



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Bestimmung der Wirkstärke von zwei neu synthetisierten Thioamiden an  
isolierten Organpräparaten von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin: Maria Körmer

Matrikel-Nummer: 0005301

Studienrichtung (lt. Studieblatt): Pharmazie

Betreuer: AO Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, am

Ich möchte mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die am Entstehen dieser Diplomarbeit beteiligt waren.

**Mein Dank gilt:**

Herrn Prof. Dr. Christian Studenik, der durch seine ständige fachliche als auch persönliche Betreuung eine derart angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen hat, dass mir das Arbeiten an der Diplomarbeit zur schönsten Zeit meines Studiums geworden ist.

Meinen Laborkollegen für die bereitwillige Unterstützung und Hilfeleistung bei den täglichen Arbeitsprozessen.

Meinen Eltern, die mich während meiner ganzen Studententätigkeit in vollster Kraft unterstützt haben und auf die ich immer zählen darf.

**Ganz besonders gilt mein Dank:**

Meiner Schwester Elisabeth, die mir in allen Höhen und Tiefen meines Studiums ein sicherer Begleiter war.

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                         |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>                                                  | <b>4</b>  |
| 1.1      | Erregungsbildung und Erregungsleitung im Herzen.....                    | 4         |
| 1.2      | Calciumkanäle als Target für Coronartherapeutica.....                   | 6         |
| <b>2</b> | <b>Zielsetzung.....</b>                                                 | <b>10</b> |
| <b>3</b> | <b>Material und Methodik .....</b>                                      | <b>11</b> |
| 3.1      | Versuchstiere.....                                                      | 11        |
| 3.2      | Isolierung und Präparation der Organe.....                              | 12        |
| 3.2.1    | Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs .....                    | 12        |
| 3.2.2    | Isolierung und Präparation der Pulmonalarterie.....                     | 13        |
| 3.2.3    | Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln .....                    | 13        |
| 3.2.4    | Isolierung und Präparation der Aorta .....                              | 14        |
| 3.2.5    | Isolierung und Präparation des terminalen Ileums .....                  | 15        |
| 3.3      | Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode).....                           | 16        |
| 3.4      | Versuchsanordnung.....                                                  | 17        |
| 3.4.1    | Apparatur für die Versuche am Papillarmuskel und Vorhof.....            | 17        |
| 3.4.2    | Apparatur für die Versuche an Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum ..... | 20        |
| 3.4.3    | Darstellung und Registrierung des Kraftwandlers.....                    | 21        |
| 3.5      | Versuchsablauf .....                                                    | 22        |
| 3.5.1    | Rechter Vorhof .....                                                    | 22        |
| 3.5.2    | Papillarmuskel .....                                                    | 23        |
| 3.5.3    | Arteria pulmonalis .....                                                | 24        |
| 3.5.4    | Aorta .....                                                             | 25        |
| 3.5.5    | Terminales Ileum .....                                                  | 26        |
| 3.6      | Testsubstanzen WHG 60T und WHG 70T .....                                | 27        |
| 3.7      | Auswertung und Messgrößen.....                                          | 30        |
| 3.7.1    | Auswertung der Versuche an rechten Vorhöfen.....                        | 30        |
| 3.7.2    | Auswertung der Versuche an Papillarmuskeln.....                         | 31        |
| 3.7.3    | Auswertung der Versuche an glattmuskulären Präparaten.....              | 31        |
| 3.8      | Statistik.....                                                          | 32        |

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4 Ergebnisse.....</b>                                                                    | <b>33</b> |
| <b>4.1 Wirkung von WHG70T auf isolierte Meerschweinchen - Organe.....</b>                   | <b>33</b> |
| 4.1.1 Wirkung von WHG70T auf die Schlagfrequenz des Vorhofs.....                            | 33        |
| 4.1.2 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels.....                 | 37        |
| 4.1.3 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis ....              | 41        |
| 4.1.4 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta .....               | 45        |
| 4.1.5 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen<br>Ileum ..... | 49        |
| <b>4.2 Wirkung von WHG60T auf isolierte Meerschweinchen - Organe.....</b>                   | <b>53</b> |
| 4.2.1 Wirkung von WHG60T auf die Schlagfrequenz des Vorhofs.....                            | 53        |
| 4.2.2 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels.....                 | 57        |
| 4.2.3 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis ....              | 61        |
| 4.2.4 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta .....               | 65        |
| 4.2.5 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen<br>Ileum ..... | 69        |
| <b>5 Diskussion .....</b>                                                                   | <b>73</b> |
| <b>5.1 Strukturvergleich von WHG60T und WHG70T .....</b>                                    | <b>73</b> |
| <b>5.2 Wirkungsvergleich der Testsubstanzen WHG60T und WHG70T .....</b>                     | <b>75</b> |
| 5.2.1 Auswirkungen auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs .....                         | 75        |
| 5.2.2 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels .....                      | 77        |
| 5.2.3 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis .....                   | 78        |
| 5.2.4 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft der Aorta .....                                | 79        |
| 5.2.5 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum .....                     | 80        |
| <b>6 Zusammenfassung .....</b>                                                              | <b>81</b> |
| <b>7 Literaturverzeichnis .....</b>                                                         | <b>82</b> |
| <b>8 Curriculum Vitae .....</b>                                                             | <b>85</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Erregungsbildung und Erregungsleitung im Herzen

### Elektrophysiologie

Die rhythmischen Aktionen des Herzens haben in Form einer elektrischen Erregung normalerweise ihren Ursprung in den Zellen des Sinusknoten im rechten Vorhof. Diese Zellen sind befähigt die elektrischen Erregungen spontan zu bilden und haben somit Schrittmacherfunktion, die die Voraussetzung für die Automatie des Herzens darstellt und den zeitlichen Abstand zwischen zwei Aktionspotentialen bestimmt – die Herzfrequenz.

Über die Vorhofmuskulatur erreicht die Erregung den atrioventrikulären Knoten, von wo sie verzögert über die Tawaraschenkel des His'schen Bündels und deren Purkinje – Fasern zur Muskulatur beider Ventrikel geleitet wird. Die Aktivierung der gesamten Muskulatur beider Ventrikel ist in weniger als 0,1 Sekunden abgeschlossen. Bei Ausfall der Spontanaktivität des Sinusknotens können AV-Knoten und Purkinje-Fasern die Schrittmacherfunktion übernehmen und stellen somit ein sekundäres bzw. tertiäres Erregungsbildungszentrum dar. Verantwortlich für die Erregungsleitung ist eine Änderung im Membranpotential, das durch die Konzentration von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen auf beiden Seiten der Membran bestimmt wird. Diese Ionen können die Membran durch ionenselektive Kanäle passieren, die spannungsabhängig ihre Membran-Ionenleitfähigkeit ändern. Die Veränderung des Membranpotentials während einer Herzaktion, die aus Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen verschiedener ionaler Einwärts- und Auswärtströme resultiert, wird als Aktionspotential bezeichnet (Forth W 2001).

### Aktionspotential

Während einer Herzaktion durchläuft jede Herzmuskelzelle ein Aktionspotential, das sich aus fünf Phasen zusammensetzt.

Die Phase 0 ist gekennzeichnet durch eine rasche Depolarisation. Um eine Depolarisation der Zellmembran auszulösen, die so stark ist, dass eine fortgeleitete Erregung entsteht, muss ein Schwellenwert von -75 mV überschritten werden. Erst dann kommt es durch

schlagartige Öffnung der Natrium-Kanäle und den Einwärtsstrom von Natrium zum raschen Potentialanstieg (Aufstrichphase).

Ebenso rasch schließen in Phase 1 die Natrium-Kanäle wieder, sodass das Aktionspotential leicht abfällt; es kommt zu einer unvollständigen Repolarisation, wobei ein kurz anhaltender Kalium-Ausstrom eine Kerbe in der Aktionspotential-Kurve verursacht.

Mit Beginn der Depolarisation setzt ein Calcium-Einstrom ein, der in Phase 2 seinen Höhepunkt erreicht. Dieser Calcium-Einstrom, der durch spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle fließt und im Gleichgewicht mit einem geringen Kalium-Ausstrom steht, hält das Potential auf einem Plateau. Er führt auch gleichzeitig zur Freisetzung von Calcium aus dem sarcoplasmatischen Reticulum und bildet damit die Grundlage der myokardialen Kontraktion.

Erst wenn die Calcium-Leitfähigkeit soweit wieder abgenommen hat, dass sie die in dieser Zeit herabgesetzte Kalium-Leitfähigkeit unterschreitet, entsteht ein Nettoausstrom von Kationen, der die Repolarisation in Phase 3 einleitet. Durch diese Negativierung des Membranpotentials wird die Kalium-Leitfähigkeit erhöht, was zur vollständigen Repolarisation führt. Während des gesamten Aktionspotentials ist die Herzmuskelfaser refraktär, es können keine weiteren Erregungen ausgelöst werden. Diese Refraktärperiode ist eine Folge der Inaktivierung des schnellen Natrium-Kanals nach dem initialen Natrium-Einstrom, sodass ein weiteres Aktionspotential nicht entstehen kann.

In Phase 4 herrscht ein Ruhemembranpotential, welches ein Kalium-Diffusionspotential darstellt und alle Zellen, die zur spontanen Impulsbildung befähigt sind, betrifft. Getragen wird diese langsame Depolarisation durch einen langsam abnehmenden Kalium-Auswärtsstrom, einen Calcium-Einwärtsstrom und einen nicht selektiven Natrium-/Kalium-Einwärtsstrom (Mutschler E 2001).

## 1.2 Calciumkanäle als Target für Coronartherapeutica

Calcium-Antagonisten zählen mit ihren unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften zu den wichtigsten Wirkstoffklassen in der Herz-Kreislauf – Therapie. Anfang der 60er Jahre untersuchte der Physiologe Albrecht Fleckenstein eine koronardilatierende Substanz, das Verapamil, am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel und hat zur Beschreibung der Kontraktionsverminderung von Verapamil den Terminus „Calcium-Antagonist“ geprägt.

Die Wirkungsweise besteht in einer Abnahme der mechanischen Kontraktilität bei erhaltener elektrischer Aktivität, also einer elektromechanischen Entkopplung. Heute kann die „Calcium-antagonistische“ Wirkungsweise als hochselektive Blockade spannungsabhängiger Calcium-Kanäle verstanden werden. Das gemeinsame Grundprinzip der Calciumkanal-Blocker beruht auf einer Hemmung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle in der Membran von Herz- und glatten Muskelzellen. Dies führt zu einem verminderten Calcium-Einstrom während des Aktionspotentials, wodurch eine Aktivierung des kontraktilen Systems verhindert wird. Diese negativ inotrope Wirkung am Herzen bewirkt mit der Herabsetzung der Kontraktilität eine Abnahme des myokardialen Sauerstoffbedarfs. Gleichzeitig wird der koronare und periphere Gefäßwiderstand verringert, was wesentlich zur antihypertensiven Wirkung beiträgt (Goldmann S Pharmazie unsrer Zeit 05-2005).

### Calciumkanäle

Die hier angesprochenen Calciumkanäle zählen zur Familie der spannungsabhängigen (voltage-gated) Ionenkanäle. Darüberhinaus gibt es zum Beispiel in Blutgefäßen Liganden-kontrollierte (ligand-operated) und Wandstress-abhängige (stretch-operated) Ionenkanäle.

Heute ist bekannt, dass in den Membranen erregbarer Zellen verschiedene Typen von Calciumkanälen (L-, T-, N-, P-/Q-, R-Typ) exprimiert werden, die sich in ihren elektrophysiologischen, strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Für das Verständnis der Wirkungsweise der therapeutisch eingesetzten Calciumkanal-Blocker sind die T- (transient/tiny) und insbesondere die L- (long lasting/large) Kanäle

bedeutsam. N-, P-/Q- und R-Typ Calciumkanäle besitzen neuronale Funktionen (Schubert-Zsilavecz M Pharmazie unsrer Zeit 05-2005).

Der L-Typ-Kanal-vermittelte Calcium-Einstrom in glatte Muskel- und Herzmuskelzellen beeinflusst den Tonus der Gefäße sowie die Kontraktilität des Myokards. Der T-Typ - Calciumstrom ist an der Erzeugung von Schrittmacherpotentialen im Sinus- und arterioventrikulären Knoten des Herzens sowie glattmuskulären Geweben der Gefäße und des Darms beteiligt und trägt damit zur autonomen Steuerung dieser Organe bei. Der T-Typ Calciumkanal wird bereits bei geringer Depolarisation aktiviert (low voltage-activated), während alle anderen Typen eine höhere Spannungsänderung benötigen (Clapham DE 2003).

Die Struktur des L-Typ Calcium-Kanals, der für die therapeutische Wirkung die größte Bedeutung besitzt, ist weitgehend aufgeklärt. Dieser spannungsabhängige Kanal besteht generell aus einer Porenregion mit Öffnungsmechanismus (gates), Ionenselektivitätsfilter sowie einem Membran-Spannungssensor zur Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit. Die Kanalpore wird allein von der  $\alpha_1$ -Untereinheit des Kanalproteins gebildet. Sie besteht aus vier sich wiederholenden Motiven mit je sechs Transmembran-Segmenten. Sowohl der Carboxy- als auch der Amino-Terminus liegen auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Die drei chemischen Klassen der Calciumantagonisten binden an unterschiedlichen Bindungsstellen an der  $\alpha_1$ -Untereinheit (Knorr A Pharmazie unsrer Zeit 05-2005).

Die  $\alpha_2\delta$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten haben modulierenden Einfluss: sie kontrollieren die Kanalexpression und beeinflussen die Bindung von Wirkstoffen und die Kanalöffnung. Schließlich sind sie an der Verankerung der Pore in der Membran beteiligt (Adams DJ 1990).

Der Typ-L Calcium-Kanal vermittelt im Myokard den so genannten „slow inward current“, den langsamen Calcium-Einstrom. Dieser bildet das Plateau des Aktionspotentials der Herzmuskelzelle. Das so eindringende extrazelluläre Calcium setzt das kontraktionsauslösende Calcium aus den intrazellulären Speichern frei.

Während kardiale L-Typ Calcium-Kanäle über  $\beta$ -adrenerge Stimulation mittels cAMP-vermittelter Phosphorylierung geöffnet werden, werden L-Kanäle in glatten Muskelzellen über das Inositolphosphat-System reguliert (Striessnig J 1998).



## Calcium – Kanalblocker

Aus therapeutischer Sicht versteht man unter diesem Begriff Antagonisten der Typ-L Calcium-Kanäle.

Die Bindung der Calciumkanal-Blocker an die  $\alpha_1$ -Untereinheit führt zu einer Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Calcium-Kanäle und damit zu einer Abnahme des nach einwärts gerichteten Calcium-Stroms. Sie führen durch Hemmung des „slow inward current“ zu einer Verkürzung des Aktionspotentials. Da dieses in seiner Spitze durch einen Natriumeinstrom getragen wird, bleibt es aber in Amplitude und Anstiegsgeschwindigkeit unbeeinflusst, woraus eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und eine Verminderung der kontraktiven Aktivierung des Myokards resultieren (Escande D 1993).

Calciumkanal-Blocker sind eine chemisch und pharmakologisch stark heterogene Wirkstoffgruppe. Entsprechend ihrer Grundstruktur werden sie in drei hochspezifische Klassen eingeteilt: die Dihydropyridine, die Phenylalkylamine und die Benzothiazepine. Diese drei Substanzklassen binden an drei unterschiedlichen Bindungsstellen an der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des Calcium-Kanals. Die Bindungsstellen haben zustandsabhängig variable Bindungsaffinitäten. Sie sind relativ hoch im aktivierten und sehr niedrig im Ruhezustand des Kanals (Steffen H 2002).

Dihydropyridine (DHP) wirken vorwiegend an Calcium-Kanälen der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Prototyp ist Nifedipin, dessen Weiterentwicklung zu den Vertretern der zweiten Generation mit bevorzugt vaskulärer Wirkung führte. Vertreter der dritten Generation zeichnen sich durch verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aus. Die Selektivität gegenüber dem Myokard führt zu einer verstärkten Vasodilatation und geringeren kardialen Wirkungen im Vergleich mit den beiden übrigen Substanzklassen. Die allen Klassen eigene negativ inotrope und chronotrope Wirkung ist hier so schwach, dass sie im gesunden Herzen reflektorisch kompensiert wird. Nur bei schon verminderter Rechtsherzfunktion kann die Kontraktilität abgeschwächt werden. Auch die starke Abhängigkeit der Dihydropyridine vom Membranpotential korreliert sehr gut mit ihrer Gefäßselektivität. Die Wirkung nimmt mit dem Depolarisationszustand der Zelle zu. Zellen der glatten Muskulatur haben ein geringeres Membranpotential als die des Herzmuskels (Lichtlen PR 1990).

Prototypen der Phenylalkylamine sind Verapamil und das potentere Derivat Gallopamil. Sie binden wie die DHP hochaffin an einer anderen Stelle der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit der inaktivierten Typ-L Calcium-Kanäle und senken das Plateau des Aktionspotentials im Myokard. Im

Gegensatz zu den DHP ist die Wirkung nicht spannungs-, sondern frequenzabhängig. Nimmt der Calcium-Kanal den Ruhezustand ein, so wird Verapamil aus der Bindung entlassen. Das hat zur Folge, dass der Block des Calcium-Kanals mit zunehmender Schlagfrequenz des Herzens zunimmt (Fleckenstein A 1971). Obwohl die Phenylalkylamine ebenfalls eine vasodilatierende Wirkung zeigen, stehen hier die kardialen Wirkungen im Vordergrund, also die Hemmung der Kontraktilität, des Sinusautomatismus und der Erregungsleitung (Lüscher TF 1998).

Der einzige in der Therapie eingesetzte Vertreter der Klasse der Benzothiazepine ist Diltiazem. Wie die beiden anderen chemischen Klassen bindet es am Typ-L Calcium-Kanal, allerdings an einem dritten Bindungsort, nämlich an der Brücke zwischen den Transmembrandomänen III und IV. Diltiazem steht in seinen pharmakologischen Eigenschaften zwischen den DHP und den Phenylalkylaminen. Es senkt ebenfalls das Plateau des Aktionspotentials im Myokard und hat eine kardiodepressive Wirkung. Es tendiert zur Auslösung einer leichten Sinusbradykardie. Wie bei Verapamil sind die Interaktionen von Diltiazem mit dem Calcium-Kanal vorwiegend Frequenz- und weniger Membranpotential-abhängig (Gasser R 1990).

Bei den vorwiegend vaskulär wirkenden DHP kann es bedingt durch den Blutdruckabfall zu einer indirekten Stimulation kardialer Funktionen infolge einer reflektorischen Sympathikusaktivierung kommen.

Die Nicht-DHP verhindern dagegen durch ihre elektrophysiologischen Wirkqualitäten diese gegenregulatorischen chronotropen und dromotropen Effekte am Herzen, weshalb bei diesen Wirkstoffen auch die Sympathikus-vermittelten Risiken fehlen. Die Hemmeffekte auf den Sinus- und AV-Knoten können allerdings zu Bradykardie, AV-Block und Asystolie führen, was zu Einschränkungen beim klinischen Gebrauch dieser Calcium-Blocker führt. Die negativ chronotropen und dromotropen Eigenschaften der Nicht-DHP-Derivate lassen sich daher speziell zur Behandlung supraventrikulärer Tachykardien nutzen (Nayler WG 1992).

## **2 Zielsetzung**

Die Aufgabe dieser Diplomarbeit bestand darin, die beiden Thioamid – Derivate WHG60T und WHG70T, die am Departement für Medizinische / Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert und von Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt wurden, bezüglich ihrer negativ chronotropen und negativ inotropen Wirkung zu untersuchen.

Die Versuchsreihen wurden an spontan schlagenden isolierten rechten Vorhöfen und an isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchen durchgeführt.

Weiters wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß die beiden Testsubstanzen eine relaxierende Wirkung auf isolierte glattmuskuläre Organe haben – getestet an isolierten Präparaten des terminalen Ileums, der Aorta und der Pulmonalarterie der Versuchstiere.

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Versuchstiere

Für die Versuche dienten isolierte Organe von Meerschweinchen (Stamm DH bzw. TRIK) aus einheitlicher Zucht.

Die Tiere stammten vom Department of Experimental Pharmacology and Toxicology der Universität Bratislava.

Zum Versuchszeitpunkt hatten die sowohl männlichen als auch weiblichen Tiere ein durchschnittliches Gewicht von zweihundertfünfzig bis fünfhundert Gramm und ein Alter von vier bis sechs Wochen.

Die Tötung erfolgte durch einen gezielten Genickschlag, um einen möglichst raschen und zugleich schmerzfreien Tod herbeizuführen.

Um eine Schädigung der Organe durch Sauerstoffmangel zu vermeiden, war es notwendig den Thorax unverzüglich zu öffnen und die benötigten Organe so rasch als möglich zu explantieren. Besonders für Versuche am Herzen musste die Entfernung rasch erfolgen, um so einer Hypoxie bzw. einer Koagulation des Blutes vorzubeugen. Aus selbigem Grund wurden das Herz sowie die anderen explantierten Organe anschließend in eine frisch bereitete Elektrolytlösung transferiert, die zusätzlich mit einem Gemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> (Oxymix<sup>TM</sup>) begast wurde. Dadurch war eine stetige Versorgung an Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet.

## **3.2 Isolierung und Präparation der Organe**

Unmittelbar nach der Tötung des Meerschweinchens wurde der Thorax mit einer OP – Schere geöffnet und die für die Untersuchungen notwendigen Organe entnommen: rechtes Atrium, Musculi papillares cordis, Arteria pulmonalis, Aorta thoracica und terminales Ileum.

Die Präparation aller fünf zu untersuchenden Organe erfolgte unter dem Mikroskop in einer mit Kork ausgelegten und mit Nährlösung gefüllten Petrischale. Bei der Präparation der Papillarmuskeln, der Pulmonalarterie und des Vorhofs wurden die mit Nährlösung befüllten Petrischalen noch zusätzlich mit Oxymix<sup>TM</sup> begast, um eine durchgehend ausreichende Versorgung an Sauerstoff und Elektrolyten zu gewährleisten.

### **3.2.1 Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs**

Nach rascher Entnahme des Meerschweinchenherzens wurde die Präparation in einer Petrischale - mit Korkboden ausgelegt und mit Elektrolytlösung gefüllt - unter ständiger Begasung der Lösung mit Oxymix<sup>TM</sup> durchgeführt. Aufgrund der geringen Größe des Herzens musste man die gesamte Präparierung unter dem Mikroskop (Nikon SMZ-10A) vornehmen.

Zunächst wurden mit einer Federschere störende Fettreste, das Perikard sowie anhaftende Teile der Lunge abgetrennt. Anschließend wurde das Herz an Basis und Spitze mit zwei Präpariernadeln durch Abstecken am Korkboden fixiert. Nun konnte der rechte Vorhof mit dem Sinusknoten entlang des Sulcus coronarius von den Ventrikeln abgetrennt werden. Um den Sinusknoten nicht zu verletzen und somit das Organ für die folgenden Untersuchungen unbrauchbar zu machen, musste sehr vorsichtig gearbeitet werden.

Der Sinusknoten befindet sich in der rechten Vorhofwand nahe der Einmündung der Vena cava superior, seine exakte Lage kann aber von außen nicht genau lokalisiert werden. So war es notwendig noch anhaftendes Fettgewebe mit äußerster Sorgfalt zu entfernen. Zudem durfte der Vorhof und somit der Sinusknoten beim Präparieren nicht überdehnt werden, da er sonst seine Fähigkeit, spontan Erregungen zu bilden, verlieren und sofort zu schlagen aufhören würde.

Um das Präparat in die Versuchsanordnung einspannen zu können, wurde an der Spitze des Vorhofs ein Teil des noch vorhandenen Fettes mit einem Bindfaden abgeschnürt. Ohne das Gewebe zu verletzen wurde durch diesen Bindfaden ein Silberdraht – Häkchen gezogen und mit einem doppelten Knoten aus Bindfaden fixiert.

Bis zum Versuchsbeginn wurde das fertige Präparat wieder in der begasten Nährlösung aufbewahrt.

### **3.2.2 Isolierung und Präparation der Pulmonalarterie**

Voraussetzung für die Präparation der Arteria pulmonalis war, wie schon bei der Isolierung und Präparation des Vorhofs, die rasche Explantation des Herzens und seine anschließende Aufbewahrung in einer mit Oxymix<sup>TM</sup> durchperlten Nährlösung. Nach der Fixierung des Organs am Korkboden der Petrischale musste mit Hilfe einer Federschere die Arteria pulmonalis so nahe wie möglich am Herzen abgetrennt werden, da nur das vom Herzen abgehende fünf bis zehn Millimeter lange Stück, das sich schließlich in rechte und linke Arteria pulmonalis aufteilt, für die folgenden Untersuchungen verwendet werden konnte.

Anschließend wurde das Präparat von eventuell anhaftendem Fett- und Muskelgewebe befreit und in etwa drei Millimeter lange ringförmige Stücke geschnitten, die bis zur Einspannung in die Versuchsanordnung in begaster Nährlösung aufbewahrt wurden.

### **3.2.3 Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln**

Wie schon zur Isolierung des Vorhofs und der Pulmonalarterie wurde die Präparierung der Papillarmuskeln unter dem Mikroskop Typ SMZ 10-A der Firma Nikon durchgeführt und die Elektrolytlösung in der verwendeten Petrischale mit Oxymix<sup>TM</sup> begast.

Analog zum Vorhof wurde das entnommene Herz an Basis und Spitze mit Präpariernadeln auf der Korkunterlage fixiert, um anhaftende Fettreste und den Herzbeutel entfernen zu können. Damit nun die Papillarmuskeln zur weiteren Präparation erreicht werden konnten, musste der rechte Ventrikel über die Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet werden. Anschließend wurde der Ventrikel aufgeklappt und erneut mit Präpariernadeln am Korkboden befestigt.

Damit der Versuchsablauf nicht durch die Spontanaktivität der Purkinje – Fasern, die bekanntlich Herzschrittmacherfähigkeiten besitzen, gestört werden konnte, wurden diese vorsichtig mit der Federschere vom Muskel entfernt.

Danach wurde ein Silberdrahthäkchen mittels Bindfaden an der Ansatzstelle des Muskels zur Trikuspitalklappe am Ansatz der Papillarmuskelsehne, die die Verbindung der Papillarmuskeln darstellt, befestigt. Nun konnte die Sehne durchtrennt und der Muskel vorsichtig herausgeschnitten werden.

Während des Präparierens musste darauf geachtet werden, den Muskel nicht zu überdehnen und dadurch seine Kontraktionskraft negativ zu beeinflussen.

Um bis zum Beginn und während des Verlaufs der Messungen eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können, mussten die Papillarmuskeln nicht nur in begaster Nährlösung aufbewahrt werden, sondern durften zusätzlich ein Durchmesser – Maximum von 0,87 Millimeter nicht überschreiten (Koch-Weser 1963). Da die Durchmesser der kräftigeren und dickeren Muskeln der linken Kammer aber deutlich über diesem Wert liegen, wurden für die Versuche bevorzugt Muskeln der rechten Kammer verwendet.

### **3.2.4 Isolierung und Präparation der Aorta**

Um die Aorta isolieren zu können, wurde zunächst der Thorax des Meerschweinchens mit einer Schere geöffnet und das Herz explantiert. Anschließend musste das Brustbein aufgebrochen, Teile der Lunge und des Zwerchfells entfernt und der Thorax ausgewaschen werden. Erst dann war es möglich, entlang des Rückgrats ein zwei bis drei Zentimeter langes Stück der thorakalen Aorta mittels Pinzette und Schere behutsam herauszuschneiden. Dabei war es wichtig die Schere mit der Spitze nach unten direkt am Rückgrat entlang zu führen, damit die äußerst sensible Aorta nicht perforiert oder verletzt wird. Auch würde eine zu starke Dehnung der Aorta zu verfälschten Versuchsergebnissen führen.

Die entnommene Aorta wurde bis zur weiteren Präparation in einem mit physiologischer Nährlösung gefülltem Becherglas unter Begasung mit Oxymix<sup>TM</sup> aufbewahrt.

Die weiteren Schritte der Präparation wurden unter dem Mikroskop (Nikon SMZ-10A) vorgenommen. Dazu wurde die Aorta in eine mit Kork ausgelegte und mit Nährlösung gefüllte Petrischale übergeführt und mit zwei Präpariernadeln an der Korkunterlage fixiert, wobei die beiden von den Nadeln durchstochenen Abschnitte der Aorta für die Versuche nicht mehr geeignet waren und verworfen werden mussten. Anschließend konnte mit der Säuberung der Aorta von anhaftendem Muskel- und Fettgewebe begonnen werden. Dabei musste die Aorta auch gewendet werden, um sehr genau wirklich sämtliche Reste des umgebenden Fettgewebes mit der Federschere abtrennen zu können. Neben der äußerst

genauen und vorsichtigen Arbeitsweise, um die Aorta nicht zu perforieren oder zu überdehnen, musste auch relativ zügig präpariert werden, um einen zu langen und damit kritischen Sauerstoffmangel zu vermeiden. Während des Präparierens konnte nämlich die Petrischale aus technischen Gründen nicht begast werden.

Nachdem die so penibel gesäuberte Aorta auf eventuelle Druckstellen, Perforationen oder andere Verletzungen untersucht worden war, wurden etwa zwei Millimeter breite ringförmige Stücke mit der Federschere abgetrennt und bis zum Einspannen in die Versuchsanordnung in einer begasten Nährlösung aufbewahrt.

### **3.2.5 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums**

Nach der Explantation des Herzens und der thorakalen Gefäße wurde das Abdomen mit einer OP – Schere geöffnet. Ohne Ausübung einer Kompression oder Traktion wurde ein etwa fünfzehn Zentimeter langer Teil des terminalen Ileums, der vor dem Caecum liegt, jejunal mit einem orange gefärbten Zwirn abgebunden und durchtrennt. Zugleich diente der Bindfaden als Markierung, um einer Verwechslung der beiden Enden vorzubeugen. Das so entnommene Darmstück wurde bis zur weiteren Präparation unter dem Mikroskop in einem Becherglas mit physiologischer Nährlösung aufbewahrt und analog den bisherigen Präparaten mit Oxymix<sup>TM</sup> begast.

Vom caecal gelegenen Ende des entnommenen Ileums wurde ein etwa ein bis zwei Zentimeter großes Stück leicht schräg abgeschnitten, in eine mit Nährlösung gefüllte Petrischale transferiert und mit Präpariernadeln auf der Korkunterlage fixiert. Und zwar hatte die Fixierung so zu erfolgen, dass das Darmstück von der Innenseite nach außen durchstoßen werden konnte. Um dies zu erleichtern, war ein schräger Schnitt des Darmstücks notwendig, da sich sonst bei so kleinen Präparaten die Darmwand sehr stark einrollt und das Risiko, den Darm für den weiteren Versuchsverlauf zu stark zu verletzen, drastisch erhöht. So konnte durch den schrägen Schnitt die Außenwand des Präparates leichter durchstoßen und das Ausmaß der Verletzung auf ein Minimum reduziert werden.

Unter dem Mikroskop wurde mit Hilfe einer Federschere das fixierte Darmstück von anhaftendem Fettgewebe befreit. Eventuell vorhandener Chymus musste mittels einer Glaspipette durch Ausspülen mit Tyrode entfernt werden.

Um das Darmstück in der Versuchsanordnung befestigen zu können, wurde an beiden Darmenden jeweils ein Silberdrahthäkchen befestigt. Dieses fixierte man am jejunalen und am caecalen Ende mit Hilfe eines Bindfadens so, dass beidseitig ein möglichst großes Stück



der Darmöffnung offen blieb. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass das Darmrohr frei blieb und so die Testsubstanz von allen Seiten auf die Schleimhaut des Darmstückes einwirken konnte. Um beim Einspannen in die Versuchsapparatur eine Verwechslung der beiden Enden zu verhindern, wurden zum Befestigen der Silberdrahthäkchen zwei verschiedenfarbige Bindfäden verwendet.

Die Präparierung dieses Organs erforderte viel Fingerspitzengefühl, um den Darm dabei nicht zu perforieren oder zu überdehnen.

### 3.3 Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode)

Als physiologische Nährlösung für die Präparate am rechten Vorhof, an den Papillarmuskeln, der Arteria pulmonalis, der Aorta und am terminalen Ileum wurde folgende Lösung verwendet:

#### Zusammensetzung Elektrolytlösung

| Komponenten                     | ml/l bzw. g/l |
|---------------------------------|---------------|
| NaCl                            | 33,6          |
| KCl                             | 35            |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 83,7          |
| MgSO <sub>4</sub>               | 1,18          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,18          |
| CaCl <sub>2</sub>               | 3,2           |
| Glucose                         | 1,98          |

**Tab. 1 Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung**

Zur Herstellung der Tyrode, die an jedem Versuchstag frisch zubereitet wurde, wurden alle in Tabelle 1 angeführten Stammlösungen, mit Ausnahme der Calciumchlorid – Lösung, in entsprechender Menge in einen Messkolben gefüllt und mit Aqua bidestillata auf etwa drei Viertel des gewünschten Volumens ergänzt. Nach Zugabe der benötigten eingewogenen Menge an Glucose wurde das Gemisch etwa zwanzig Minuten mit Oxymix™ begast. Die Begasung der Tyrode vor Zugabe der Calciumchlorid – Lösung war insofern wichtig, um

eine Ausfällung von schwer löslichen Calciumionen und eine daraus resultierende Trübung zu verhindern. Auch die darauffolgende tropfenweise Einpipettierung des Calciumchlorids war unter Vorsicht vorzunehmen. Im Falle einer Trübung wäre ein einwandfreies Arbeiten nicht mehr gewährleistet und die Tyrode hätte verworfen werden müssen.

Anschließend wurde der Kolben bis zur Markierung mit Aqua bidestillata aufgefüllt und zur optimalen Durchmischung einige Male umgeschwenkt.

Vor der Befüllung der Organbäder mit der frisch zubereiteten Tyrode wurden diese mit verdünnter Salzsäure und destilliertem Wasser gereinigt und mittels Wärmepumpe für die Versuchsdurchführung konstant auf 37° C temperiert. Um sowohl einen konstanten pH – Wert im physiologischen Bereich von pH 7,2 bis 7,4 als auch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sicherzustellen, wurde die Nährlösung in den Organbädern während des ganzen Versuchsvorganges kontinuierlich mit Oxymix<sup>TM</sup> durchströmt.

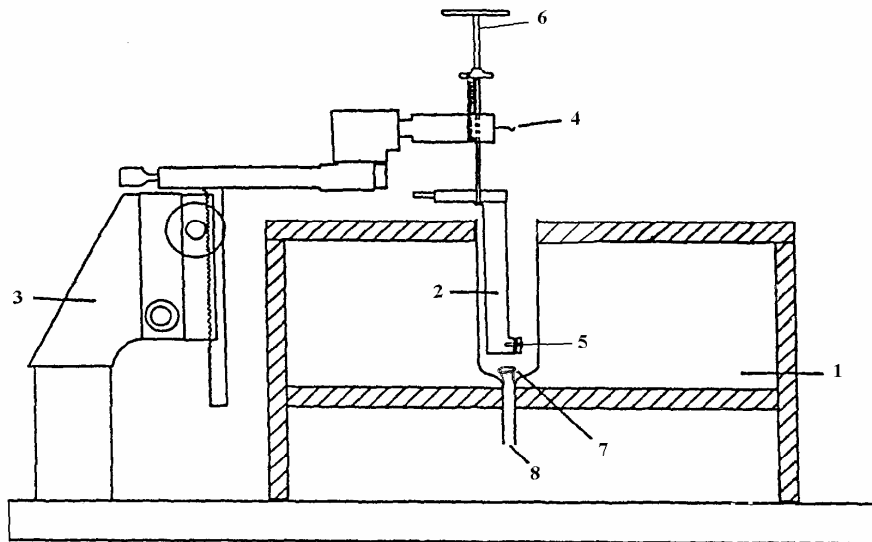
### **3.4 Versuchsanordnung**

Für die Versuche standen zwei unterschiedliche Versuchsaapparaturen zur Verfügung, wobei eine davon für Messungen am Papillarmuskel und am Vorhof diente. Mit der zweiten Apparatur, die sich in ihrem Aufbau von der vorigen unterscheidet, wurden Messungen am Darm, der Aorta und der Pulmonalarterie durchgeführt.

#### **3.4.1 Apparatur für die Versuche am Papillarmuskel und Vorhof**

Abb. 1 zeigt den Aufbau der Versuchsaapparatur zur Messung der Frequenz spontan schlagender Vorhöfe und der Kontraktionskraft elektrisch gereizter Papillarmuskeln.

Die Apparatur setzt sich aus einem Wasserbad aus Acrylglas, einer Heizspirale, einem Thermostat, einer Muskelkammer, einer Glasfritte, einem Stativ, einem Stativschlitten, einer Muskelhalterung, einem Kraftwandler, einer Aufhängevorrichtung und einem Feintrieb zusammen.



**Abb. 1 Apparatur für Papillarmuskel und Vorhof**

1. Wasserbad 2. Organhalterung 3. Stativ 4. Aufhängevorrichtung für Organ am Stativschlitten mit Kopplung an Kraftwandler 5. Fixierung mit Elektrode 6. Feintrieb für Vorspannung 7. Muskelkammer 8. Gaszufuhr, Fritte und Abfluss

Die Muskelkammer mit einem Volumen von fünfundzwanzig Milliliter wurde mit physiologischer Elektrolytlösung gefüllt und über eine Glasfritte von unten mit dem Gasmisch Oxymix<sup>TM</sup> versorgt. Dadurch konnte man eine nahezu konstante Sauerstoffversorgung des Präparates während der gesamten Versuchsdauer sicherstellen. Dies war von großer Bedeutung, da die Organe, vor allem der Papillarmuskel, äußerst sensibel auf Veränderung der Sauerstoffkonzentration reagieren und es dadurch zu Beeinträchtigungen der Versuchsergebnisse kommen konnte. Zudem war es durch die Begasung möglich, einen physiologischen pH – Wert von 7,2 bis 7,4 einzustellen, der so während des gesamten Versuchsablaufes konstant gehalten werden konnte. Um möglichst optimale physiologische Bedingungen herzustellen, war zudem noch eine konstante Temperierung der Nährlösung auf  $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  notwendig. Zu diesem Zweck tauchte die Muskelkammer direkt in ein Wasserbad, das mittels Heizspirale beheizt wurde. Die Temperatur konnte mit einem installierten Thermostat kontrolliert werden.

Bedingt durch Verdunstung von Wasser kam es gelegentlich zu geringen Volumsverlusten, die aber durch vorsichtiges Auffüllen mit physiologischer Elektrolytlösung ausgeglichen werden konnten. Die Spülung des Organbades mit Tyrode bzw. die Reinigung mit verdünnter Salzsäure und destilliertem Wasser erfolgte per Hand mit einer Kunststoffspritze, an die ein Gummischlauch befestigt worden war.

Die wie unter 3. 2. 1. und 3. 2. 3. beschriebenen isolierten Präparate des Papillarmuskels und des rechten Vorhofs wurden nun mittels den zuvor an einem ihrer Enden befestigten Häkchen an einem Silberdraht passender Länge eingehängt und dieser an der Aufhängevorrichtung befestigt. An dieser Aufhängevorrichtung war zugleich der Kraftwandler (siehe Kap. 3. 4. 3.) angeschlossen, der die Kontraktionen der präparierten Organe in elektrische Impulse umwandelte. Daraufhin wurden sowohl Vorhof als auch Papillarmuskel mit ihren jeweils freien Enden so in zwei Plexiglasscheibchen der Muskelhalterung eingeklemmt, dass sie auf der Kathode, einem Silberchloridplättchen, auflagen.

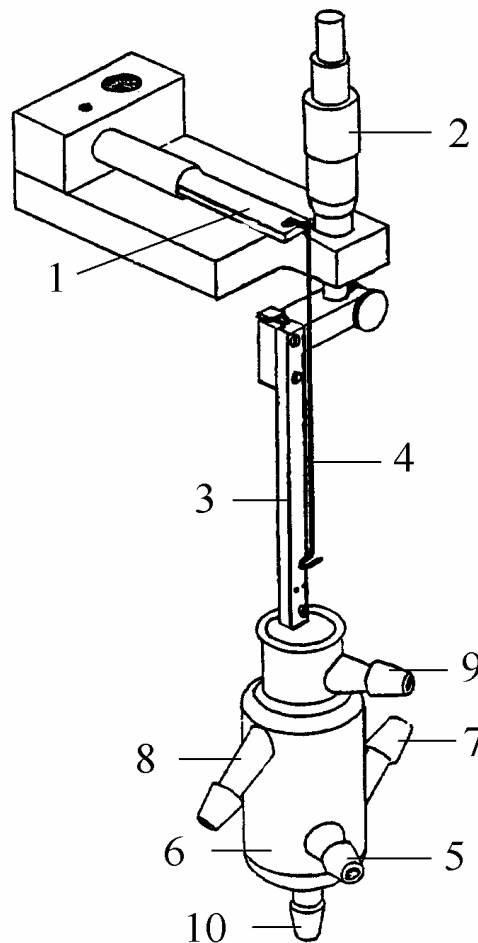
Das Einspannen musste möglichst schnell vollzogen werden, um einer Mangelversorgung der präparierten Organe vorzubeugen. Zudem musste auch darauf geachtet werden, die äußerst empfindlichen Präparate nicht zu überdehnen.

Anschließend wurde die Muskelhalterung mit Hilfe des am Stativ beweglichen Stativschlittens soweit abgesenkt, bis schließlich das gesamte Präparat von der physiologischen Elektrolytlösung umspült wurde. Um eine maximale Kontraktionskraft der Organpräparate zu erhalten, war das Anlegen einer Vorspannung notwendig. Diese konnte mit dem Feintrieb individuell für jedes Organ eingestellt werden.

Für die Versuche verwendete man einen Kraftwandler und einen Verstärker (Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier) der Firma World Precision Instruments. Die Reizung des Papillarmuskels erfolgte über einen Accupulser A310 (World Precision Instruments). Zur Aufzeichnung der Kontraktionsamplituden der elektrisch gereizten Papillarmuskeln als auch der Kontraktionsfrequenzen der spontan schlagenden Vorhöfe diente der Schreiber Typ Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel der Firma Kipp & Zonen.

### 3.4.2 Apparatur für die Versuche an Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum

Die in Abb. 2 dargestellte Versuchsanordnung diente zur Messung isometrischer Kontraktionen isolierter glattemuskulärer Organe.



**Abb. 2 Apparatur für Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum**

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

Die Organbäder fassten ein Volumen von acht beziehungsweise fünfundzwanzig Millilitern. Im Unterschied zur Apparatur für die Versuche an Vorhof und Papillarmuskel (Abb. 1) bestand bei diesen Organbädern die Muskelkammer aus doppelwandigem Glas, durch das auf 37°C konstant temperiertes Wasser floss, um auch hier eine Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen zu gewährleisten. Zu selbigem Zweck wurde die sich im

Organbad befindende physiologische Nährlösung mit Hilfe einer Fritte gleichmäßig mit Oxygix<sup>TM</sup> durchströmt. Die Gas- und Wasserzufuhr erfolgte über Schlauchanschlüsse an der Seite der Muskelkammer. Zum Wechseln oder Entfernen der Elektrolytlösung diente ein Abflussschlauch, der mit einer Quetschklemme verschlossen war und sich an der Unterseite des Organbades befand.

Mit Hilfe der zuvor an den Ileum - Präparaten befestigten Häkchen wurde das Organ an der Oberseite an einem Silberdraht und an der Unterseite an einem Draht an der Organhalterung eingehängt. Der obere Draht, der an einer Aufhängevorrichtung angebracht wurde, stellte die Verbindung zum Kraftwandler dar, durch den die Kontraktionen der Organe in elektrische Impulse transformiert wurden. Die ringförmigen Präparate der Aorta und der Arteria pulmonalis wurden ohne Häkchen direkt zwischen den zwei Silberdrähten, die an den Enden L – förmig gebogen waren, eingespannt. Bei der Befestigung der isolierten Organe musste jedoch darauf geachtet werden, dass die Präparate nicht zu stark gedehnt werden. Dies hätte nämlich zur Verfälschung der Versuchsergebnisse bzw. zu einem Scheitern des Versuchs führen können.

Mit einem Stativschlitten konnten nun die eingespannten Organe problemlos in das mit Nährlösung gefüllte Organbad abgesenkt sowie auch herausgehoben werden. Über den Feintrieb konnte anschließend die für die maximale Kontraktionskraft notwendige Vorspannung exakt geregelt werden. Für die Messung der Kontraktionskraft der Organe wurden ein Kraftwandler sowie ein Verstärker (Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier) der Firma World Precision Instruments verwendet. Die Detektion der Versuchsergebnisse erfolgte wieder mit einem Schreiber der Marke Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel von Kipp & Zonen.

### **3.4.3 Darstellung und Registrierung des Kraftwandlers**

Das Prinzip des Kraftwandlers beruht auf der Transformierung einer mechanischen Kraft in ein elektrisches Signal:

Der mechanische Vorgang war in unserem Fall die Kontraktionskraft der isolierten Organe, die nach der Erfassung über einen Wandler oder Transducer in eine elektrische Größe umgewandelt wurde. Verwendet wurde dafür ein Widerstandswandler mit Dehnungstreifen in Wheatstonescher Brückenschaltung vom Typ AE875 der Firma Aksjeselskapet.

Bei einer Krafteinwirkung fließt der Strom proportional zu den Dehnungskräften, da der elektrische Widerstand im Messstreifen durch Dehnung verändert wird.

Die notwendige Exzitationsspannung für den Kraftwandler lieferten zwei sechs Volt Batterien (Varta Spezial, No. 430, EC 4R25). Die durch Muskelkontraktionen ausgelösten Signale wurden von einem 4 – Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments) verstärkt und anschließend von einem Schreiber (Dual Channel Model BD 112 Flatbed Recorder, Kipp & Zonen) registriert.

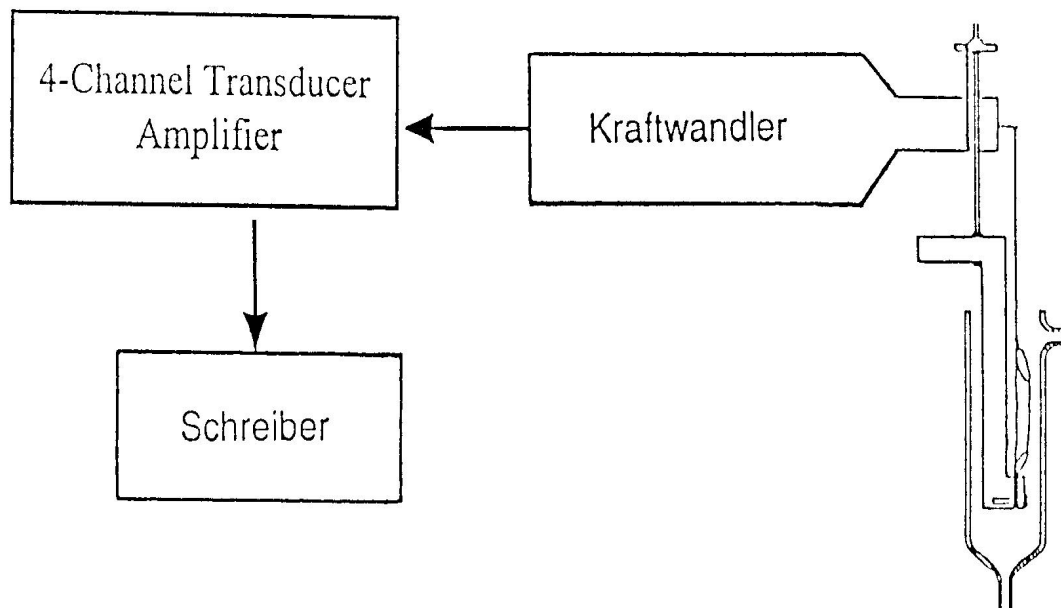


Abb. 3 Schematische Darstellung des Kraftwandlers

### 3.5 Versuchsablauf

Um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es notwendig, die Testung der Substanzen an den unterschiedlichen Organen mehrmals durchzuführen, sodass sich die verschiedenen Versuchsabläufe über einen längeren Zeitraum täglich wiederholten. Die folgenden Darstellungen sollen die einzelnen Versuche an den unterschiedlichen Organen näher schildern.

#### 3.5.1 Rechter Vorhof

Wie in den Kapiteln 3. 2. 1. und 3. 4. 1. beschrieben, wurde der fertig präparierte Vorhof in die entsprechende Versuchsausrüstung eingespannt und mit Hilfe des Stativschlittens soweit in die Muskelkammer abgesenkt, bis das gesamte Präparat von der bereits auf 37 °C temperierten und begasten physiologischen Elektrolytlösung umgeben war. Zur Erzielung

der maximalen Kontraktionskraft musste eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt und mittels Feintrieb durch entsprechende Nachjustierung während der gesamten Dauer des Versuches konstant gehalten werden.

Nach etwa einer Stunde wies der Vorhof meist eine kontinuierliche, spontane Schlagzahl auf und man konnte mit der ersten Phase des Versuchs, der Kontrollphase, beginnen. Während dieser Kontrollphase wurde die Frequenz der Herzschläge alle fünf Minuten aufgezeichnet, solange bis sich eine gleichbleibende Schlagfrequenz etwa fünfmal wiederholt hatte. Erst dann konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden.

Mit Hilfe einer Finnpiquette wurde die Substanz in steigender Konzentration in die Muskelkammer eingespritzt. Die Substanzzugabe sollte immer möglichst nahe am Organ und möglichst an derselben Stelle erfolgen, ohne das Organ selbst oder den Kraftwandler dabei zu berühren.

In Abständen von jeweils fünfundvierzig Minuten – eine Zeitspanne, in der an allen Organen eine hundert prozentige Wirkung gewährleistet ist – wurde die jeweils nächst höhere Konzentrationsstufe in die Muskelkammer zugegeben und alle fünf Minuten die Schlagfrequenz gemessen. Diese wurde mittels Schreibgerät mit einem Papiervorschub von fünf Millimetern pro Sekunde jeweils für zwölf Sekunden (entspricht sechs Zentimeter auf dem Millimeterpapier) aufgezeichnet. Um die Schlagfrequenz pro Minute ermitteln zu können, musste nun nur noch mit fünf multipliziert werden.

### **3.5.2 Papillarmuskel**

Der Papillarmuskel wurde, wie bereits beschrieben (s. Kap. 3. 4. 1), über den an ihm befestigten Silberhaken an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt und das lose Ende des Muskels in die Organhalterung eingeklemmt, sodass ein Kontakt zur Reizelektrode hergestellt war. Danach wurde das eingespannte Präparat in das mit physiologischer Nährlösung gefüllte Organbad abgesenkt und mit 3.92 mN vorgespannt, um eine maximale Kraftentwicklung des Papillarmuskels zu erreichen.

Zurückzuführen auf die Plastizität des Muskels, der immer mehr gedehnt wurde, kam es im Laufe des Versuchs zu einer Verminderung der Spannung und dadurch zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Dem konnte – ähnlich dem Versuch am Vorhof – insofern entgegen gewirkt werden, indem man die Ausgangsspannung über Regulierung des Feintriebs aufrecht erhielt (Reiter M 1967).



Da die Papillarmuskeln im Gegensatz zum spontan – aktiven Vorhof keine Schrittmacherfunktion besitzen, mussten sie mit Hilfe von elektrischen Reizen zur Kontraktion angeregt werden. Dafür wurden als Quelle der elektrischen Reize das Reizgerät Accupulser A310 (World Precision Instruments) und Silberchloridelektroden verwendet.

Nach einer dreißig – minütigen Anpassungszeit wurde der Papillarmuskel mittels Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von einem Hertz und einer Dauer von drei Millisekunden gereizt. Die Stromstärke wurde solange erhöht, bis die Schwellenstromstärke erreicht war und der Muskel kontrahierte. Nach dem Erreichen dieses Schwellenwertes wurde die Stromstärke um weitere zehn Prozent gesteigert, um sicherzustellen, dass bei jeder Reizung auch tatsächlich eine Kontraktion ausgelöst wird. Bei einer zu knapp über dem Schwellenwert eingestellten Reizstärke könnte als Folge der Papillarmuskel nicht jede Sekunde kontrahieren sondern unkoordinierte Reiz – Kontraktionsfrequenzen auftreten. Andererseits musste die Stromstärke so gering als möglich gewählt werden, um eine Überreizung verhindern zu können. Wird die Schwellenstromstärke nämlich zu stark überschritten, führt dies auf Dauer zu einer Entleerung der endogenen Catecholaminspeicher des Muskels und somit zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse (Furchgott et al. 1959).

Während der Kontrollphase wurden alle fünf Minuten jeweils etwa fünf Kontraktionsamplituden aufgezeichnet. Erst nach Erreichen einer konstanten Amplitudenlänge konnte mit der kumulativen Substanzzugabe – analog zum Vorhof – begonnen werden, wobei immer nach fünfundvierzig Minuten die Konzentration der Testsubstanz erhöht wurde.

Die Aufzeichnung von jeweils fünf Kontraktionsamplituden erfolgte im Fünf–Minuten–Rhythmus bei 5 mV, mit Ausnahme der letzten Messung am Ende eines Fünfundvierzig – Minuten–Intervalls, die bei 20 mV durchgeführt wurde, um eine exaktere Vermessung zu ermöglichen.

### **3.5.3 Arteria pulmonalis**

Die etwa drei Millimeter dicken, ringförmigen Gefäßpräparate, die bis dahin in physiologischer Nährlösung aufbewahrt wurden, wurden so am Kraftwandler befestigt, dass sie zwischen zwei Drähten, welche an ihren Enden L – förmig gebogen waren, eingespannt waren (s. Kap. 3. 4. 2.). Anschließend wurde die Organhalterung mit Hilfe des Stativschlittens in das mit Tyrode gefüllte und auf 37 °C vorgewärmte Organbad abgesenkt,

mit dem Positionswahlschalter die Nulllinie definiert und zur Erreichung der maximalen Kontraktionskraft mittels Mikrometer mit 9,81 mN vorgespannt. Nach Anlegen der Vorspannung folgte eine zwanzig – minütige Anpassungszeit, in der sich das Präparat an die gegebenen Bedingungen gewöhnen konnte. Während dieser Spanne auftretende Abweichungen von der Nulllinie wurden mit Hilfe des Feintriebs nachjustiert.

Nach Ende dieser Anpassungsphase wurde die Nährlösung durch Öffnen der Klemmen am Plastikschauch abgelassen und durch eine Tyrode, die mit neunzig mmol/l Kaliumchlorid versetzt war, ersetzt. Gleichzeitig wurde mit der Aufzeichnung begonnen.

Um die Abnahme der Kontraktionskraft bestimmen zu können, war nämlich eine maximale Kontraktion des Präparates notwendig. Diese erzielte man, indem man die sich im Organbad befindliche Nährlösung gegen eine neunzig millimolare Kaliumchlorid – Lösung austauschte.

Zur Herstellung der Kaliumchlorid – Lösung wurde 0,67 g Kaliumchlorid in 100 ml Tyrode gelöst.

Diese neue Elektrolytlösung wirkte einen Anstieg der Kontraktionskraft der Gefäßmuskeln, welcher nach etwa hundert Minuten in einem Plateau endete. Das Erreichen dieser Plateauphase entsprach der maximalen Kontraktion und konnte daher mit hundert Prozent angenommen werden.

Nach Ausbildung dieses „steady state“ erfolgte die kumulative Zugabe der Testsubstanz, dessen Konzentration alle fünfundvierzig Minuten erhöht wurde. Mit Hilfe von Finnpietten wurde die Stammlösung von zunächst einem, dann zwei, sieben, zwanzig und schließlich siebenzig µl in das Organbad injiziert. Während des gesamten Versuches wurden die Werte mit dem Schreiber bei einer Einstellung von 0,5 Millimeter pro Minute aufgezeichnet und über den Abstand der Kurve zur Nulllinie konnte die Abnahme der Kontraktion errechnet werden.

### **3.5.4 Aorta**

Die Aortapräparate wurden in ähnlicher Weise wie die Pulmonalarterie in die Apparatur eingespannt, wobei darauf zu achten war, das Aortastück nicht zu verdrehen oder zu stark zu dehnen.

Der gesamte Versuchsablauf verlief analog dem der Pulmonalarterie – mit dem einzigen Unterschied, dass nach Eintauchen des Präparates in die Elektrolytlösung mit Hilfe des Feintriebs eine Vorspannung von 19,6 mN angelegt wurde. So wurde nach einer

vorangegangenen Anpassungsphase, in der Abweichungen von der Nulllinie mit dem Feintrieb korrigiert wurden, die physiologische Nährlösung durch Öffnen der Schlauchklemmen abgelassen und durch eine neunzig millimolare Kaliumchlorid – Lösung ersetzt. Nach Erreichen der maximalen Kontraktionskraft wurde erneut die Stabilisierung des Plateaus abgewartet und die Testsubstanz, wie unter 3. 5. 3. beschrieben, zugefügt.

Bei einer etwaigen zu geringen Vorkontraktion, die auch bei den beiden anderen glattmuskulären Präparaten auftreten konnte, musste die mit Kaliumchlorid versetzte Nährlösung wieder abgelassen und das Organbad zur Regeneration des isolierten Organs mit Tyrode befüllt werden. Nach einer Regenerationsphase von etwa dreißig Minuten konnte das Präparat mit der bereits beschriebenen Kaliumchlorid – Lösung erneut kontrahiert werden, wodurch meist eine deutlich höhere bis maximale Kontraktion erreicht wurde und somit eine aussagekräftige Testung der Substanz erfolgen konnte.

### **3.5.5 Terminales Ileum**

Das Präparat des terminalen Ileums wurde über zwei Silberdrahthäkchen, welche an den beiden Enden des Darmstücks zuvor angebracht worden waren, in die Aufhängevorrichtung eingehängt (s. Kap. 3. 2. 5. und 3. 4. 2). Dabei war zu beachten, dass das jejunale Ende nach oben und das caecale Ende nach unten orientiert waren. Anschließend konnte das so fixierte Präparat in die Kammer mit der zuvor temperierten Nährlösung eingetaucht werden. In diesem Fall wurde mit einer Vorspannung von 4,9 mN gearbeitet. Während der etwa dreißig – minütigen Anpassungszeit wurde auch hier per Feintrieb immer auf die definierte Nulllinie am Kopp & Zonen Schreiber nachjustiert.

War eine konstante Bewegung des Ileums gegeben wurde auch hier mit Hilfe einer Schlauchklemme die Nährlösung über einen Schlauch an der Unterseite der Apparatur abgelassen und eine zuvor bereitete Kaliumchlorid – Lösung in die Muskelkammer eingefüllt. Im Falle des terminalen Ileums verwendete man jedoch, im Unterschied zu Aorta und Pulmonalis, eine sechzig millimolare Lösung. Diese diente ebenso der Vorkontraktion des Organs, welche augenblicklich nach dem Befüllen des Organbads erfolgte und vom Flatbed – Recorder aufgezeichnet wurde. Nach etwa fünfzig Minuten stellte sich ein Plateau an der Kurve, die der Schreiber durchgehend zeichnete, und somit eine hundert prozentige Kontraktion des Darms ein. Nun konnte mit der kumulativen Zugabe der Substanz – Lösung begonnen werden. Wie bei sämtlich anderen Versuchen war auch hier darauf zu achten, dass bei der Zugabe mit einer Finnpiette an stets der gleichen Stelle, möglichst nahe dem

Organ, weder das Organ selbst noch der Kraftwandler berührt wurden, um ein Ausfahren des Schreibers und ein Verfälschen der Ergebnisse zu verhindern.

Nach jeweils fünfundvierzig Minuten Wirkphase wurde immer die nächst höhere Substanz – Konzentration zugegeben und die Änderung der Kontraktionskraft des Darms durchgehend aufgezeichnet.

### 3.6 Testsubstanzen WHG 60T und WHG 70T

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde an den isolierten Organen der Meerschweinchen die pharmakologische Wirkung der Substanzen WHG 60T und WHG 70T untersucht.

Diese beiden sowie weitere Testsubstanzen wurden am Department für Medizinische / Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Erker für diese Diplomarbeit zur Verfügung gestellt.

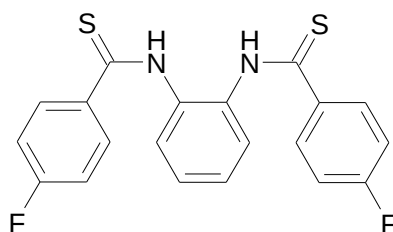
#### *Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz WHG 60T*

Substanzcode: WHG 60T

Systematische Bezeichnung: N1-{2-[(4-fluorobenzothioyl)amino]phenyl}-4-fluoro-1-benzolcarbothioamid

Molekulargewicht: 384,47 g/mol

Farbe: gelb



WHG60T

Molecular Weight =384.47

Exact Mass =384

Molecular Formula =C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

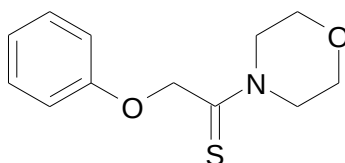
#### *Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz WHG 70T*

*Substanzcode:* WHG 70T

*Systematische Bezeichnung:* 1-Morpholino-2-phenoxy-1-ethanthion

*Molekulargewicht:* 237,32 g/mol

*Farbe:* weiß



WHG70T

Molecular Weight =237.32

Exact Mass =237

Molecular Formula =C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S

Untersucht wurde der Effekt der beiden Testsubstanzen auf die Herzmuskelpräparate Papillarmuskel und rechter Vorhof sowie ihre Wirkung auf die glatte Muskulatur der Aorta, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums.

Für die Versuche wurde die erforderliche Menge an Stammlösungen täglich frisch zubereitet. Hierfür mussten die Testsubstanzen WHG 60T und WHG 70T in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden. Dabei wurde die Substanzeinwaage so gewählt, dass durch kumulative Zugabe der Stammlösung eine Wirkstoffkonzentration von hundert µmol/l im Organbad erreicht wurde. Um dies gewährleisten zu können, mussten bei der Einwaage auch die unterschiedlichen Kammervolumina, welche acht und fünfundzwanzig Milliliter betrugen, miteinbezogen werden (s. Tab. 2 und Tab. 3).

Bei jedem Versuch wurden die so erhaltenen Stammlösungen I und II der jeweiligen Testsubstanz in fünf Konzentrationsstufen verwendet: ein, drei, zehn, dreißig und hundert µmol/l. Wie im Pipettierschema in Tab. 4 ersichtlich, wurde unter Verwendung von Finnpietten durch kumulative Injektion der Stammlösungen von zunächst ein, dann zwei, sieben, zwanzig und zuletzt siebzig µl die erwünschten Konzentrationen im Organbad erreicht. In einem Intervall von jeweils fünfundvierzig Minuten wurde so die Konzentration der Testsubstanz in der Muskelkammer stufenweise erhöht. Diese Zeitspanne gewährleistete, dass die Testsubstanzen in jeder Konzentrationsstufe ihre Wirkungen vollständig entfalten konnten.

### Stammlösungen von WHG 60T

| Stammlösung | Volumen Organbad | Einwaage an WHG 60T<br>[100 µmol/l]/Organbad |
|-------------|------------------|----------------------------------------------|
| I           | 8 ml             | 0,308 mg                                     |
| II          | 25 ml            | 0,961 mg                                     |

**Tab. 2 Stammlösungen WHG 60T bezogen auf 8 und 25 ml Organbad. Einwaage WHG 60T gelöst in 100 µl DMSO**

### Stammlösungen von WHG 70T

| Stammlösung | Volumen Organbad | Einwaage an WHG 70T<br>[100 µmol/l]/Organbad |
|-------------|------------------|----------------------------------------------|
| I           | 8 ml             | 0,185 mg                                     |
| II          | 25 ml            | 0,593 mg                                     |

**Tab. 3 Stammlösungen WHG 70T bezogen auf 8 und 25 ml Organbad. Einwaage WHG 70T gelöst in 100 µl DMSO**

**Stufenweise Zugabe der dem jeweiligen Bad entsprechenden Stammlösung bis zum Erreichen der Endkonzentration von 100 µmol/l im Organbad**

| <b>Zugegebene Menge</b> | <b>Endkonzentration/Organbad</b> |
|-------------------------|----------------------------------|
| 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                       |

Tab. 4 Pipettierschema

## 3.7 Auswertung und Messgrößen

### 3.7.1 Auswertung der Versuche an rechten Vorhöfen

Beim Versuchspräparat des rechten Vorhofs wurde die Änderung der Schlagfrequenz ( $f$ ) bestimmt, das heißt als Messgröße diente die Anzahl der Schläge des Vorhofs pro Minute. Um die Änderung der Schlagfrequenz möglichst genau ermitteln zu können, war es notwendig, die Parameter des Schreibers mit einzubeziehen. Bei einem Papiervorschub von fünf Millimeter pro Sekunde entsprachen die auf einer Papierstrecke von sechs Zentimeter aufgezeichneten Peaks der Anzahl der Schläge in zwölf Sekunden. Die Anzahl der Schläge pro Minute erhielt man so durch die Multiplikation mit dem Faktor fünf. Von den so erhaltenen Werten musste die Lösungsmittelwirkung, die von vorigen Arbeitsgruppen ermittelt worden war, abgezogen werden.

Der erhaltene Kontrollwert wurde hundert Prozent gleichgesetzt und die Messwerte, die man nach jeweils fünfundvierzig Minuten Einwirkzeit der jeweiligen Testsubstanzkonzentration erhielt, dazu in Relation gesetzt und als Prozentwerte ermittelt.

### 3.7.2 Auswertung der Versuche an Papillarmuskeln

Die Versuche an den Papillarmuskeln dienten zur Feststellung einer positiv bzw. negativ inotropen Wirkung der jeweiligen Testsubstanz auf die Herzmuskelpräparate. Hierfür wurde also die Änderung der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) des Papillarmuskels, angegeben in Millinewton (mN) als Messgröße, durch die kumulative Einwirkung der Testsubstanz bestimmt.

Die mit Hilfe des Detektors auf dem Millimeterpapier aufgezeichneten Amplituden wurden zunächst mit einem Lineal abgemessen und die erhaltenen Werte in Zentimeter anschließend mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert, um so die tatsächlichen Größen zu erhalten.

Zuletzt wurde von den so ermittelten Werten die Lösungsmittelwirkung abgezogen, der Kontrollwert als hundert Prozent angenommen und die nachfolgenden Messwerte zu diesem wieder in Relation gesetzt.

### 3.7.3 Auswertung der Versuche an glattemuskulären Präparaten

Bei der Auswertung der Versuchsreihen von Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum diente erneut die Kontraktionskraft ( $f_c$ ) in Millinewton (mN) als Messgröße. Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft der jeweiligen Präparate feststellen zu können, war es notwendig, die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft bezogen auf einen Kontrollwert zu berechnen.

Hierfür wurden während der schon beschriebenen Messungen an Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum am Ausdruck des Schreibers jeweils jene Zeitpunkte markiert, an denen der Zusatz der verschiedenen Substanzkonzentrationen erfolgte. Um die tatsächlichen Werte in Millinewton zu ermitteln, wurde für die Auswertung der Abstand in Zentimeter jener Punkte zur Nulllinie gemessen und danach der erhaltene Wert mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert – wobei bei der Messung mit fünf Millivolt ein Zentimeter 0,98 mN entsprach. Zur Ermittlung des Kontrollwerts wurde anhand der aufgezeichneten Kontraktionskurve der Abstand von der Plateauphase nach der maximalen Vorkontraktion zur Nulllinie herangezogen. Als Kontrollwert wurde also jener Werte definiert, bei dem am Ende der Plateauphase vor der ersten Substanzbeigabe jeweils „steady-state“ – Bedingungen herrschten.



Von den erhaltenen Werten musste auch hier wieder die Lösungsmittelwirkung abgezogen und die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft durch die kumulative Einwirkung der Testsubstanz gegenüber dem Kontrollwert ermittelt und verglichen werden.

### 3.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung zog man die erhobenen Messwerte der einzelnen Versuchsreihen heran.

Aus einer Anzahl von „n“ Versuchen wurden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM = standard error of mean) errechnet und die Änderung der Messgrößen (Kontraktionskraft und Schlagfrequenz) in Prozent ausgedrückt. In den Tabellen wurde die Schlagfrequenz mit „f“ (frequency), die Kontraktionskraft mit „f<sub>c</sub>“ (force of contraction) bezeichnet.

Um eine Aussage bezüglich der statistischen Signifikanz, also der Veränderungen durch die Testsubstanzen im Vergleich zum Kontrollwert, treffen zu können, wurde der Student – t – Test für gepaarte Beobachtungen herangezogen. Dadurch konnte die Irrtumswahrscheinlichkeit P ermittelt werden. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5% ( $P < 0,05$ ) beziehungsweise < 1% ( $P < 0,01$ ) wurden die Unterschiede als signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0,1% ( $P < 0,001$ ) als hochsignifikant gesehen.

Um die Effekte der Testsubstanzen anschaulich präsentieren zu können, wurden die statistisch ausgewerteten Daten der Versuche zur graphischen Darstellung in Konzentration – Wirkungskurven übertragen. Auf die Ordinate wurden die Änderungen der Kontraktionskraft oder der Schlagfrequenz in Prozent aufgetragen, während auf der Abszisse die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  logarithmisch dargestellt wurden. Die Punkte entlang der Konzentration – Wirkungskurve geben den arithmetischen Mittelwert aus n Versuchen, die vertikalen Balken die Größe der Standardfehler an.

Die  $\text{EC}_{50}$  (Effective Concentration 50%), die jene Konzentration, bei der die Kontraktionskraft beziehungsweise die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes abgesunken ist, in  $\text{mmol/l}$  darstellt, wurde auf graphischem Weg aus der Konzentration – Wirkungskurve ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wirkung von WHG70T auf isolierte Meerschweinchen - Organe

#### 4.1.1 Wirkung von WHG70T auf die Schlagfrequenz des Vorhofs

Der Einfluss der Testsubstanz WHG70T auf die Schlagfrequenz des isolierten Vorhofes wurde, wie in Kapitel 3. 5. 1. beschrieben, an fünf verschiedenen Präparaten in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht.

Nachdem zur Erzielung der maximalen Kontraktionskraft eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt worden war, musste eine konstante Schlagfrequenz des Vorhofs erreicht werden. Diese betrug nach Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche durchschnittlich  $189 \pm 13,73$  Schläge pro Minute und wurde als hundert Prozent festgesetzt. Die folgenden Frequenzänderungen wurden prozentuell auf diesen Kontrollwert bezogen.

Die Testsubstanz WHG70T zeigte eine leicht positiv chronotrope Wirkung, wobei das Ausmaß der Schlagfrequenz – Erhöhung konzentrationsabhängig anstieg und erst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  leicht absank. Das bedeutet, dass im untersuchten Konzentrationsbereich eine Zunahme der Schlagfrequenz von 100 auf  $108,54 \pm 5,70$  Schläge pro Minute festgestellt werden konnte. Demzufolge wurde keine  $\text{EC}_{50}$ , also keine Abnahme der Schlagfrequenz auf fünfzig Prozent des Kontrollwertes, erreicht.

Die Änderung der Schlagfrequenz erwies sich in allen fünf Konzentrationen als statistisch nicht signifikant.

In Tabelle 5 sind die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) pro Minute und ihre Standardfehler (SEM) bei den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  aus insgesamt fünf Versuchen sowohl in absoluten Zahlen als auch in Prozentangaben angeführt.

Graphisch sind in Abb 4. die prozentuellen Veränderungen der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz WHG70T, die in  $\mu\text{mol/l}$  auf der Ordinate aufgetragen sind, dargestellt. Auf der Abszisse befinden sich die durchschnittlichen Änderungen der Schlagfrequenz pro Minute, die

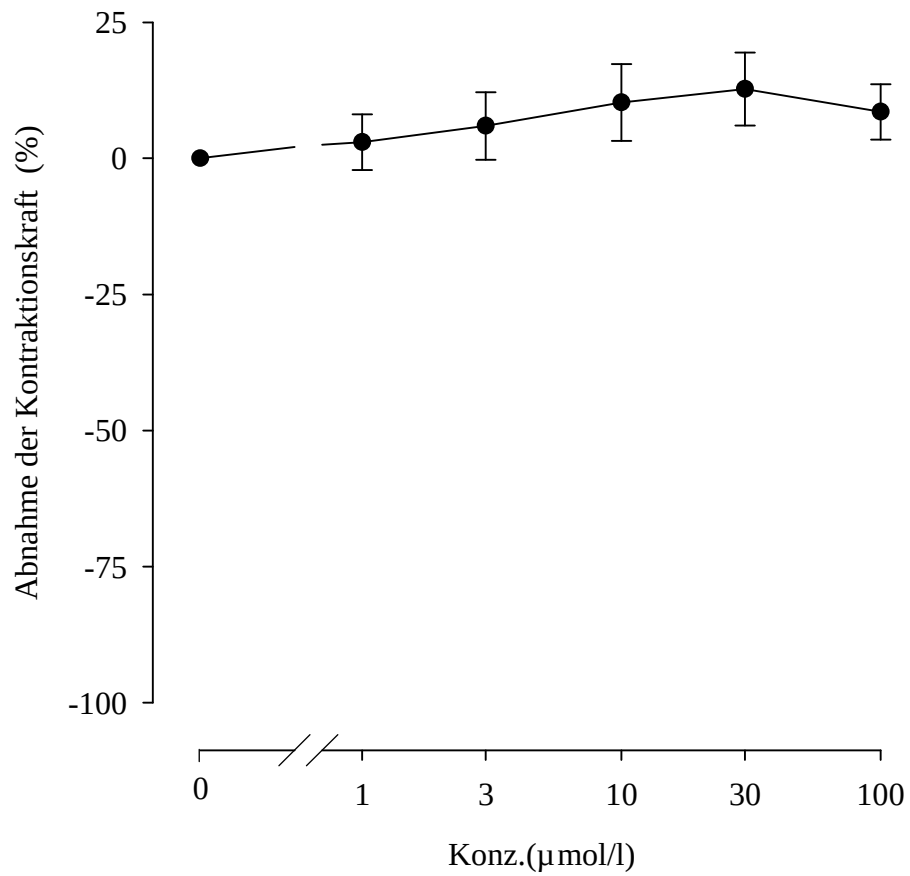
vertikalen Balken entsprechen den Standardfehlern (SEM) von den arithmetischen Mittelwerten aus fünf unabhängigen Versuchsdurchführungen.

Abb. 5 zeigt einen Ausschnitt der Originalaufnahmen, die vom Schreibgerät während der Versuche aufgezeichnet wurden. Anhand der Amplitudenanzahl innerhalb zwölf Sekunden, was einer Laufstrecke von sechs Zentimetern entspricht, konnte durch Multiplikation mit dem Faktor fünf die Schlagfrequenz pro Minute ermittelt werden.

#### **Wirkung von WHG70T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs**

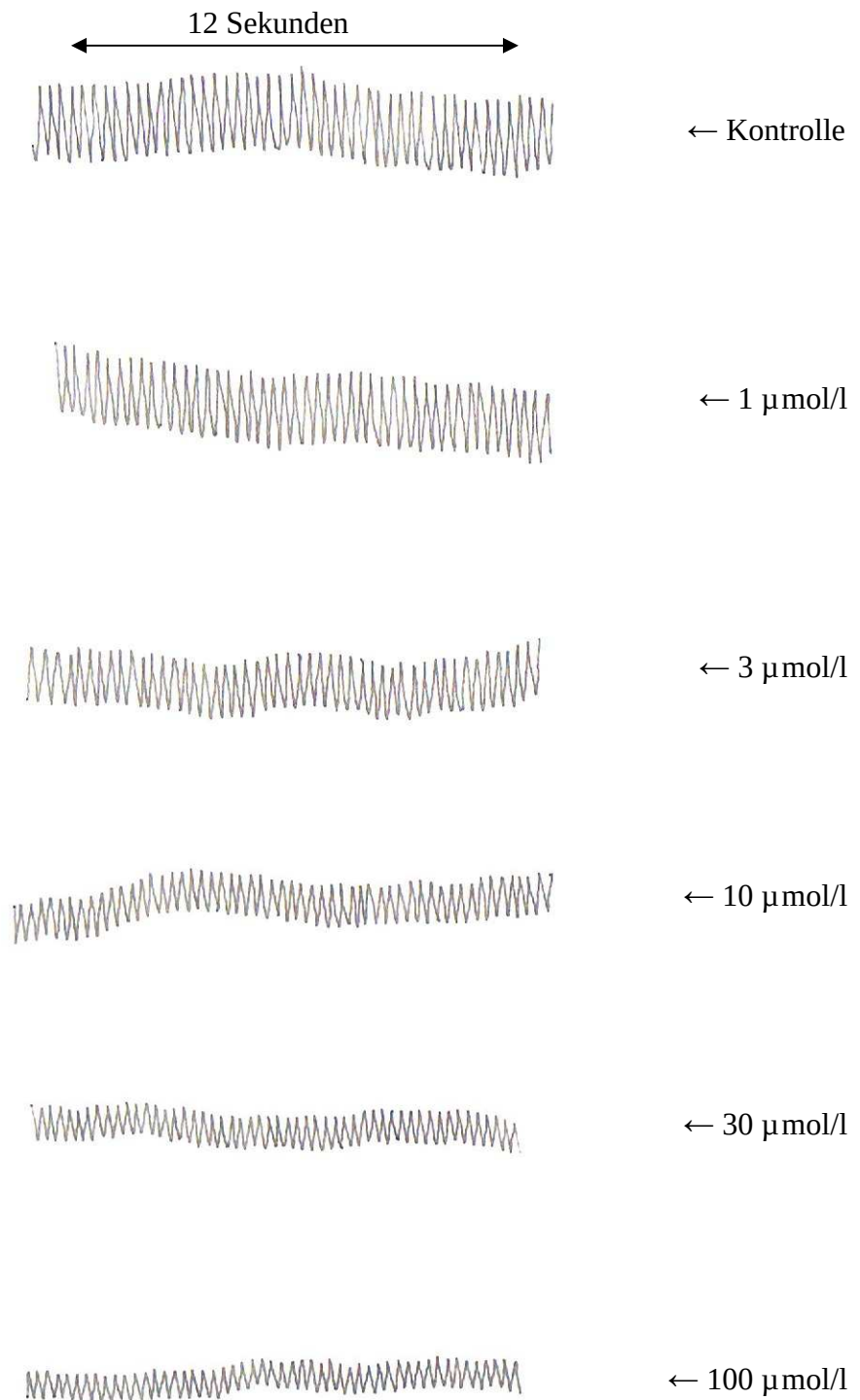
| Konz. WHG70T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | $f \pm \text{SEM (\%)}$ | P     |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| 0 (Kontrolle)                         | $189,00 \pm 13,73$      | 100                     | ----- |
| 1                                     | $192,00 \pm 8,89$       | $102,98 \pm 5,11$       | n. S. |
| 3                                     | $197,00 \pm 8,00$       | $105,95 \pm 6,19$       | n. S. |
| 10                                    | $205,00 \pm 8,51$       | $110,28 \pm 7,60$       | n. S. |
| 30                                    | $210,00 \pm 10,12$      | $112,73 \pm 6,70$       | n. S. |
| 100                                   | $203,00 \pm 11,14$      | $108,54 \pm 5,70$       | n. S. |

**Tab. 4 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am rechten Vorhof**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf den rechten Vorhof**

**Abb. 4 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am rechten Vorhof**

**Schlagfrequenz des rechten Vorhofs unter Einfluss von WHG70T**



**Abb. 5 Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100 µmol/l erhöht wurde.**

#### 4.1.2 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Zur Testung der Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des Herzens wurden fünf Versuche an isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchen durchgeführt, die in Kap. 3. 5. 2. näher beschrieben sind. Auch hier erfolgte in fünfundvierzig minütigen Abständen die Substanzzugabe in der steigenden Konzentration 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$ . Zuvor mussten die isolierten Organe jedoch mithilfe von elektrischen Reizen zur Kontraktion angeregt und ein Erreichen einer konstanten Länge der Kontraktionsamplituden abgewartet werden. Diese Kontrollmessungen ergaben nach Abzug der Ergebnisse aus den Lösungsmittelversuchen einen durchschnittlichen Wert von  $1,31 \pm 0,4 \text{ mN}$ , der als hundert Prozent angenommen wurde.

WHG70T zeigte eine negativ inotrope Wirkung, wobei die stufenweise erfolgte Konzentrationserhöhung von 3 auf 30  $\mu\text{mol/l}$  interessanterweise in diesem Konzentrationsbereich beinahe keine Veränderung in der Kontraktionskraft bewirkte, sondern jene erst wieder bei einer Substanzkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  vermindert wurde. Da die negativ inotrope Wirkung von WHG70T nur einen - im getesteten Konzentrationsbereich - maximalen Wert von  $0,86 \pm 0,27 \text{ mN}$  erreichte, der  $64,66 \pm 1,80$  Prozent entspricht, konnte auch bei den Versuchen am Papillarmuskel keine  $\text{EC}_{50}$  ermittelt werden.

Statistisch erwies sich die Wirkung von WHG70T auf die isolierten Papillarmuskeln als signifikant, bei einem Konzentrationsbereich von 100  $\mu\text{mol/l}$  sogar als hochsignifikant.

Tab. 5 zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Änderungen der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) der Papillarmuskeln als auch deren Standardfehler (SEM), angegeben in mN und Prozent; auch hier wurden die Ergebnisse aus insgesamt fünf unabhängigen Versuchen ermittelt.

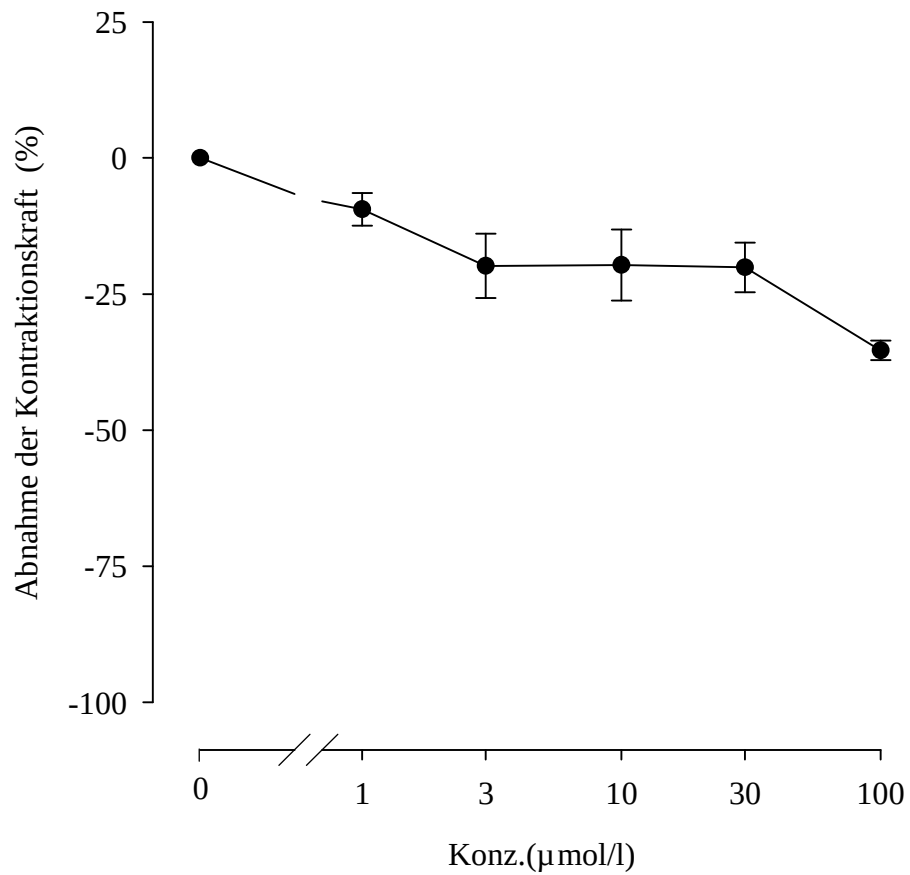
In der graphischen Darstellung der negativ inotropen Wirkung von WHG70T in Abb. 6 ist besonders gut zu erkennen, dass die kumulative Zunahme der Substanzkonzentration keine lineare Verminderung der Kontraktionskraft bewirkt, sondern dass im Konzentrationsbereich von 3 bis 30  $\mu\text{mol/l}$  fast keine Veränderung der Kontraktionskraft auftritt, sondern diese erst wieder bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  absinkt. Die Ordinate gibt die steigenden Konzentrationen der Testsubstanz, die Abszisse die Änderung der Kontraktionskraft der Papillarmuskeln wieder.

Die durch die Testsubstanz ausgelöste Verkleinerung der Kontraktionsamplitude, die während der Versuchsdurchführungen vom Detektor aufgezeichnet wurde, ist ausschnittsweise in Abb. 7 angeführt.

### **Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels**

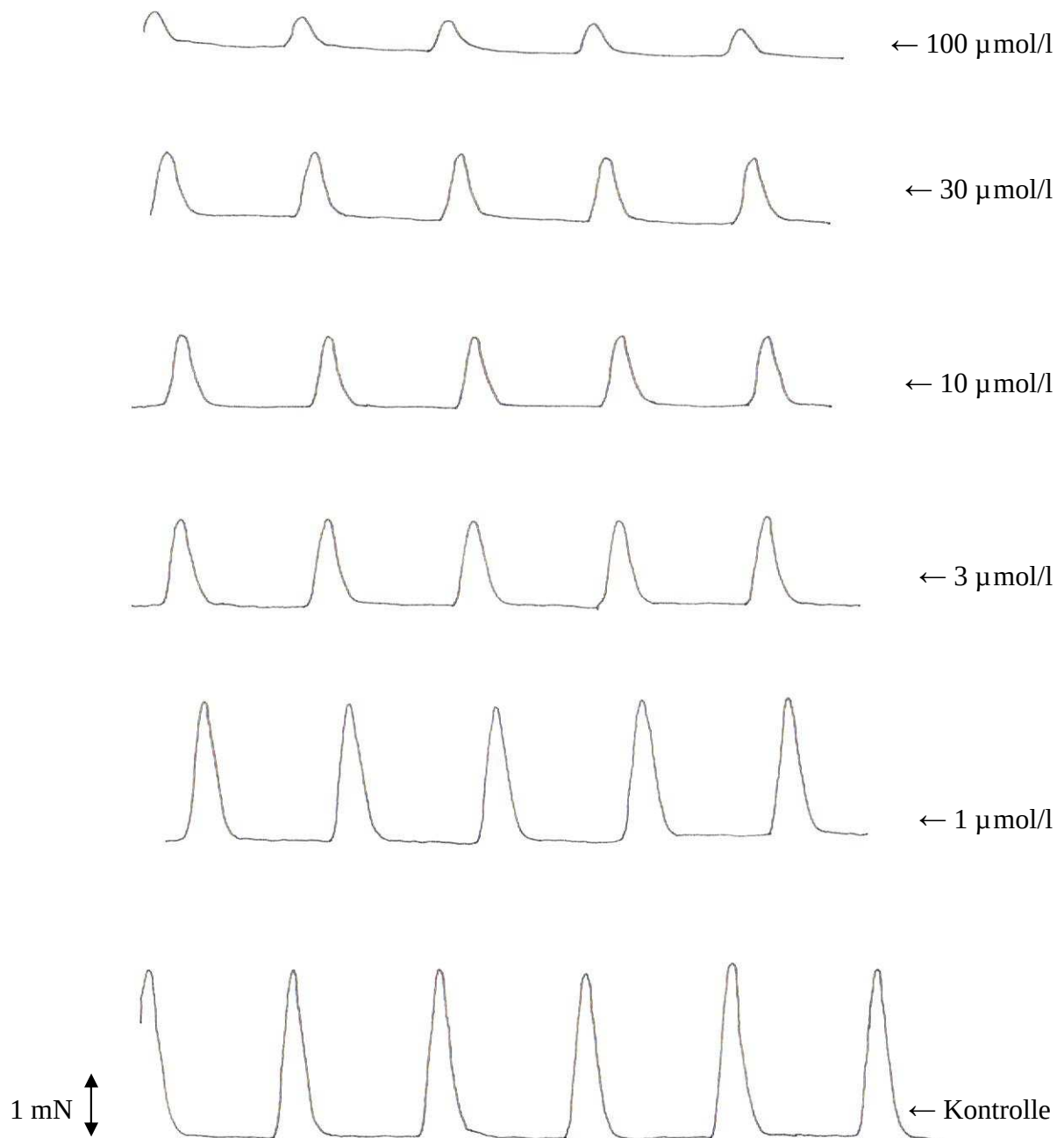
| Konz. WHG70T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | $f_c \pm \text{SEM}$ (%) | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 1,31 $\pm$ 0,40           | 100                      | -----   |
| 1                                     | 1,22 $\pm$ 0,41           | 90,55 $\pm$ 3,01         | < 0,05  |
| 3                                     | 1,12 $\pm$ 0,42           | 80,19 $\pm$ 5,93         | < 0,05  |
| 10                                    | 1,14 $\pm$ 0,44           | 80,32 $\pm$ 6,54         | < 0,05  |
| 30                                    | 1,12 $\pm$ 0,41           | 79,91 $\pm$ 4,55         | < 0,05  |
| 100                                   | 0,86 $\pm$ 0,27           | 64,66 $\pm$ 1,80         | < 0,001 |

**Tab. 5 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Papillarmuskel**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf den Papillarmuskel**

**Abb. 6 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Papillarmuskel**



**Kontraktionskraft des Papillarmuskels unter Einfluss von WHG70T**

**Abb. 7 Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.**

#### 4.1.3 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

In fünf Versuchen wurde der Einfluss der Testsubstanz WHG70T auf die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis untersucht. Wie im Kapitel 3. 5. 3. beschrieben, musste eine maximale Vorkontraktion der Gefäßmuskel erfolgen, um das Ausmaß der Kontraktionsabnahme bestimmen zu können. Dies geschah mit einer neunzig millimolaren Kaliumchloridlösung. Nach Erreichen des „steady state“ erfolgte die kumulative Substanzzugabe im fünfundvierzig Minuten – Rhythmus. Der Abstand der Plateauphase zur Nulllinie in Zentimetern wurde mit 0,98 multipliziert, um Werte in Millinewton zu erhalten, und als hundert Prozent angenommen. Dieser Kontrollwert betrug durchschnittlich  $13,80 \pm 1,49$  mN und wurde als Vergleichswert zur Bestimmung der prozentuellen Abnahme der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz herangezogen.

Die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis wurde durch die Substanz WHG70T nur äußerst geringfügig verringert, sodass selbst bei einer Konzentration von hundert  $\mu\text{mol/l}$  keine  $\text{EC}_{50}$  erreicht werden konnte. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei den ersten vier Konzentrationen unter fünf Prozent, bei der höchsten Konzentration sogar unter ein Prozent; die ermittelten Werte können daher als signifikant bzw. als hochsignifikant angesehen werden.

In Tab. 6 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ), ermittelt aus fünf Versuchen, in Millinewton und Prozent sowie deren Standardfehler und deren statistische Signifikanz angeführt.

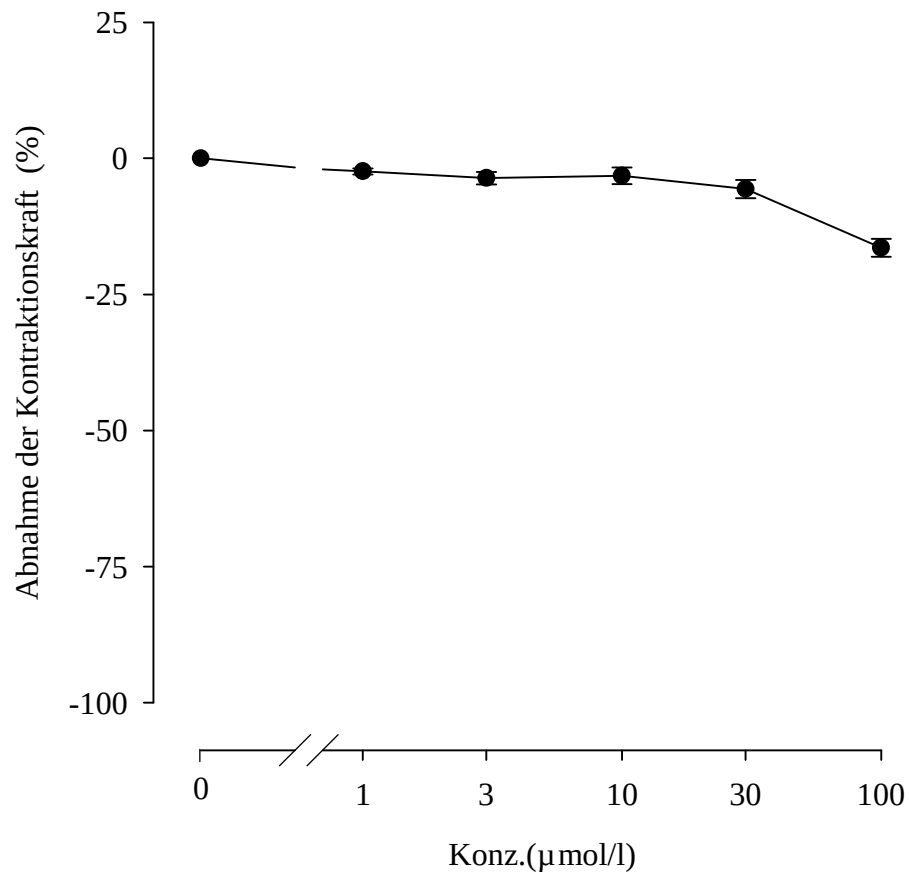
Abb. 8 stellt die Konzentration – Wirk – Beziehung graphisch dar, wobei deutlich erkennbar ist, dass WHG70T kaum Wirkung auf die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Pulmonalarterien besitzt. Der Einfluss der Testsubstanz lässt sich auch durch Erhöhung der Substanzkonzentration nur unwesentlich steigern: Im Konzentrationsbereich 1 – 30  $\mu\text{mol/l}$  ist die Abnahme der Kontraktionskraft sogar so gering, dass die Konzentrations – Wirkungskurve beinahe eine Gerade darstellt, und auch in der höchsten getesteten Konzentration von hundert  $\mu\text{mol/l}$  die Verringerung der Kontraktionskraft nur einen Prozentwert von 16,44 erreicht.

Auch die Kontraktionskurve in Abb. 9, die während einem der fünf Versuchsdurchführungen aufgezeichnet wurde, zeigt deutlich dass die Testsubstanz auch bei Steigerung der Konzentration keine merkliche Verringerung in der Kontraktionskraft bewirkt, sondern diese erst im letzten und höchsten Konzentrationsbereich deutlich wird.

**Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis**

| Konz. WHG70T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM (mN)}$ | $f_c \pm \text{SEM (\%)}$ | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 13,80 $\pm$ 1,49          | 100                       | -----   |
| 1                                     | 13,46 $\pm$ 1,44          | 97,60 $\pm$ 0,56          | < 0,05  |
| 3                                     | 13,28 $\pm$ 1,43          | 96,36 $\pm$ 1,14          | < 0,05  |
| 10                                    | 13,31 $\pm$ 1,36          | 96,80 $\pm$ 1,52          | < 0,05  |
| 30                                    | 12,94 $\pm$ 1,28          | 94,36 $\pm$ 1,70          | < 0,05  |
| 100                                   | 11,50 $\pm$ 1,18          | 83,56 $\pm$ 1,65          | < 0,001 |

**Tab. 6 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Arteria pulmonalis**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf die Arteria pulmonalis**

**Abb. 8 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Arteria pulmonalis**

**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur von Pulmonalarterien unter Einfluss von WHG70T**

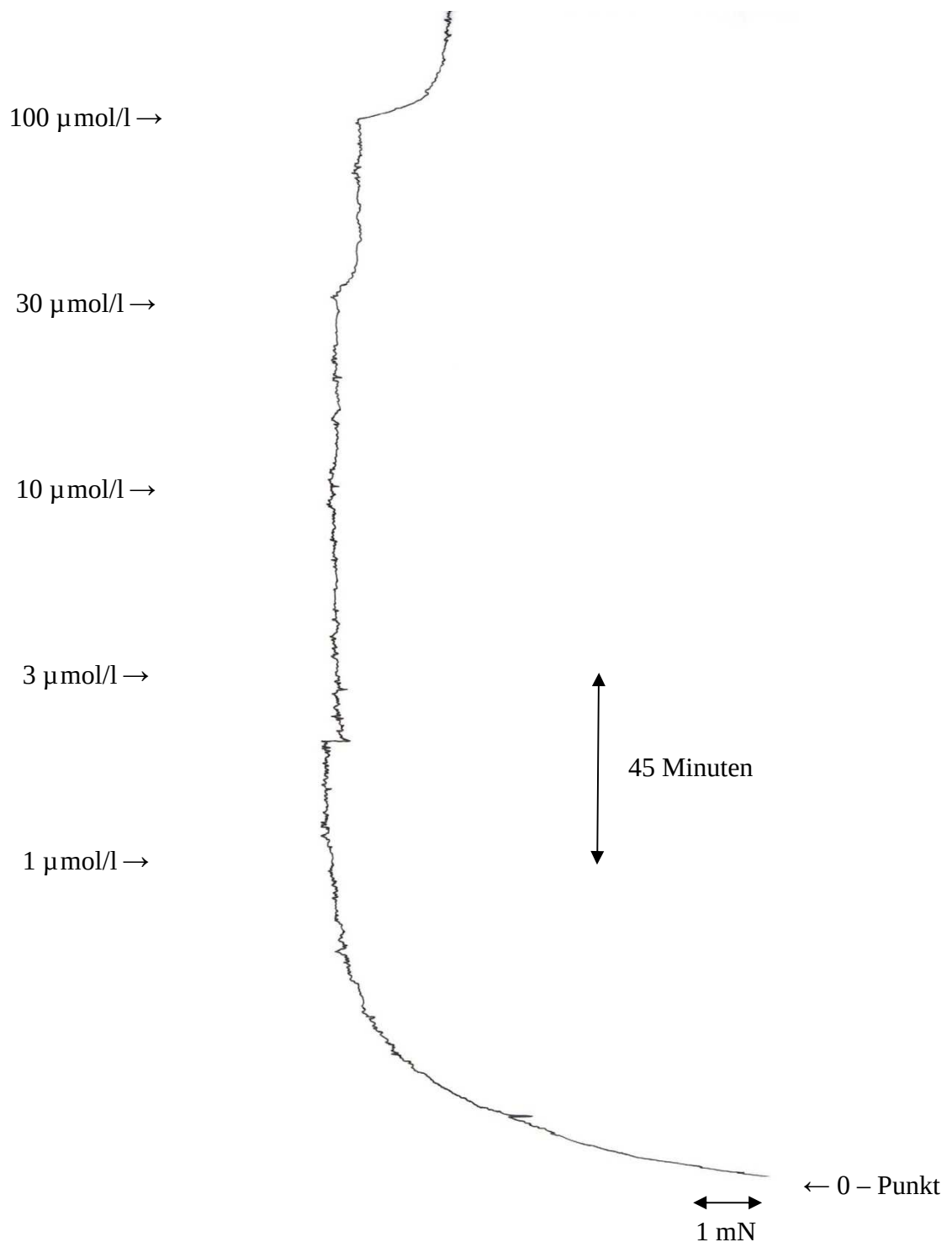


Abb. 9 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Arteria pulmonalis - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.

#### 4.1.4 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

Bei dieser Untersuchung wurde der Einfluss der Testsubstanz WHG70T auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta an fünf unabhängigen Versuchsdurchführungen ermittelt (siehe Kap. 3. 5. 4). Vor der kumulativen Zugabe der Testsubstanz in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  musste jedes Präparat mit einer neunzig millimolaren Kaliumchlorid – Lösung maximal vorkontrahiert werden, um so den relaxierenden Effekt von WHG70T auf die glatte Gefäßmuskulatur der Aorta feststellen zu können. Während des gesamten Versuchsablaufes wurde auch hier jegliche Veränderung in der Kontraktionskraft mit Hilfe eines Schreibers genau dokumentiert.

Nach Multiplikation des Abstandes von der maximalen Vorkontraktion bis zur Nulllinie in Zentimetern mit dem Eichfaktor 0,98 ergab sich als Mittelwert der Versuchsreihe eine Kontraktionskraft von  $8,96 \pm 1,83 \text{ mN}$ , wobei die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche bereits berücksichtigt sind.

WHG70T zeigte kaum relaxierende Wirkung auf die Gefäßmuskulatur der Aorta – in den niedrigen Konzentrationsbereichen war sogar ein geringfügiger Anstieg der Kontraktionskraft um 2,23 Prozent zu verzeichnen. Selbst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  war nur eine äußerst minimale Relaxierung der Gefäßmuskulatur um 0,76 Prozent erkennbar, die auch bei weiterer Konzentrationssteigerung nicht deutlicher wurde, sodass sich nur die Werte ermittelt bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  als signifikant erweisen.

Die aus fünf Versuchsdurchführungen erhaltenen arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) sind in Tab. 7 in mN und in Prozentwerten angeführt, ebenso wie die daraus berechneten Standardabweichungen und Irrtumswahrscheinlichkeiten.

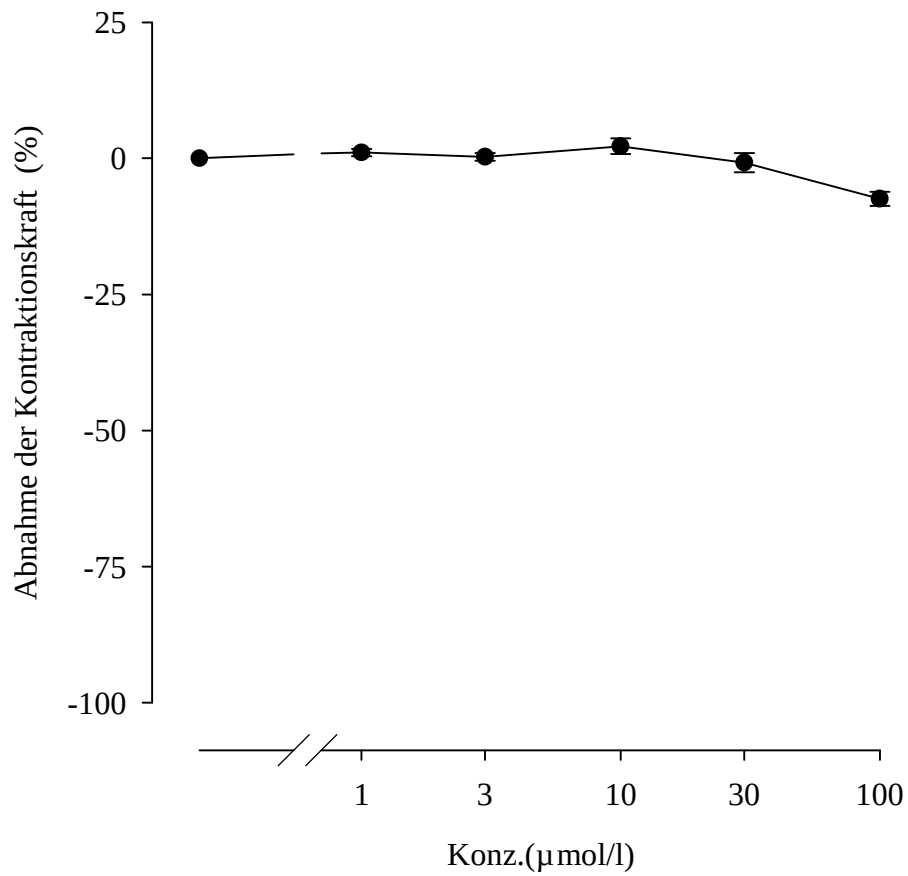
Abb. 10 stellt die Ergebnisse der Versuchsreihe an der isolierten Aorta graphisch dar. Darin ist deutlich zu erkennen, dass WHG70T kaum Einfluss auf die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Aorta ausübt, sondern die Konzentrations – Wirkungskurve beinahe linear verläuft. Erst in einem Konzentrationsbereich von 30 bis 100  $\mu\text{mol/l}$  scheint eine leichte Relaxierung der Gefäße aufzutreten, die jedoch nur so gering ausfällt, dass wie auch schon bei der Auswertung der Versuche an der Arteria pulmonalis keine  $\text{EC}_{50}$  ermittelt werden kann.

In Abb. 11 ist eine Originalaufzeichnung, stellvertretend für alle fünf Versuchsdurchführungen dargestellt. Auch anhand dieses Kurvenverlaufs wird deutlich, dass ein Einfluss von WHG70T auf die Kontraktilität der Aorta kaum erkennbar ist.

### **Wirkung von WHG70T auf die Kontraktilität der Aorta**

| Konz. WHG70T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM (mN)}$ | $f_c \pm \text{SEM (\%)}$ | P      |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| 0 (Kontrolle)                         | 8,96 $\pm$ 1,83           | 100                       | -----  |
| 1                                     | 9,03 $\pm$ 1,82           | 101,05 $\pm$ 0,68         | n. s.  |
| 3                                     | 9,04 $\pm$ 1,85           | 100,29 $\pm$ 0,70         | n. s.  |
| 10                                    | 9,14 $\pm$ 1,85           | 102,23 $\pm$ 1,45         | n. s.  |
| 30                                    | 8,86 $\pm$ 1,79           | 99,24 $\pm$ 1,76          | n. s.  |
| 100                                   | 8,30 $\pm$ 1,28           | 92,56 $\pm$ 1,28          | < 0,05 |

**Tab. 7 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Aorta**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf die Aorta**

**Abb. 10 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Aorta**



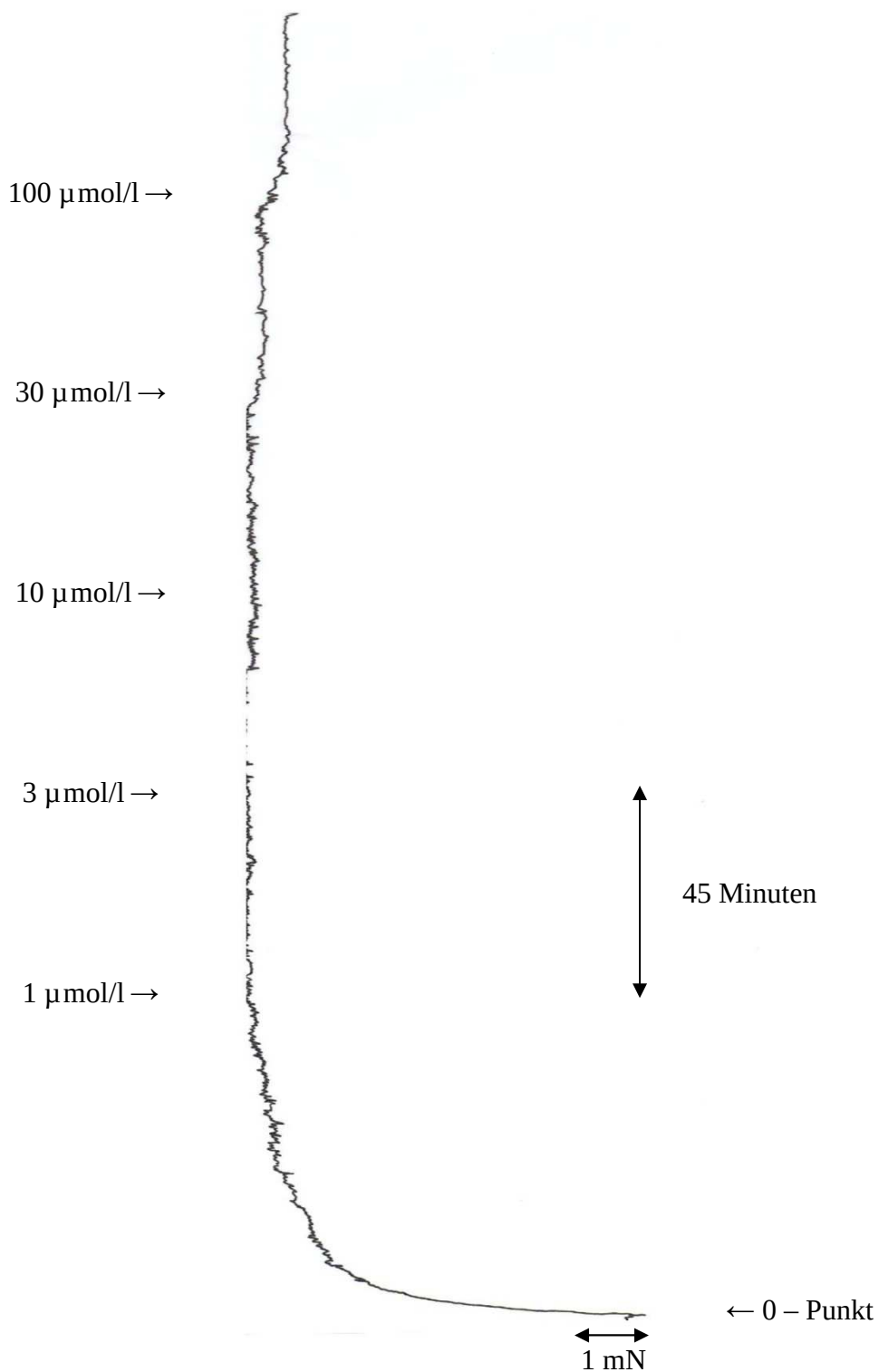
**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Aorta unter Einfluss von WHG70T**

Abb. 11 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Aorta - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.

#### 4.1.5 Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileum

Auch die Wirkung von WHG70T auf die Kontraktilität des isolierten Dünndarms wurde an insgesamt fünf Versuchen in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. Der detaillierte Versuchsablauf ist in Kapitel 3. 5. 5. beschrieben.

Um Veränderungen der Kontraktilität unter dem Einfluss der Testsubstanz beurteilen zu können, war eine Vorkontraktion der Präparate mittels einer sechzig millimolaren Kaliumchlorid – Lösung notwendig. Diese maximale Kontraktionskraft, die durch die Vorkontraktion erreicht wurde, betrug im Mittel aus den fünf Versuchen  $11,3 \pm 1,50$  mN und wurde als hundert Prozent definiert. Mit diesem Kontrollwert wurden die Veränderungen der Kontraktilität unter dem Einfluss von WHG70T, dessen Konzentration alle fünfundvierzig Minuten erhöht wurde, verglichen.

Im Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz sank die Kontraktionskraft des Dünndarms sukzessive mit jeder Konzentrationserhöhung um jeweils etwa zwei bis drei Prozent. Erst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  wurde die Kontraktilität statistisch signifikant um 14,17 Prozent verringert und erreichte in der höchsten Konzentrationsstufe ihr Minimum von  $67,64 \pm 2,23$  Prozent mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner ein Prozent.

In Tab. 8 sind die aus fünf Versuchen am terminalen Ileum erhaltenen arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) und ihre Standardfehler (SEM) in mN und Prozent angeführt.

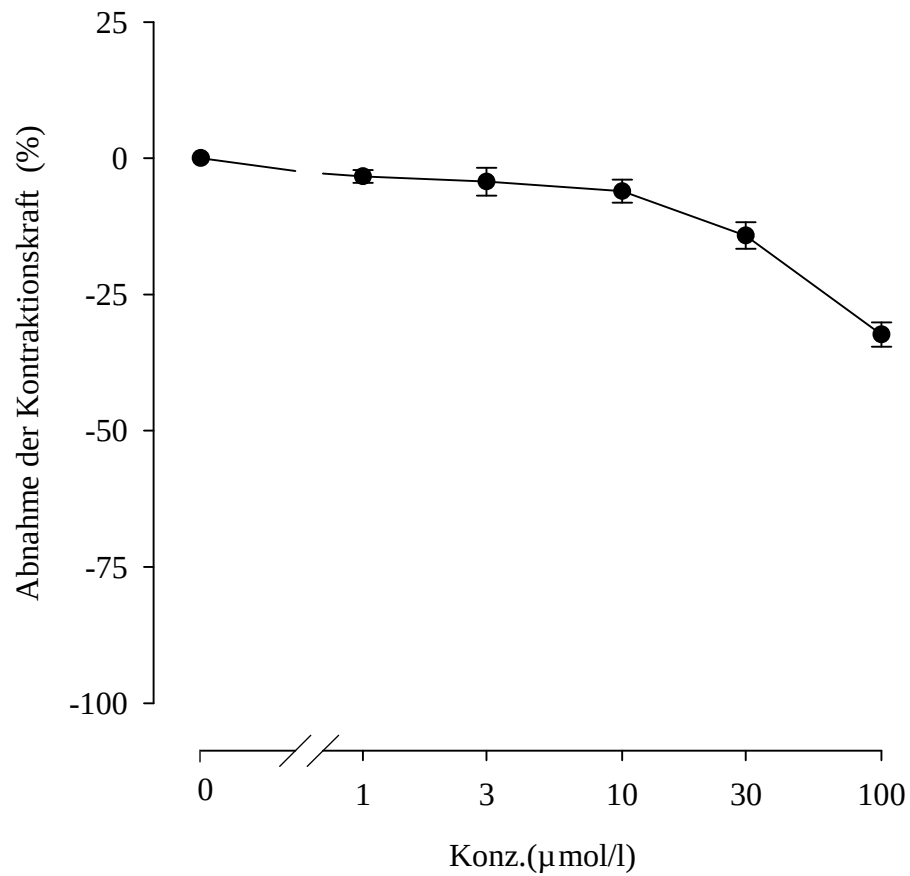
In der graphischen Darstellung in Abb. 12 wird deutlich, dass - analog zu den beiden anderen untersuchten glattemuskulären Organen - WHG70T in den ersten Konzentrationsstufen auch auf den isolierten Dünndarm kaum Veränderungen in der Kontraktilität hervorruft. Obwohl bei den Testkonzentration von 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  der Einfluss der Testlösung auf die Kontraktilität des terminalen Ileum wesentlich stärker ausfällt als der auf Aorta und Pulmonalis, ist die Abnahme der Kontraktionskraft auch hier noch zu gering, um eine  $EC_{50}$  erreichen zu können.

In Abb. 13 findet sich eine Aufzeichnung über die Veränderung der Kontraktilität, die während des Versuchsablaufes vom Schreiber detektiert wurde, wieder.

**Wirkung von WHG70T auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums**

| Konz. WHG70T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | $f_c \pm \text{SEM}$ (%) | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 11,3 $\pm$ 1,50           | 100                      | -----   |
| 1                                     | 10,99 $\pm$ 1,62          | 96,65 $\pm$ 1,17         | n. s.   |
| 3                                     | 10,95 $\pm$ 1,73          | 95,69 $\pm$ 2,58         | n. s.   |
| 10                                    | 10,70 $\pm$ 1,59          | 93,94 $\pm$ 2,12         | n. s.   |
| 30                                    | 9,73 $\pm$ 1,35           | 85,83 $\pm$ 2,44         | < 0,05  |
| 100                                   | 7,75 $\pm$ 1,27           | 67,64 $\pm$ 2,23         | < 0,001 |

**Tab. 8 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Ileum**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf das terminale Ileum**

**Abb. 12 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten terminalen Ileum**

**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des terminalen Ileum unter Einfluss von**  
**WHG70T**

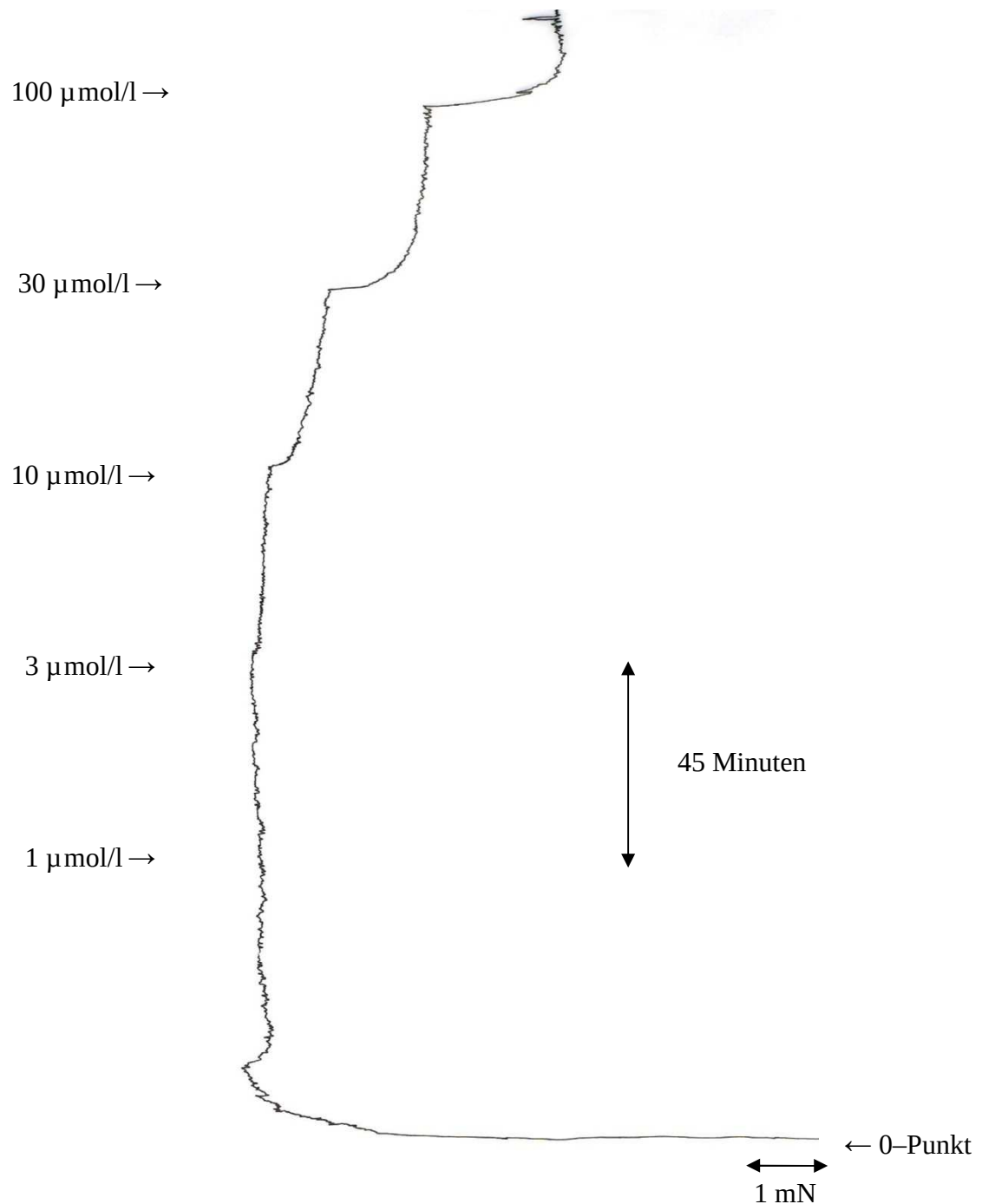


Abb. 13 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Ileum - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.

## 4.2 Wirkung von WHG60T auf isolierte Meerschweinchen - Organe

### 4.2.1 Wirkung von WHG60T auf die Schlagfrequenz des Vorhofs

Zur Untersuchung des Einflusses von WHG60T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes war die Testung an nur vier Präparaten ausreichend, da die erhaltenen Messdaten kaum Schwankungen unterworfen und gut reproduzierbar waren.

Zu Beginn jeder Versuchsdurchführung stand die Kontrollphase, in der sich das Vorhof – Präparat an die Versuchsumgebung gewöhnen konnte und das Einstellen einer gleichbleibende Schlagfrequenz abgewartet wurde. Diese betrug im Mittel  $235,25 \pm 18,75$  Schläge pro Minute und wurde als Kontrollwert mit hundert Prozent angenommen. Danach konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden.

Bei allen vier Versuchsdurchführung musste die Testung jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da unabhängig voneinander jedes der vier Vorhof – Präparate bei Zugabe einer zehn  $\mu$ molaren Testlösung nach wenigen Minuten die Spontanaktivität einstellte.

Daher können in Tab. 9 die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) pro Minute und ihre Standardfehler (SEM) nur bei den Konzentrationen 1 und 3  $\mu$ mol/l in absoluten Zahlen und in Prozentangaben angeführt werden, wobei die ermittelten Daten in beiden Konzentrationen als statistisch signifikant gelten.

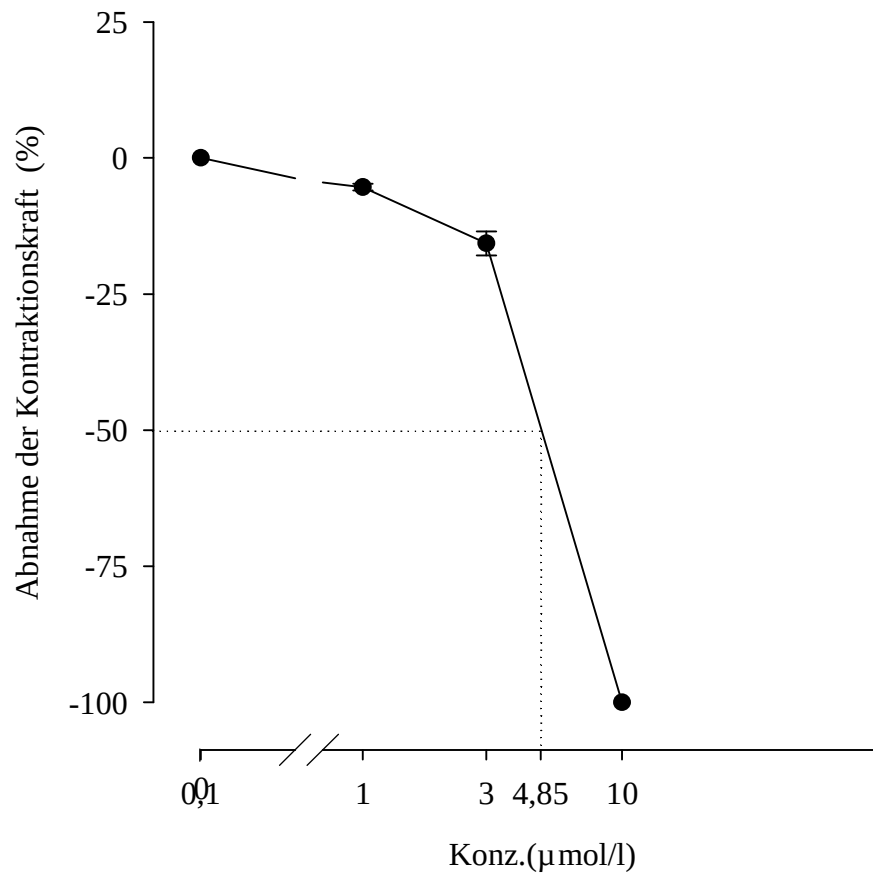
Die stark negativ chronotrope Wirkung von WHG60T lässt sich in der Dosis – Wirkungskurve in Abb. 14 deutlich erkennen. Bei einem Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ mol/l sinkt die Schlagfrequenz zunächst um 5,35%. Durch Steigerung der Testkonzentration um 2  $\mu$ mol/l verdreifacht sich die negativ chronotrope Wirkung, die Frequenzabnahme erreicht einen prozentuellen Wert von 15,86 und fällt bei weiterer Erhöhung der Konzentration auf 10  $\mu$ mol/l nach wenigen Minuten rapide ab. Besonders deutlich wird der massive Einfluss von WHG60T auf die Schlagfrequenz dadurch, dass die  $EC_{50}$ , in der Grafik mit Hilfe der punktierten Linien ermittelt, bereits bei einer Konzentration von 4,85  $\mu$ mol/l erreicht wird.

Abb. 15 zeigt einen Ausschnitt der vom Schreiber aufgezeichneten Frequenzamplituden während der Kontrollphase sowie bei den Konzentrationen von 1, 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ .

**Wirkung von WHG60T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs**

| Konz. WHG60T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | $f \pm \text{SEM (\%)}$ | P      |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| 0 (Kontrolle)                         | 235,25 $\pm$ 18,75      | 100                     | -----  |
| 1                                     | 223,75 $\pm$ 18,53      | 94,65 $\pm$ 0,60        | < 0,05 |
| 3                                     | 200,00 $\pm$ 18,82      | 84,32 $\pm$ 2,19        | < 0,05 |
| 10                                    | 0                       | 0                       | -----  |

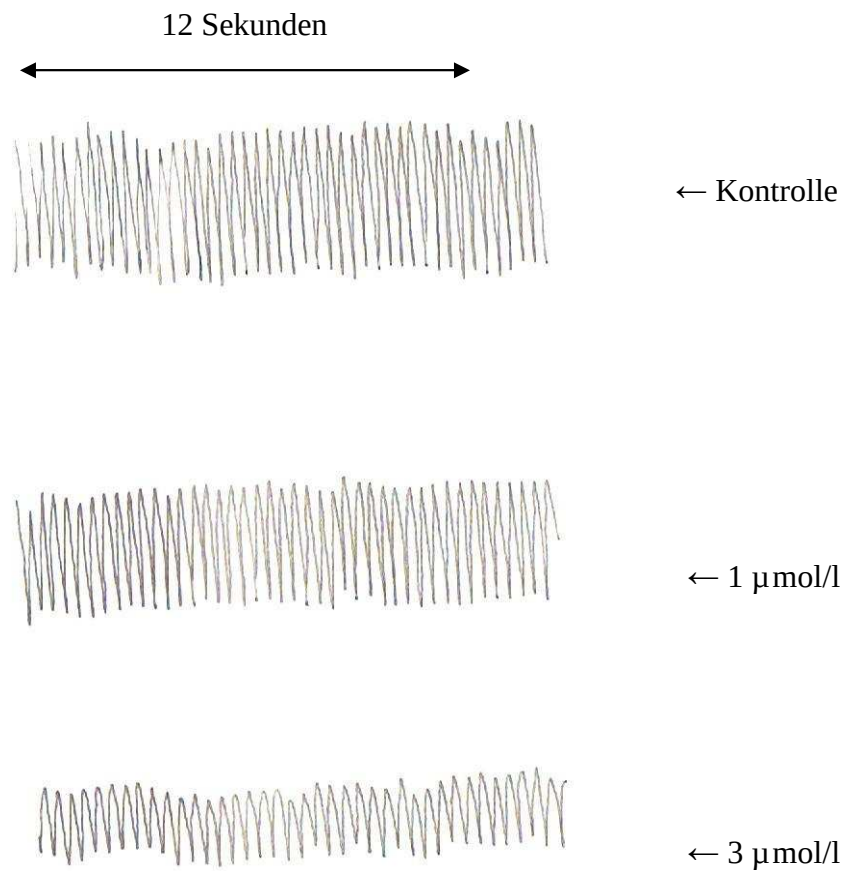
**Tab. 9 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus vier Versuchsdurchführungen am rechten Vorhof**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T auf den rechten Vorhof**

**Abb. 14 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T, ermittelt aus vier Versuchsdurchführungen am rechten Vorhof**



**Schlagfrequenz des rechten Vorhofs unter Einfluss von WHG60T**



**Abb. 15 Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG60T in steigender Konzentration auf die Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1 über 3 auf 10 µmol/l erhöht wurde.**

#### 4.2.2 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Um den Einfluss von WHG60T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels untersuchen zu können, wurden in fünf Versuchen steigende Testkonzentrationen der Elektrolytlösung, in der sich das isolierte Muskel – Präparat befand, zugesetzt. Die Zugabe der Testlösung konnte erst erfolgen, nachdem die Organe mit elektrischen Reizen zur Kontraktion angeregt worden waren und die Kontraktionsamplituden eine konstante Länge aufwiesen. Der genaue Versuchsablauf ist in Kap. 3. 5. 2. beschrieben.

Der aus den Kontrollmessungen ermittelte Durchschnittswert von  $2,33 \pm 0,21$  mN wurde als hundert Prozent festgesetzt und diente als Bezugswert für nachfolgende Änderungen der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz WHG60T. Diese zeigte bereits bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  eine negativ inotrope Wirkung, die Kontraktionskraft nahm um  $20,79 \pm 3,97$  Prozent ab. Die Abnahme der Kontraktionskraft setzte sich bei weiterer Zugabe der Testlösung beinahe linear fort und erreichte bereits bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  ein Maximum von  $67,25 \pm 1,37$  Prozent. Bei Erhöhung der Testmenge auf  $30 \mu\text{mol/l}$  traten sofort unkoordinierte Kontraktionsfrequenzen auf und nach wenigen Minuten musste der Versuch beendet werden, da der Papillarmuskel seine Kontraktionskraft völlig verloren hatte.

Wie in Tab. 10 ersichtlich gelten die aus fünf Versuchsansätzen ermittelten Werte als statisch signifikant bzw. bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  sogar als hochsignifikant. Aufgrund der stark negativ inotropen Wirkung von WHG60T konnten bei höheren Konzentrationen keine Werte ermittelt werden, da die Papillarmuskeln in allen fünf Versuchen bei einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  nach kurzer Zeit ihre Kontraktionen einstellten.

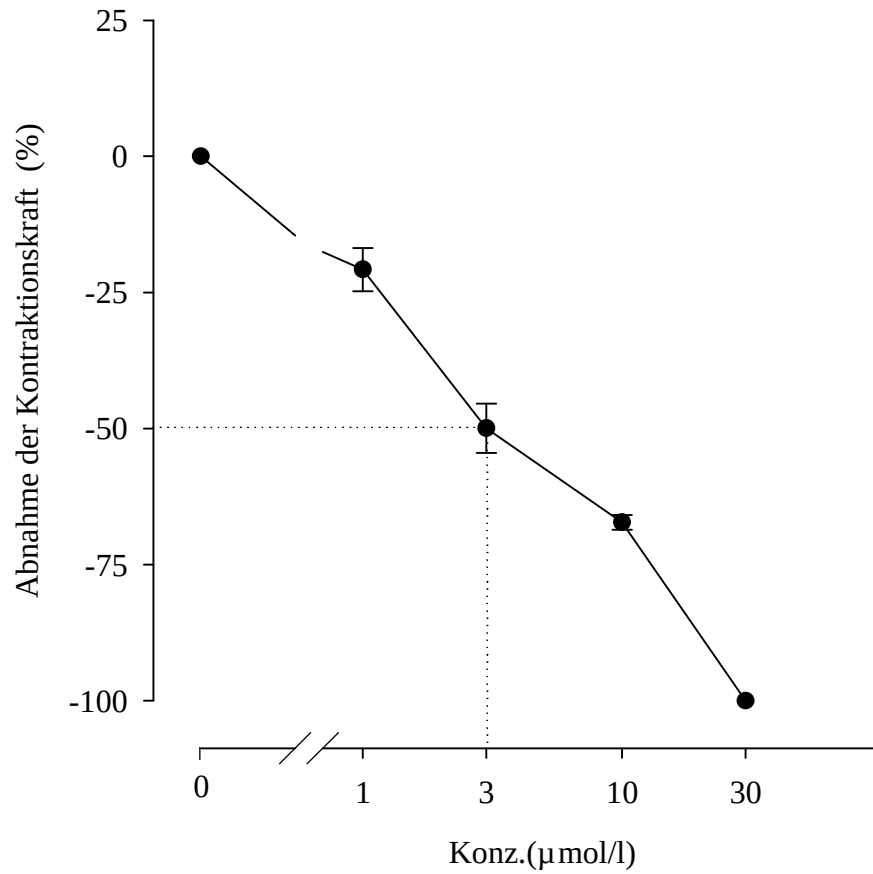
Die Konzentrations – Wirkungskurve von WHG60T auf den Papillarmuskel in Abb. 16 zeigt die fast lineare Abnahme der Kontraktionskraft unter Einfluss der Testsubstanz, die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei einer Konzentration von genau  $3 \mu\text{mol/l}$  aus der graphischen Darstellung ermittelt.

In Abb. 17 ist ein Ausschnitt der - zwecks exakterer Vermessung bei zwanzig mV durchgeführter - Aufzeichnung des Detektors dargestellt, die deutlich die durch die Testsubstanz hervorgerufene Verkleinerung der Amplitude zeigt.

### **Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels**

| Konz. WHG60T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM (mN)}$ | $f_c \pm \text{SEM (\%)}$ | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 2,33 $\pm$ 0,21           | 100                       | -----   |
| 1                                     | 1,85 $\pm$ 0,19           | 79,21 $\pm$ 3,97          | < 0,05  |
| 3                                     | 1,18 $\pm$ 0,17           | 50,05 $\pm$ 4,55          | < 0,05  |
| 10                                    | 0,77 $\pm$ 0,09           | 32,75 $\pm$ 1,37          | < 0,001 |
| 30                                    | 0                         | 0                         | -----   |

**Tab. 10** Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Papillarmuskel

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T auf den Papillarmuskel**

**Abb. 16 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Papillarmuskel**

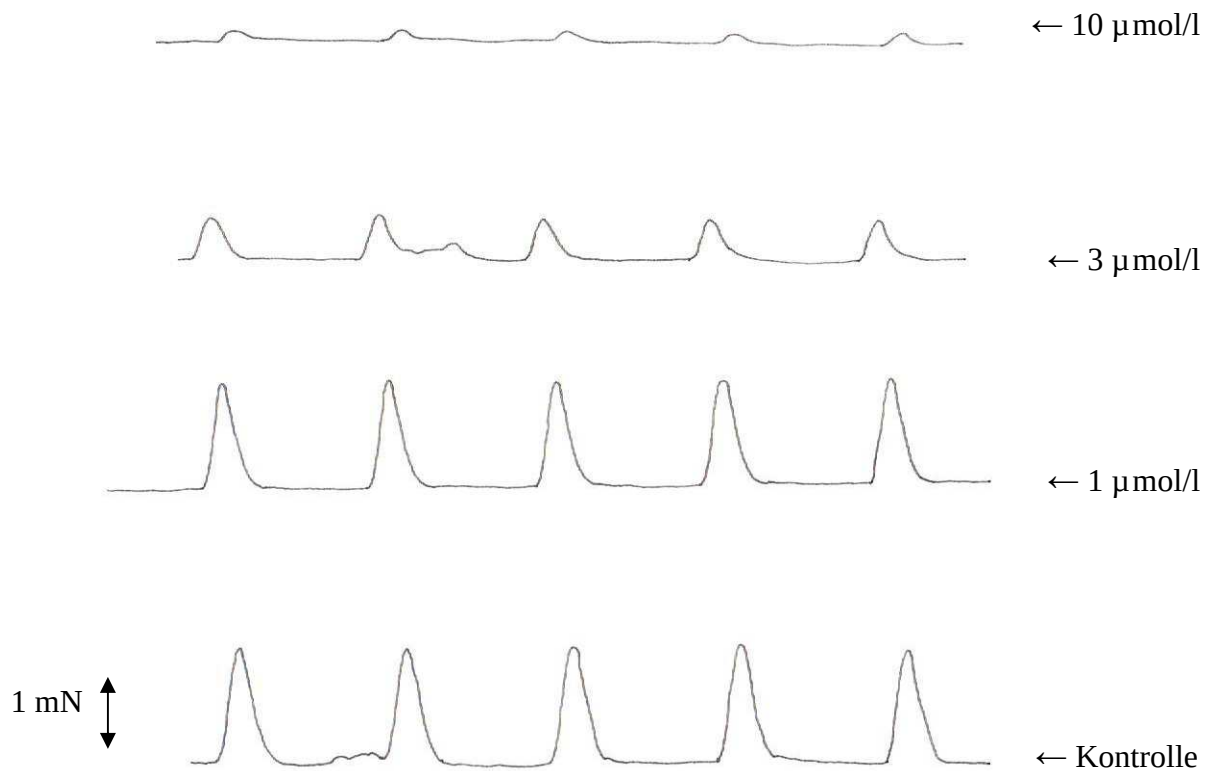
**Kontraktionskraft des Papillarmuskels unter Einfluss von WHG60T**

Abb. 17 Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG60T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100 µmol/l erhöht wurde.

### 4.2.3 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

An der Arteria pulmonalis wurde die Testsubstanz WHG60T in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  an insgesamt fünf Präparaten getestet, um Auswirkungen auf die Kontraktionskraft feststellen zu können. Auch hier erfolgte die kumulative Substanzzugabe in fünfundvierzig – minütigen Intervallen, wobei zuvor eine maximale Vorkontraktion mit Hilfe einer neunzig millimolaren Kaliumchloridlösung erfolgte und das Einstellen einer Plateauphase abgewartet wurde (s. Kap. 3. 5. 3). Das Erreichen dieses „steady state“ entsprach der maximalen Kontraktion und wurde mit hundert Prozent angenommen.

Unter dem Einfluss von WHG60T war bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  eine Relaxation der Gefäßmuskulatur der Pulmonalarterie von  $11,15 \pm 1,98 \%$  zu erkennen. Bei weiterer Konzentrationssteigerung nahm das Ausmaß der Relaxation deutlich zu und erreichte bei der Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  einen prozentuellen Wert von  $89,38 \pm 3,58$ .

Wie in Tab. 11 ersichtlich waren die Messergebnisse bei den Konzentrationen 1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  signifikant, bei den Konzentrationen von 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  hochsignifikant.

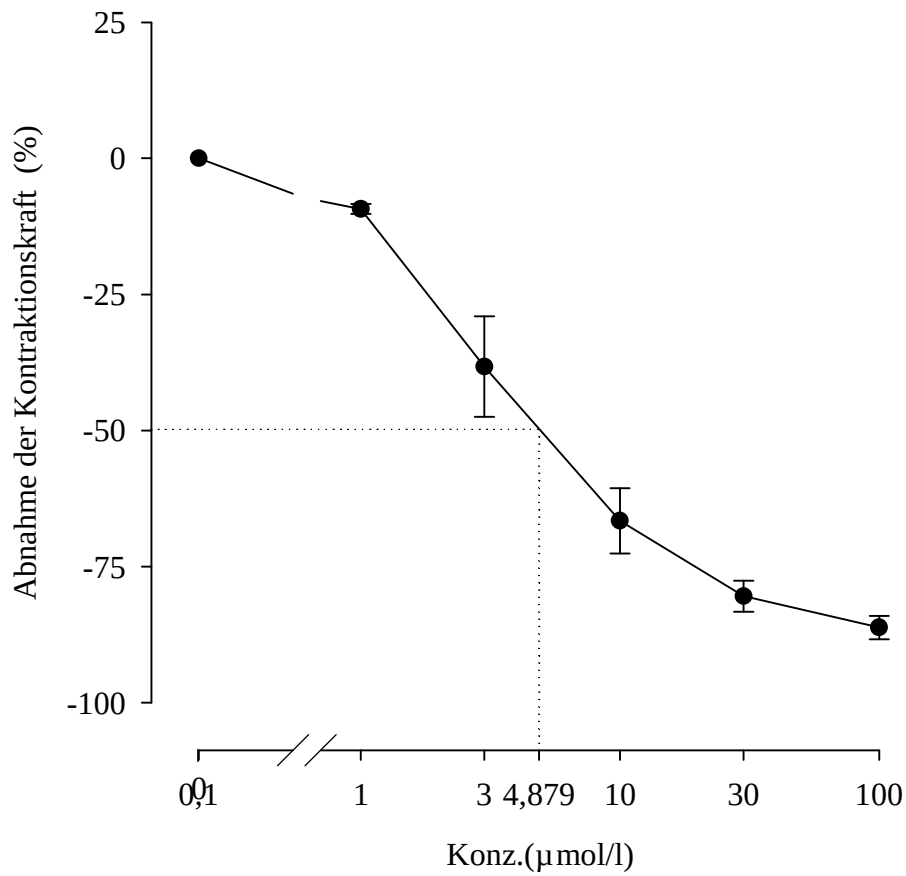
In Abb. 18 ist zur Veranschaulichung der Wirkung von WHG60T die Konzentrations – Wirkungskurve dargestellt. An dieser ist auch zu erkennen, dass in dem fünfundvierzig – minütigen Messzyklus bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  die Kontraktionskraft um mehr als fünfzig Prozent sinkt, die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei einer Konzentration von 4,879  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

An der Originalaufzeichnung in Abb. 19 wie auch an der Dosis – Wirkungskurve, ist zu erkennen, dass die Kontraktionskraft im Konzentrationsbereich 1 – 30  $\mu\text{mol/l}$  stark absinkt. Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  ist die Relaxation der Gefäßmuskulatur weniger massiv, sodass die Kurve, die während eines Versuchsablaufes vom Schreiber aufgezeichnet wurde, in den letzten beiden Konzentrationsbereichen deutlich abflacht.

**Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis**

| Konz. WHG60T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | $f_c \pm \text{SEM}$ (%) | P         |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|
| 0 (Kontrolle)                         | $11,88 \pm 1,10$          | 100                      | -----     |
| 1                                     | $10,58 \pm 1,08$          | $88,85 \pm 1,98$         | $< 0,05$  |
| 3                                     | $6,97 \pm 1,25$           | $58,42 \pm 7,88$         | $< 0,05$  |
| 10                                    | $3,42 \pm 0,91$           | $28,61 \pm 6,70$         | $< 0,001$ |
| 30                                    | $1,88 \pm 0,60$           | $15,74 \pm 4,42$         | $< 0,001$ |
| 100                                   | $1,24 \pm 0,42$           | $10,62 \pm 3,58$         | $< 0,001$ |

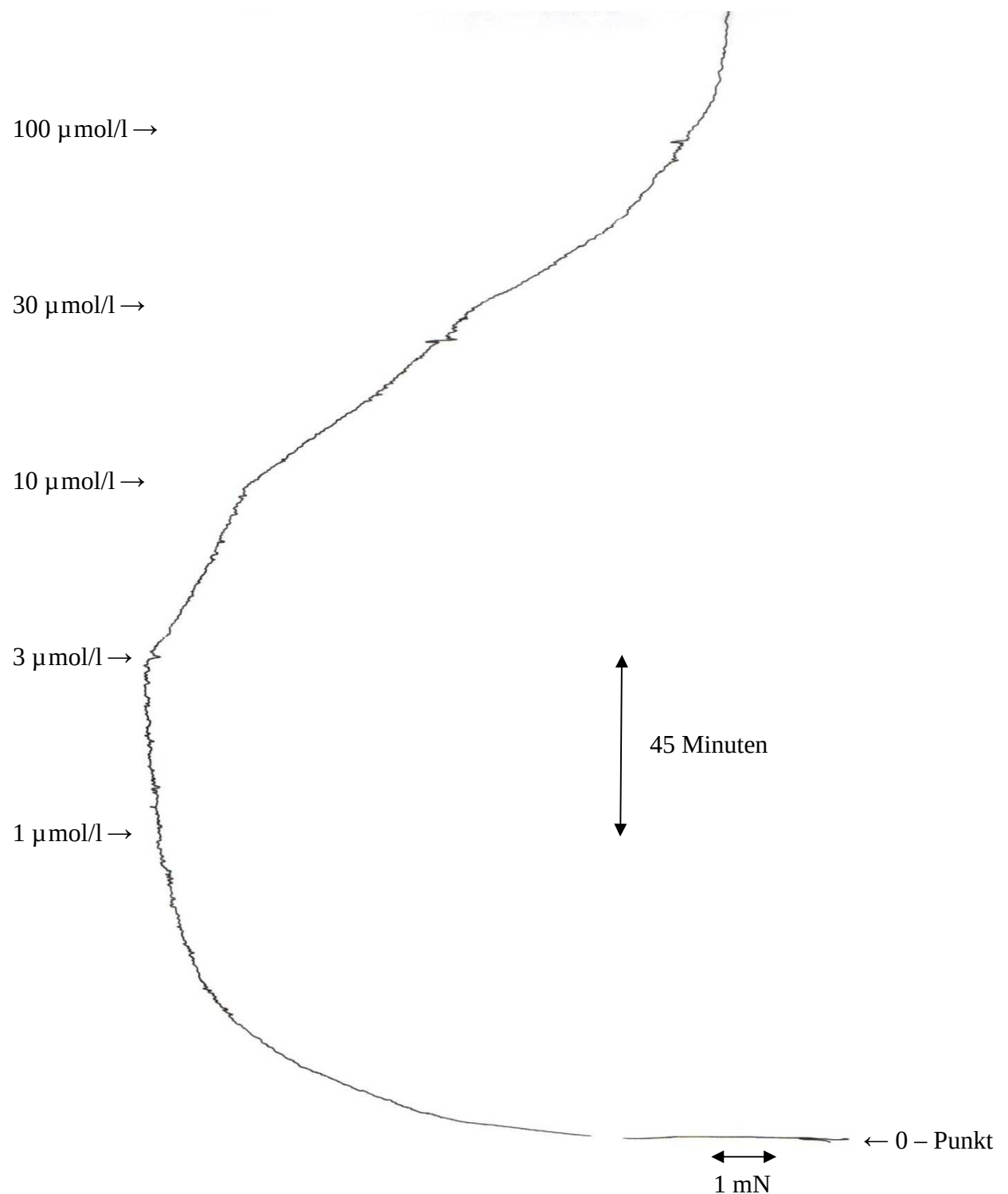
**Tab. 11** Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Arteria pulmonalis

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T auf die Arteria pulmonalis**

**Abb. 18 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Pulmonalarterie**



**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis unter Einfluss von**  
**WHG60T**



**Abb. 19 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG60T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Arteria pulmonalis - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.**

#### 4.2.4 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

Um einen relaxierenden Effekt von WHG60T auf die glattmuskulären Gefäße vom Typ der Aorta feststellen zu können, wurde die Substanz in den steigenden Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  an fünf unabhängigen isolierten Aorta – Präparaten getestet.

In ähnlicher Weise wie bei der Versuchsdurchführung an Arteria pulmonalis – Präparaten musste auch hier nach einer vorangegangenen Anpassungsphase das isolierte Organ maximal vorkontrahiert und das Erreichen einer Plateauphase abgewartet werden. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kap. 3. 5. 4 detailliert beschrieben.

Als Kontroll- und definierter 100% - Wert wurde der Mittelwert aus allen fünf Versuchen mit  $11,76 \pm 1,11$  gemessen. Anhand dieses Wertes lässt sich eine prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur unter Einfluss von WHG60T ermitteln.

Bereits ab 1  $\mu\text{mol/l}$  WHG60T war eine leichte Relaxation der Aorta erkennbar, die mit jeder Erhöhung der Menge an Testsubstanz geringfügig verstärkt wurde. Beispielsweise konnte durch Konzentrationssteigerung von 3 auf 10  $\mu\text{mol/l}$  die Kontraktionskraft um etwa vierzehn Prozent verringert werden, eine weitere Verdreifachung der Konzentration auf 30  $\mu\text{mol/l}$  brachte eine Abnahme um etwa sechzehn Prozent. Nach Abwarten von fünfundvierzig Minuten bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreichte die Kontraktionskraft der Aorta das durchschnittliche Minimum von  $40,12 \pm 4,87\%$ .

In Tab. 12 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ), ermittelt aus fünf Versuchen, in Millinewton und Prozent sowie deren Standardfehler und deren statistische Signifikanz angeführt. Die ermittelten Werte gelten in den ersten drei Konzentrationsstufen als signifikant, bei den Konzentrationsstufen von 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  als hochsignifikant.

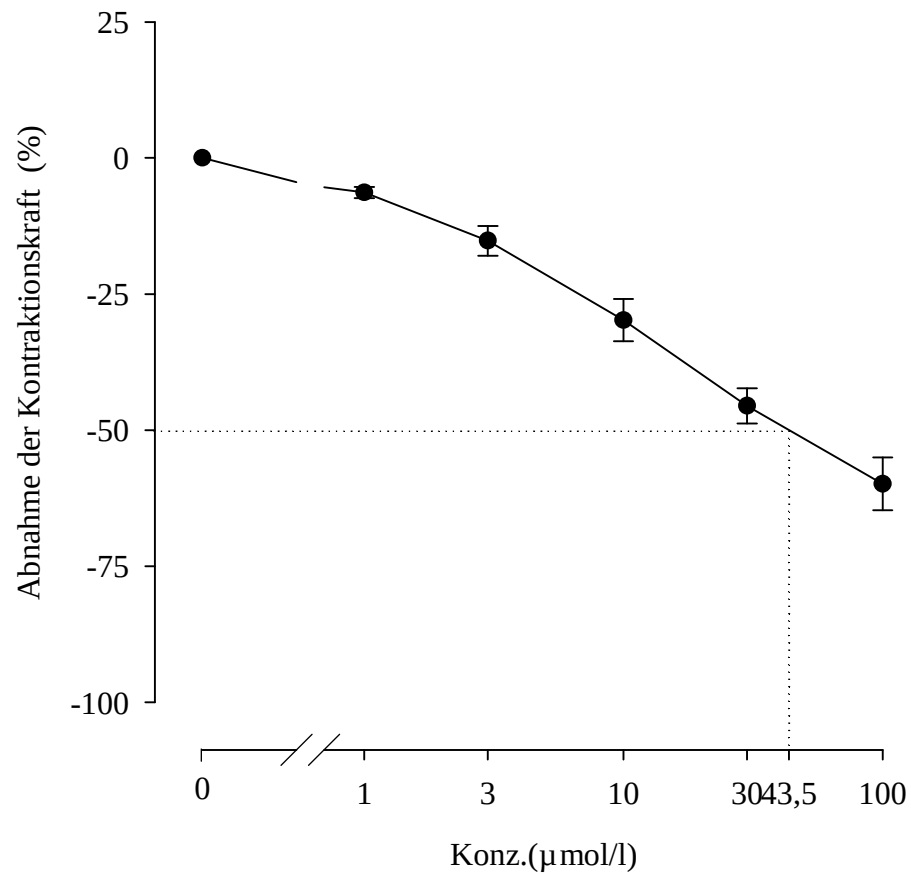
Die Dosis – Wirkungskurve in Abb. 20 zeigt, dass ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  die stufenweise Erhöhung der Testkonzentration von WHG60T eine jeweils annähernd gleiche Verringerung der Kontraktionskraft bewirkt, sodass die Kurve im Konzentrationsbereich 3 bis 100  $\mu\text{mol/l}$  beinahe eine Gerade darstellt. Die  $\text{EC}_{50}$  wird bei einer Konzentration von 43,5  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

Abb. 21 zeigt einen der fünf vom Schreiber detektierten Kontraktionsverläufe, der während eines Versuchsablaufes aufgezeichnet wurde und zur Ermittlung der durchschnittlichen Messergebnisse herangezogen wurde.

### **Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft der Aorta**

| Konz. WHG60T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM (mN)}$ | $f_c \pm \text{SEM (\%)}$ | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 11,76 $\pm$ 1,11          | 100                       | -----   |
| 1                                     | 11,01 $\pm$ 1,06          | 93,64 $\pm$ 1,05          | < 0,05  |
| 3                                     | 9,97 $\pm$ 0,99           | 84,79 $\pm$ 2,73          | < 0,05  |
| 10                                    | 8,27 $\pm$ 0,97           | 70,19 $\pm$ 3,88          | < 0,05  |
| 30                                    | 6,38 $\pm$ 0,70           | 54,45 $\pm$ 3,23          | < 0,001 |
| 100                                   | 4,61 $\pm$ 0,54           | 40,12 $\pm$ 4,87          | < 0,001 |

**Tab. 12 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Aorta**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T auf die Aorta**

**Abb. 20 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen an der isolierten Aorta**

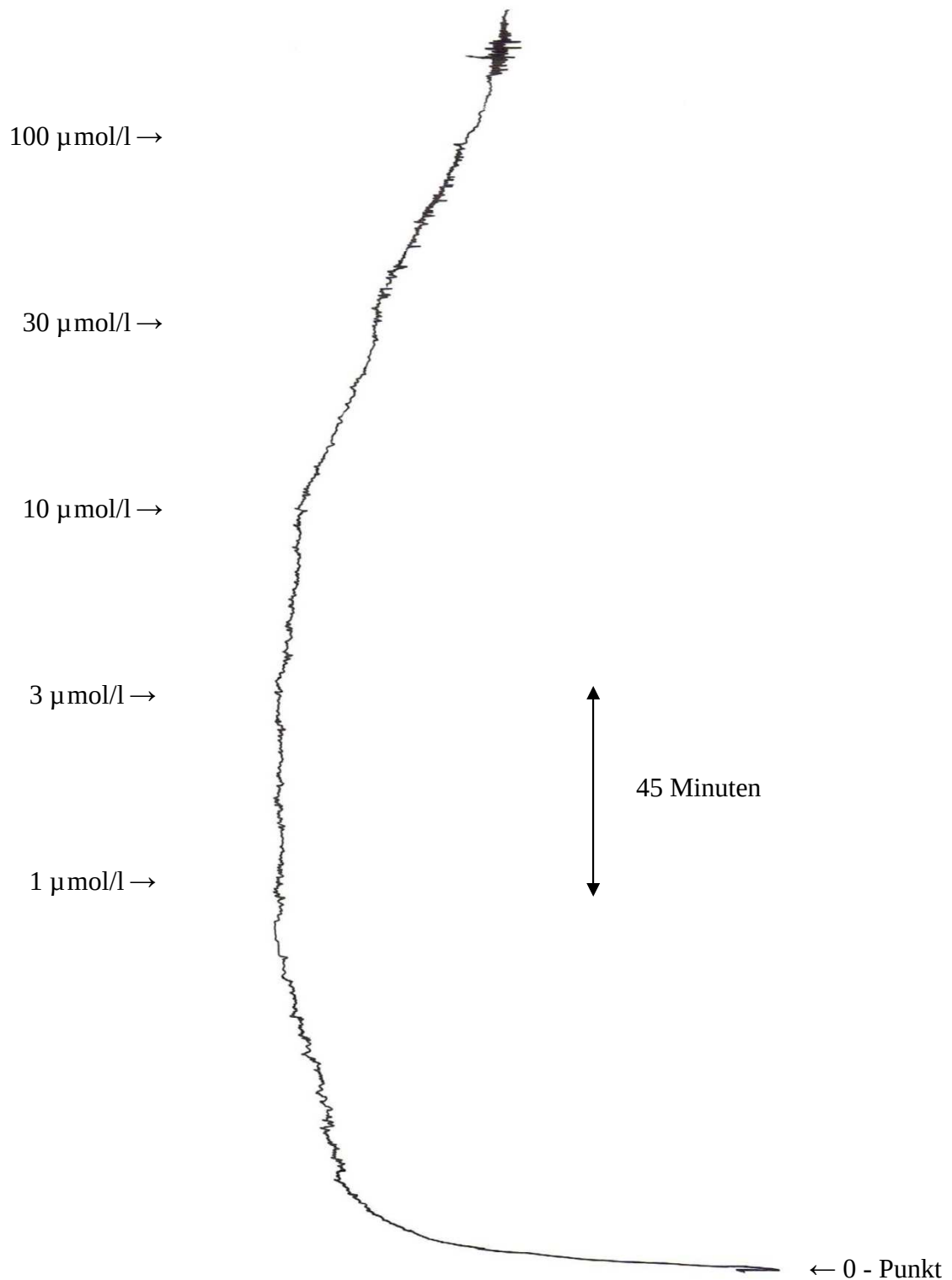
**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Aorta unter Einfluss von WHG60T**

Abb. 21 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG60T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Aorta - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde.

#### 4.2.5 Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileum

Zur Feststellung des Einflusses von WHG60T auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums wurde die Substanz in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  an fünf Meerschweinchendarm – Präparaten getestet.

Um einen eventuell relaxierenden Effekt der Testsubstanz erkennen zu können, war eine maximale Vorkontraktion der Organe notwendig, was mit Hilfe einer sechzig millimolaren Kaliumchloridlösung erfolgte. Diese maximale Kontraktion der glattemuskulären Präparate diente als Kontrollwert, mit dem nachfolgende Änderungen in der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz in Relation gesetzt werden konnten (genaue Versuchsdurchführung s. Kap. 3. 5. 5).

Schon ab der ersten Testkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  begann die Kontraktionskraft drastisch zu sinken, bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  hatten die Darmpräparate bereits siebenzig Prozent ihrer Kontraktionskraft eingebüßt. Bei weiterer Konzentrationserhöhung ging auch das noch verbleibende Kontraktionsvermögen verloren, sodass die Organe in den zwei- und dreistelligen Konzentrationsbereichen vollständig relaxiert waren.

Aufgrund der stark relaxierenden Wirkung von WHG60T auf das terminale Ileum erhält man bei der prozentuellen Auswertung der Versuchsreihen in den letzten drei Konzentrationsbereichen negative Werte, wobei alle Messergebnisse statistisch als hoch signifikant gelten (s. Tab. 13).

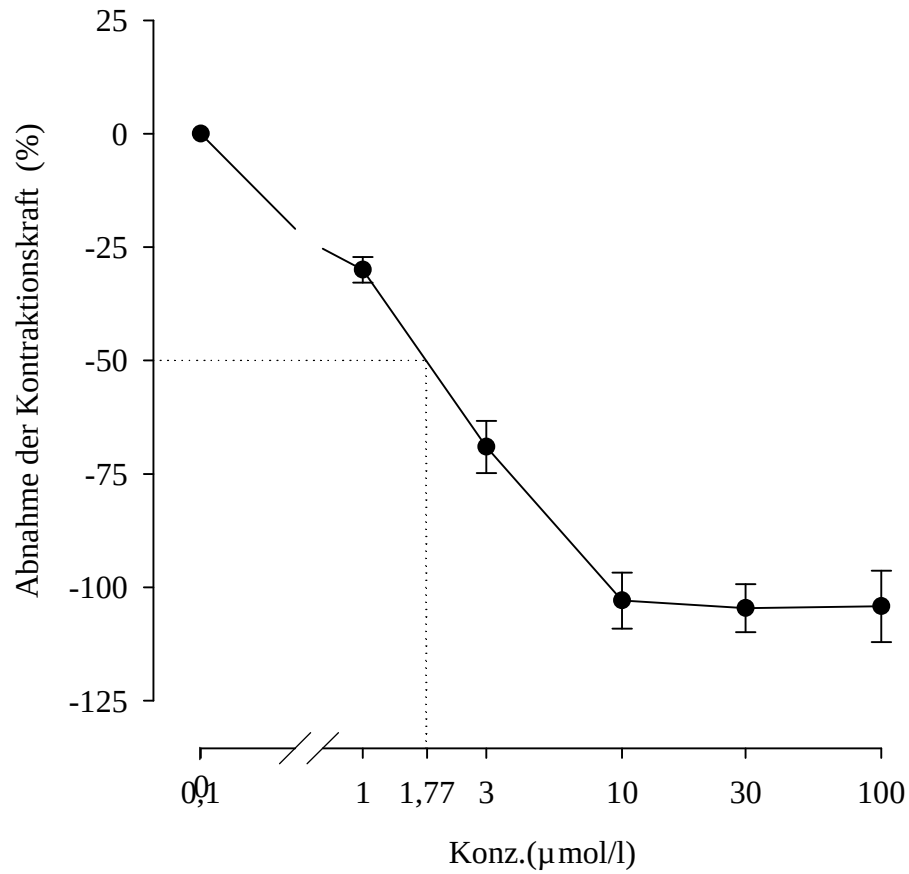
In der Konzentrations – Wirkungskurve in Abb. 22 ist die relaxierende Wirkung von WHG60T in Abhängigkeit der Testkonzentration graphisch dargestellt. Die Relaxation der Darmmuskulatur bei den ersten beiden Konzentrationen verläuft so massiv, dass das Ileum bereits bei einer Konzentration von 1,77  $\mu\text{mol/l}$  fünfzig Prozent seiner Kontraktionskraft verloren hat. Zudem kann sich der Verlauf der Kurve bei weiterer Konzentrationssteigerung nicht linear fortsetzen, da die Kontraktionskraft bereits bei 10  $\mu\text{mol/l}$  um hundert Prozent gesunken ist. So knickt die Konzentrations – Wirkungskurve bei der 100 – Prozentmarke ab. Die  $\text{EC}_{50}$  ist in der Graphik anhand der unterbrochenen Linie erkennbar.

Ebenso verhält es sich bei dem Ausdruck des Schreibers, der während eines Versuchsablaufes aufgezeichnet wurde (s. Abb. 23). Eine Konzentrationssteigerung auf 30 bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  bewirkt im Kurvenverlauf keine Veränderung mehr.

### **Wirkung von WHG60T auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums**

| Konz. WHG60T<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | $f_c \pm \text{SEM}$ (%) | P       |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| 0 (Kontrolle)                         | 11,17 $\pm$ 1,68          | 100                      | -----   |
| 1                                     | 7,98 $\pm$ 1,47           | 69,99 $\pm$ 2,81         | < 0,001 |
| 3                                     | 3,77 $\pm$ 1,12           | 30,93 $\pm$ 5,76         | < 0,001 |
| 10                                    | 0,01 $\pm$ 0,57           | -2,94 $\pm$ 6,15         | < 0,001 |
| 30                                    | -0,21 $\pm$ 0,47          | -4,58 $\pm$ 5,30         | < 0,001 |
| 100                                   | 0,02 $\pm$ 0,49           | -4,39 $\pm$ 7,86         | < 0,001 |

**Tab. 13 Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten Ileum**

**Konzentrations- Wirkungskurve von WHG70T auf das terminale Ileum**

**Abb. 20 Konzentrations- Wirkungskurve von WHG60T, ermittelt aus fünf Versuchsdurchführungen am isolierten terminalen Ileum**



**Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des terminalen Ileum unter Einfluss von**  
**WHG70T**

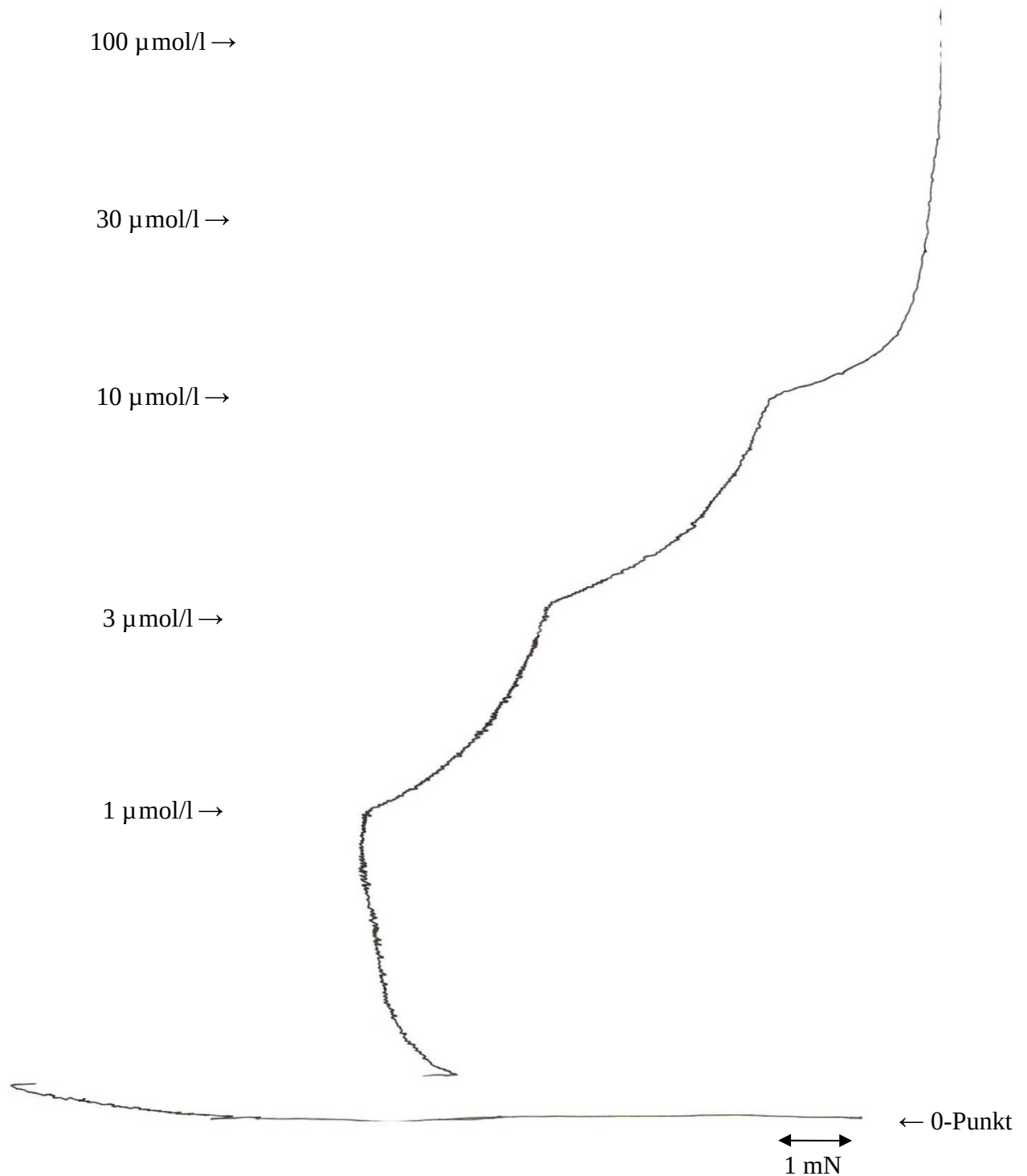


Abb. 21 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG70T in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Ileum - Präparaten, wobei die Konzentration der Testsubstanz in fünfundvierzig – minütigen Intervallen von 1, 3, 10 über 30 auf 100 µmol/l erhöht wurde.

## 5 Diskussion

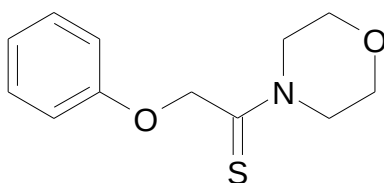
In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Wirkung der beiden Thioamid – Derivate WHG70T und WHG60T auf die Kontraktionskraft und Spontanaktivität isolierter Herzmuskelpräparate des Meerschweinchens untersucht.

Weiters wurden die Auswirkungen der beiden Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft der isolierten glattmuskulären Präparate von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum geprüft.

Beide Testsubstanzen wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und kamen zum ersten Mal an isolierten Organen des Meerschweinchens zur Anwendung.

### 5.1 Strukturvergleich von WHG60T und WHG70T

WHG70T, das in Abb. 22 dargestellt ist, ist ein Thioamid – Derivat: und zwar handelt es sich dabei um ein Glycolsäure – Thioamid, dessen  $\alpha$ -Hydroxygruppe mit einem Benzolring verethert ist. Zudem liegt der Amid-Stickstoff als Bestandteil eines Morpholin-Rings vor.



WHG70T

Molecular Weight =237.32

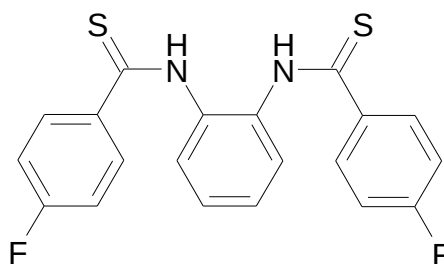
Exact Mass =237

Molecular Formula =C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S

Abb. 22: Strukturformel von WHG70T

Hingegen liegt im Fall von WHG60T ein symmetrisches Dithioamid – Derivat vor: Die beiden Stickstoff-Atome von zwei Benzoessäurethioamid-Strukturen sind über einen Benzolring in ortho-Stellung miteinander verbunden. Zudem sind die beiden endständigen Aromaten jeweils mit einem Fluor-Atom substituiert (siehe Abb. 23).

Es ist anzunehmen, dass die Erweiterung zur Dithiodibenzamid-Struktur sowie die Einführung von zwei Fluor-Substituenten mit einer Erhöhung der Lipophilie gegenüber WHG70T einher geht.



WHG60T

Molecular Weight =384.47

Exact Mass =384

Molecular Formula =C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

**Abb. 23: Strukturformel von WHG60T**

Die einzige strukturelle Gemeinsamkeit, die diese beiden Verbindungen aufweisen, besteht in der Thioamid – Funktion.

## 5.2 Wirkungsvergleich der Testsubstanzen WHG60T und WHG70T

In allen durchgeführten Versuchen zeigte das Dithiodibenzamid WHG60T eine deutlich ausgeprägtere Wirkung als die Vergleichssubstanz WHG70T, wobei neben einer unterschiedlichen Rezeptoraffinität eventuell auch die erhöhte Lipophilie gegenüber WHG70T eine Rolle spielen könnte.

Als Ursache für die sowohl massive negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung als auch für die stark spasmolytische Wirkung von WHG60T auf glattmuskuläre Präparate könnte eine Blockade der Calciumkanäle vom L-Typ vorliegen: Diese bewirkt einen verminderten Calcium-Einstrom in die Muskelzelle, der Zelltonus sinkt und eine Abnahme der Kontraktilität ist die Folge.

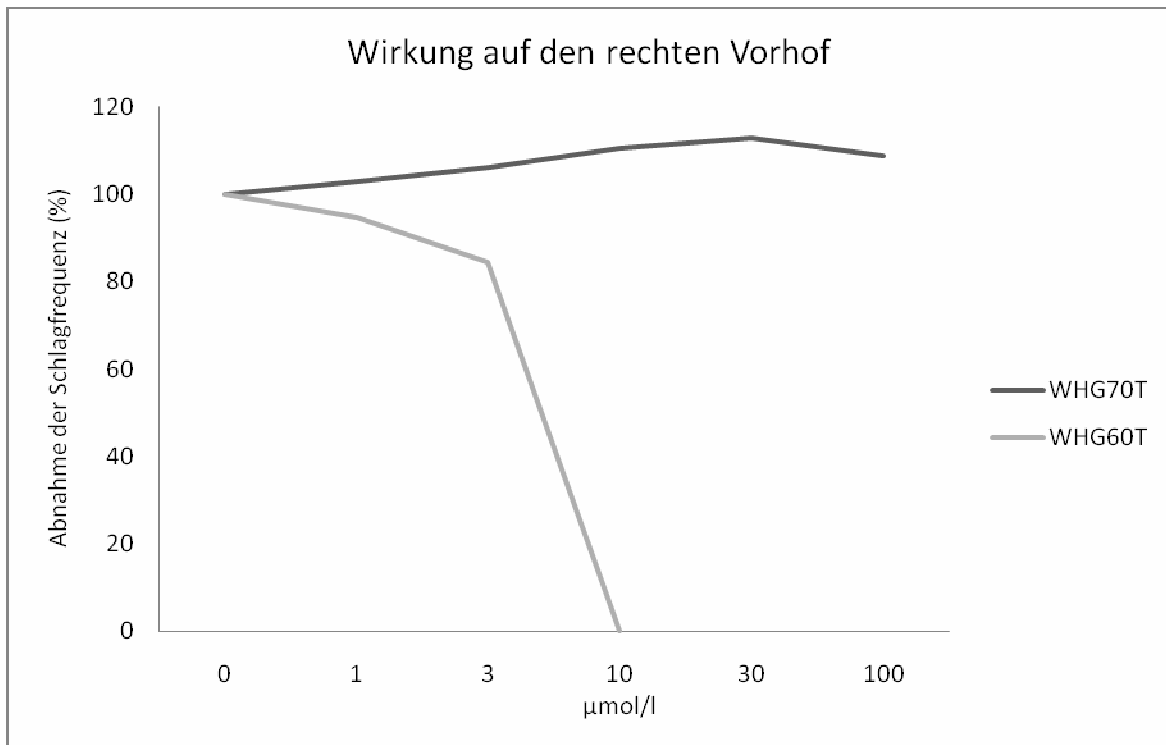
Dieser Wirkmechanismus kann jedoch nur als Vermutung gelten. Um diese Annahme verifizieren zu können, wären weitere Versuche notwendig.

### 5.2.1 Auswirkungen auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Die Testsubstanz WHG70T zeigte eine leicht positiv chronotrope Wirkung, wobei das Ausmaß der Schlagfrequenz – Erhöhung konzentrationsabhängig anstieg und erst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  leicht absank. Demzufolge wurde keine  $\text{EC}_{50}$ , also keine Abnahme der Schlagfrequenz auf fünfzig Prozent des Kontrollwertes, erreicht.

Im Gegensatz zur positiv chronotropen Wirkung von WHG70T zeigte das symmetrische Derivat WHG60T eine deutliche Reduktion der Schlagfrequenz – wobei die negativ chronotrope Wirkung so stark war, dass bei allen vier Versuchsdurchführung die Testung vorzeitig abgebrochen werden musste, da unabhängig voneinander jedes der vier Vorhof – Präparate bei Zugabe einer zehn  $\mu\text{molaren}$  Testlösung nach wenigen Minuten die Spontanaktivität einstellte. Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bereits bei einer Konzentration von 4,85  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

Die äußerst unterschiedlichen Auswirkungen der beiden Testsubstanzen auf die Chronotropie des Meerschweinchenherzens sind in Abb. 24 graphisch dargestellt.



**Abb. 24** Graphischer Vergleich der chronotropen Wirkungen von WHG60T und WHG70T

Der Vergleich der  $EC_{50}$ -Konzentration von WHG60T und dem Calcium – Kanalblocker Diltiazem, zeigt, dass der bewährte Calcium - Antagonist mit einer  $EC_{50}$  von  $\leq 0,8 \mu\text{mol/l}$  (Erker et al. 1996) die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz um mehr als das Sechsfache übersteigt.

### 5.2.2 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Die Testung der Auswirkung von WHG70T in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels ergab eine leicht negativ inotrope Wirkung, die allerdings nur so schwach ausfiel, dass keine  $\text{EC}_{50}$  erreicht werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeigte WHG60T eine so stark negativ inotrope Wirkung, dass bereits bei einer Testkonzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  unkoordinierte Kontraktionsfrequenzen auftraten und der Papillarmuskel in allen Versuchsansätzen nach wenigen Minuten seine Kontraktionskraft völlig verloren hatte. Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei einer Konzentration von 3,0  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Hinsichtlich des Einflusses auf die Inotropie übersteigt WHG60T die Wirkung des Calciumantagonisten Diltiazem, dessen  $\text{EC}_{50}$  bei einer Konzentration über 5,0  $\mu\text{mol/l}$  liegt.

Das Ausmaß der stark unterschiedlichen Effekte der beiden Testsubstanzen auf die Inotropie des Papillarmuskels soll in Abb. 25 deutlicher veranschaulicht werden.

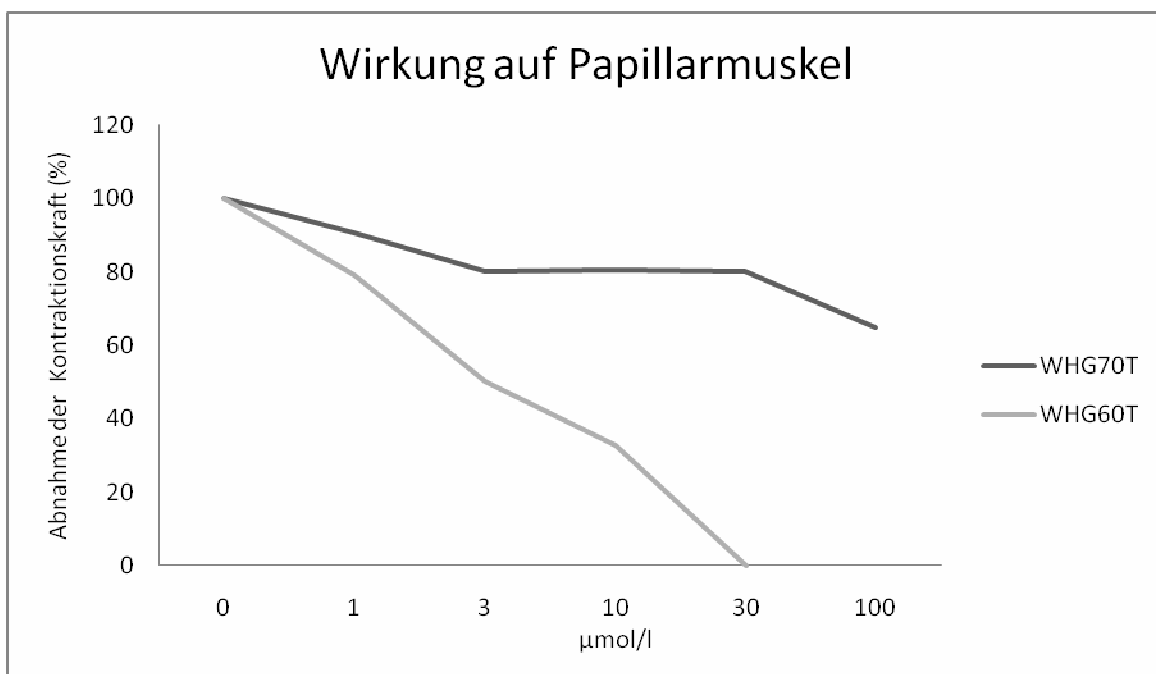


Abb. 25 Graphischer Vergleich der inotropen Wirkungen von WHG60T und WHG70T

### 5.2.3 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis wurde durch die Substanz WHG70T nur äußerst geringfügig verringert, sodass selbst bei einer Konzentration von hundert  $\mu\text{mol/l}$  keine  $\text{EC}_{50}$  erreicht werden konnte. Die Testsubstanz zeigt anfänglich auch bei Steigerung der Konzentration keine merkliche Verringerung in der Kontraktionskraft, sondern diese wird erst im letzten und höchsten Konzentrationsbereich erkennbar.

Hingegen zeigte die Testsubstanz WHG60T bereits in der geringsten getesteten Konzentration eine Relaxation der Gefäßmuskulatur, deren Ausmaß bei weiterer Konzentrationssteigerung deutlich zunahm und einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $4,88 \mu\text{mol/l}$  erreichte. Die Divergenz in der gefäßrelaxierenden Wirkung der beiden Testsubstanzen ist in Abb. 26 verdeutlicht.

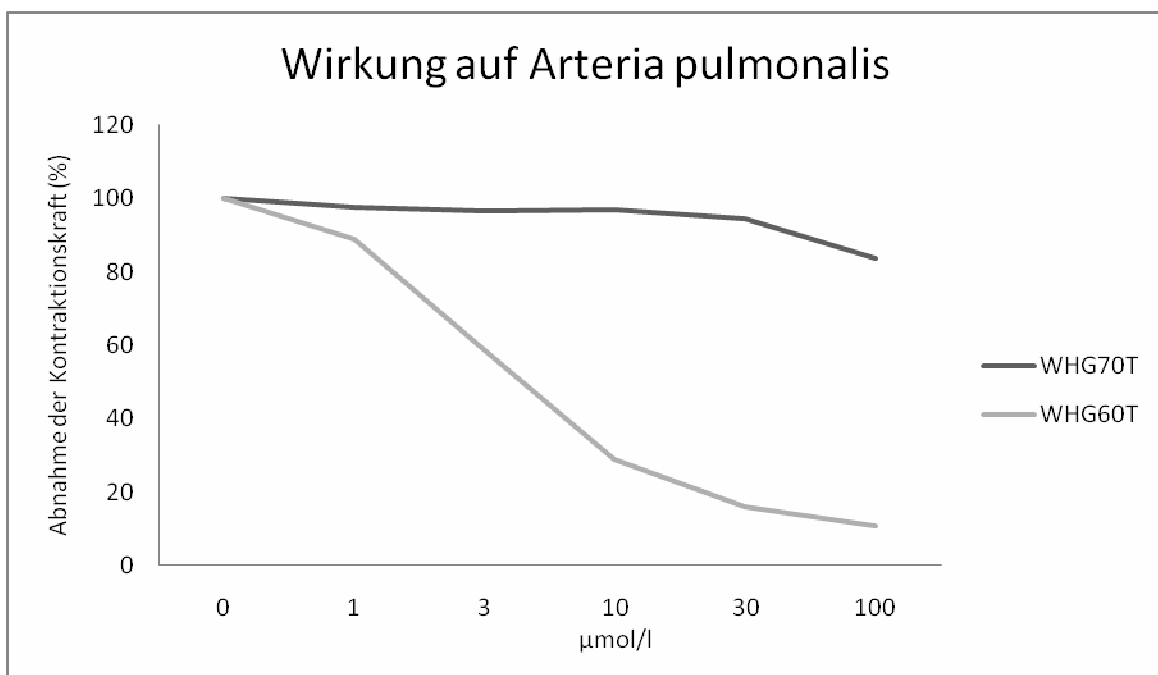


Abb. 26 Graphischer Vergleich der gefäßrelaxierenden Wirkungen von WHG60T und WHG70T

#### 5.2.4 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft der Aorta

Auch bei den Versuchsreihen an der isolierten Aorta zeigte WHG70T kaum relaxierende Wirkung an der Gefäßmuskulatur – in den niedrigen Konzentrationsbereichen war sogar ein geringfügiger Anstieg der Kontraktionskraft zu verzeichnen, wie in dem graphischen Vergleich in Abb. 27 ersichtlich ist. Selbst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  war nur eine äußerst minimale Relaxierung der Gefäßmuskulatur erkennbar, die auch bei weiterer Konzentrationssteigerung nicht deutlicher wurde, sodass auch hier keine  $\text{EC}_{50}$ -Konzentration ermittelt werden konnte.

Am schwächsten ausgeprägt war die relaxierende Wirkung von WHG60T bei der glatten Muskulatur der Aorta. Im Vergleich mit der zweiten Testsubstanz WHG70T zeigte die Verbindung jedoch bereits ab 1  $\mu\text{mol/l}$  eine leichte Relaxation der Gefäßmuskulatur, die mit jeder Erhöhung der Menge an Testsubstanz geringfügig verstärkt wurde, sodass eine  $\text{EC}_{50}$  von 43,5  $\mu\text{mol/l}$  erreicht werden konnte.

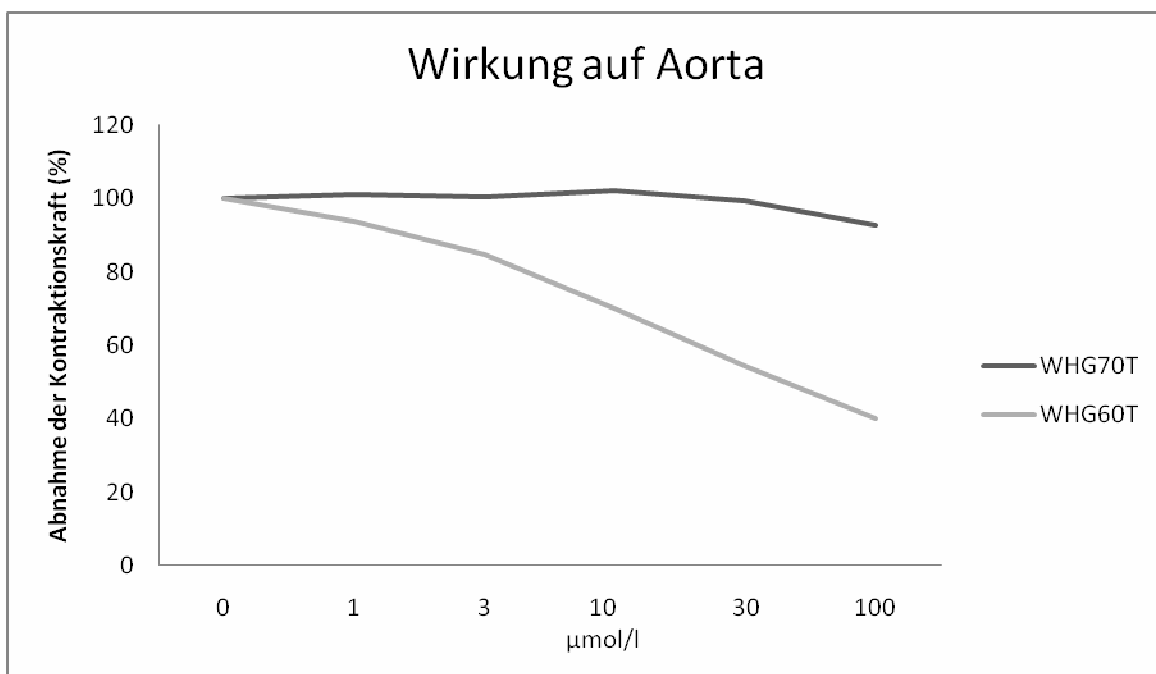


Abb. 27 Graphischer Vergleich der gefäßrelaxierenden Wirkungen von WHG60T und WHG70T



### 5.2.5 Auswirkungen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum

Analog zu den beiden anderen untersuchten glattemuskulären Organen – ruft WHG70T in den ersten Konzentrationsstufen auch auf den isolierten Dünndarm kaum Veränderungen in der Kontraktilität hervor. Obwohl bei den Testkonzentrationen von 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  der Einfluss der Testlösung auf die Kontraktilität des terminalen Ileum wesentlich stärker ausfällt als der auf Aorta und Pulmonalis, ist die Abnahme der Kontraktionskraft auch hier noch zu gering, um eine  $\text{EC}_{50}$  erreichen zu können.

Im Gegensatz dazu zeigte WHG60T auch in der spasmolytischen Wirkung, getestet an Ileum-Präparaten des Meerschweinchens, eine deutlichere Effektivität (s. Abb. 28) als das Monothioamid WHG70T. Schon ab der ersten Testkonzentration begann die Kontraktionskraft drastisch zu sinken, bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  hatten die Darmpräparate bereits siebzig Prozent ihrer Kontraktionskraft eingebüßt. Bei weiterer Konzentrationserhöhung ging auch das noch verbleibende Kontraktionsvermögen verloren, sodass die Organe in den zwei- und dreistelligen Konzentrationsbereichen vollständig relaxiert waren. Die  $\text{EC}_{50}$  lag bei der geringen Konzentration von 1,77  $\mu\text{mol/l}$ .

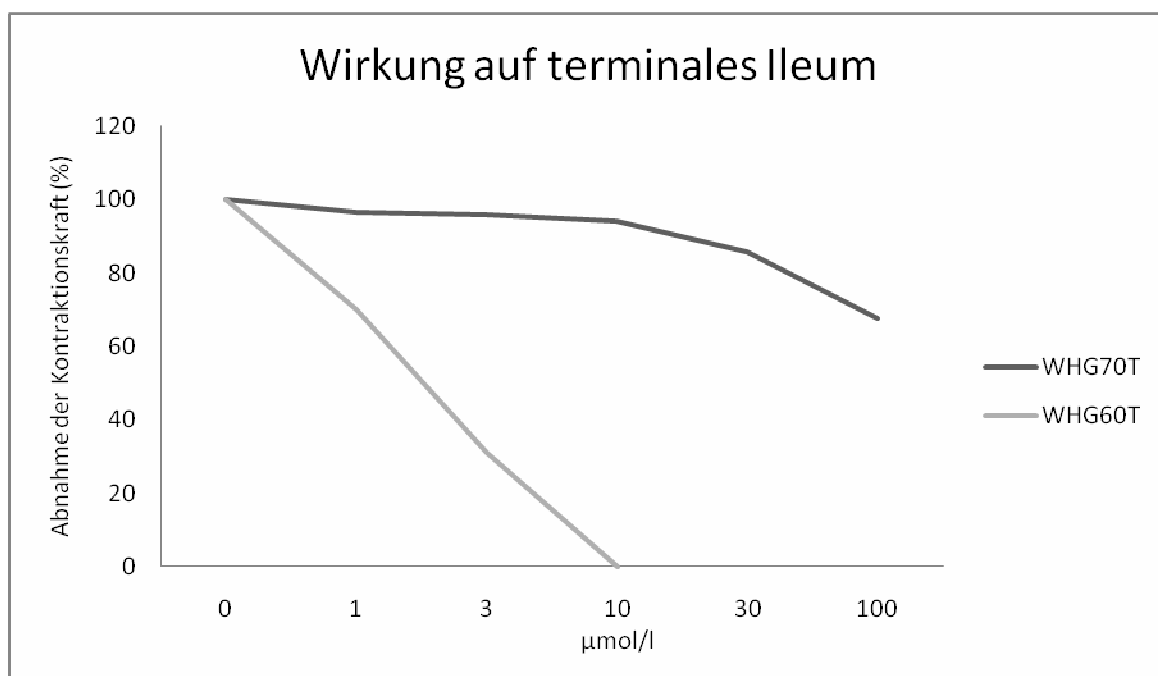


Abb. 28 Graphischer Vergleich der spasmolytischen Wirkung von WHG60T und WHG70T

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war, die Wirkungen der beiden neu synthetisierten Thioamid-Derivate WHG60T und WHG70T in aufsteigenden Konzentrationen an verschiedenen muskulären Organen des Meerschweinchens zu untersuchen und sich die hierfür notwendigen Fertigkeiten zur Präparation sowie die korrekte Handhabung der erforderlichen Messgeräte anzueignen.

Anschließend wurden die ermittelten Ergebnisse ausgewertet und die beiden Testverbindungen hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen.

Alle Versuche wurden nach der von Reiter beschriebenen Methode zur isometrischen Kontraktionsmessung an isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Zur Ermittlung der Einflüsse der Testsubstanzen wurde Präparate von Vorhof, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta und terminalen Ileum herangezogen.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass die Auswirkungen von WHG60T auf die beschriebenen Organe um ein Vielfaches ausgeprägter waren als die Einflüsse von WHG70T. Die gefäßrelaxierende und die spasmolytische Wirkung auf glattemuskuläre Organe als auch die negativ inotrope und chronotrope Wirkung auf Herzmuskelpräparate von WHG70T war sogar so gering, dass sich in allen Versuchsreihen eben genannter Untersuchungen keine  $EC_{50}$  ermitteln lassen konnte.

Hingegen zeigte WHG60T maßgebliche Einflüsse auf Kontraktionskraft der isolierten Muskelpräparate, der negativ inotrope Effekt konnte sogar die Wirkstärke von Diltiazem übersteigen. Am stärksten ausgeprägt war – mit einer  $EC_{50}$  von  $1,77 \mu\text{mol/l}$  – die relaxierende Wirkung der Testsubstanz bei der glatten Muskulatur des terminalen Ileum.

## 7 Literaturverzeichnis

Schubert-Zsilavec M, Gasser R, Knorr A (2005) Calciumantagonisten, Pharmazie in unserer Zeit, 34. Jahrgang, 5-2005, Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim

Clapham DE, Montell C, Schutz G, Julius D (2003) Compendium of Voltage Gated Ion Channels: Transient Receptor Potential Channels, International Union of Pharmacology 55, 591-596

Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ, Glossmann H (1998) Structural Basis of Drug Binding in L-type Calcium Channels, Trends Pharmacol Sci 19, 108-115

Lüscher TF, Casentino F (1998) Die Klassifikation von Calciumantagonisten und ihre Auswahl bei der Behandlung von Hypertonie – Eine Neubewertung, Drugs 55, 509-517

Steffen H, Klaus W (2002) Calciumantagonisten – Pharmakologie und klinische Anwendung, Uni-MED Science, Bremen

Escande D, Henry P (1993) Potassium channels as pharmacological targets in cardiovascular medicine, Heart J 14 Suppl B, 2-9

Adams DJ, Nonner W (1990) voltage-dependent potassium channels: gating, ion permeation and block, In: Potassium Channels – structure, classification, function and therapeutical potential, Ellis Horwood Series in pharmaceutical technology, Ellis horwood Limited, Chichester pp 40-42

Fleckenstein A (1971) Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions, In: Harris P, Opie L (eds) Calcium and the Heart, Proceedings oft he Meeting oft he European Section oft he International Study Group for Research in Cardiac Metabolism, London, Academic Press, London, New York, pp 135-188

Fleckenstein A (1983a) History of calcium antagonists, In: Schwartz A, Taira N (eds) Calcium channel blocking drugs: A novel intervention for the treatment of cardiac disease, Circ Res 52: 3-16

Fleckenstein A (1983b) Calcium antagonism in heart and smooth muscle – Experimental facts and therapeutic prospects, John Wiley Publishing Company, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore

Fleckenstein A, Döring HJ, Kammermeier H (1967) Experimental heart failure due to inhibition of utilisation of high-energy phosphates. In: Proceedings of an International Symposium on the Coronary Circulation and Energetics of the Myocardium, Milano 1966, Karger, Basel, New York, pp 220-236

Fleckenstein A, Frey M, Thimm F, Fleckenstein-Grün G (1990) Excessive mural calcium overload – a predominant causal factor in the development of stenosing coronary plaques in humans, Cardiovasc Drugs and Therapy 4, 1005-1014

Fleckenstein-Grün G (1996) Die Geschichte der Entdeckung und klinischen Anwendung von Calciumantagonisten, In: Kübler W, Tritthart HA (eds) Calciumantagonisten: Forschung und Klinik, Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft, Steinkopf-Verlag, Darmstadt, pp 1-15

Furchgott RF, De Gubareff T, Grossmann A (1959) Release of autonomic mediators in cardiac tissue by suprathreshold stimulation, Science 6, 129:328-329

Koch-Weser J (1963) Influence of osmolarity of perfusate on contractility of mammalian myocardium, Am J Physiol 204:957-962

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 332, 351-353, 455-456, 708

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban und Fischer Verlag, München, Jena 496-499, 429-434

Gasser R (1990) Antiarteriosclerotische Wirkung von Calciumantagonisten und coronare Herzkrankheit, Facultas-Universitätsverlag Wien

Lichtlen PR, Hugenholtz PG, Rafflenbeul W, Hecker H, Jost S, Deckers JW (1990) Retardation of angiographic progression of coronary artery disease by nifedipine, Lancet 335: 1109-1113

Nakajima H, Hoschiyama M, Yamashita K, Kiyomoto A (1975) Effect of diltiazem on electrical and mechanical activity of isolated cardiac ventricular muscle of guinea pig, Jpn, J Pharmacol 25, 383-392

Nayler WG (1992) Calciumantagonisten der zweiten Generation, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

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

Saikawa T, Nagamoto Y, Arita M (1977) Electrophysiologic effects of diltiazem, a new channel inhibitor on canine cardiac fibers, Jap Heart J 18, 235-244

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

Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Roth H (2005) Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

## 8 Curriculum Vitae

### **Persönliche Daten:**

Maria Körmer  
Rechte Dorfstrasse 8, 2201 Seyring  
geboren am 28. Februar 1982 in Wien  
als Tochter von Anna und Karl Körmer

### **Ausbildung:**

1988 – 1992: Volksschule Gerasdorf / NÖ  
1992 – 1996: Unterstufe  
1996 – 2000: Oberstufe des Gymnasiums der Schulbrüder Strebersdorf, Wien  
  
15. 6. 2000: Ablegen der Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg  
  
14. 9. 2000: Inskription an der Universität Wien für Pharmazie (A-449)  
23. 4. 2003: Ablegen der 1. Diplomprüfung Pharmazie  
Ab Februar 2008: Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie & Toxikologie der  
Universität Wien

### **Berufliche Erfahrungen:**

Juli 1997: Fröhlich Handelsservice GmbH, Seyring  
Juli 2001: Anstaltsapotheke des AKH, Wien  
August 2001: Apotheke zur Hl. Dreifaltigkeit, Mag. E. Lux, Wolkersdorf  
Juli & August 2002: Öffentlichkeitsarbeit für das Bayrische Rote Kreuz, Saringer  
GmbH, München  
Juli 2004: Securitas Werttransporte GmbH, Wien  
August 2004: Stadtapotheke, Dr. Pock, Gerasdorf  
Juli & August 2006: LBI Trauma Care Consult, PhD H. Redl, Wien  
Februar – November 2007: Leonhardus-Apotheke, Dr. E. Hirsch, Wien