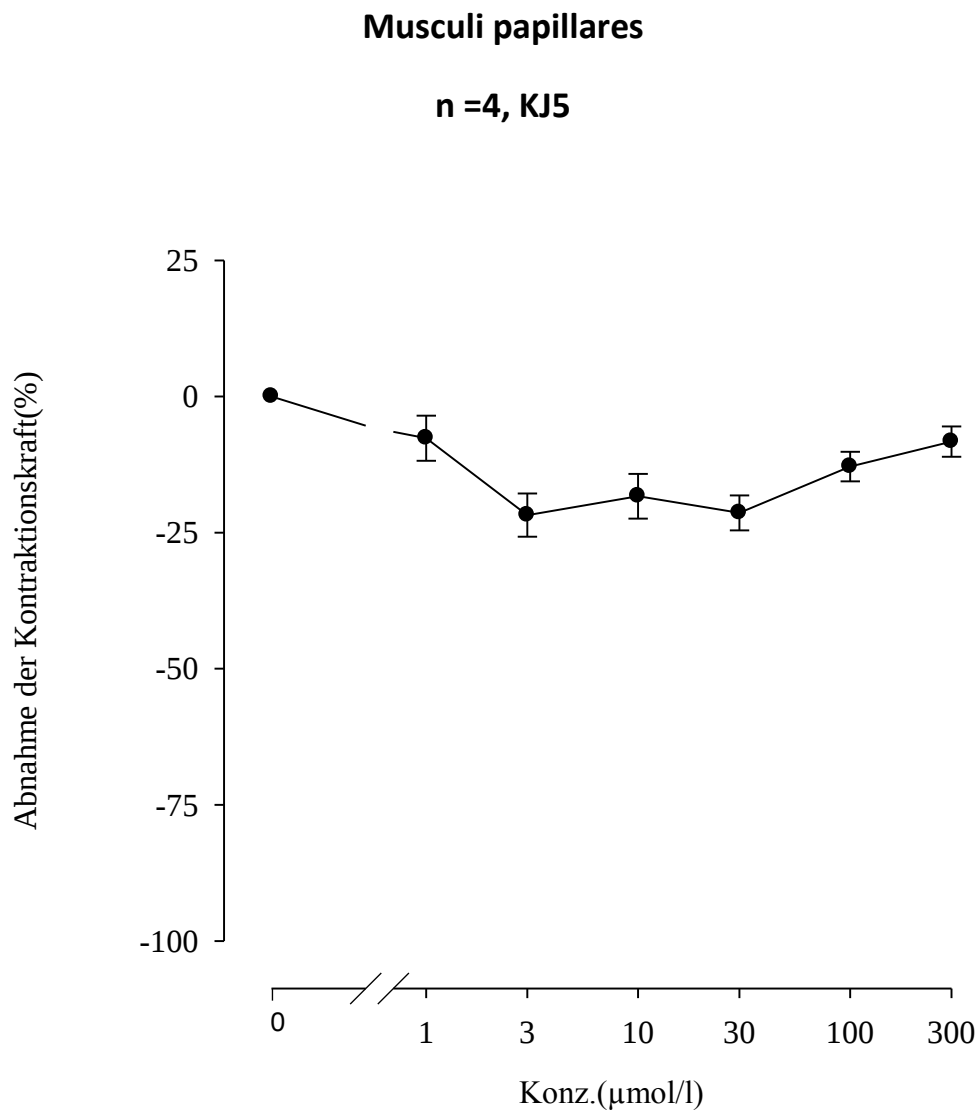
KJ5 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	2.72 ± 0.86	0 ± 0	4	----
1	2.44 ± 0.69	-7.67 ± 4.16	4	n.s.
3	2.13 ± 0.74	-21.79 ± 3.97	4	0.05
10	2.26 ± 0.8	-18.32 ± 4.10	4	0.05
30	2.11 ± 0.68	-21.38 ± 3.20	4	0.05
100	2.38 ± 0.8	-12.87 ± 2.73	4	n.s.
300	2.51 ± 0.85	-8.28 ± 2.79	4	n.s.

Legende zu Tabelle 7:

f_c = arithmetisches Mittel der Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler in mN

Abbildung 17: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von KJ5 bei Musculi papillares

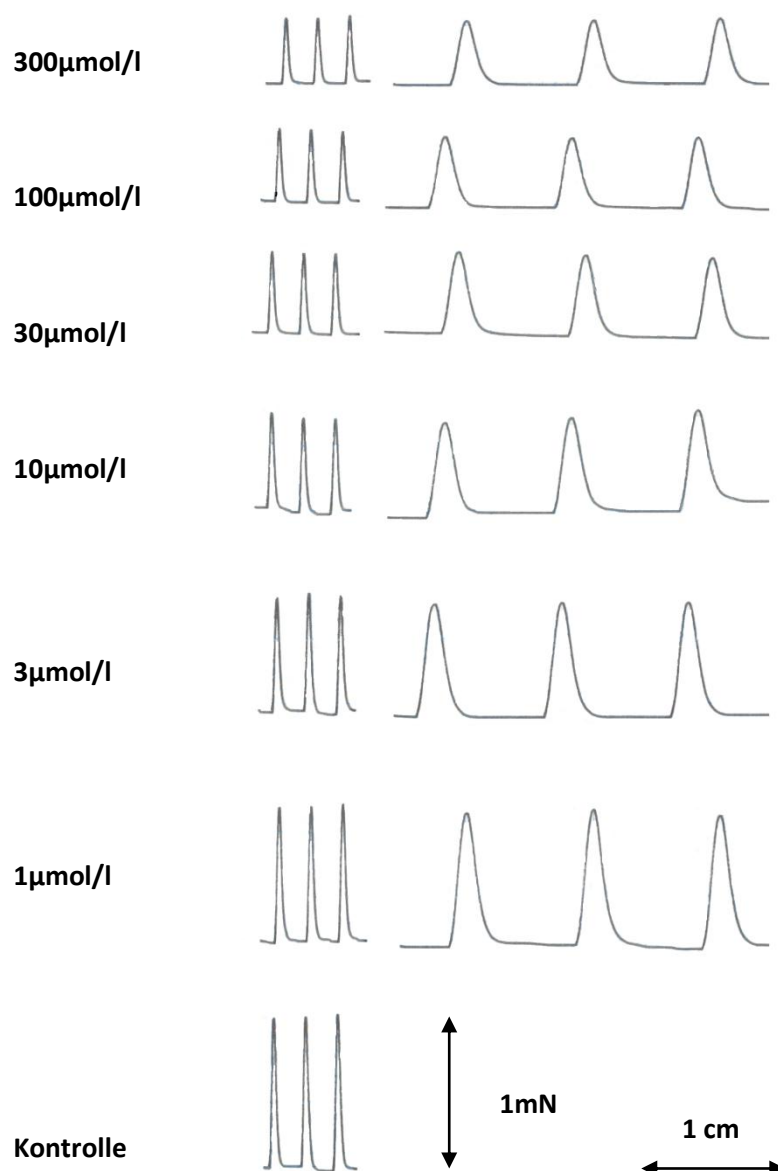


Legende zu Abbildung 17:

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft bei Musculi papillares bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ5.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ5 auf die Kontraktionskraft von Musculi papillares



Legende zu Abbildung 18:

Die Aufnahme zeigt die Änderung der Kontraktionskraftamplitude nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz KJ5 in Intervallen von 45 Minuten.

3.2 Testsubstanz KJ16

3.2.1 Wirkung auf die Arteria pulmonalis

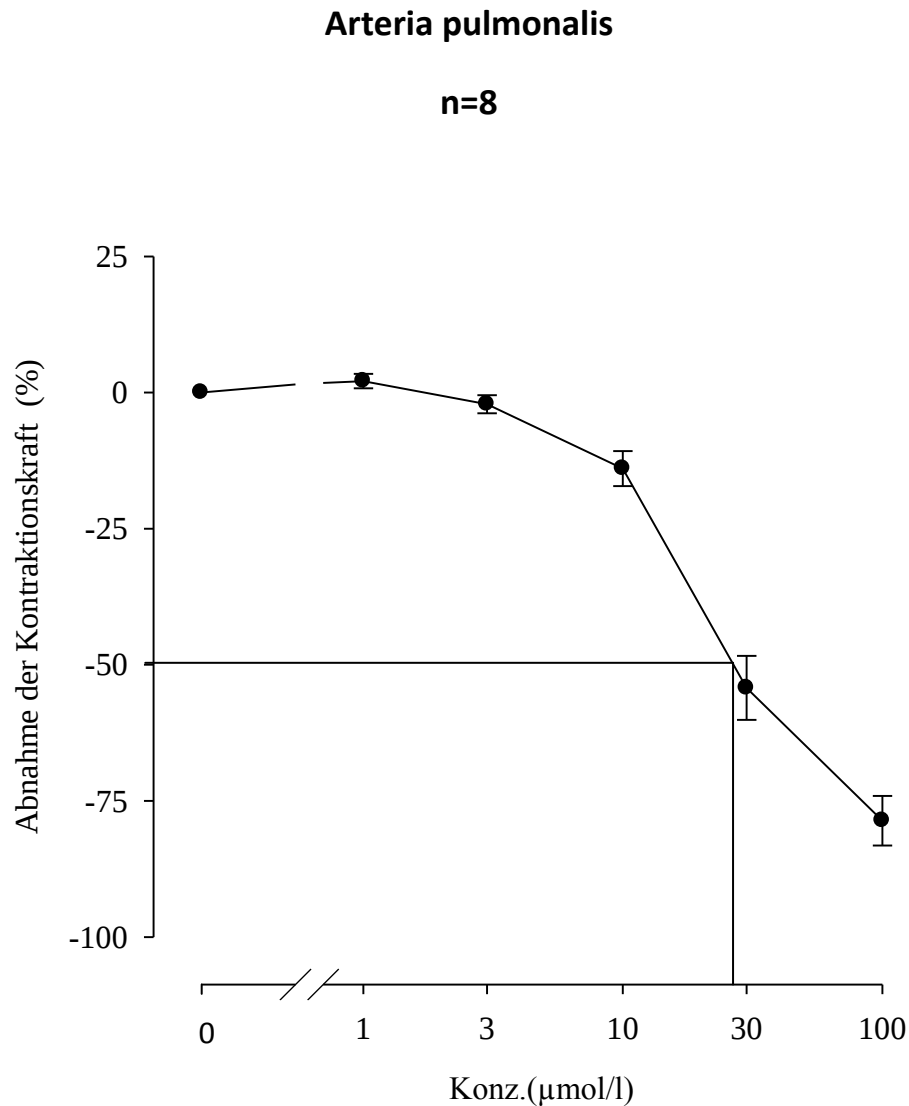
Der Versuch wurde, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 8 Versuchen ergab sich ein Mittelwert der Kontrolle, welcher mit 8.46 ± 1.25 mN zu 100 % der Kontraktionskraft entsprach. Bereits ab einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ war eine deutliche Abnahme der Kontraktion sichtbar, welche mit zunehmender Konzentration noch deutlicher wurde. Schließlich wurde bei einer Konzentration von $27.8\mu\text{mol/l}$ der EC_{50} -Wert erreicht.

Tabelle 8: Wirkung von KJ16 auf Arteria pulmonalis

KJ16 ($\mu\text{mol/l}$)	$\text{fc} \pm \text{SEM}$ (mN)	$\text{fc} \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	8.46 ± 1.25	0 ± 0	8	----
1	8.59 ± 1.22	2.10 ± 1.31	8	n.s.
3	8.22 ± 1.16	-2.14 ± 1.66	8	n.s.
10	7.21 ± 0.97	-13.96 ± 3.21	8	0.05
30	3.95 ± 0.68	-54.25 ± 5.88	8	0.01
100	1.84 ± 0.48	-78.64 ± 4.56	8	0.01

Legende zu Tabelle 8:

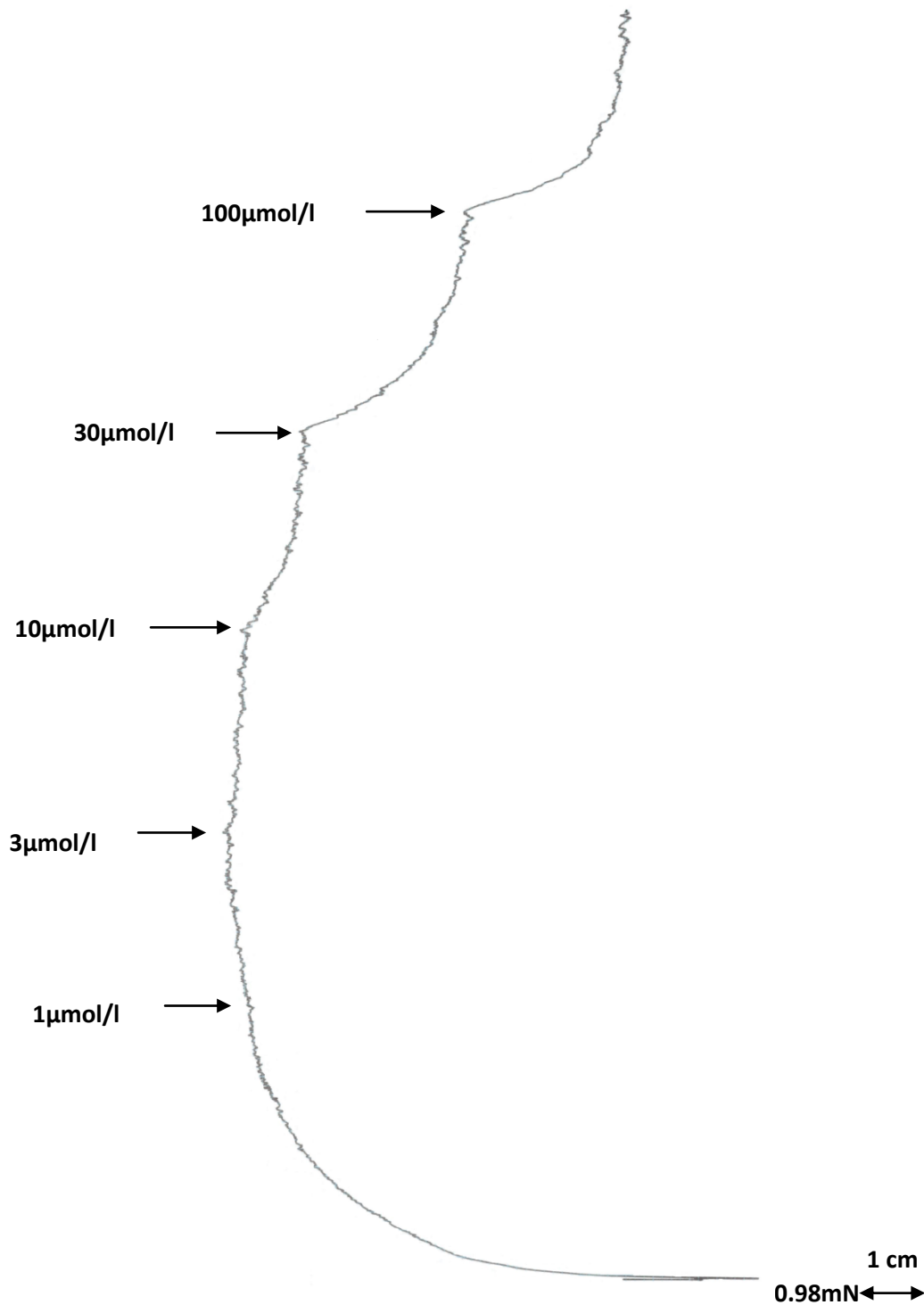
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von KJ16 an Arteria pulmonalis**Legende zu Abbildung 19:**

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft der Arteria pulmonalis bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ16.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l.

Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 20: spasmolytische Wirkung von KJ16 bei Arteria pumlonalis**Legende zu Abbildung 20:**

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ16. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.2.2 Wirkung auf die isolierte Aorta

Das Organ wurde zunächst mit KCL-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit der Testsubstanz KJ16 in verschiedenen Konzentrationen beschickt.

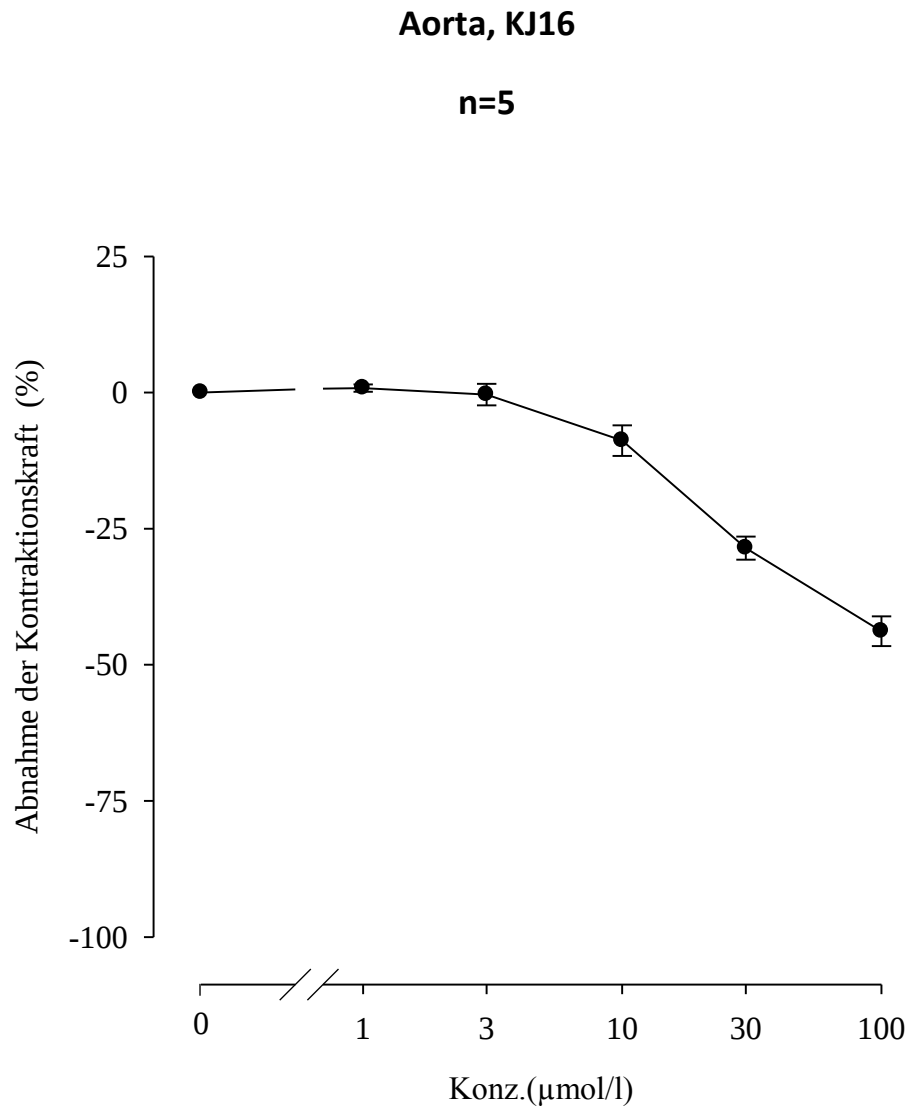
Nach 5 Versuchen wurde der Mittelwert des Kontrollwertes errechnet und die weiteren Ergebnisse zu diesem in Relation gesetzt. Der Kontrollwert betrug 10.46 ± 2.16 mN. Ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ war eine deutliche Reduktion der Konzentrationskraft zu beobachten.

Tabelle 9: Wirkung von KJ16 auf die Aorta

KJ16 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	10.46 $\pm$ 2.16	0 $\pm$ 0	5	----
1	10.54 $\pm$ 2.17	-0.83 $\pm$ 0.67	5	n.s.
3	10.39 $\pm$ 2.14	-0.38 $\pm$ 1.97	5	n.s.
10	9.51 $\pm$ 2.00	-8.83 $\pm$ 2.80	5	n.s.
30	7.44 $\pm$ 1.59	-28.57 $\pm$ 2.12	5	0.05
100	5.70 $\pm$ 1.09	-43.84 $\pm$ 2.74	5	0.01

Legende zu Tabelle 9:

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

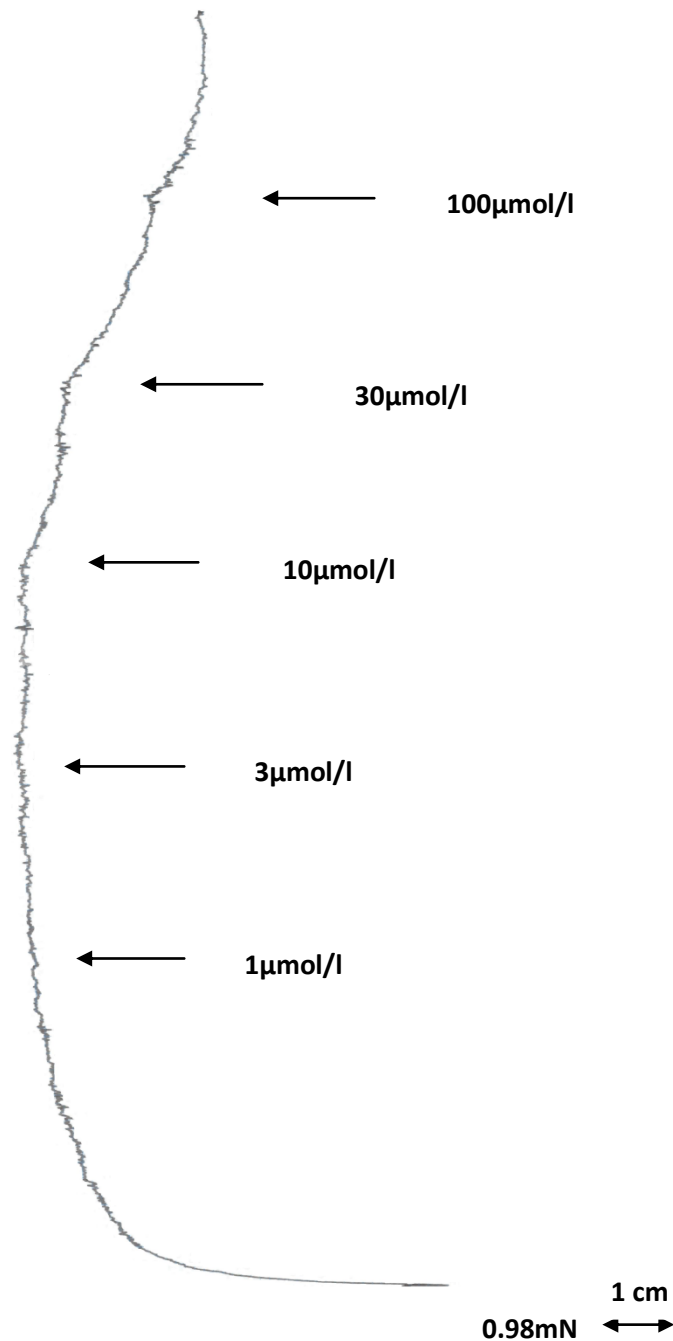
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von KJ16 bei der Aorta**Legende zu Abbildung 21:**

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft der Aorta bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ16.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l.

Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ16 auf die isolierte Aorta.



Legende zu Abbildung 22:

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ16. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.2.3 Wirkung von KJ16 auf Ileum terminalis

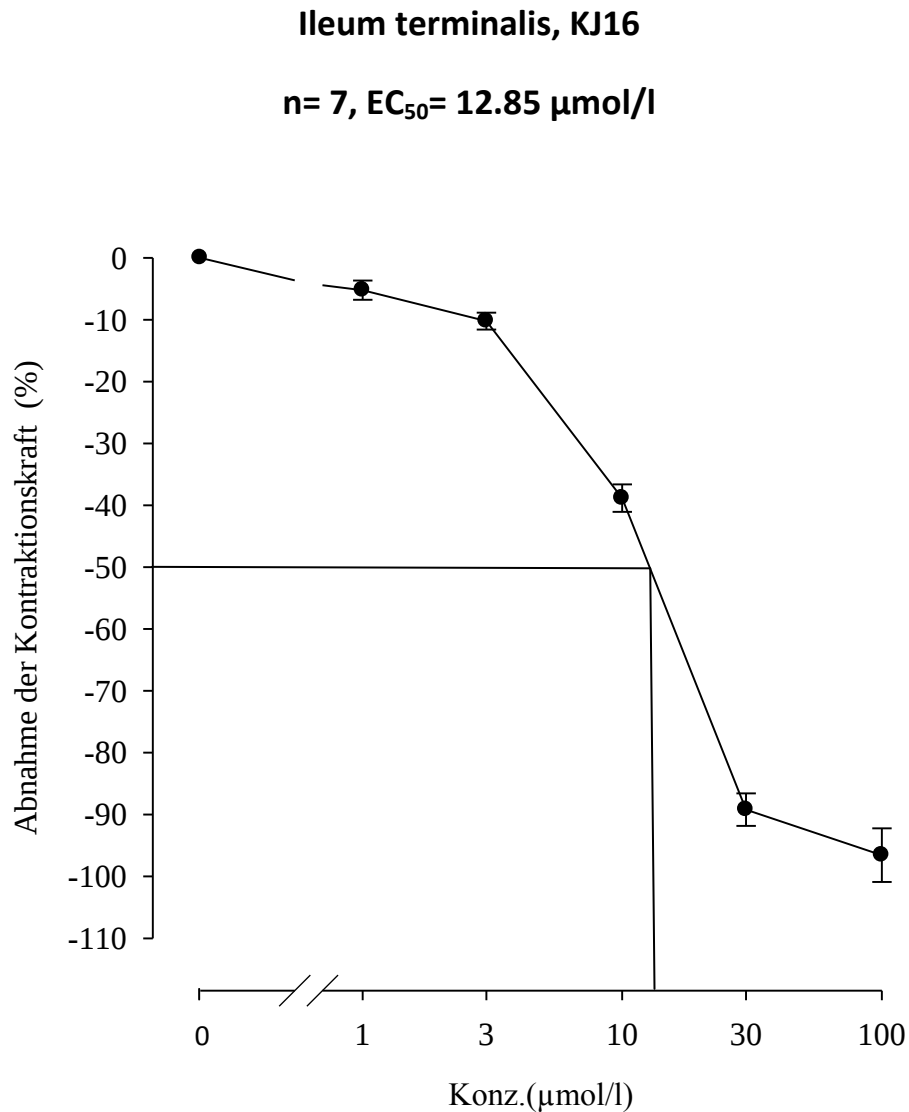
Das Organ wurde zunächst mit KCL-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit der Testsubstanz KJ5 in verschiedenen Konzentrationen beschickt. Der Kontrollwert beträgt 16.30 ± 2.10 mN. Bereits ab der ersten Konzentration ist eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktion zu erkennen. Ab einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ wird eine extrem deutliche Abnahme sichtbar, welche sich in einem steilen Abfall des Graphen und einem errechneten EC_{50} -Wert von $12.85\mu\text{mol/l}$ zeigte.

Tabelle 10: Wirkung von KJ16 auf Ileum terminalis

KJ16 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	16.30 ± 2.10	0 ± 0	7	----
1	15.59 ± 2.20	-5.24 ± 1.55	7	n.s.
3	14.68 ± 2.08	-10.23 ± 1.38	7	n.s.
10	10.00 ± 1.38	-38.85 ± 2.20	7	0.05
30	1.99 ± 0.57	-89.20 ± 2.61	7	0.001
100	1.06 ± 0.73	-96.57 ± 4.33	7	0.001

Legende zu Tabelle 10:

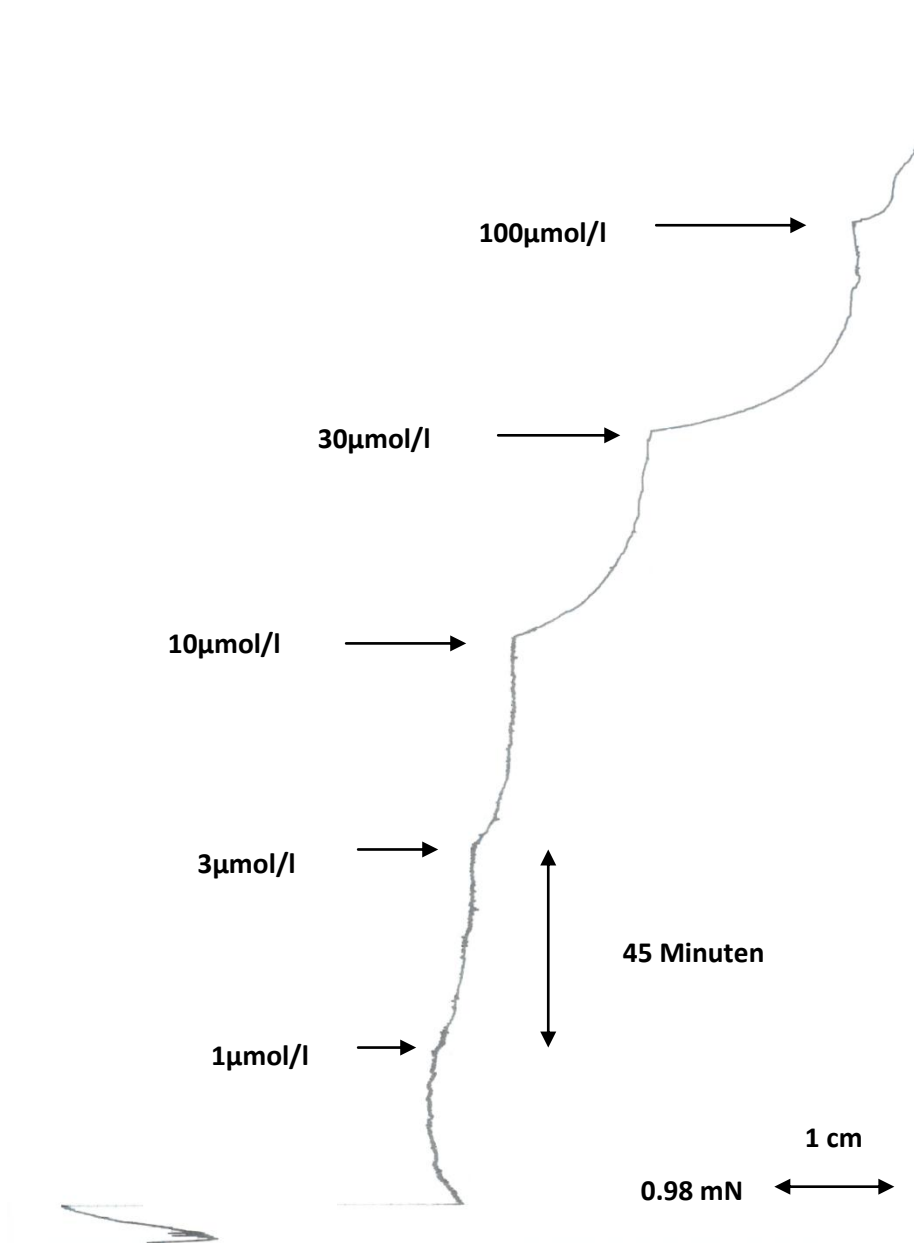
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 23: Konzentrations- Wirkungskurve von KJ16 bei Ileum terminalis**Legende zu Abbildung 23:**

Der Graph zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft bei Ileum terminalis bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ16.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ16 auf Ileum terminalis



Legende zu Abbildung 24:

Die Konzentrationskurve zeigt die Änderung des Muskeltonus nach Zugabe der Testsubstanz KJ16. Das Intervall der Zugabe betrug 45 Minuten.

3.2.4 Wirkung auf die Schlagfrequenz des isolierten Atrium dexter

Bei den Versuchsreihen an den spontan schlagenden Vorhöfen ergab sich ein Kontrollwert (100%) von 247 ± 8.45 Schlägen/min. Ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ erfolgte eine deutliche Abnahme der Schlagfrequenz. Bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ konnte die Schlagfrequenz nicht mehr eindeutig gemessen werden.

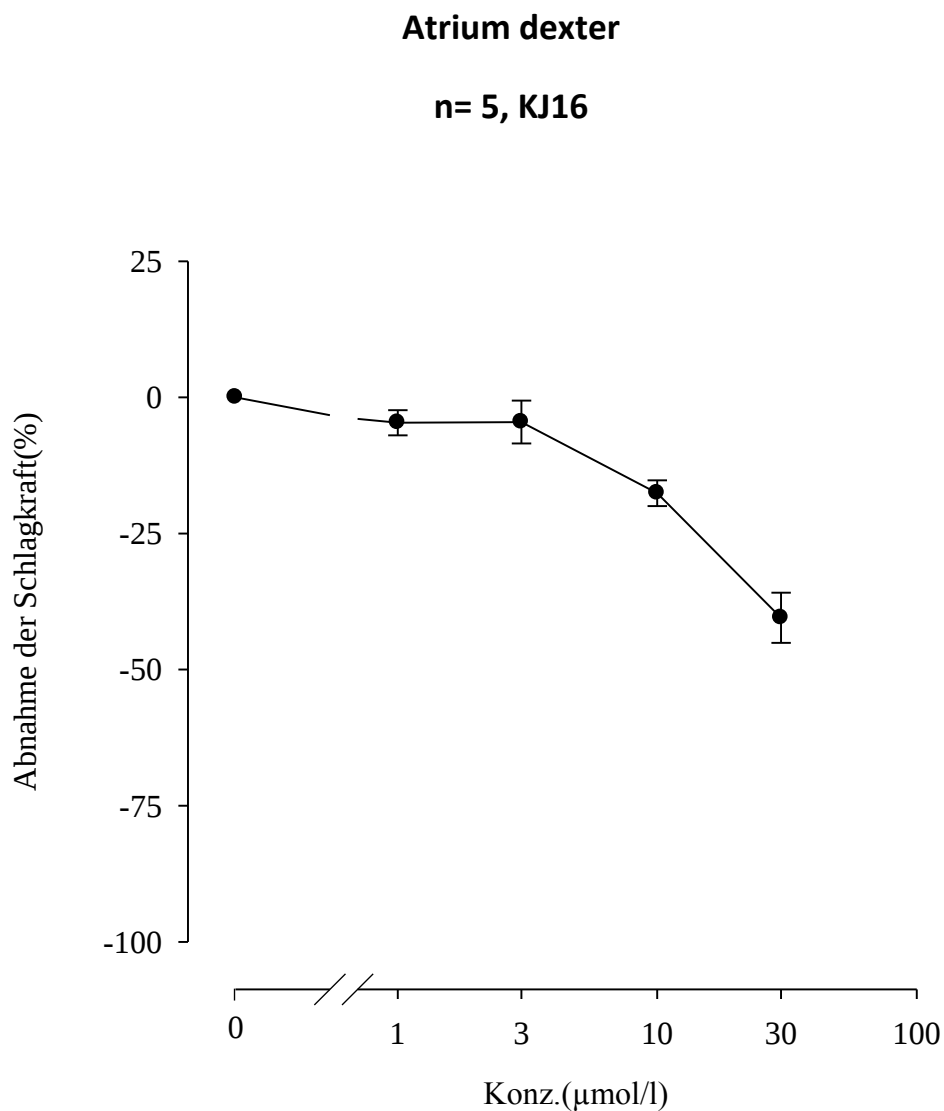
Tabelle 11: Wirkung von KJ16 auf die Schlagfrequenz des Atrium dexter

KJ16 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	247 $\pm$ 8.45	0 $\pm$ 0	5	----
1	235 $\pm$ 6.32	-4.67 $\pm$ 2.31	5	n.s.
3	235 $\pm$ 7.41	-4.54 $\pm$ 3.93	5	n.s.
10	203 $\pm$ 5.14	-17.60 $\pm$ 2.37	5	0.05
30	147 $\pm$ 11.68	-40.49 $\pm$ 4.61	5	0.01
100	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	5	0.001

Legende zu Tabelle 11:

Anhand der Tabelle werden die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des Sinusknoten pro Minute, die entsprechenden Standardfehler (SEM), sowohl in Schlägen/min, als auch in %, sowie die Konzentrationsstufen der Testsubstanz ($\mu\text{mol/l}$) und die Anzahl der Versuche (n) ersichtlich.

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von KJ16 auf den Atrium dexter

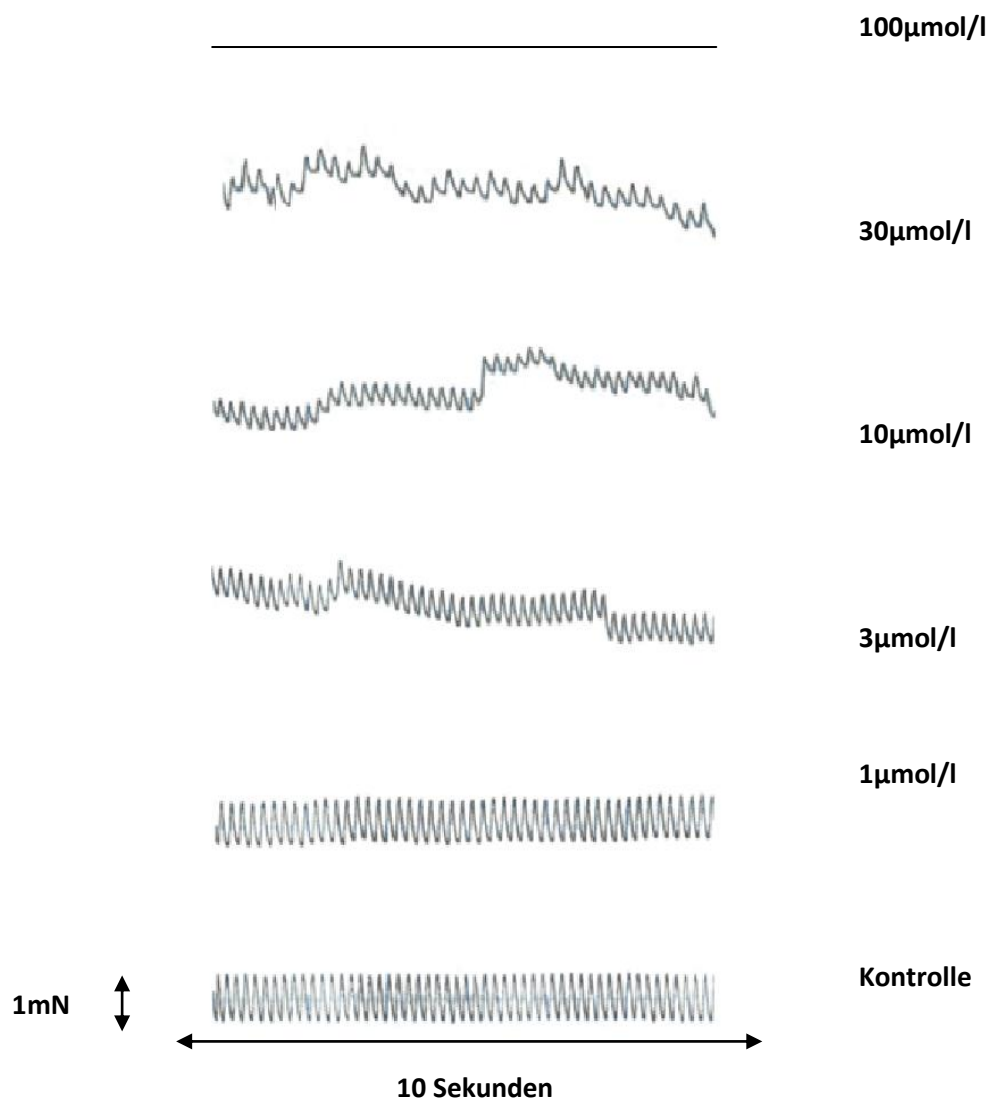


Legende zu Abbildung 25:

Der Graph zeigt die Veränderung der Schlagkraft des Atrium dexter bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ16.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Schlagkraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ16 auf die Schlagfrequenz von Atrium dexter



Legende zu Abbildung26 :

Die Originalaufzeichnung zeigt eine Abnahme der Schlagfrequenz unter kumulativer Konzentrationserhöhung der Testsubstanz KJ16 in Abständen von 45 Minuten.

3.2.5 Wirkung von KJ16 auf Musculi papillares

Nachdem bei einer Zugabe von 300µmol/l der Testsubstanz KJ5, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, eine Zunahme der Kontraktionskraft zu beobachten war, entschied man auch hier diese Konzentration zu testen.

Aus 5 Versuchen wurden die Mittelwerte der Kontrollwerte errechnet und als Standard festgelegt.

Zu beobachten war ein stetiger Abfall der Kontraktionskraft bis zu einer Konzentration von 100µmol/l. Ab einer Konzentration von 300µmol/l stieg die Kontraktionskraft wiederum an.

Tabelle 12: Wirkung von KJ16 auf die Kontraktionskraft von Musculi papillares

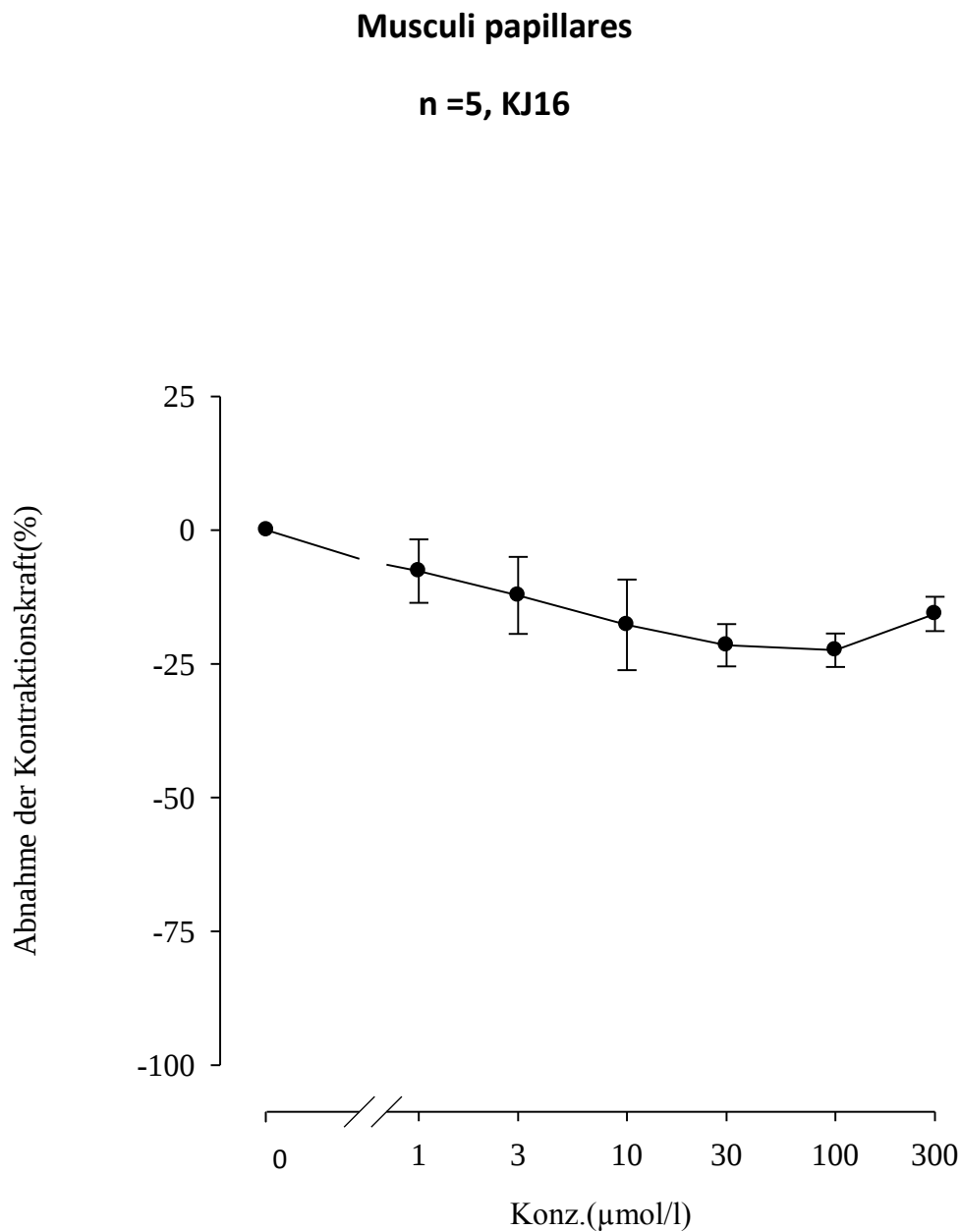
KJ16 (µmol/l)	fc±SEM (mN)	fc±SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	3.22±1.04	0±0	5	----
1	2.92±0.94	-7.65±5.94	5	n.s.
3	2.96±1.03	-12.21±7.20	5	n.s.
10	2.83±1.02	-17.71±8.47	5	0.05
30	2.52±0.89	-21.51±3.96	5	0.05
100	2.43±0.78	-22.45±3.12	5	0.05
300	2.66±0.85	-15.66±3.22	5	0.05

Legende zu Tabelle 12:

fc = arithmetisches Mittel der Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler in mN

Abbildung 26: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von KJ16 bei Musculi papillares

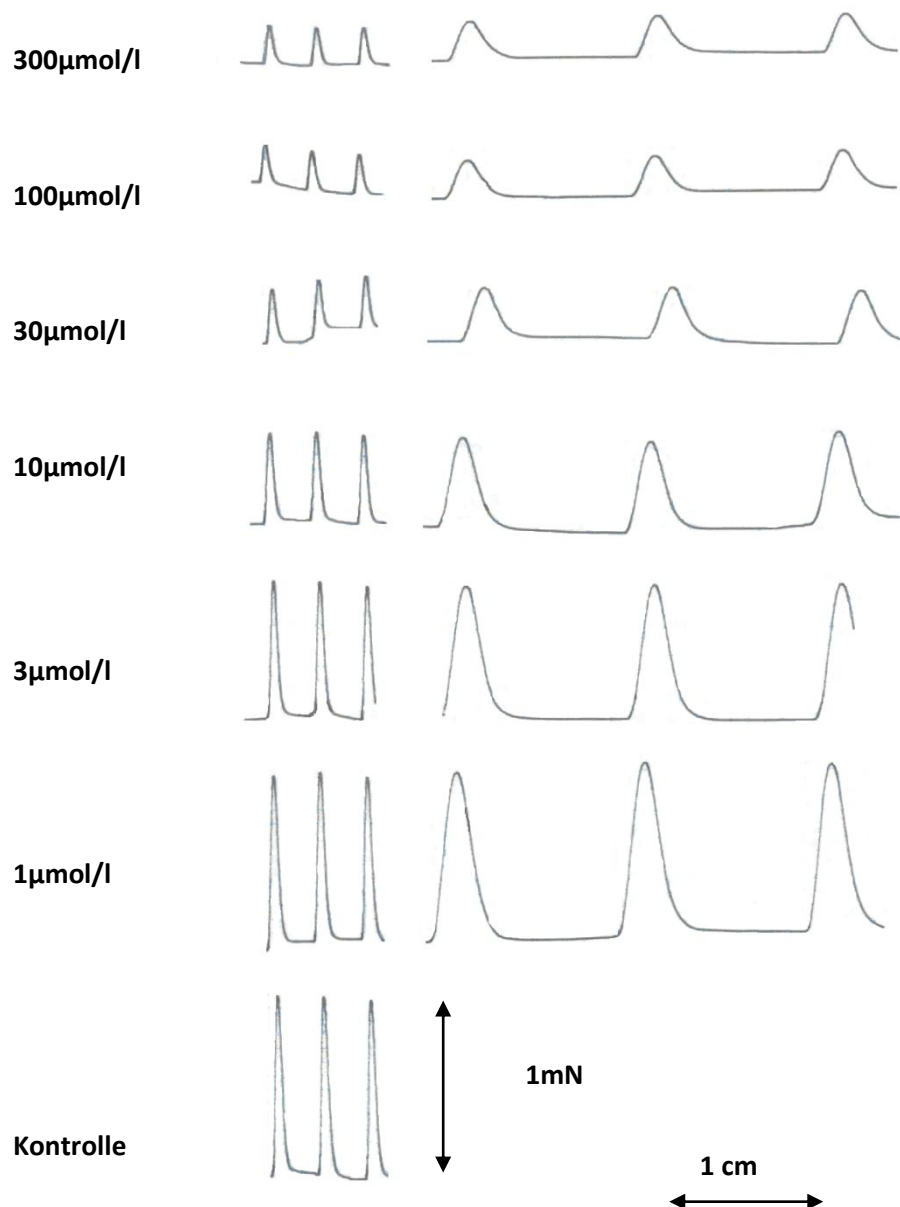


Legende zu Abbildung 26:

Der Graph zeigt die Veränderung der Konzentrationskraft bei Musculi papillares bei kontinuierlicher Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz KJ16.

Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration wurden als Punkte, ihre Standardfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz KJ16 auf die Kontraktionskraft von Musculi papillares



Legende zu Abbildung 27:

Die Aufnahme zeigt die Änderung der Kontraktionskraftamplitude nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz KJ16 in Intervallen von 45 Minuten.

3.3 Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf isolierte Organe

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, wurde für beide Testsubstanzen das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Da aber auch dieses Lösungsmittel eine Wirkung auf die isolierten Präparate hatte, musste diese Wirkung in die Berechnung der Ergebnisse miteinbezogen werden.

Dazu wurden die isolierten Organe in einer eigenen Versuchsreihe getestet. Dabei wurde DMSO, wie bei den Versuchen mit der Testsubstanz, nach je 45 Minuten kumulativ in den Konzentrationen 1µmol/l, 3µmol/l, 10µmol/l, 30µmol/l, 100µmol/l und 300µmol/l zugegeben.

3.3.1 DMSO- Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Dimethylsulfoxid verursachte bei einer Konzentration von 300µmol/l eine Abnahme des Muskeltonus von 100% auf 84.79 ± 4.43 %.

Tabelle 13: DMSO- Wirkung auf die Arteria pulmonalis

DMSO (µmol/l)	fc±SEM (mN)	fc±SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9.82±0.39	0±0	3	----
1	9.92±0.35	-2.72±1.72	3	n.s.
3	9.71±0.37	-4.01±3.05	3	n.s.
10	9.40±0.40	-3.39±1.38	3	n.s.
30	9.07±0.58	-3.74±1.24	3	n.s.
100	8.80±0.53	-2.91±1.03	3	n.s.
300	8.32±0.63	-0.87±1.16	3	n.s.

Legende zu Tabelle 13:

fc = arithmetisches Mittel

SEM = Standardfehler in mN

3.3.2 DMSO- Wirkung auf Aorta

Dimethylsulfoxid verursachte bei einer Konzentration von 300 μ mol/l eine Abnahme des Muskeltonus von 100% auf 99.66 ± 1.42 %.

Tabelle 14: DMSO- Wirkung auf die Aorta

DMSO (μ mol/l)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9.78 $\pm$ 2.14	0 $\pm$ 0	3	----
1	10.00 $\pm$ 2.23	-1.84 $\pm$ 0.95	3	n.s.
3	10.00 $\pm$ 2.21	-1.93 $\pm$ 0.91	3	n.s.
10	9.95 $\pm$ 2.20	-1.51 $\pm$ 1.38	3	n.s.
30	9.92 $\pm$ 2.20	-1.08 $\pm$ 2.46	3	n.s.
100	9.83 $\pm$ 2.15	-0.34 $\pm$ 2.34	3	n.s.
300	9.21 $\pm$ 1.88	-0.34 $\pm$ 1.42	3	n.s.

Legende zu Tabelle 14:

fc = arithmetisches Mittel

SEM = Standardfehler in mN

3.3.3 DMSO- Wirkung auf Ileum terminalis

Dimethylsulfoxid verursachte bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ eine Abnahme des Muskeltonus von 100% auf $57.20 \pm 4.38 \%$.

Tabelle 15: DMSO- Wirkung auf Ileum terminalis

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	30.54 ± 10.19	0 ± 0	3	----
1	30.26 ± 10.18	-1.51 ± 0.53	3	n.s.
3	29.64 ± 10.10	-4.56 ± 1.92	3	n.s.
10	29.09 ± 10.28	-8.66 ± 3.38	3	n.s.
30	28.48 ± 10.24	-11.59 ± 3.65	3	0.05
100	28.83 ± 10.12	-19.35 ± 4.20	3	0.05
300	28.03 ± 9.98	-42.80 ± 6.38	3	0.01

Legende zu Tabelle 15:

f_c = arithmetisches Mittel

SEM = Standardfehler in mN

3.3.4 DMSO- Wirkung auf Musculi papillares

Dimethylsulfoxid verursachte bei einer Konzentration von 300 μ mol/l eine Abnahme der Kontraktionskraft von 100% auf 45.28 ± 4.38 %.

Tabelle 16: DMSO- Wirkung auf Musculi papillares

DMSO (μ mol/l)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	0.47 $\pm$ 0.06	0 $\pm$ 0	3	----
1	0.46 $\pm$ 0.08	-3.70 $\pm$ 3.70	3	n.s.
3	0.43 $\pm$ 0.07	-10.42 $\pm$ 3.84	3	n.s.
10	0.36 $\pm$ 0.05	-23.79 $\pm$ 9.82	3	0.05
30	0.29 $\pm$ 0.03	-37.40 $\pm$ 2.32	3	0.01
100	0.25 $\pm$ 0.02	-45.95 $\pm$ 10.26	3	0.01
300	0.21 $\pm$ 0.03	-54.72 $\pm$ 4.38	3	0.001

Legende zu Tabelle 16:

fc = arithmetisches Mittel

SEM = Standardfehler in mN

4. Diskussion

Wie in Abschnitt 1.1 besprochen, war das Ziel dieser Diplomarbeit, zwei neu synthetisierte Stilbenderivate (KJ5 und KJ16) auf ihre Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen.

Getestet wurden die beiden Testsubstanzen an glatter Muskulatur, wie der Arteria pulmonalis, der Aorta und dem terminalen Ileum. Weiters wurden die Substanzen an der Herzmuskulatur, wie Atrium dexter und Musculi papillares getestet.

Bei den Versuchen, wurde auf eine mögliche Veränderung der Kontraktionskraft, sowie auf eine Änderung der inotropen und chronotropen Wirkung untersucht.

Dann wurden die Wirkungen der beiden Testsubstanzen an den jeweiligen Organen miteinander verglichen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die strukturellen Veränderungen, einen Einfluss auf die Wirkung im Vergleich mit der Leitsubstanz Resveratrol besitzen.

4.1 Vergleich der beiden Testsubstanzen an isolierten Organen

Dazu wurde die Wirkung der beiden Testsubstanzen (KJ5 und KJ16) an fünf verschiedenen Präparaten (der Arteria pulmonalis, der Aorta, dem terminalen Ileum, dem Atrium dexter und dem Musculi papillares) in den Konzentrationen $1\mu\text{mol/l}$, $3\mu\text{mol/l}$, $10\mu\text{mol/l}$, $30\mu\text{mol/l}$, $100\mu\text{mol/l}$ und $300\mu\text{mol/l}$ getestet. Die Konzentration von $300\mu\text{mol/l}$ wurde nur an den Präparaten von Musculi papillares getestet.

4.1.1 Vergleich bei Arteria pulmonalis

Beide Substanzen wirkten relaxierend auf die Arteria pulmonalis.

Bei der Testsubstanz KJ5 war eine stetige Abnahme der Kontraktionskraft zu beobachten. Sie sank bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ auf $-28.02 \pm 0.97 \%$ bezogen auf die Kontrolle. Ein EC_{50} -Wert konnte mit dieser Verbindung nicht erreicht werden.

Im Vergleich dazu, war bei der Testsubstanz KJ16 erst ab einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ eine Abnahme der Kontraktionskraft zu beobachten. Die jedoch ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ statistisch signifikant wurde. Bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ wurde eine Abnahme von $-78.64 \pm 4.56 \%$ bezogen auf die Kontrolle beobachtet. Dazu wurde bei $27.80\mu\text{mol/l}$ der EC_{50} -Wert erreicht.

4.1.2 Vergleich bei isolierter Aorta

Bei beiden getesteten Substanzen stellte man eine relaxierende Wirkung an der Aorta fest.

Allerdings ist die Abnahme der Kontraktionskraft bei der Testsubstanz KJ5 sehr gering. Bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ entspricht die Abnahme $-8.32 \pm 2.42 \%$ bezogen auf die Kontrolle.

Bei der Testsubstanz KJ16 ist dagegen ab einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Abnahme zu beobachten. Ab $100\mu\text{mol/l}$ beträgt sie $-43.84 \pm 2.74 \%$ bezogen auf die Kontrolle.

4.1.3 Vergleich bei Ileum terminalis

Auch hier ist bei beiden Testsubstanzen eine relaxierende Wirkung zu beobachten.

Sowohl bei KJ5 als auch bei KJ16 war eine deutliche Reduktion der Kontraktionskraft bemerkbar. Diese lag bei 100µmol/l KJ5 bei -89.02 ± 2.05 bezogen auf die Kontrolle. Damit wurde ein EC_{50} von 25.50µmol/l errechnet.

Bei KJ16 ergab die Abnahme bei 100µmol/l -96.57 ± 4.33 %. Der EC_{50} lag bei 12.85 µmol/l.

4.1.4 Vergleich bei Atrium dexter

Bei der Testsubstanz KJ16 konnte ein negativer chronotroper Effekt, der ab einer Konzentration von 10µmol/l signifikant wurde, festgestellt werden. Bei der letzten Einspritzung einer Konzentration von 100µmol/l reduzierte sich die Schlagfrequenz auf -100 ± 0 %.

Ein ebenfalls negativer chronotroper Effekt wurde auch bei der Testsubstanz KJ5 beobachtet. Im Gegensatz zu KJ16 war bei KJ5 auch bei einer Konzentration von 100µmol/l noch eine Schlagfrequenz messbar. Diese betrug -23.07 ± 4.87 % bezogen auf die Kontrolle.

4.1.5 Vergleich bei Musculi papillares

Eine Abnahme von -21.79 ± 3.97 % der Kontraktionskraft konnte bei der Testsubstanz KJ5 bei einer Konzentration von 3µmol/l festgestellt werden. Danach erfolgte bei 10µmol/l eine leichte Zunahme und bei 30µmol/l erneut eine Abnahme der Kontraktionskraft. Diese Abnahme setzte sich auch bei einer Konzentration von 100µmol/l fort und stieg bei 300µmol/l wieder an. Bei dieser Endkonzentration stellte man eine Abnahme von -8.28 ± 2.79 % fest.

Im Vergleich dazu sank die Kontraktionskraft bei KJ16 bis zu einer Konzentration von 100µmol/l kontinuierlich. Bei einer Konzentration von 300µmol/l war allerdings ein Anstieg auf -15.66 ± 3.22 % zu beobachten.

4.2 Die beiden Testsubstanzen im Vergleich mit Resveratrol

Tabelle 17: Vergleich der beiden Testsubstanzen mit Resveratrol an der glatten Muskulatur

Substanz	Aorta	Arteria pulmonalis	Terminales Ileum
KJ5 $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	-8.32 ± 2.42	-28.02 ± 0.97	-89.02 ± 2.05
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	----	----	25.50
KJ16 $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	-43.84 ± 2.74	-78.64 ± 4.56	-96.57 ± 4.33
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	----	27.80	12.85
Resveratrol $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 300 $\mu\text{mol/l}$; bezogen auf Kontrollwert	-75.72 ± 17.66	-81.06 ± 3.96	-69.68 ± 2.62
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	145	126	46.4

Legende zu Tabelle 17:

Daten von Resveratrol stammen Löttsch V (2004)

Bei den Versuchen an der Aorta, wurde weder bei der Testsubstanz KJ5, noch bei KJ16 ein EC_{50} - Wert erreicht.

Bei gleichem Versuchsablauf bewirkte Resveratrol eine Relaxation der glatten Muskulatur, die sich ab 300 $\mu\text{mol/l}$ als signifikant erwies und zu einem EC_{50} - Wert von 145 $\mu\text{mol/l}$ führte. (Löttsch 2004).

Bei den Präparaten von Arteria pulmonalis, konnte nur die Testsubstanz KJ16 einen EC_{50} - Wert erreichen, der aber deutlich unter dem von Resveratrol lag.

Auch am Terminalen Ileum waren die beiden Testsubstanzen dem Resveratrol überlegen.

Tabelle 18: Vergleich der getesteten Substanzen mit Resveratrol an der Herzmuskulatur

Substanz	Atrium dexter	Musculi papillares
KJ5 $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	-23.07 ± 4.87	-8.28 ± 2.79 (bei 300 $\mu\text{mol/l}$)
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	----	----
KJ16 $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	-100 ± 0	-15.66 ± 3.22 (bei 300 $\mu\text{mol/l}$)
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	----	----
Resveratrol $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 300 $\mu\text{mol/l}$; bezogen auf Kontrollwert	$-60,86 \pm 9,57$	$118,27 \pm 20,25$
EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	----	----

Legende zu Tabelle 18:

Daten von Resveratrol stammen von Löttsch V (2004)

Bei Substanz KJ16 ist die Abnahme der Schlagfrequenz beim Vorhof stärker ausgeprägt als beim Resveratrol selbst und statistisch signifikant. Hingegen zeigt Substanz KJ5 eine schwächere Wirkung auf.

Die beiden Testsubstanzen zeigten jeweils nur eine leichte negative inotrope Wirkung, jedoch nicht statistisch signifikant.

Resveratrol wies eine leicht positive inotrope Wirkung auf, die aber statistisch nicht von Bedeutung ist. Bei den Versuchen mit Resveratrol wurde kaum eine Wirkung auf die Herzmuskulatur ausgeübt (Löttsch 2004).

5. Zusammenfassung

Aufgabe und Zielsetzung dieser Diplomarbeit war es, zwei neu synthetisierte Stilbenderivate (KJ5 und KJ16), auf ihre Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen zu untersuchen.

Dabei dienten Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis, um die Wirkung auf die glatte Muskulatur zu testen. Um eine Wirkung auf die Herzmuskulatur zu überprüfen, bediente man sich Präparaten von Atrium dexter und Musculi papillares.

Von Interesse war nicht nur die Eigenwirkung der jeweiligen Testsubstanz, sondern auch der Vergleich mit der bereits sehr gut erforschten Leitsubstanz Resveratrol.

Aus den Versuchen an den isolierten Organen des Meerschweinchens konnten folgende mögliche Schlüsse gezogen werden:

KJ5 zeigte bei den Versuchen an der isolierten Aorta keine signifikante Änderung der Kontraktionskraft, hingegen war bei KJ16 eine deutliche Abnahme sichtbar.

Auch im Vergleich der beiden Substanzen auf die Wirkung auf Arteria pulmonalis erwies sich KJ16 als deutlich potentere Verbindung. Hier wurden auch die Werte der Leitsubstanz Resveratrol übertroffen.

Ein ähnliches Bild ergaben die Versuche am terminalen Ileum, nur konnten hier sowohl KJ16, als auch KJ5 deutlich stärkere Wirkungen als die Leitsubstanz erzielen.

Bei den Versuchen an der Herzmuskulatur, zeigte sich nur KJ16 am Atrium dexter als interessante Verbindung.

6. Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B., et al., *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. Anticancer Res. 24 2783-2840. (2004).

Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, SchröderJ, Noel (2004) an aldol switch discovered in stilben syntetases mediates cyclization specificity of type 3 polketide synthases. Chemistry & Biology 11: 1179- 1197

Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP (1996) Plasma urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3, 5, 4'- Trihydroxystilben) after short- term or prolonged administration or red wine to rats. Int J Tissue React 18: 67-71

Bianchini F & Vainio H.: Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? Eur J Cancer Prev; 12(5):417-425. (2003).

Burger A, Wachter H (1998) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. Walter de Gruyter Berlin New York pp 1064

Cal C, Carban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B (2003) Resveratrol and Cancer. Chemopreventive, apoptosis and chemo immunosensitizing activities. Curr Med Chem-Anti-Cancer agents 3: 77-93

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

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

Ding XZ and Aldrian TE (2002) Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human cancer cells. Pancreas 25: 71- 76

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

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

Hung L-M, Chen J.K, Hung S-S (1997) Cardio protective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Science* 275: 218- 220

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

Kopp P (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine a possible explanation for the conundrum of the “French paradox”? *European Journal of Endocrinology* 138: 619- 620

Leighton F, Cuevas A, Guasch V et al.: *Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans*. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25(2-3):133-141. (1999).

Lötsch V (2004) Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivates (STPAR29A) auf verschiedene isolierte Präparate von Meerschweinchen. Diplomarbeit Universität Wien

Mutschler E, Geisslinger g, Kroemer HK, Schäfer- Korting M (2001) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart pp 332, 455-456

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

Silbernagl S, Lang F (1998) Taschenatlas der Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart pp 294

Soleas GJ, Diamandis EP and Goldberg DM (2001) the world of Resveratrol. Adv Exp Med Biol 492: 159-182

Ther L (1965) Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart pp 286- 303

7. Curriculum vitae

Name	Nicolas Alexander Ruhm
Geburtsdatum	22. Juni 1978
Geburtsort	1170 Wien
Wohnort	Gladiolenweg 9 2601 Sollenau
Staatsbürgerschaft	Österreich
Mutter	Maria Ruhm 12.02.50
Vater	Johann Ruhm 21.04.47
Geschwister	Verena Ruhm 01.08.72
Ausbildung	
1984-1987	Volksschule Schrebergasse, 1220 Wien
1987-1988	Volksschule 2601 Sollenau
1988-1992	Hauptschule 2603 Felixdorf
1992-1993	Polytechnischer Lehrgang, 2700 Wr. Neustadt
1993-1996	Pharmazeutisch-Kaufmännische Assistenten Lehre, in der Apotheke 2601 Sollenau; Lehrabschlußprüfung 1996
1997	Externistenprüfung in den Fächern Biologie und Chemie am Bundesoberstufenrealgymnasium Hegelgasse, 1010 Wien
1999	Studienberechtigungsprüfung am Polycollege, 1050 Wien