



universität
wien

DIPLOMARBEIT

UNTERSUCHUNG DER WIRKSTÄRKE VON ZWEI NEU
SYNTHETISIERTEN HETEROCYCLISCHEN VERBINDUNGEN
(WHG 57T UND VMG) AN VERSCHIEDENEN ISOLIERTEN
PRÄPARATEN VOM MEERSCHWEINCHEN

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Nicola Hinteregger
Matrikel-Nummer:	0204354
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. - Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Wien, im Juni 2009

Mein besonderer Dank gilt Herrn Ao. Univ. - Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für die Betreuung meiner Diplomarbeit und die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre während der gesamten Entstehungsphase der Diplomarbeit.

Herrn Peter Höflich möchte ich für die immer freundliche Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor danken.

Ein ganz großes Dankeschön an meine Mama, die mir während meiner ganzen Studienzeit Rückhalt gab und mir immer zur Seite stand.

Herzlichen Dank an meinen Papa, der mich während des gesamten Studiums unterstützt und gefördert hat.

Außerdem danke ich allen meinen Freunden und Studienkollegen, die mich während meiner Studienzeit begleitet haben und diese zu einer unvergesslich schönen Zeit gemacht haben.

Danke meinem Heinz, der immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ziel der Arbeit	1
1.2 Anatomie des Herzens	2
1.3 Automatie des Herzens	3
1.4 Ionenkanäle	4
1.4.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle	4
1.4.2 Ligandengesteuerte Calciumkanäle	5
1.4.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle	6
1.5 Ruhe- und Aktionspotential	7
1.5.1 Aktionspotential einer reizbildenden Herzmuskelzelle	7
1.5.2 Aktionspotential des Arbeitsmyokards	8
1.6 Elektromechanische Kopplung	8
1.7 Calciumantagonisten	9
1.8 Schwefelwasserstoff	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Apparaturen	11
2.1.1 Versuchsanordnung I	11
2.1.2 Versuchsanordnung II	13
2.2 Versuchstiere	15
2.3 Die Präparate	16
2.3.1 Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs	16
2.3.2 Isolierung und Präparation des Papillarmuskels	17
2.3.3 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis	18
2.3.4 Isolierung und Präparation der Aorta	18
2.3.5 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums	19

2.4 Die physiologischen Nährlösungen.....	20
2.4.1 Nährlösung für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum	20
2.4.2 Nährlösung für die Aorta	21
2.5 Versuchsablauf.....	22
2.5.1 Versuchspräparat rechter Vorhof	22
2.5.2 Versuchspräparat Papillarmuskel.....	22
2.5.3 Versuchspräparat Arteria pulmonalis	23
2.5.4. Versuchspräparat Aorta	24
2.5.5 Versuchspräparat terminales Ileum.....	24
2.6 Untersuchte Substanzen.....	25
2.6.1 Testsubstanz WHG 57T	25
2.6.2 Testsubstanz VMg	26
2.6.3 Dimethylsulfoxid (DMSO)	26
2.7 Auswertung und Statistik	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Testsubstanz WHG 57T	29
3.1.1 Wirkung auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs	29
3.1.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	32
3.1.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....	35
3.1.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	38
3.1.5 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.....	41
3.2 Testsubstanz VMg	44
3.2.1 Wirkung auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs	44
3.2.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	47
3.2.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....	50
3.2.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	53
3.2.5 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.....	56

3.3 Lösungsmittel DMSO	59
3.3.1 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	59
3.3.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....	60
3.3.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	60
3.3.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.....	61
4. Diskussion.....	62
4.1 Versuchspräparat rechter Vorhof	62
4.2 Versuchspräparat Papillarmuskel	63
4.3 Versuchspräparat Arteria pulmonalis.....	64
4.4 Versuchspräparat Aorta	65
4.5 Versuchspräparat terminales Ileum	66
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Curriculum Vitae.....	71

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Diplomarbeit war die pharmakologische Untersuchung der neu synthetisierten Testsubstanzen **WHG 57T** und **VMg** mit Hilfe isolierter Organe aus Meerschweinchen. Dabei wurden die Substanzen hinsichtlich einer möglichen inotropen und chronotropen Wirkung bzw. einer relaxierenden Wirkung getestet.

Um die möglichen Wirkungen der neuen Testsubstanzen WHG 57T und VMg zu untersuchen, wurden an 5 verschiedenen Organen des Meerschweinchens Versuchsreihen mit den Testsubstanzen durchgeführt. So wurde an den Herzmuskelpräparaten rechter Vorhof und Papillarmuskel die chronotrope bzw. inotrope Wirkung der Substanzen geprüft und an Arteria pulmonalis, Aorta und terminalem Ileum die vasodilatierende Wirkung bzw. die relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur erforscht.

Dadurch konnte die pharmakologische Wirkung der Testsubstanzen WHG 57T und VMg an den jeweiligen Organen festgestellt und dargestellt werden.

1.2 Anatomie des Herzens

Anatomisch gesehen, besteht das Herz aus dem linken und aus dem rechten Herzen, wobei diese jeweils 2 Hohlräume von unterschiedlicher Größe aufweisen – den Vorhof (*Atrium*) und die Kammer (*Ventrikel*).

Ein Septum (*Septum interatriale*) trennt den linken und den rechten Vorhof voneinander, während der *Sulcus coronarius* die Vorhöfe von den Kammern separiert. (Lippert et al. 2003) Dieser Sulcus stellt die Herzbasis dar, an der sich die Herzklappen befinden, und die daher auch Ventilebene genannt wird. (Mutschler et al. 2008)

Die beiden Kammern werden durch die Kammerscheidewand (*Septum interventriculare*) separiert. Im Inneren der Kammern befinden sich die Papillarmuskeln, im linken Ventrikel befinden sich zwei dieser Muskeln, und im rechten Ventrikel drei. Während der Systole kontrahieren die Papillarmuskeln und unterbinden damit, dass sich die Segelklappen in die Vorhöfe öffnen. (Lippert et al. 2003)

Als mechanischer Schutz dient ein doppelwandiger Beutel, der das Herz vollständig umschließt. Die außenliegende Wand des Herzbeutels wird als *Perikard* bezeichnet, während die innere Wand dem *Epikard* entspricht. Das Epikard ist mit dem Herzmuskel verwachsen und kann daher auch als Außenhaut des Herzens verstanden werden. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich eine Flüssigkeit (*Liquor pericardii*), die eine reibungsfreie Bewegung des Herzens im Herzbeutel gewährleisten soll. (Mutschler et al. 2008)

Das Herz fungiert als Pumpe des Körpers, die durch regelmäßige Anspannungs- (*Systole*) und Entspannungsphasen (*Diastole*) das Blut durch die beiden Kreisläufe, Lungen- und Körperkreislauf, befördert und damit dafür sorgt, dass alle Organe mit genügend Sauerstoff versorgt werden.

Über die großen Hohlvenen (*Vena cava superior*, *Vena cava inferior*) gelangt das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf in den rechten Vorhof. Das Blut gelangt dann über die rechte Kammer über die Lungenarterie (*Arteria pulmonalis*) weiter in den Lungenkreislauf. Das sauerstoffangereicherte Blut aus diesem kleinen Kreislauf wird über die Lungenvenen in den linken Vorhof befördert und weiter in die linke Kammer und von dort in den Körperkreislauf gepumpt. (Schmidt und Lang 2007)

1.3 Automatie des Herzens

Das Herz ist zur eigenständigen Erregungsbildung und -leitung in der Lage (=Automatie des Herzens) und gewährleistet so seine Pumpaktivität. (Mutschler et al. 2008)

Das Herz verfügt über zwei verschiedene Sorten von Muskelzellen: das Reizleitungssystem, hier wird ein Impuls gebildet und weitergeleitet, und das Arbeitsmyokard, wo durch den Impuls eine Kontraktion entsteht. (Silbernagl et. al 2003)

Der Sinusknoten, der sich im rechten Vorhof an der Einmündung der Vena cava superior befindet, fungiert als primärer Schrittmacher, hier findet die primäre Erregungsbildung statt.

Als sekundärer Schrittmacher kann, bei Ausfall des Sinusknotens, der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) dienen, dieser befindet sich zwischen Vorhof und Kammer.

Die Erregung wird also zuerst im Sinusknoten gebildet, wird dann über das Arbeitsmyokard der Vorhöfe auf den AV-Knoten übertragen, von wo aus die Erregung über das His'sche Bündel, die Kammerschenkel (Tawara-Schenkel) und die Purkinje-Fasern schließlich in die Kammermuskulatur übergeleitet wird.

Bei Aussetzen des Sinusknotens und des AV-Knotens können sogenannte tertiäre Zentren unterhalb des AV-Knotens die Erregungsbildung übernehmen. (Mutschler et al. 2008)

1.4 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind transmembranäre Proteine, die durch Porenbildung den Transport von Ionen durch Zellmembranen ermöglichen.

Die Voraussetzungen für einen passiven Ionentransport ohne Energieverbrauch schafft vor allem die Natrium-Kalium-ATPase. Sie befördert 3 Natriumionen, im Austausch gegen 2 Kaliumionen, aus der Zelle heraus und sorgt so für einen Konzentrationsgradienten, durch den andere Ionen ohne Energieaufwand durch Zellmembranen transportiert werden können.

Die Na^+/K^+ -ATPase bewerkstelligt den Transport gegen ein Konzentrationsgefälle durch die Hydrolyse von Adenintriphosphat (ATP). (Schmidt und Lang 2007)

Durch den Transport von beispielsweise Kalium-, Natrium bzw. Calciumionen kommt es zu Konzentrationsunterschieden und damit auch zur Ladungsverschiebung zwischen Innerem und Äußerem der Zelle, wodurch eine elektrische Potentialdifferenz auftritt, die als Membranpotential bezeichnet wird. (Silbernagl et. al 2003)

Aufgrund der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase liegt extrazellulär eine hohe Konzentration an Natriumionen und intrazellulär eine geringe Konzentration vor, bezogen auf das Zellinnere liegt also ein negatives Membranpotential vor. In Ruhe liegt das Potential einer erregbaren Zelle bei -60 bis -100 mV (=Ruhemembranpotential). (Mutschler et al. 2008)

Je nach Mechanismus der Öffnung des Ionenkanals, kann man zwischen spannungsabhängigen und ligandengesteuerten Ionenkanälen unterscheiden. Während sich spannungsabhängige Kanäle aufgrund einer Änderung des Membranpotentials öffnen und schließen, wird die Öffnung und Schließung von ligandengesteuerten Kanälen durch Atome oder Moleküle, die an den Kanal binden (Liganden), beeinflusst. (Schmidt und Lang 2007)

1.4.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Bei den spannungsabhängigen Calciumkanälen kann man zwischen „low-voltage-activated“ (LVA) und „high-voltage-activated“ (HVA) Calciumkanälen unterscheiden.

Während die HVA-Calciumkanäle in L-Typ-, N-Typ-, P-Typ-, Q-Typ- und R-Typ-Kanäle unterteilt werden können, ist der T-Typ-Kanal der einzige Vertreter der LVA-Calciumkanäle. (Randall und Tsien 1995)

Die Aktivierung funktioniert bei allen spannungsabhängigen Calciumkanälen auf die gleiche Weise: aufgrund einer Änderung des Membranpotentials kommt es zur Bewegung eines als Spannungssensor dienenden transmembranären Segments des Kanals und somit zur Öffnung der Kanalpore. (Schmidt und Lang 2007)

Von besonderer physiologischer Bedeutung ist der L-Typ-Calciumkanal. In glatten Gefäßmuskelzellen und in Herzmuskelzellen werden über diese Calciumkanäle Calciumionen in die Zelle transportiert, die die Muskelkontraktion triggern.

Im Sinus- und AV-Knoten sind die L-Typ-Kanäle für die Auslösung des Aktionspotentials verantwortlich. (Silbernagl et al. 2003)

Der L-Typ-Calciumkanal setzt sich aus 5 unterschiedlichen Proteineinheiten zusammen, wobei die größte Untereinheit, α_1 , die Pore in der Plasmamembran bildet, und auch den Angriffspunkt für Substanzen mit Wirkung auf den L-Typ-Calciumkanal darstellt. (Aktories et al. 2006)

1.4.2 Ligandengesteuerte Calciumkanäle

Für die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum, sind vor allem die sogenannten Ryanodinrezeptoren, die ligandenaktivierten Calciumkanälen entsprechen, von Bedeutung.

Diese Ryanodinrezeptoren werden durch einen Calciumeinstrom über spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Calciumkanäle in die Zelle aktiviert (=Calcium-induzierte Calciumfreisetzung).

Die Aktivierung der Ryanodinrezeptoren kann aber auch durch andere Liganden erfolgen, beispielsweise durch cyclo-ADP-Ribose, Acylcarnitin oder reaktive Sauerstoffspezies. (Löffler und Petrides 2003)

Desweiteren gehören zu den ligandengesteuerten Calciumkanälen die Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptoren (IP_3 -Rezeptoren). Durch Interaktion von IP_3 mit diesem Rezeptor werden Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma der Zelle transportiert. (Löffler und Petrides 2003)

1.4.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle

K_{ATP} -Kanäle (Adenosintriphosphat-sensitive Kaliumkanäle) sind Komplexe, die aus dem Kaliumkanal, der die porenbildende Untereinheit (K_{ir}) darstellt, und einer regulierenden Untereinheit, die den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) enthält, bestehen.

Durch Bindung von ATP oder Sulfonylharnstoff an diese Untereinheit kommt es zur Blockade des Kaliumkanals. (Yokoshiki et al. 1998)

ATP-sensitive Kaliumkanäle sind in vielen verschiedenen Geweben vorhanden, beispielsweise in den β -Zellen des Pankreas, in renalen Epithelzellen, in Skelettmuskelzellen, in Gefäßmuskelzellen und anderen glatten Muskelzellen sowie in Endothelzellen. (Yokoshiki et al. 1998)

Aufgrund dieses vielfältigen Vorkommens der K_{ATP} -Kanäle im Organismus, ist auch die physiologische Bedeutung dieser Kanäle mannigfaltig.

So sind die ATP-abhängigen Kaliumkanäle in den β -Zellen des Pankreas für die Regulation der Insulinfreisetzung mitverantwortlich: steigt der Glucosespiegel im Blut, so erhöht sich die ATP-Konzentration und die K_{ATP} -Kanäle schließen, woraufhin durch die resultierende Depolarisation der Plasmamembran spannungsabhängige Calciumkanäle aktiviert werden. Die einströmenden Calciumionen geben schließlich das Signal zur Insulinfreisetzung. (Misler 1995)

In Herzmuskelzellen bewirkt die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen einen reduzierten Einstrom von Calciumionen in die Zelle und schützt somit vor Schäden durch ischämische Zustände.

In glatten Gefäßmuskelzellen wiederum bewirkt die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen eine Vasorelaxation. (Yokoshiki et al. 1998)

Es lässt sich also erkennen, dass ATP-abhängige Kaliumkanäle wichtige Zielstrukturen für die Therapie verschiedener Erkrankungen darstellen, so zum Beispiel bei der Behandlung von Diabetes, Angina pectoris und Hypertonie. (Yokoshiki et al. 1998)

1.5 Ruhe- und Aktionspotential

Unter Aktionspotential versteht man die Veränderung des Ruhemembranpotentials hin zu einem weniger negativen Wert und die anschließende Wiederherstellung des ursprünglichen Membranpotentials. (Mutschler et al. 2008)

Zu einer Änderung des Membranpotentials kann es beispielsweise durch eine Änderung der Ionenleitfähigkeit der Plasmamembran oder durch eine weitergeleitete Erregung kommen. Wird dabei das sogenannte Schwellenpotential (bei ca. -40 mV) erreicht, so kommt es durch die Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu einer weiteren Verschiebung des Membranpotentials, so dass es kurzfristig sogar im positiven mV-Bereich liegt (=Depolarisation).

Anschließend wird durch den Auswärtsstrom von Kaliumionen, das ursprüngliche Membranpotential wieder hergestellt (=Repolarisation). (Silbernagl et al. 2003)

1.5.1 Aktionspotential einer reizbildenden Herzmuskelzelle

In den Zellen des Sinusknoten gibt es kein konstantes Ruhepotential, sondern nach der Repolarisation der Zelle erhöht sich das Zellpotential allmählich, bis schließlich wieder das Schwellenpotential erreicht und ein Aktionspotential ausgelöst wird.

Der negativste Wert, der nach der Repolarisation erreicht wird, wird *maximales diastolisches Potential* genannt. (Silbernagl et al. 2003)

Dadurch wird gewährleistet, dass die Depolarisation von selbst, ohne einen Reiz von außen, abläuft.

Ermöglicht wird diese spontane Depolarisation durch die sogenannten Funny-Ionenkanäle. Diese öffnen sich mit Erreichen des maximalen diastolischen Potentials, wodurch es, durch den Einstrom von Kationen in die Zelle, zur langsamen Depolarisation kommt. Wird nun das Schwellenpotential erreicht, öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und es kommt zu einem intensiven Einstrom von Calciumionen in die Zelle, wodurch das Aktionspotential ausgelöst wird. Erreicht das Potential positive Werte steigt die Leitfähigkeit der Plasmamembran für Kaliumionen an, so dass durch den Auswärtsstrom von Kaliumionen wieder das maximale diastolische Potential erreicht wird. (Silbernagl et al. 2003)

Im Normalfall bewirkt jedes Aktionspotential im Sinusknoten eine Kontraktion des Herzens. Die Impulsfrequenz des Schrittmachers bestimmt also die Herzfrequenz. (Silbernagl et al. 2003)

1.5.2 Aktionspotential des Arbeitsmyokards

Das Arbeitsmyokard ist, anders als die Schrittmacherzellen, nicht zur spontanen Depolarisation in der Lage. Hier kann nur durch eine Depolarisation in der Umgebung ein Aktionspotential eingeleitet werden.

Während im Sinus- und AV-Knoten der Anstieg eines Aktionspotentials relativ flach ist und v.a. durch den Einstrom von Calciumionen bewirkt wird, kommt es im Arbeitsmyokard durch den Einstrom von Natriumionen durch spannungsabhängige Natriumkanäle zu einem steilen Anstieg des Aktionspotentials. Darauf folgt eine Plateauphase, die durch einen langsamen Einstrom von Calciumionen bewirkt wird.

Anschließend wird, wie in den Schrittmacherzellen, durch einen Auswärtsstrom von Kaliumionen repolarisiert, wobei im Arbeitsmyokard zwischen den einzelnen Aktionspotentialen ein konstantes Ruhepotential vorliegt. (Mutschler et al. 2008)

1.6 Elektromechanische Kopplung

Als elektromechanische Kopplung wird die Umwandlung eines Aktionspotentials in eine Kontraktion bezeichnet.

Elektromechanische Kopplung am Herzen: durch ein Aktionspotential werden spannungsabhängige Calciumkanäle in der Plasmamembran der Myokardzelle aktiviert, wodurch es zum Einstrom von Calciumionen in die Zelle kommt. Durch die daraufhin ansteigende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kommt es zum sogenannten „Triggereffekt“ und ligandengesteuerte, Ryanodin-sensitive Ca^{2+} -Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums werden aktiviert. Daraufhin kommt es zum Calciumausstrom aus dem, als Calciumspeicher dienendem, sarkoplasmatischen Retikulum. Dieses Calcium verursacht letztendlich die elektromechanische Kopplung der Herzkontraktion. (Silbernagl et al. 2003)

1.7 Calciumantagonisten

Angriffspunkt der Calciumantagonisten (Calciumkanalblocker) sind die Calciumkanäle vom L-Typ, wo sie den Einstrom von Calciumionen in die Zelle hemmen.

Dies hat in Zellen des Arbeitsmyokards zur Folge, dass die Konzentration der Calciumionen, die die Kontraktion triggern, sinkt und somit die Schlagkraft abnimmt (negative Inotropie).

Außerdem wirken Calciumkanalblocker durch Angriff am Sinusknoten negativ chronotrop (Abnahme der Schlagfrequenz), da durch die Blockade des Calciumeinstroms in die Zelle das Aktionspotential verlängert wird, so dass die Anzahl der Aktionspotentiale, und damit die Herzfrequenz, reduziert wird.

Auf die glatte Gefäßmuskulatur wirken Calciumantagonisten relaxierend, wodurch sich auch ihre vasodilatierende Wirkung ergibt. (Aktories et al. 2006)

Durch Calciumantagonisten kann also, sowohl direkt durch Senkung der Kontraktilität und der Schlagfrequenz des Herzens, als auch indirekt durch Verringerung von Vor- und Nachlast durch Vasodilatation, die Herzarbeit und somit der Sauerstoffverbrauch des Herzens reduziert werden. (Mutschler et al. 2008)

Chemisch gesehen können die Calciumantagonisten in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Dihydropyridine (Nifedipin-Typ)
- Phenylalkylamine (Verapamil-Typ)
- Benzothiazepine (Diltiazem-Typ)

Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen in der Wirksamkeit am Herzen. Während Calciumantagonisten der Phenylalkylamin- und der Benzothiazepin-Gruppe negativ chronotrop und negativ inotrop wirken, besitzen Wirkstoffe der Dihydropyridin-Gruppe nur eine geringe Wirkung auf das Herz. Denn durch ihre rasche Blutdrucksenkung kommt es zu einer reflektorischen Aktivierung des Sympathikus und des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), durch die die negativ inotrope Wirkung ausgeglichen wird. (Aktories et al. 2006)

1.8 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein gasförmiger Botenstoff, der, neben Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO), eine wichtige Rolle in der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur spielt. (Jacob et al. 2008)

Während Schwefelwasserstoff in der glatten Gefäßmuskulatur aus der Aminosäure L-Cystein durch das Enzym Cystathionin- γ -Lyase gebildet wird, katalysieren in der glatten Muskulatur des Ileums sowohl Cystathionin- γ -Lyase als auch das Enzym Cystathionin- β -Synthase die Entstehung von Schwefelwasserstoff aus L-Cystein. (Hosoki et al 1997)

In der glatten Gefäßmuskulatur verursacht dieser endogen gebildete Schwefelwasserstoff die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen, dies führt zu einem Auswärtsstrom von Kalium aus der Zelle heraus und somit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Infolgedessen kommt es, durch die Deaktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und folglich zur Vasodilatation. (Jacob et al. 2008)

Außerdem bewirkt Schwefelwasserstoff möglicherweise die Freisetzung gewisser gefäßerweiternder Faktoren, wie NO und EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor), aus dem Gefäßendothel. (Zhao und Wang 2002)

Aufgrund dieser relaxierenden Wirkung von Schwefelwasserstoff, sind Substanzen, die H_2S freisetzen, potentielle blutdrucksenkende Wirkstoffe.

2. Material und Methoden

2.1 Apparaturen

2.1.1 Versuchsanordnung I

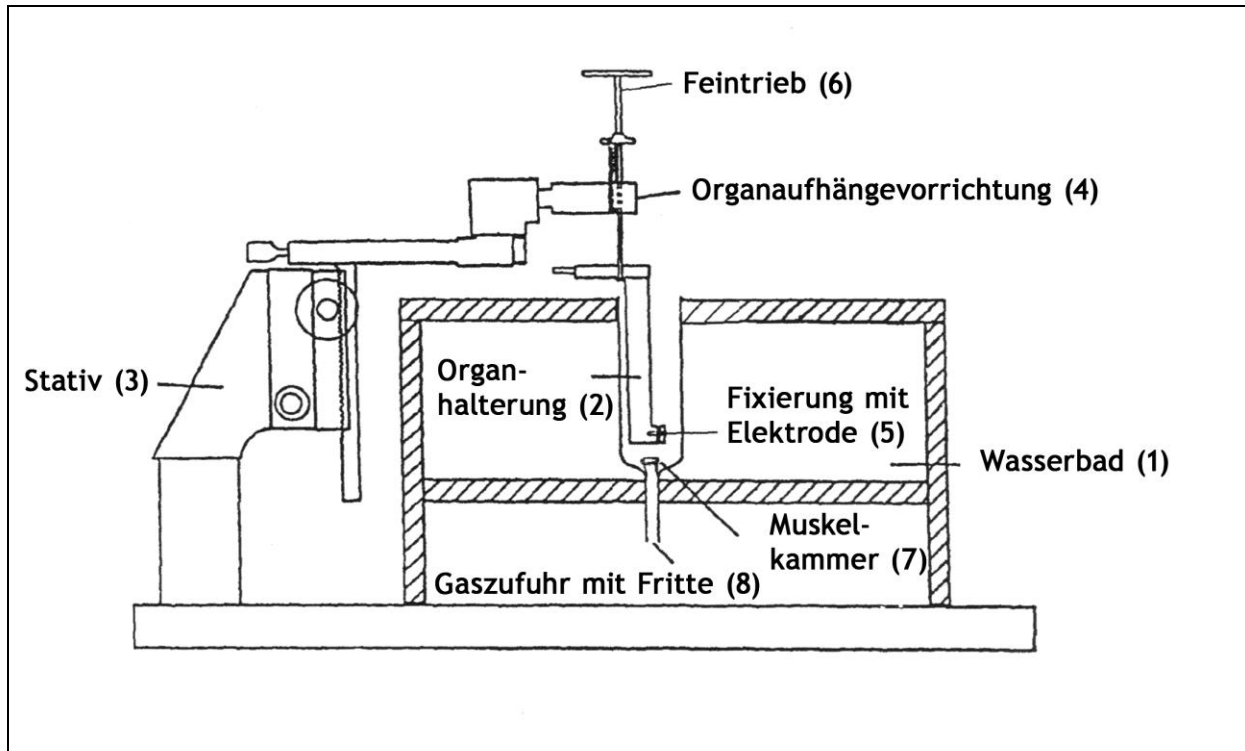


Abbildung 1

Mit dieser Apparatur wurden die Eigenwirkungen der Testsubstanzen auf den Papillarmuskel und den rechten Vorhof des Meerschweinchens untersucht. Beim spontan schlagenden rechten Vorhof wurde die Frequenz und beim elektrisch stimulierten Papillarmuskel die Kontraktionskraft ermittelt.

Die Versuchsanordnung setzte sich zusammen aus einem Wasserbad (1) und einem Organbad (7), das in der Abdeckung des Wasserbades eingelassen war. In das Wasserbad wurde destilliertes Wasser eingefüllt, welches durch einen Thermostat und eine Heizspirale auf eine konstante Temperatur von $35,5 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt wurde.

Das Organbad wurde mit 25 ml einer physiologischen Nährlösung gefüllt, die über eine Glasfritte (8) fortlaufend mit Oxy_{mix}₁ versehen wurde, um eine genügende Sauerstoffversorgung und einen gleichbleibenden pH von 7,2-7,4 zu gewährleisten.

₁ Gemisch aus 95% Sauerstoff O₂ und 5% Kohlendioxid CO₂

Die isolierten Präparate wurden an einem Steg aus Plexiglas (2) angebracht, indem sie in einen Silberdraht eingehängt wurden, der am Kraftwandler befestigt war. 1 bis 2 mm des frei hängenden Präparats wurden dann zwischen einer Plexiglasscheibe und der Kathode durch eine Schraube fixiert (5).

Die gesamte Organhalterung konnte über einen Stativschlitten (3) hinauf und hinab gefahren werden. So wurde dann der eingespannte Papillarmuskel bzw. rechte Vorhof in das Organbad hinabgelassen, bis das Präparat vollständig in der Nährlösung eingetaucht war.

Um eine Schädigung des Organs zu vermeiden, sollte beim Befestigen rasch vorgegangen werden, ohne dabei das Präparat zu überdehnen oder durch sonstige äußere Kräfte zu schädigen.

Nachdem das Präparat eingespannt war, musste es, auf den jeweiligen Versuch abgestimmt, mit dem Feintrieb (6) vorgespannt werden, um eine maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Die Kontraktionskraft wurde dann mit Hilfe des Kraftwandlers gemessen. Dieser wandelte die Stärke der Kontraktion in einen Stromimpuls, der durch einen Amplifier (Transbridge TM 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, USA) verstärkt wurde, um. Die so ermittelten Daten wurden durch einen Schreiber (Flatbed Recorder BD 112 Dual Channel, Firma Kipp&Zonen, Niederlande) aufgezeichnet.

2.1.2 Versuchsapparatur II

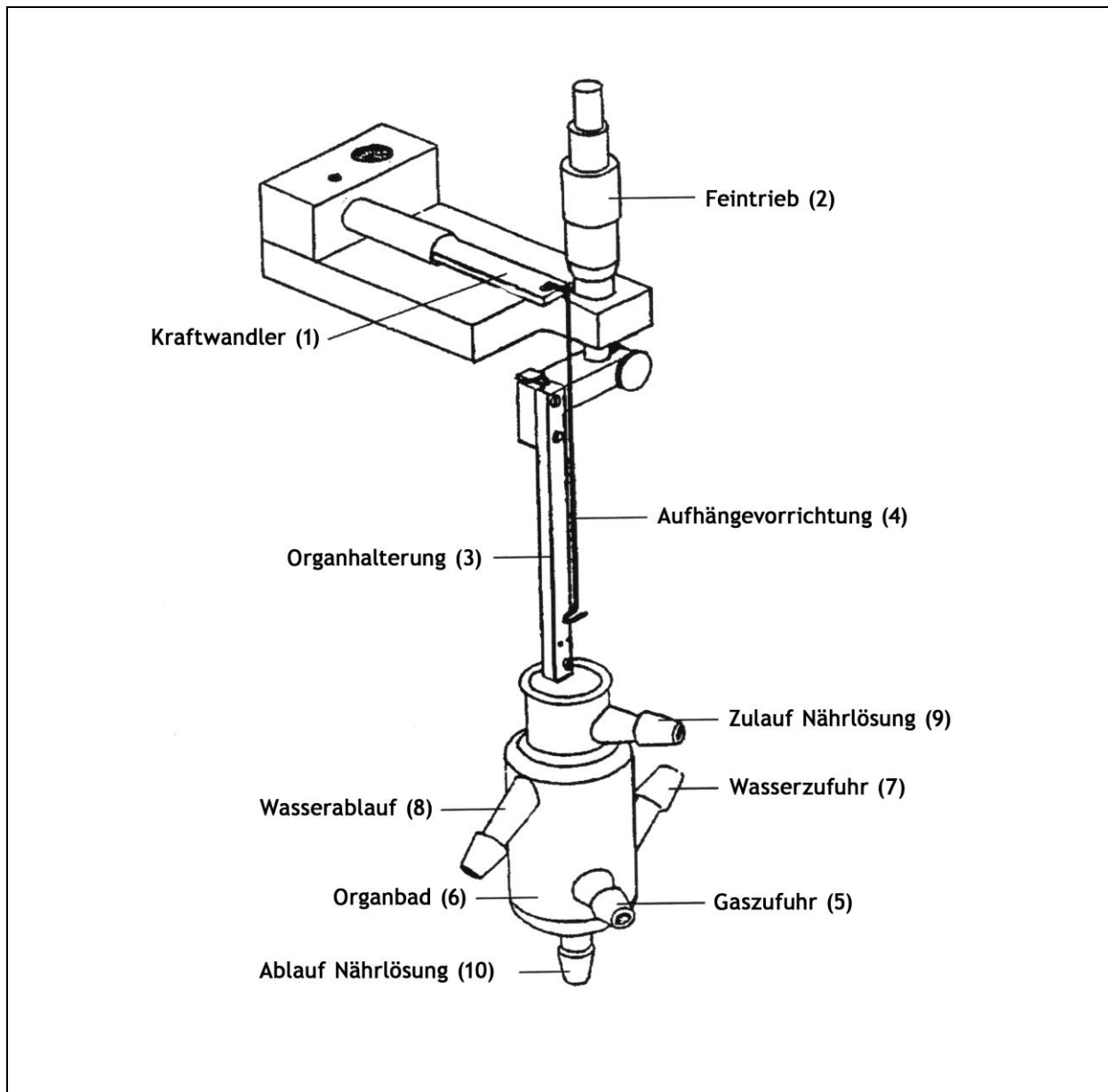


Abbildung 2

Mit Hilfe dieser Apparatur wurden die Eigenwirkungen der Testsubstanzen auf das terminale Ileum, die Aorta und die Arteria pulmonalis untersucht.

Die Versuchsapparatur bestand aus einem Organbad (6), das - je nach Größe - mit 25 ml bzw. mit 8 ml physiologischer Nährlösung gefüllt wurde. Um das Organbad herum befand sich ein Hohlraum, der mit Wasser durchspült wurde. Das Wasser wurde in einem Wasserbad auf eine Temperatur von $37 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt, um eine optimale Umgebungstemperatur für die isolierten Organe zu gewährleisten.

Für eine bestmögliche Sauerstoffversorgung wurde die physiologische Nährlösung während des gesamten Versuchs mit Oxymix begast (5).

Um das terminale Ileum in der Apparatur befestigen zu können, mussten zunächst an beiden Enden des isolierten Darmstücks Silberdrahthäkchen angebracht werden. Das Präparat wurde dann am oberen Häkchen in die Aufhängevorrichtung (4) der Organhalterung (3) der Apparatur eingehängt und das untere Häkchen wurde an einem Silberdrahtstück, das sich am unteren Ende der Organhalterung befand, fixiert.

Die Aorta- und Arteria pulmonalis-Präparate konnten direkt zwischen der Aufhängevorrichtung und dem Drahtstück am unteren Ende der Organhalterung eingespannt werden. Wichtig war hierbei, dass die Organe weder überdehnt wurden, noch zu locker befestigt wurden und so von der Aufhängevorrichtung rutschen konnten.

Anschließend wurde die Organhalterung mit dem befestigten Präparat in das Organbad hinabgelassen, so dass es vollständig in der physiologischen Nährlösung eingetaucht war. Im Folgenden wurde wieder mit dem Feintrieb (2) vorgespannt und die Kontraktionskraft mit Hilfe des Kraftwandlers (1) und des Amplifiers gemessen und durch den Schreiber festgehalten.

Abbildung 3: Aufbau der Versuchsanordnung II

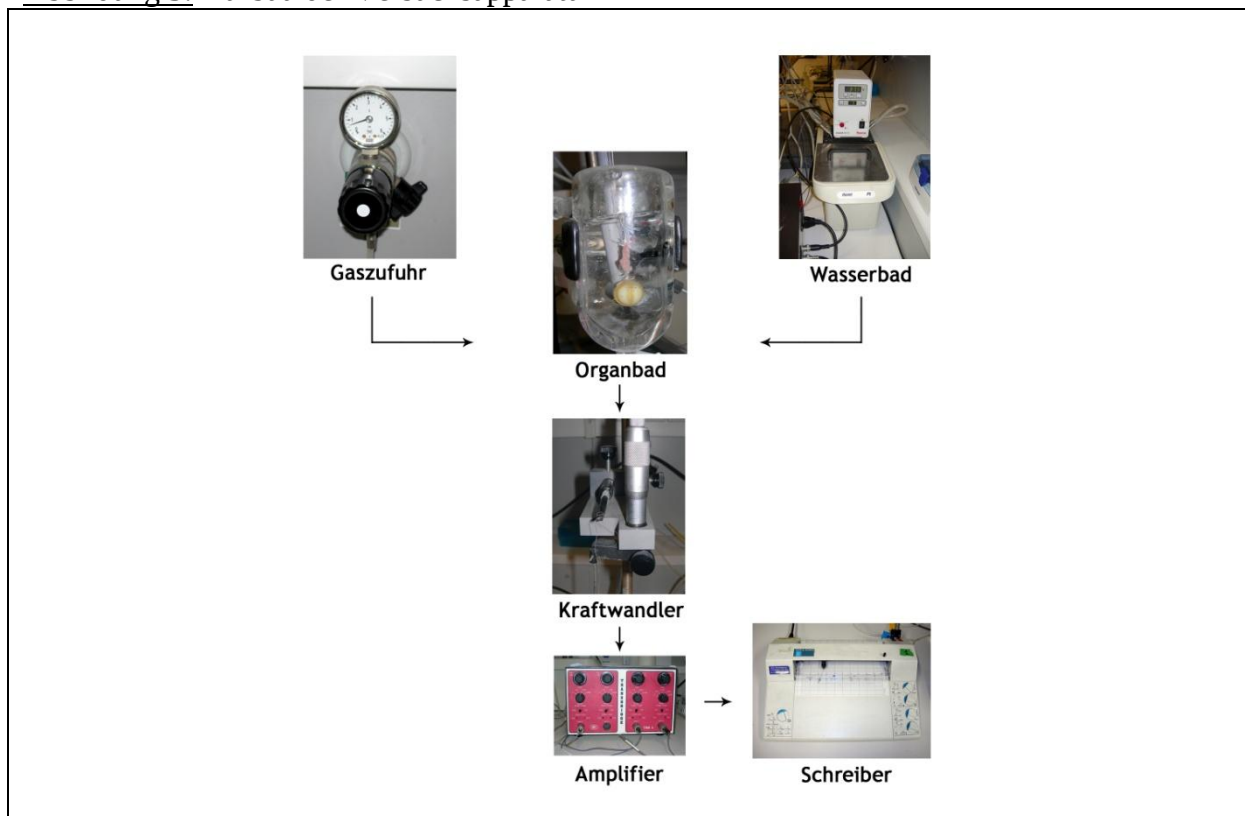


Abbildung 3

2.2 Versuchstiere

Die für die Versuchsreihen verwendeten Organe wurden aus männlichen und weiblichen Meerschweinchen entnommen und anschließend präpariert. Die Meerschweinchen stammten aus dem Department für Toxikologie und Labortierzucht in Dobrá Voda (Universität Bratislava).

Die Tiere sollten ein Körpergewicht zwischen 250 und 500 g haben und wurden durch einen Genickschlag getötet, wodurch ein fast schmerzloser Tod garantiert wurde. Die Meerschweinchen mussten nüchtern sein, bevor sie getötet wurden, um einen konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des terminalen Ileums zu erzielen.

Außerdem war es besonders wichtig die Organe schnell zu entnehmen, um eine Koagulation des Bluts bzw. eine Hypoxie zu verhindern. Daher wurde gleich nach dem Exitus des Tieres der Thorax mit einer Schere geöffnet und das Herz entnommen. Dieses wurde in eine physiologische Nährlösung übergeführt, die mit Oxymix durchströmt wurde.

Nach dem Herzen wurde die thorakale Aorta entnommen, indem der Rippenbogen freigelegt wurde und, nachdem anhaftendes Blut mit physiologischer Nährlösung abgespült worden war, mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere ein 2-3 cm langes Stück der Aorta entlang des Rippenbogens herausgelöst wurde. Dieses Stück der thorakalen Aorta wurde dann gleich in ein Becherglas mit physiologischer Nährlösung, die mit Oxymix perfundiert wurde, übergeführt, um es so für die weitere Präparation aufzubewahren.

Anschließend wurde das terminale Ileum isoliert, hierzu wurde das Abdomen mit einer Schere geöffnet, der Darm freigelegt, das Mesenterium durchtrennt und ein ca. 20 cm langes Stück des terminalen Ileums herausgeschnitten, wobei das jejunale gelegene Ende mit einem roten Zwirn gekennzeichnet wurde, um die beiden Enden bei der folgenden Präparierung unterscheiden zu können. Das entnommene Stück des terminalen Ileums wurde ebenfalls in ein mit Nährlösung gefülltes Becherglas gegeben.

2.3 Die Präparate

Die Präparation erfolgte auf eigens dafür vorgesehenen Arbeitsplätzen unter einem Mikroskop (Nikon SMZ-10A, Japan), um ein möglichst genaues Arbeiten zu ermöglichen und um eine Verletzung der Organe zu vermeiden. Die isolierten Organe wurden mit Stecknadeln auf in Petrischalen, die mit physiologischer Nährlösung gefüllt waren, gelegten Korkböden fixiert.

Die Präparation musste kurz nach der Isolierung der Organe, mit größter Vorsicht und relativ rasch durchgeführt werden. Die so vorbereiteten Präparate wurden bis zu Versuchsbeginn in einem Becherglas mit Nährlösung aufbewahrt und mit Oxy mix versorgt.

2.3.1 Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs

Zunächst wurde das Perikard entfernt und das Herz an Basis und Spitze mit Präpariernadeln am Korkboden befestigt. Anschließend wurde entlang des Sulcus coronarius ein Schnitt gesetzt und so der rechte Vorhof von den Ventrikeln getrennt. Dabei musste man sehr vorsichtig vorgehen, um den Sinusknoten, der sich in der rechten Vorhofwand in der Nähe der Einmündung der Vena cava superior befindet, nicht zu beschädigen, da man sonst das Präparat nicht mehr für den Versuch verwenden hätte können.

Dann wurde mit einem Zwirn ein Silberdrahthäkchen am oberen Teil des rechten Vorhofs, am dort noch vorhandenen Fett und Gewebe, angebunden. An diesem Häkchen konnte dann das Organ in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

Damit der rechte Vorhof nicht zu schlagen aufhörte, musste rasch und achtsam vorgegangen werden und das Organ ständig in mit Oxy mix perfundierter Nährlösung aufbewahrt werden.

Abbildung 4: Isolierung des rechten Vorhofs



Abbildung 4

Abbildung 4 zeigt das isolierte Herz eines Meerschweinchens, das sich in einer mit physiologischer Nährlösung gefüllten Petrischale befindet. Über den rechts im Bild sichtbaren weißen Kunststoffschlauch wird die Nährlösung mit Oxymix perfundiert. Mit Schere und Pinzette wird durch einen Schnitt entlang des Sulcus coronarius der Vorhof isoliert.

2.3.2 Isolierung und Präparation des Papillarmuskels

Der rechte Ventrikel wurde entlang des Septums, von der Arteria pulmonalis bis zur Herzspitze, aufgeschnitten, geöffnet und mit Präpariernadeln festgesteckt. Die Purkinjefasern wurden entfernt, um eine Störung des späteren Versuchsablaufs durch ihre Spontanaktivität, zu vermeiden.

Am Ansatz der Muskelsehne wurde dann ein Silberdrahthäkchen mit einem Zwirn angebunden, die Sehne hierauf behutsam durchtrennt und der Muskel herausgeschnitten.

Für die Präparation der Papillarmuskeln benötigte man viel Geschicklichkeit, da die isolierten Papillarmuskeln einen maximalen Durchmesser von 0,87 mm haben sollten, um eine genügende Sauerstoffversorgung zu garantieren (Koch-Weser 1963). Es war daher wichtig behutsam vorzugehen, um den Muskel nicht zu überdehnen oder zu verletzen.

2.3.3 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis

Gleich nach der Isolierung der Papillarmuskeln wurde die Arteria pulmonalis entnommen, indem man, nach der Entfernung von Herzbeutel, Teilen der Lunge und Fettresten, 5 bis 10 mm der Arteria pulmonalis, die direkt vom rechten Ventrikel abzweigt, herausschnitt. Anschließend wurde das Organ wieder auf einem Korkboden in einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale mit Präpariernadeln festgesteckt und behutsam mit einer Federschere von Muskel- und Fettgewebe befreit und dann zu 2-3 mm breiten Ringen geschnitten. Diese Präparate wurden bis zum Beginn der Versuche in mit Oxymix durchperlter Nährlösung aufgehoben und konnten dann direkt in die Aufhängevorrichtung der Versuchsanordnung eingespannt werden.

2.3.4 Isolierung und Präparation der Aorta

Die isolierte thorakale Aorta wurde wiederum auf Kork in physiologischer Nährlösung fixiert. Anschließend wurden vorsichtig, ohne dabei die Aorta zu verletzen, mit einer Federschere die Muskel- und Gewebereste entfernt. Eingeschnittene Aortastücke konnten für die Versuche nicht verwendet werden, Präparate mit noch zu viel anhaftendem Gewebe waren jedoch auch ungeeignet.

Die so vorbereitete Aorta wurde dann noch in 2-3 mm große Ringe zerschnitten, die dann direkt in die Versuchsanordnung eingehängt wurden.

Abbildung 5: Präparation der Aorta



Abbildung 5

Abbildung 5 zeigt die isolierte Aorta, die mit Hilfe von Stecknadeln in der Petrischale fixiert ist. Gut zu erkennen sind die anhaftenden Gewebereste, die noch mit der Federschere entfernt werden müssen.

2.3.5 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums

Von dem isolierten Teil des terminalen Ileums wurden 1-2 cm lange Stücke abgeschnitten und an ihrer Unterseite auf dem Korkboden in der mit physiologischer Nährlösung gefüllten Petrischale mit Stecknadeln so fixiert, dass die Öffnungen an beiden Enden nicht verschlossen wurden. Dann wurden die Stücke mit einer Pipette mit Nährlösung durchgespült um Chymus-Reste zu entfernen. Anschließend wurden an beiden Enden Silberdrahthäkchen angebracht, wobei man hierfür verschiedenfarbige Zwirne verwendete, um das Dickdarm- und das Magenende nicht zu verwechseln. Zuletzt wurde noch mit einer Federschere anhaftendes Mesenterium entfernt.

Abbildung 6: Präparat des terminalen Ileums

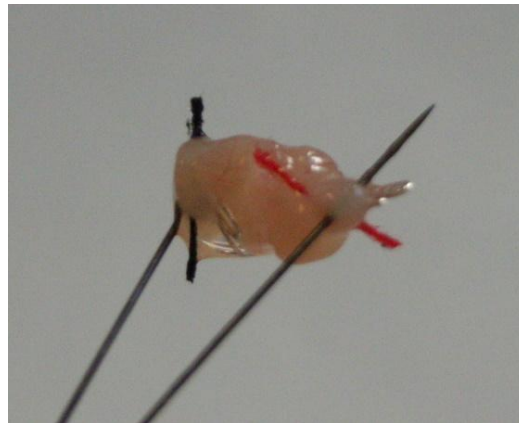


Abbildung 6

Abbildung 6 zeigt ein präpariertes Stück des terminalen Ileums mit den an beiden Enden angebrachten Silberdrahthäkchen. Die Silberdrahthäkchen sind mit einem roten und einem schwarzen Faden befestigt, wobei der rote Zwirn das obere Ende des Präparates markiert.

2.4 Die physiologischen Nährlösungen

2.4.1 Nährlösung für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum

Die Nährlösung, die für die angegebenen Organe verwendet wurde, war von einer Krebs-Henseleit-Nährlösung abgeleitet und wurde entsprechend der Vorschrift von Reiter zubereitet. Die Nährlösung war gemäß der Bedürfnisse des rechten Vorhofs, des Papillarmuskels, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums zusammengesetzt.

In Tabelle 1 sind die entsprechenden Komponenten dieser angepassten Nährlösung in mmol/L angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Nährlösung

Komponente	mmol/L	Stocklösung g/L	ml Stocklösung/L Tyrode
NaCl	114,99	200,05	33,60
KCl	4,73	10,07	35,00
NaHCO ₃	24,90	25,00	83,70
KH ₂ PO ₄	1,18	136,00	1,18
MgSO ₄	1,18	248,00	1,18
Glucose	10,00	Reinsubstanz	1,98 g
CaCl ₂	3,20	29,40	3,20

Tabelle 1

2.4.2 Nährlösung für die Aorta

Die Nährlösung für die Aorta wich in ihrer Zusammensetzung leicht von der Nährlösung für die restlichen Organe ab, und war damit speziell an die erforderlichen Bedingungen für die Aorta angepasst.

In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung dieser Nährlösung angegeben.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährlösung

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

Tabelle 2

Die physiologischen Nährlösungen wurden am Morgen jedes Versuchstages neu hergestellt. Zunächst wurden die entsprechenden Mengen der Stocklösungen zusammengefügt, die eingewogene Glucosemenge zugegeben und mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend wurde die Nährlösung noch für 20 Minuten mit Oxymix perfundiert, um eine optimale Sauerstoffversorgung und einen konstanten pH von 7,2 bis 7,4 zu garantieren und so physiologische Bedingungen für die Präparate zu schaffen.

Die Stocklösung des CaCl₂ wurde erst nachdem der Ansatz der Nährlösung mit Oxymix durchperlt worden war, tropfenweise mit einer Messpipette hinzugefügt, um eine Ausfällung von schwerlöslichen Calciumsalzen zu verhindern.

2.5 Versuchsablauf

2.5.1 Versuchspräparat rechter Vorhof

Zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurde die Versuchsapparatur I verwendet. Der vorbereitete rechte Vorhof wurde an dem am oberen Ende des Präparates befestigten Silberdrahthäkchen in die Aufhängevorrichtung eingehängt und am unteren Ende zum Teil zwischen der Kathode am Glassteg und dem Plexiglasplättchen fixiert. Dann wurde der so befestigte rechte Vorhof über den Stativschlitten in das mit physiologischer Nährlösung gefüllte Organbad hinabgelassen. Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die physiologische Nährlösung mit Oxymix perfundiert und über das Wasserbad auf eine Temperatur von $35 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt.

Anschließend spannte man mit dem Feintrieb auf 10,4 mN (1.06 g) vor, wobei dieser Wert während des ganzen Versuchs konstant gehalten werden sollte.

Nun wartete man ab, bis sich der Vorhof an die Bedingungen angepasst hatte und sich die Schlagfrequenz stabilisiert hatte. Dazu zeichnete man alle 5 Minuten die Schlagfrequenz mit dem Schreiber mit.

Sobald die Frequenz konstant war, konnte mit der stufenweisen Substanzzugabe begonnen werden, alle 45 Minuten wurden 1, 2, 7, 20 bzw. 70 $\mu\text{mol/L}$ der Stammlösung der Testsubstanz zugegeben, wobei weiterhin alle 5 Minuten die Schlagfrequenz mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde.

Durch die Einwirkzeit von 45 Minuten zwischen den einzelnen Konzentrationssteigerungen konnte eine vollständige Entfaltung der Wirkung der Testsubstanz gewährleistet werden.

2.5.2 Versuchspräparat Papillarmuskel

Anhand des Papillarmuskels konnte die Auswirkung der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft untersucht werden. Der Papillarmuskel wurde ebenso wie der rechte Vorhof in die Versuchsapparatur I eingespannt und in das mit Nährlösung gefüllte und auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ temperierte Organbad hinabgelassen.

Anschließend wurde mit dem Feintrieb eine Vorspannung von 3,92 mN (0.4 g) eingestellt und im Verlauf des Versuchs immer wieder nachgespannt.

Aufgrund der fehlenden Spontanaktivität des Papillarmuskels, musste er mittels Reizgerät (Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Asolator A360, World Precision Instruments, Hamden, USA) mit elektrischen Reizen stimuliert werden, um die Kontraktionskraft messen zu können. Das Reizgerät reizte mit 3 ms dauernden Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Reizung kontinuierlich erfolgte, so dass der Muskel jede Sekunde kontrahierte, und dass der Reizstrom nicht zu hoch war, da sonst die Katecholamin-Speicher zu schnell entleert worden wären und damit die Messergebnisse verfälscht worden wären. Daher sollte die Stromstärke mit der gereizt wurde maximal 10% über der muskulären Reizschwelle liegen.

Nach einer Anpassungsphase von bis zu 90 Minuten, in der ein Konstant-werden der Kontraktionskraft abgewartet wurde und dies durch Aufzeichnung der Kontraktionsamplituden alle 5 Minuten kontrolliert wurde, wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. Die Konzentrationsstufen betrugen dabei wieder 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/L}$. Dabei wurden alle 5 Minuten 5 bis 10 Amplituden mit dem Schreiber aufgezeichnet und so die Kontraktionskraft gemessen.

2.5.3 Versuchspräparat Arteria pulmonalis

Die vorbereiteten ringförmigen Stücke der Arteria pulmonalis konnten direkt in die Versuchsanordnung II eingespannt werden, indem die an der Organhalterung befestigten, zurechtgebogenen Silberdrähte von oben und von unten gegengleich in das ringförmige Präparat eingefädelt wurden. Anschließend wurde ins Organbad, das mit physiologischer Nährlösung gefüllt und auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ vorgeheizt war, abgelassen und mit dem Feintrieb eine Vorspannung von 9,81 mN (1 g) angelegt. Nach einer 20-minütigen Anpassungsphase wurde nochmals nachjustiert und damit eine mögliche Abweichung von der Nulllinie nachgebessert. Nun wurde die Nährlösung im Organbad abgelassen und 25 bzw. 8 ml (je nach Größe des Organbades) einer 90 mmolaren KCl-Lösung eingefüllt. Zur Herstellung dieser KCl-Lösung wurden 0,44 g Kaliumchlorid in 100 ml der physiologischen Nährlösung gelöst. Durch den Austausch der ursprünglichen Tyrode gegen die KCl-Lösung konnte eine maximale Kontraktion der Arteria pulmonalis erzielt werden und damit im Folgenden die durch die Testsubstanz bewirkte Abnahme der Kontraktion bestimmt werden.

Im Anschluss an die KCl-Zugabe musste eine 100-prozentige Kontraktion des Präparates und damit die Ausbildung eines konstanten Plateaus abgewartet werden. Erst nach dieser Anpassungsphase konnte mit der stufenweisen Substanzzugabe begonnen werden. Der gesamte Versuch und die Auswirkungen der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft wurden dabei vom Schreiber dokumentiert.

2.5.4. Versuchspräparat Aorta

Die Versuche an der Aorta wurden in gleicher Weise durchgeführt wie die in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Versuche an der Arteria pulmonalis, bis auf dass mit der speziellen Aorta-Tyrode gearbeitet wurde.

2.5.5 Versuchspräparat terminales Ileum

Das Präparat des terminalen Ileums wurde an den in der Vorbereitung befestigten Silberdrahthäkchen in die Versuchsanordnung II so eingespannt, dass sich das Darmende oben und das Magenende unten befand. Dann wurde wieder in das mit Tyrode gefüllte und auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ vorgewärmte Organbad abgesenkt und im Anschluss auf eine Vorspannung von 4,9 mN (1 g) eingestellt.

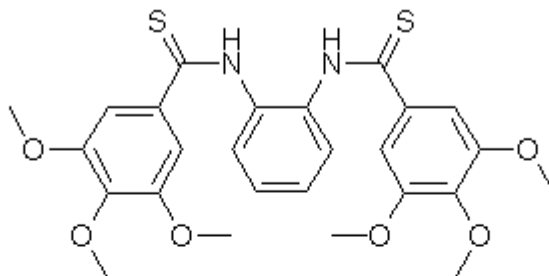
Nach 20 Minuten der Anpassung wurde die Tyrode im Organbad durch eine 60 mmolare KCl-Lösung ausgewechselt. Wie bei Aorta und Arteria pulmonalis wurde durch die KCl-Lösung nach ca. 45 bis 90 Minuten eine maximale Kontraktion der glatten Muskulatur des terminalen Ileums erreicht. Nach Erreichen dieses Plateaus konnte mit der Zugabe der Substanzlösung in, alle 45 Minuten, ansteigenden Konzentrationen begonnen werden.

Ab der Zugabe der KCl-Lösung bis 45 Minuten nach Injektion der letzten Konzentration der Testsubstanz wurde die Änderung der Kontraktionsstärke des terminalen Ileums vom Schreiber aufgezeichnet.

2.6 Untersuchte Substanzen

2.6.1 Testsubstanz WHG 57T

Strukturformel:



Summenformel: C₂₆H₂₈N₂O₆S₂

Molekulargewicht: 528,65

Nomenklatur: N1-{2-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)amino]phenyl}-3,4,5-trimethoxybenzamid

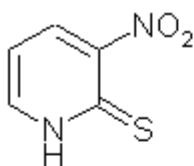
Aussehen: dunkelgelbes Pulver

Die Synthese dieser Testsubstanz erfolgte im Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Thomas Erker.

Für die Versuche wurde jeden Tag eine frische Stammlösung der Testsubstanz hergestellt. Dazu wurde die Substanz, entsprechend der unterschiedlichen Volumina - 8 bzw. 25 ml - der Organbäder, eingewogen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Von der Substanz wurde so viel eingewogen, dass letztendlich, nach stufenweiser Zugabe der Stammlösung, eine Konzentration von 100 µmol/L im Organbad erreicht wurde. Die Konzentration wurde gesteigert, indem zunächst 1 µmol/L der Stammlösung der Testsubstanz mittels Eppendorf- bzw. Finnpiquette (Labsystems, Finnland) in das Organbad injiziert wurde, möglichst ohne dabei die Aufhängevorrichtung, das Präparat oder den Kraftwandler zu berühren. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurden alle 45 Minuten 2, 7, 20 bzw. 70 µmol/L hinzugefügt und somit Konzentrationsstufen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L erzielt.

2.6.2 Testsubstanz VMg

Strukturformel:



Summenformel: C₅H₄N₂O₂S₁

Molekulargewicht: 156,16

Nomenklatur: 3-Nitropyridin-2(1H)-thion

Aussehen: bronzefarbige nadelförmige, feine Kristalle

Die Testsubstanz VMg wurde ebenfalls von Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien zur Verfügung gestellt.

Die Stammlösung dieser Substanz wurde in gleicher Weise wie die Stammlösung von WHG 57T, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, hergestellt.

2.6.3 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Als Lösungsmittel für die Stammlösungen beider Testsubstanzen wurde DMSO verwendet. Hierbei musste jedoch berücksichtigt werden, dass DMSO selbst auch eine Eigenwirkung auf die verschiedenen Organe besitzt. Daher mussten alle Versuche auch ohne Testsubstanz, nur mit DMSO, in gleicher Weise wie die Testsubstanz-Versuche, durchgeführt werden. So konnte das Ausmaß der DMSO-Wirkung bestimmt werden, bei der Auswertung der einzelnen Versuchsergebnisse beachtet werden und schließlich die Wirkung von DMSO von der Wirkung der Testsubstanzen unterschieden werden.

2.7 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der Versuche an Arteria pulmonalis, Aorta und terminalem Ileum wurde die Kontraktionskraft (f_c) in mN der jeweiligen Präparate als maßgeblicher Wert herangezogen. Dazu wurde zunächst aus der durch den Schreiber erfassten Kontraktionskurve der Kontrollwert (=Kontraktionskraft unmittelbar vor Zugabe der ersten Konzentration der Testsubstanz) ermittelt, wobei noch mit dem Eichfaktor der Versuchsanordnung multipliziert werden musste, um den korrekten Wert in mN zu erhalten. Dieser Wert wurde gleich 100 % Kontraktion gesetzt.

Dann wurden die Werte bei den jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanz aus der Kontraktionskurve abgelesen, ebenfalls mit dem Eichfaktor der Versuchsanordnung multipliziert und die aus den Lösungsmittelversuchen ermittelten Werte der Eigenwirkung des Lösungsmittels abgezogen.

Anschließend konnte die, durch die einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz nach 45 Minuten Einwirkzeit bewirkte, prozentuelle Reduktion der Kontraktionskraft in Bezug auf den Kontrollwert ausgerechnet werden.

Zur Beurteilung der Wirkung der Testsubstanz auf den Papillarmuskel diente ebenfalls die Kontraktionskraft (f_c). Mit einem passenden Lineal wurden die durch den Schreiber aufgezeichneten Amplituden abgemessen und durch Multiplikation mit dem Eichwert der Versuchsanordnung die Kontraktionskraft (f_c) in mN ausgerechnet. Als Kontrollwert diente jene Kontraktionskraft, die direkt vor der erstmaligen Substanzzugabe erreicht worden war. Nach Abzug der Lösungsmittelwirkung von den einzelnen Messwerten, wurde die Abnahme der Kontraktionskraft auf den Kontrollwert bezogen und in Prozent angegeben.

Die Wirkung der Testsubstanz auf den rechten Vorhof wurde anhand der Schlagfrequenz (f) bestimmt. Das Ausmaß dieser Wirkung manifestierte sich in der Änderung der Anzahl der Schläge pro Minute.

Zur Ermittlung der Schlagfrequenz musste die Anzahl der bei jeder Konzentration aufgezeichneten Peaks mit 5 multipliziert werden. Dieser Faktor ergab sich aus der Papierlaufgeschwindigkeit des Schreibers von 5 mm pro Sekunde und einer Aufzeichnung der Peaks auf einer Länge von 6 cm - die Anzahl der aufgezeichneten Peaks entsprach damit der Anzahl der Schläge pro 12 Sekunden.

Anschließend konnten die bei den jeweiligen Konzentrationen bestimmten Messwerte auf den während der Anpassungsphase ermittelten Kontrollwert bezogen und in Prozent angegeben werden.

Um die Versuchsreihen an den jeweiligen Organen statistisch auszuwerten, wurde der arithmetische Mittelwert der Messwerte von n Versuchen berechnet und im Folgenden auch der Standardfehler (SEM = standard error of mean) dieses Mittelwertes ermittelt.

Anschließend wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit P erhoben, indem man den Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen einsetzte, um so die statistische Signifikanz der Ergebnisse abschätzen zu können. Unter der Irrtumswahrscheinlichkeit P versteht man die Wahrscheinlichkeit mit der sich ein Testergebnis vom tatsächlichen, wahren Ergebnis unterscheidet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($P \leq 0,05$) werden die Unterschiede als signifikant eingestuft, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1% ($P \leq 0,01$) als sehr signifikant und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% ($P \leq 0,001$) als höchst signifikant.

Zur besseren Veranschaulichung der Wirkung der Testsubstanz wurden die statistisch erfassten Ergebnisse der Versuche als Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Dabei wurde auf der y-Koordinate die Änderung der Schlagfrequenz bzw. der Kontraktionskraft in % und auf der x-Koordinate die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/L}$ angegeben. An dieser Kurve kann man dann an den schwarzen Punkten den arithmetischen Mittelwert aus den Ergebnissen der Versuche bei den entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanz ablesen. Das Ausmaß der zugehörigen Standardabweichungen kann man an den vertikalen Balken erkennen.

3. Ergebnisse

3.1 Testsubstanz WHG 57T

3.1.1 Wirkung auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Zur Untersuchung der Effekte der Testsubstanz WHG 57T auf die Schlagfrequenz (f) wurde der rechte Vorhof wie in Kapitel 2.3.1 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben in die Versuchsanordnung I eingespannt. Nachdem sich die Schlagfrequenz stabilisiert hatte, konnte der Kontrollwert bestimmt und durch den Schreiber festgehalten werden. Anschließend wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen, und die Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz bei den einzelnen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L gemessen und durch den Schreiber dokumentiert.

In Tabelle 3 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 5 Versuchen am rechten Vorhof sowohl in Schläge pro Minute als auch als prozentuelle Änderung der Schlagfrequenz – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 7 (siehe Seite 30) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von WHG 57T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs abgelesen werden.

Tabelle 3: Wirkung von WHG 57T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

WHG 57T (µmol/L)	f ± SEM (Schläge/min)	f ± SEM (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	209 ± 11,11	0 ± 0	5	—
1	199 ± 11,98	-4,74 ± 2,76	5	n.s.
3	205 ± 10,37	-1,78 ± 1,78	5	n.s.
10	196 ± 15,12	-6,62 ± 3,70	5	n.s.
30	193 ± 11,02	-7,56 ± 2,70	5	n.s.
100	212 ± 10,91	+1,68 ± 2,90	5	n.s.

Tabelle 3

Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 57T bezogen auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

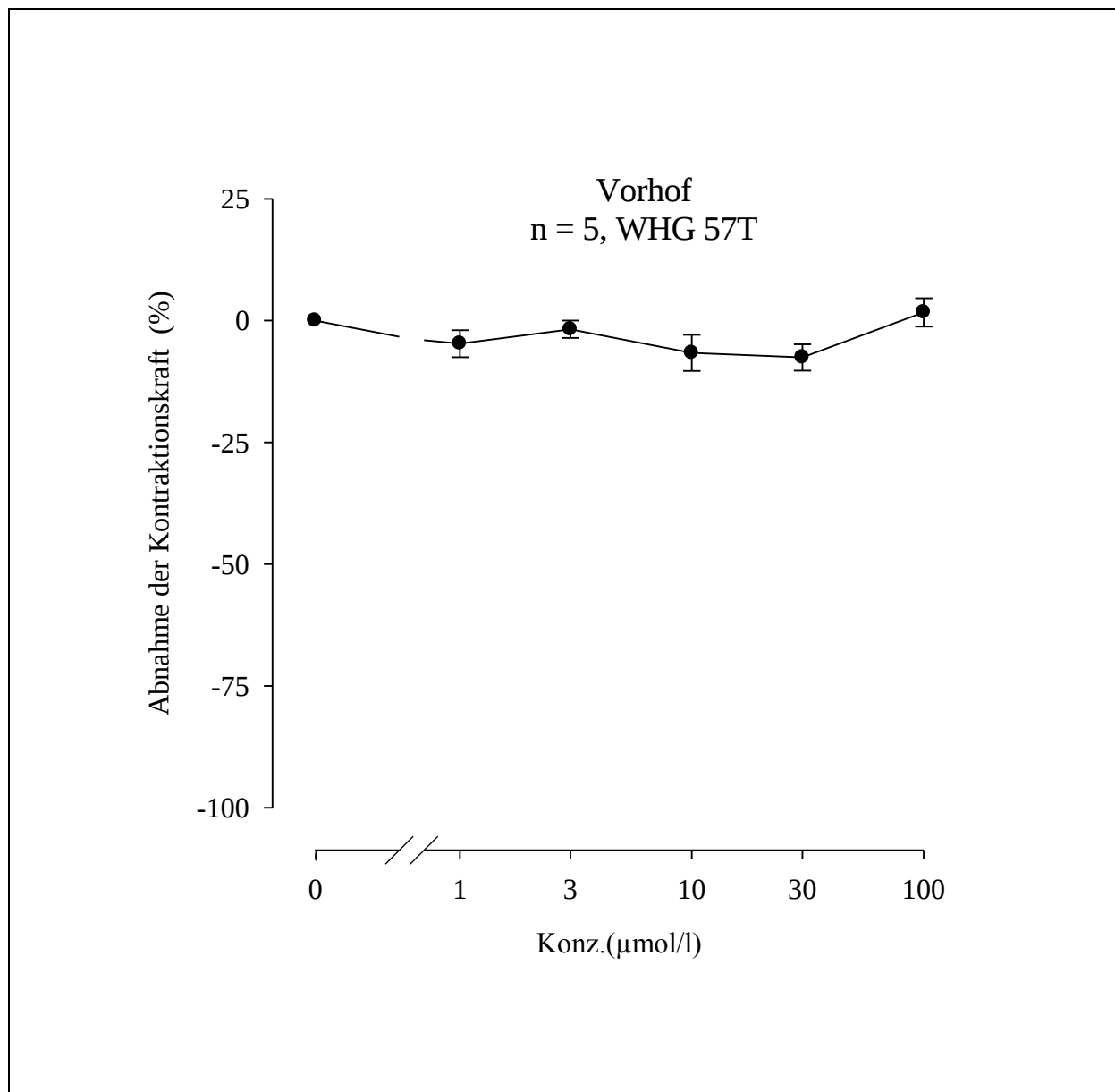


Abbildung 7

Legende zu Abbildung 7:

Die Kurve spiegelt die Auswirkungen der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz WHG 57T auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wieder. Auf der x-Koordinate ist die Konzentration in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Schlagfrequenz in % angeführt. Die schwarzen Punkte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten der Einzelergebnisse der Versuche am rechten Vorhof und die senkrechten Balken veranschaulichen die zugehörigen Standardfehler.

Abbildung 8: Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionen des rechten Vorhofs unter der Einwirkung von WHG 57T

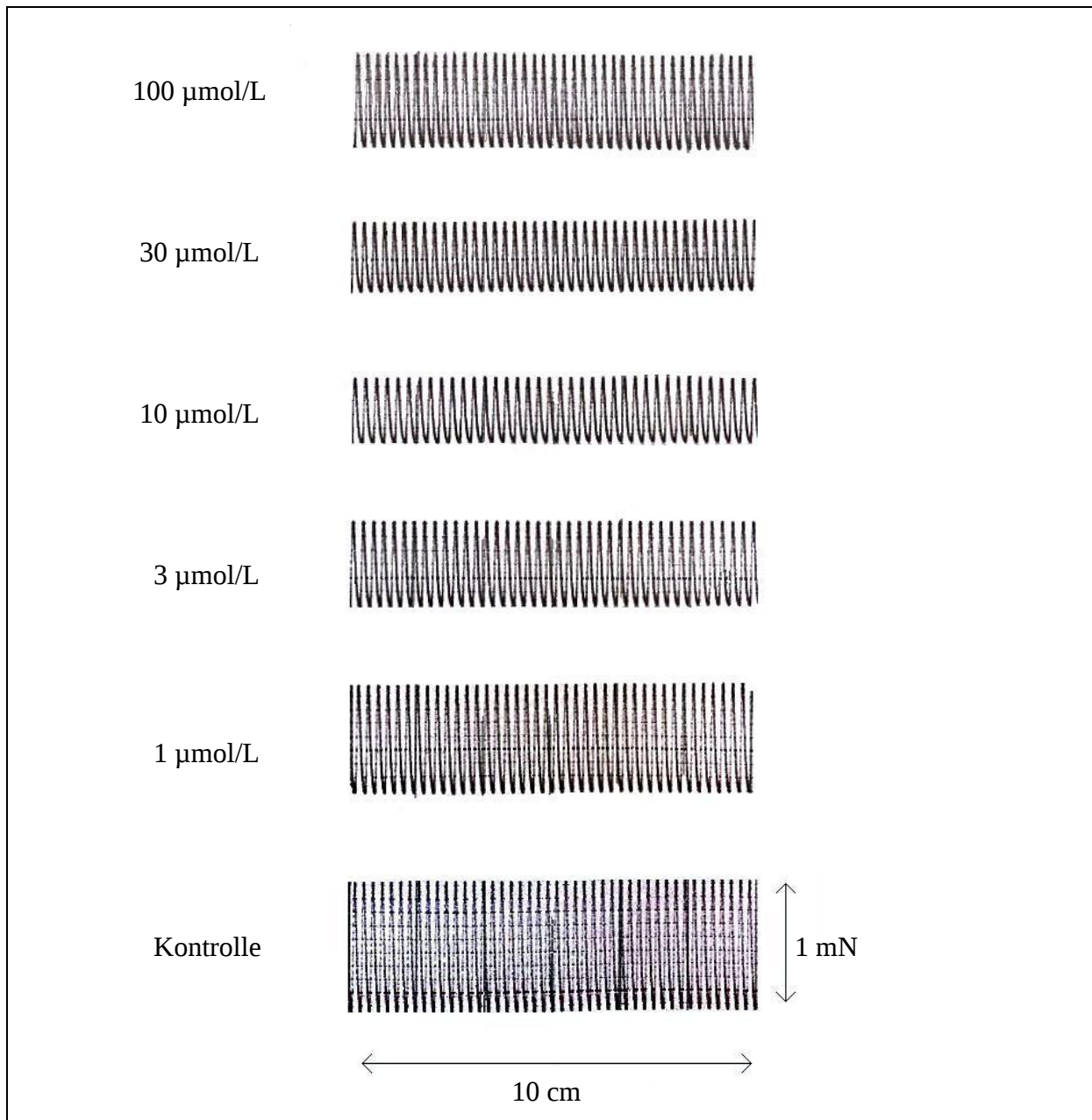


Abbildung 8

Legende zu Abbildung 8:

Die durch die einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz bewirkte Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurde durch Aufzeichnung der isometrischen Kontraktionen durch den Schreiber dokumentiert. Dabei wurde alle 5 Minuten für die Dauer von 12 Sekunden aufgezeichnet.

Die jeweiligen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 bzw. 100 µmol/L wurden alle 45 Minuten durch die kumulative Zugabe der Substanzlösung erreicht.

3.1.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Zur Untersuchung der Effekte von WHG 57T auf die Kontraktionskraft (f_c) wurden die Papillarmuskel wie in Kapitel 2.3.2 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben in die Versuchsanordnung I eingespannt. Nach einer bis zu 90-minütigen Anpassungsphase, in der sich die Kontraktionskraft stabilisierte, wurde der Kontrollwert mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet und bestimmt. Anschließend wurde mit der Substanzzugabe begonnen. Nach einer jeweiligen Einwirkzeit von 45 Minuten wurde die nächste Konzentration zugegeben, wobei alle 5 Minuten die Kontraktionskraft durch den Schreiber dokumentiert wurde.

In Tabelle 4 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 5 Versuchen am Papillarmuskel sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 9 (siehe Seite 33) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von WHG 57T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels abgelesen werden.

Tabelle 4: Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

WHG 57T ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$0,58 \pm 0,07$	0 ± 0	5	—
1	$0,56 \pm 0,06$	$-8,13 \pm 4,08$	5	n.s.
3	$0,49 \pm 0,04$	$-13,75 \pm 3,42$	5	n.s.
10	$0,51 \pm 0,03$	$-9,01 \pm 5,12$	5	n.s.
30	$0,56 \pm 0,04$	$-1,24 \pm 4,56$	5	n.s.
100	$0,59 \pm 0,06$	$+2,18 \pm 2,96$	5	n.s.

Tabelle 4

Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 57T bezogen auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

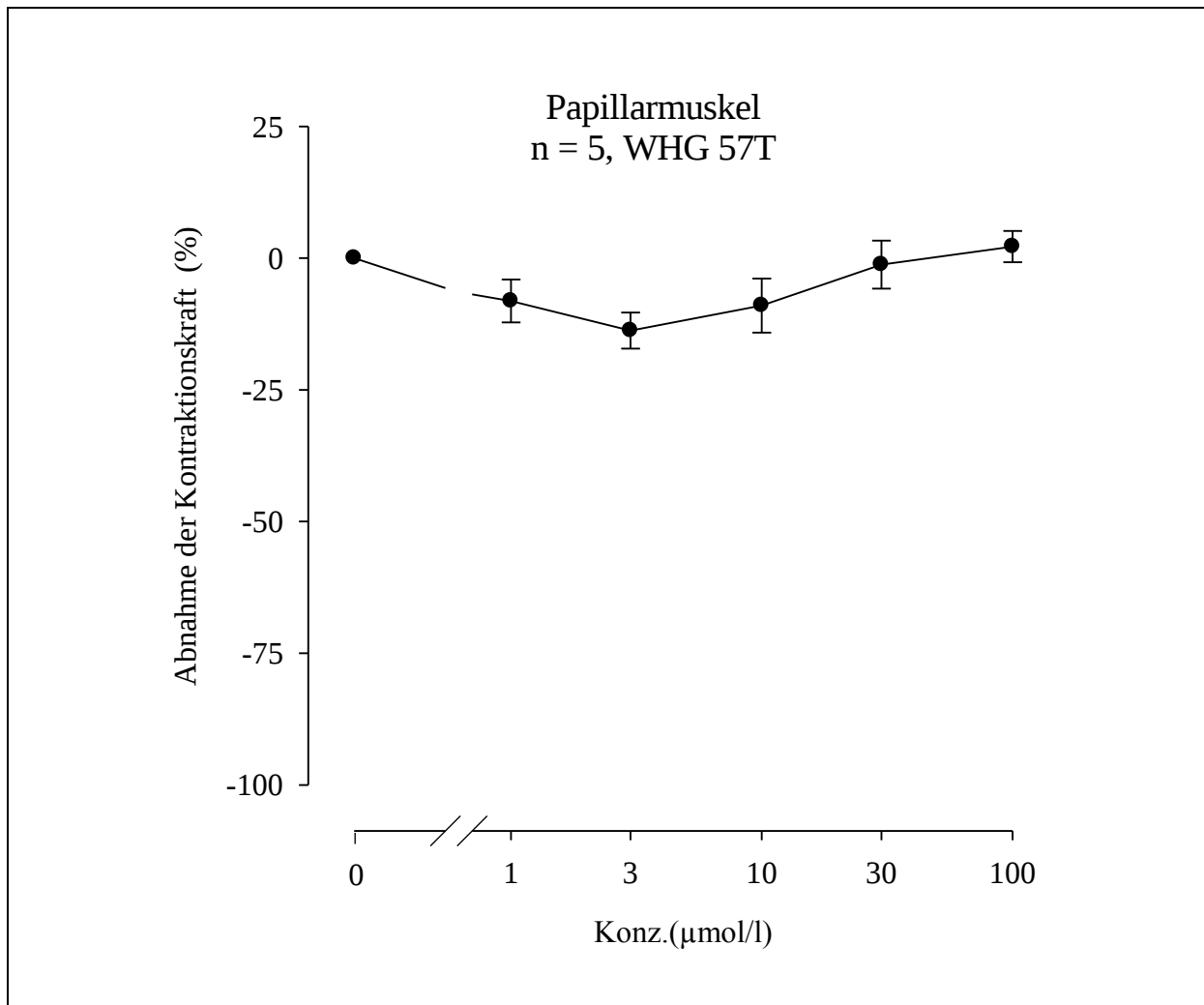


Abbildung 9

Legende zu Abbildung 9:

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve stellt die Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen der Stammlösung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels graphisch dar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind an den schwarzen Punkten, die Standardfehler als vertikale Balken erkennbar.

Abbildung 10: Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionen eines elektrisch stimulierten Papillarmuskels unter der Einwirkung von WHG 57T

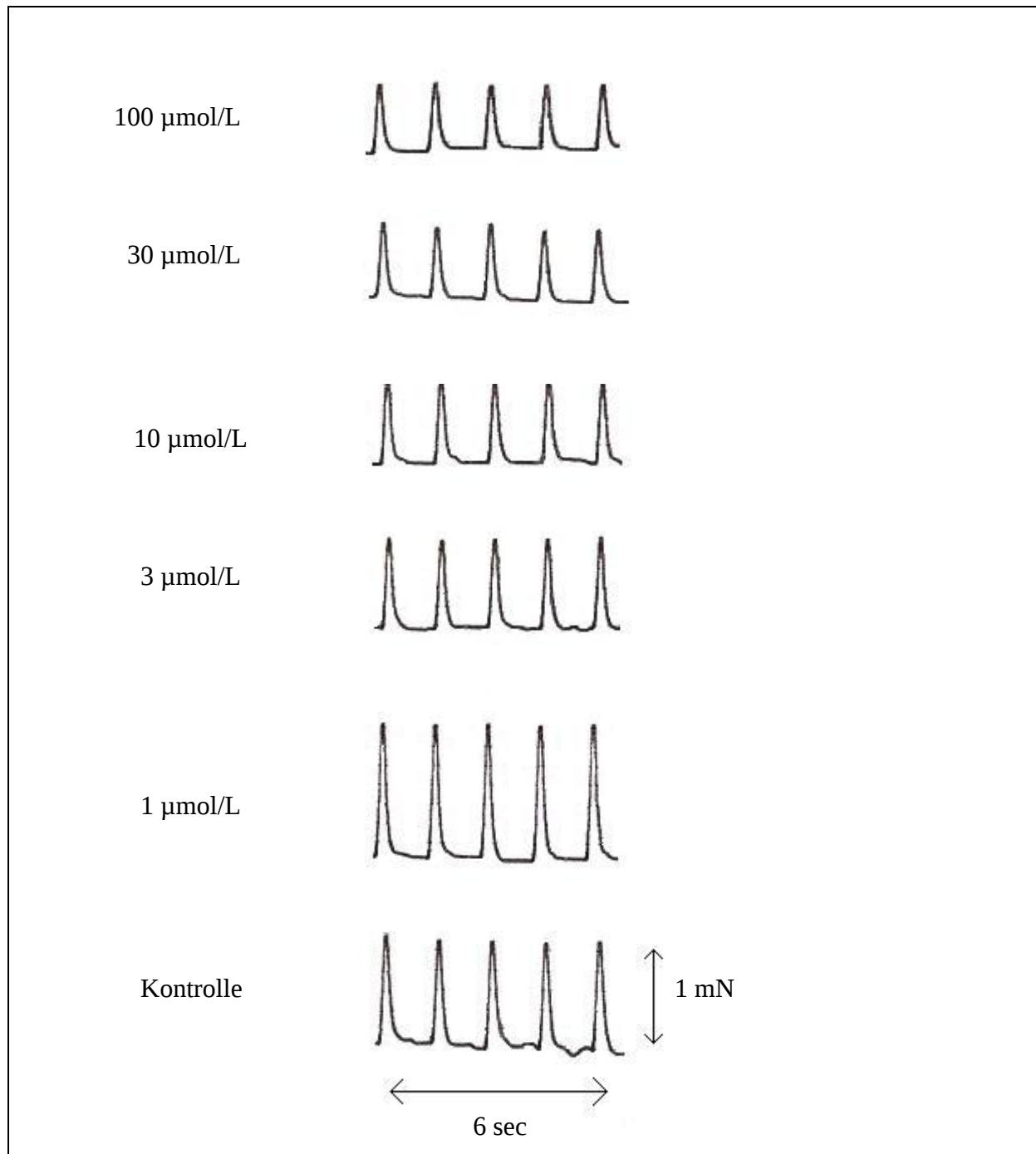


Abbildung 10

Legende zu Abbildung 10:

Diese Aufzeichnung des Schreibers zeigt die Kontraktionsamplituden eines isolierten und elektrisch stimulierten Papillarmuskels. An ihnen kann man die Änderung der Kontraktionskraft unter der Einwirkung der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz WHG 57T erkennen. Wobei alle 45 Minuten die Konzentration gesteigert wurde, um so schließlich eine Konzentration von 100 µmol/L im Organbad zu erreichen.

3.1.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Zur Untersuchung der Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft (f_c) wurde die Arteria pulmonalis wie in Kapitel 2.3.3 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben in die Versuchsapparatur II eingespannt.

Anschließend wurde das eingespannte Präparat der Arteria pulmonalis, nach einer 20-minütigen Anpassungsphase, mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung vorkontrahiert.

Nach der Kontrollphase, in der eine konstant-bleibende Kontraktion abgewartet wurde, und der Ermittlung des Kontrollwertes, konnte mit der stufenweisen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. In einem Abstand von 45 Minuten wurden so Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/L}$ im Organbad erreicht.

In Tabelle 5 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 5 Versuchen an der Arteria pulmonalis sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 11 (siehe Seite 36) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von WHG 57T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis abgelesen werden.

Tabelle 5: Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

WHG 57T ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$10,45 \pm 3,23$	0 ± 0	5	—
1	$10,05 \pm 3,13$	$-4,03 \pm 0,19$	5	n.s.
3	$9,71 \pm 3,03$	$-7,23 \pm 0,68$	5	n.s.
10	$9,29 \pm 2,91$	$-11,26 \pm 1,43$	5	n.s.
30	$9,04 \pm 2,81$	$-13,62 \pm 1,66$	5	n.s.
100	$8,79 \pm 2,81$	$-16,55 \pm 2,87$	5	n.s.

Tabelle 5

Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 57T bezogen auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

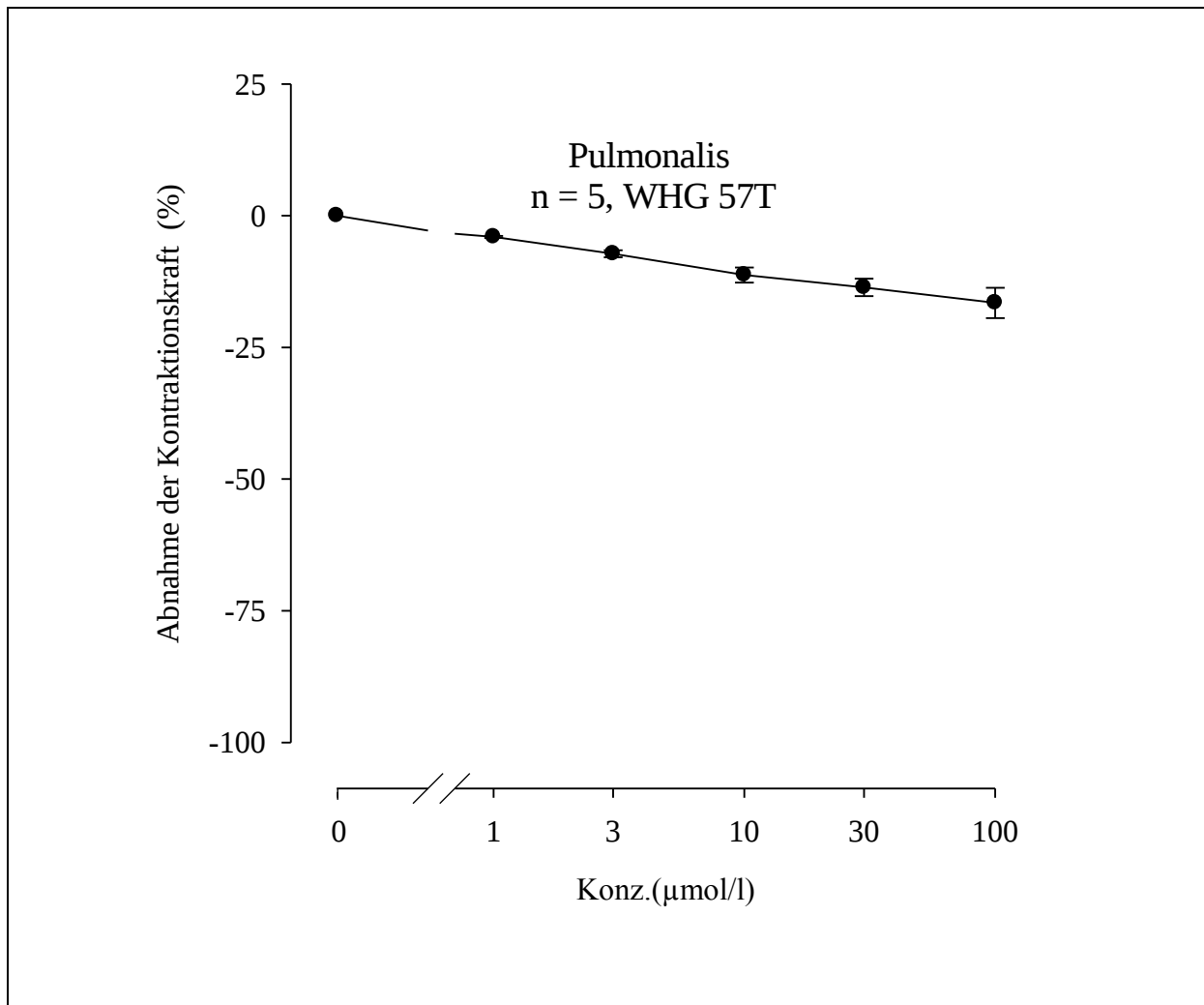


Abbildung 11

Legende zu Abbildung 11:

Aus dieser Graphik ist die durch die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz ausgelöste Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis erkennbar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte und deren Standardfehler (SEM) durch die vertikalen Balken veranschaulicht.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Arteria pulmonalis unter der Einwirkung von WHG 57T

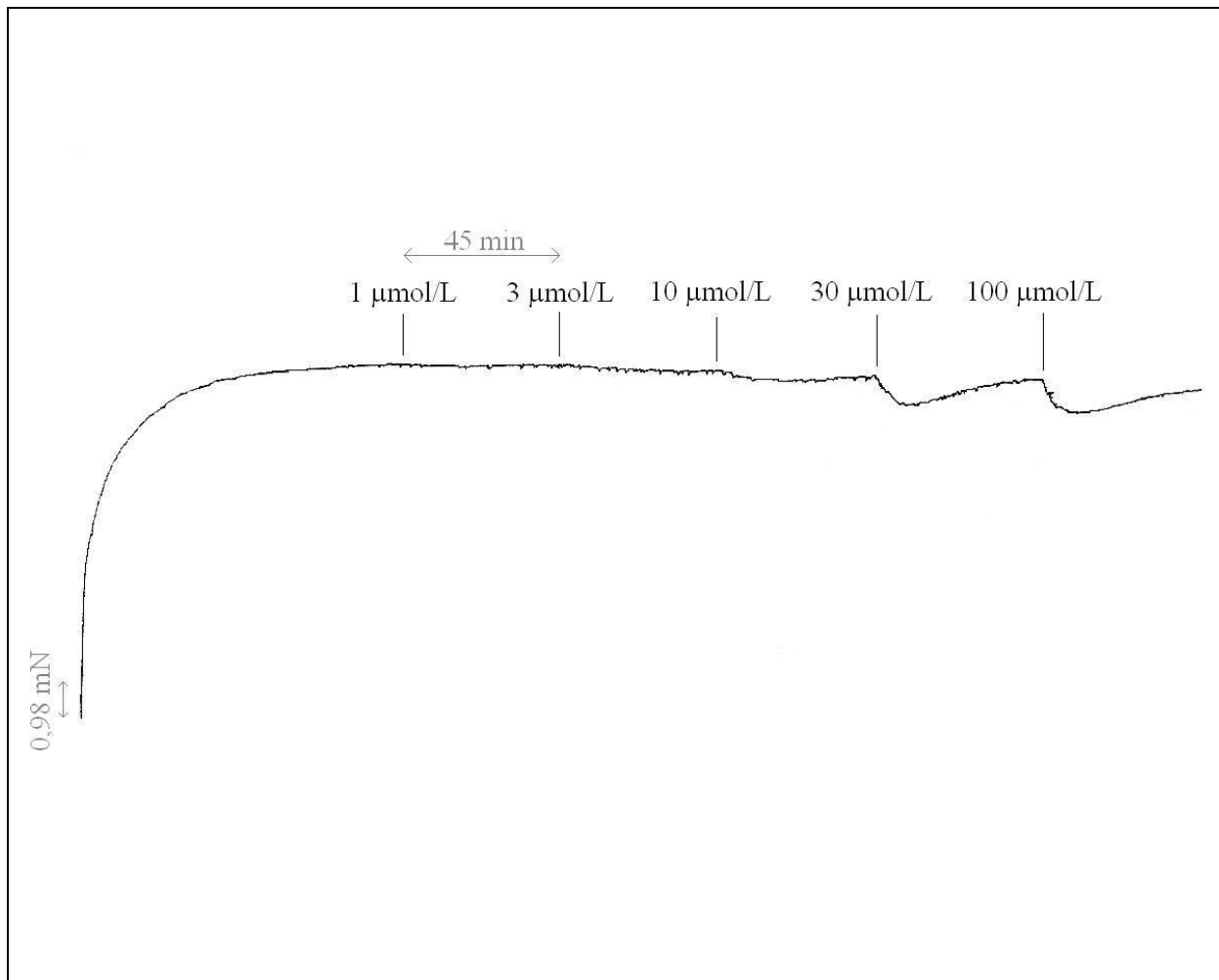


Abbildung 12

Legende zu Abbildung 12:

Diese Aufzeichnung durch den Schreiber zeigt die Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis unter dem Einfluss der Testsubstanz WHG 57T. Zunächst wurde die Ausbildung eines konstanten Plateaus abgewartet, um so eine 100-prozentige Kontraktion zu gewährleisten und einen aussagekräftigen Kontrollwert zu erhalten. Dann wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad durch Zugabe der entsprechenden Volumina an Substanzlösung erhöht, so dass Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L auf das Versuchspräparat einwirkten.

Der Zeitpunkt der Zugabe der Substanzlösung in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.1.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta

Um die Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft (f_c) der Aorta zu untersuchen, wurde die Aorta wie in Kapitel 2.3.4 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben in die Versuchsanordnung II eingespannt.

Nachdem eine 100-prozentige Kontraktion der Aorta durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung erreicht worden war und man so einen Kontrollwert erhielt, konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen wiederum 45 Minuten betrug.

In Tabelle 6 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 5 Versuchen an der Aorta sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 13 (siehe Seite 39) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten zu sehen.

Aus Tabelle und Kurve können also die Effekte der Testsubstanz WHG 57T, in den unterschiedlichen Konzentrationen, auf die Kontraktionskraft der Aorta abgelesen werden.

Tabelle 6: Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft der Aorta

WHG 57T ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$6,62 \pm 0,56$	0 ± 0	5	—
1	$6,58 \pm 0,60$	$-0,86 \pm 0,95$	5	n.s.
3	$6,52 \pm 0,61$	$-1,89 \pm 1,78$	5	n.s.
10	$6,51 \pm 0,67$	$-2,37 \pm 2,23$	5	n.s.
30	$6,51 \pm 0,72$	$-2,45 \pm 3,21$	5	n.s.
100	$6,39 \pm 0,79$	$-4,75 \pm 3,63$	5	n.s.

Tabelle 6

Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 57T bezogen auf die Kontraktionskraft der Aorta

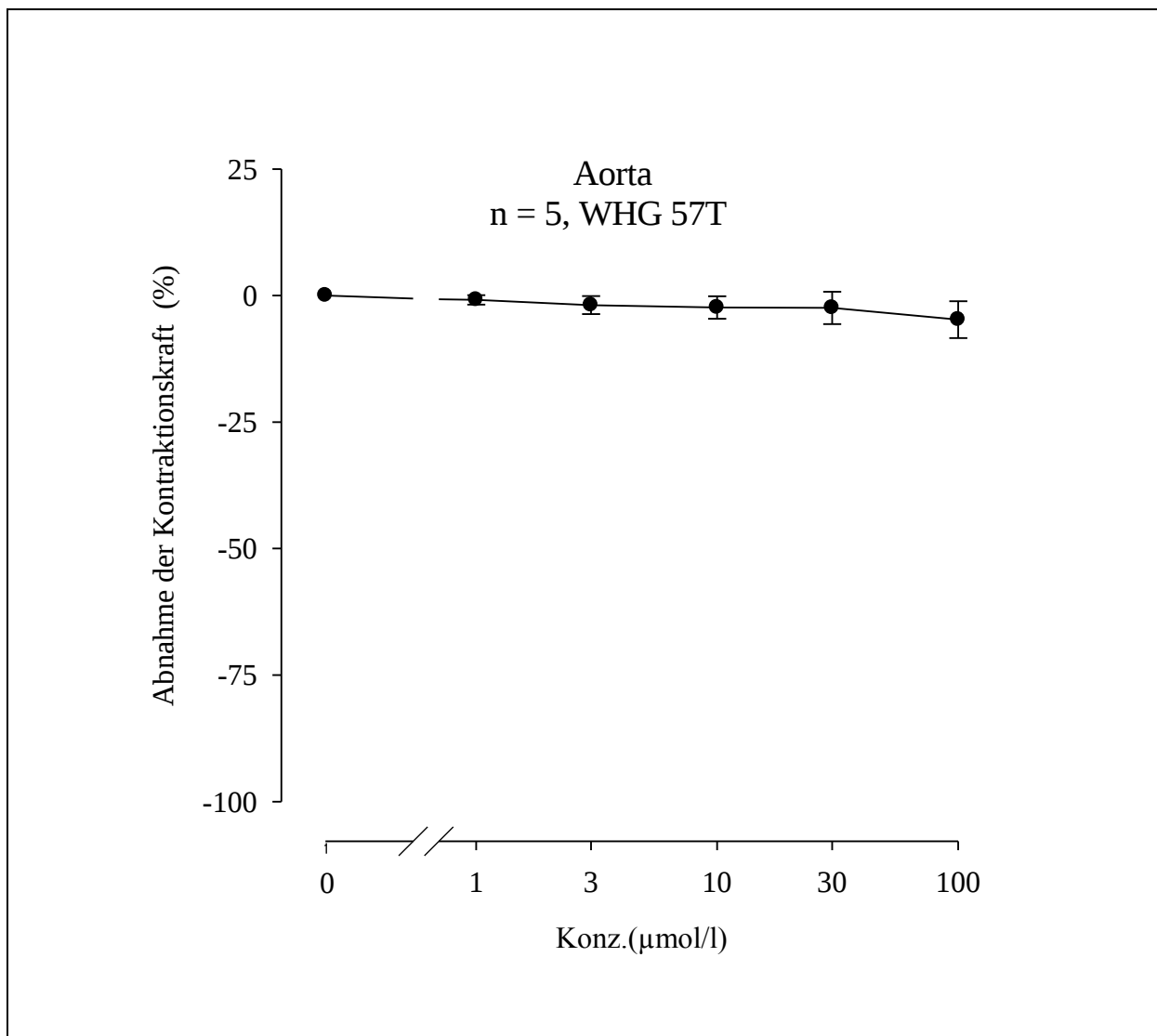


Abbildung 13

Legende zu Abbildung 13:

Diese graphische Darstellung veranschaulicht die Änderung der Kontraktionskraft der Aorta, ausgelöst durch die Testsubstanz WHG 57T, deren Konzentration alle 45 Minuten gesteigert wurde.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte dargestellt, deren Standardabweichungen (SEM) sind an den Balken erkennbar.

Abbildung 14: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta unter der Einwirkung von WHG 57T

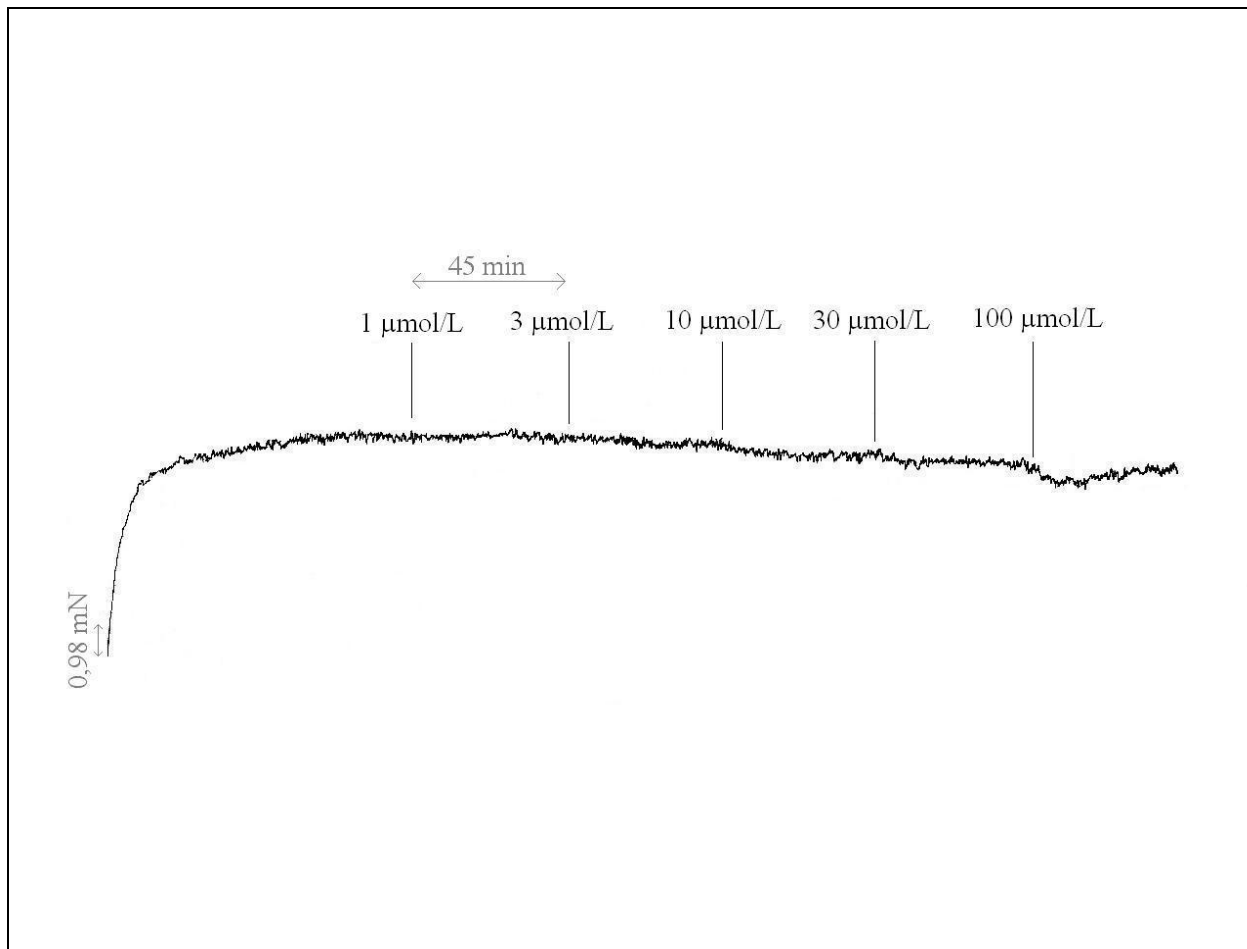


Abbildung 14

Legende zu Abbildung 14:

Zur Dokumentation des Einflusses der Testsubstanz WHG 57T auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde diese Aufzeichnung durch den Schreiber festgehalten. Nach Ausbildung eines konstanten Plateaus wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad erhöht und so Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L erreicht.

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.1.5 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Zur Untersuchung der Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft (f_c) wurde das terminale Ileum wie in Kapitel 2.3.5 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben in die Versuchsanordnung II eingespannt.

Nach der 20-minütigen Anpassungsphase wurde die physiologische Nährlösung durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung ausgetauscht, und so eine 100-prozentige Kontraktion des Versuchspräparates erzielt.

Nach dem Konstantwerden der Kontraktionskraft, was an der Ausbildung eines konstanten Plateaus in der Aufzeichnung des Schreibers erkannt werden konnte, wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen.

In Tabelle 7 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 8 Versuchen am terminalen Ileum sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 15 (siehe Seite 42) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der Testsubstanz WHG 57T in den unterschiedlichen Konzentrationen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums abgelesen werden.

Tabelle 7: Wirkung von WHG 57T auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

WHG 57T ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$12,42 \pm 1,37$	0 ± 0	8	—
1	$11,92 \pm 1,42$	$-4,70 \pm 1,73$	8	n.s.
3	$11,33 \pm 1,37$	$-9,70 \pm 2,20$	8	n.s.
10	$9,80 \pm 1,20$	$-21,72 \pm 3,80$	8	0,05
30	$7,70 \pm 1,08$	$-39,40 \pm 4,73$	8	0,05
100	$7,23 \pm 1,01$	$-42,45 \pm 4,37$	8	0,05

Tabelle 7

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WHG 57T bezogen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

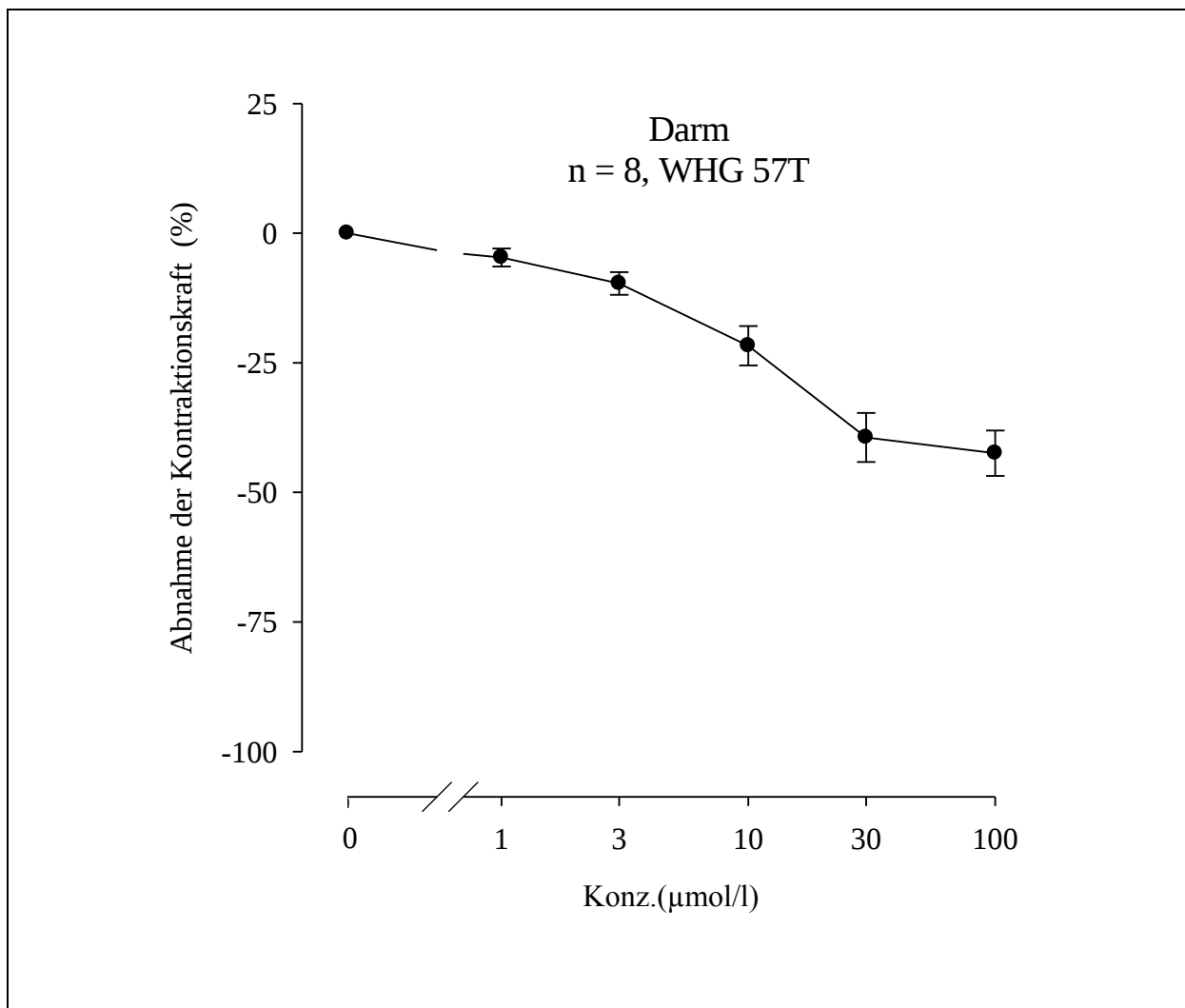


Abbildung 15

Legende zu Abbildung 15:

Aus dieser graphischen Darstellung ist die Wirkung der Testsubstanz WHG 57T in den unterschiedlichen Konzentrationen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums erkennbar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in $\mu\text{mol/L}$ und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind als schwarze Punkte dargestellt, deren Standardabweichungen (SEM) sind an den senkrechten Balken erkennbar.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileums unter der Einwirkung von WHG 57T

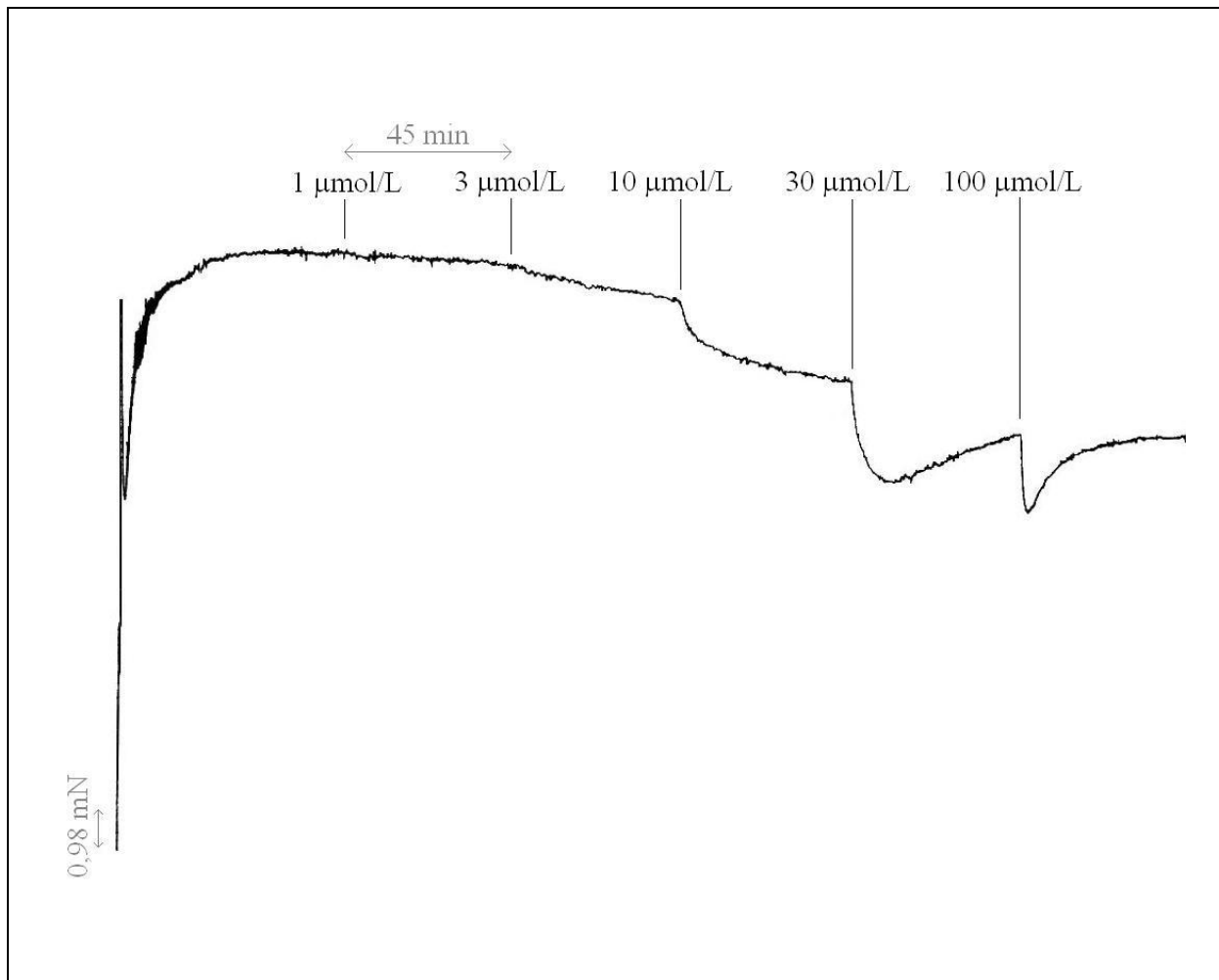


Abbildung 15

Legende zu Abbildung 16:

Diese durch den Schreiber aufgezeichnete Kontraktionskurve zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter dem Einfluss der Testsubstanz WHG 57T. Zunächst wurde die Ausbildung eines konstanten Plateaus abgewartet und so eine 100-prozentige Kontraktion garantiert und ein aussagekräftiger Kontrollwert erhalten. Dann wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad gesteigert, so dass Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L auf das Präparat des terminalen Ileums einwirkten.

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.2 Testsubstanz VMg

3.2.1 Wirkung auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Zur Untersuchung der Effekte der Testsubstanz VMg auf die Schlagfrequenz (f) wurde der rechte Vorhof wie in Kapitel 2.3.1 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben in die Versuchsanordnung I eingespannt.

Nachdem sich die Schlagfrequenz stabilisiert hatte, konnte der Kontrollwert durch den Schreiber festgehalten und bestimmt werden. Anschließend wurde mit der stufenweisen Substanzzugabe begonnen, und die Wirkung von VMg auf die Schlagfrequenz bei den einzelnen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L gemessen und durch den Schreiber dokumentiert.

In Tabelle 8 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 4 Versuchen am rechten Vorhof sowohl in Schläge pro Minute als auch als prozentuelle Änderung der Schlagfrequenz – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 17 (siehe Seite 45) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von VMg auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs abgelesen werden.

Tabelle 8: Wirkung von VMg auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

VMg (µmol/L)	f ± SEM (Schläge/min)	f ± SEM (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	195 ± 2,89	0 ± 0	4	—
1	193 ± 5,20	-1,28 ± 2,22	4	n.s.
3	194 ± 8,26	-0,66 ± 3,91	4	n.s.
10	200 ± 8,90	+2,54 ± 4,12	4	n.s.
30	195 ± 3,54	0 ± 1,07	4	n.s.
100	199 ± 2,39	+1,94 ± 0,65	4	n.s.

Tabelle 8

Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von VMg bezogen auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

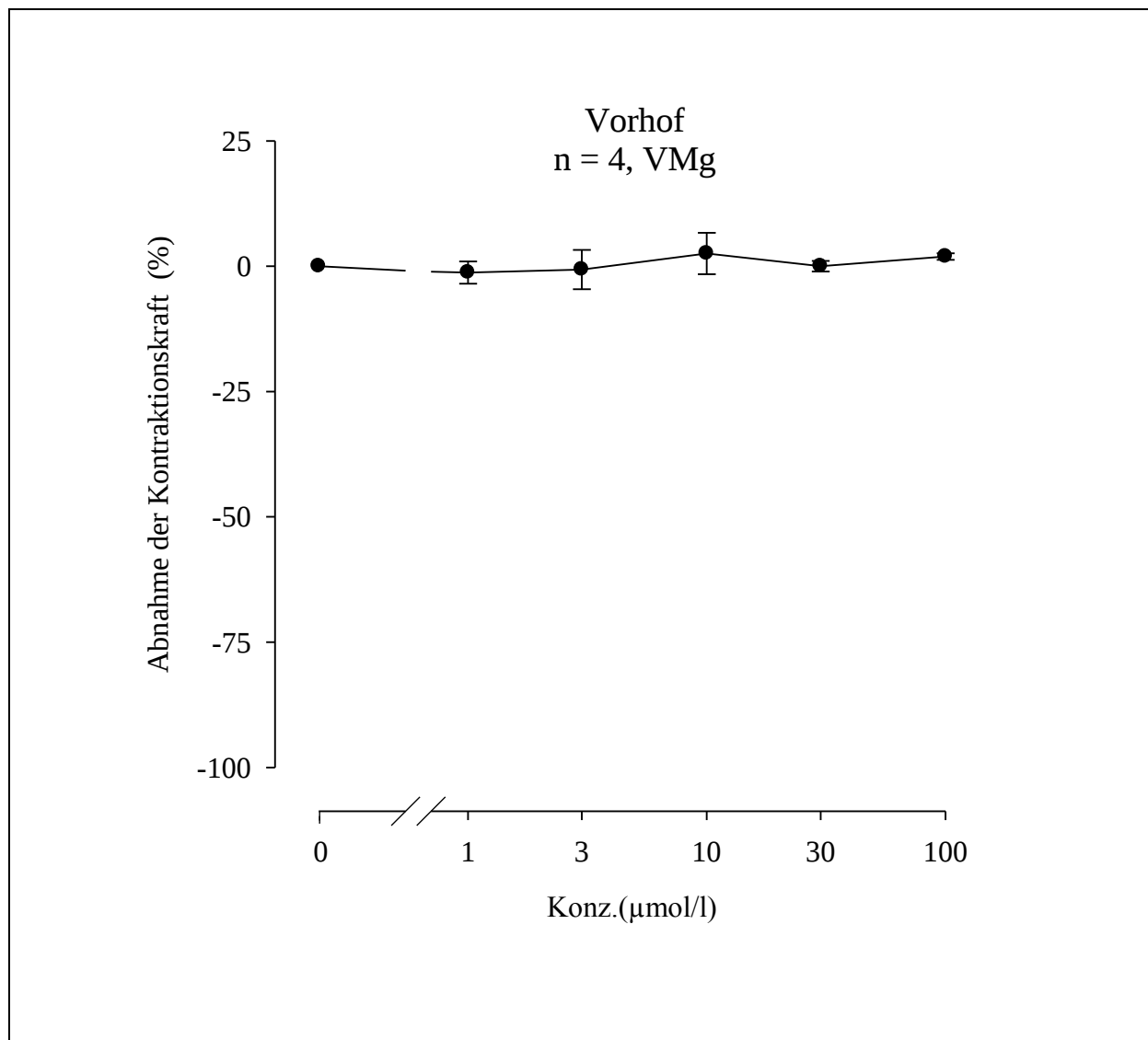


Abbildung 17

Legende zu Abbildung 17

Die Kurve spiegelt die Effekte der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz VMg auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wieder.

Auf der x-Koordinate ist die Konzentration in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Schlagfrequenz in % angeführt.

Die schwarzen Punkte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten der Einzelergebnisse der Versuche am rechten Vorhof und die senkrechten Balken veranschaulichen die zugehörigen Standardfehler.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionen des rechten Vorhofs unter der Einwirkung von VMg

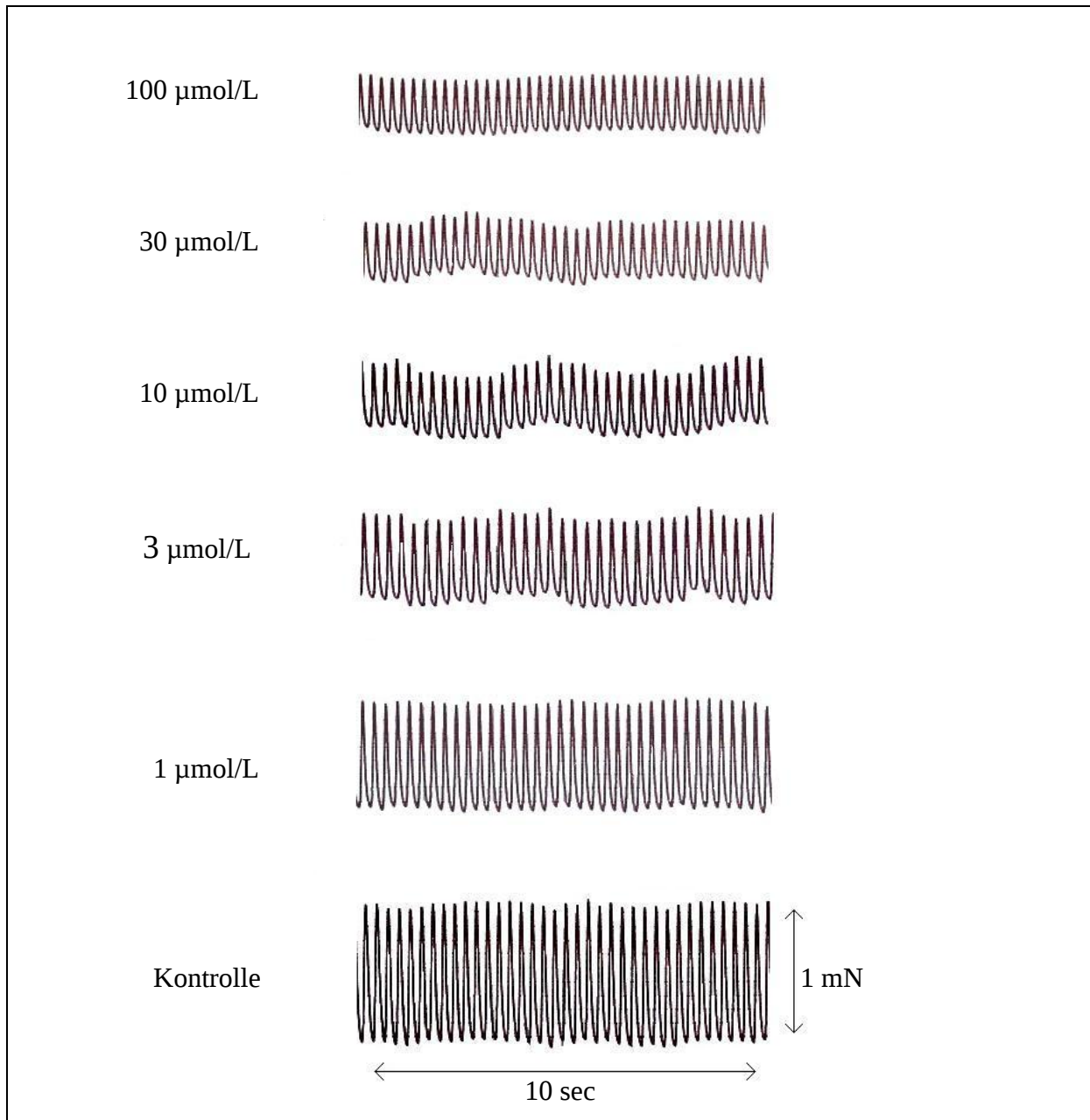


Abbildung 18

Legende zu Abbildung 18:

Die durch die einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz bewirkte Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurde durch Aufzeichnung der isometrischen Kontraktionen durch den Schreiber dokumentiert. Dabei wurde alle 5 Minuten für die Dauer von 12 Sekunden aufgezeichnet.

Die jeweiligen Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/L}$ wurden alle 45 Minuten durch die kumulative Zugabe der Substanzlösung erreicht.

3.2.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Zur Untersuchung der Effekte von VMg auf die Kontraktionskraft (f_c) wurden die Papillarmuskel wie in Kapitel 2.3.2 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben in die Versuchsanordnung I eingespannt.

Nach einer bis zu 90-minütigen Anpassungsphase, in der sich die Kontraktionskraft stabilisierte, wurde der Kontrollwert mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet und bestimmt. Anschließend wurde mit der Substanzzugabe begonnen. Nach jeweils 45 Minuten wurde die nächste Konzentration zugegeben, wobei alle 5 Minuten Kontraktionsamplituden mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet wurden.

In Tabelle 9 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 5 Versuchen am Papillarmuskel sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 19 (siehe Seite 48) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von VMg auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels abgelesen werden.

Tabelle 9: Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

VMg ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$1,14 \pm 0,44$	0 ± 0	5	—
1	$0,99 \pm 0,37$	$-13,08 \pm 3,35$	5	0,05
3	$1,00 \pm 0,39$	$-13,22 \pm 2,30$	5	0,05
10	$1,07 \pm 0,42$	$-8,57 \pm 3,99$	5	n.s.
30	$1,21 \pm 0,49$	$+2,45 \pm 4,02$	5	n.s.
100	$1,20 \pm 0,46$	$+3,44 \pm 5,57$	5	n.s.

Tabelle 9

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von VMg bezogen auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

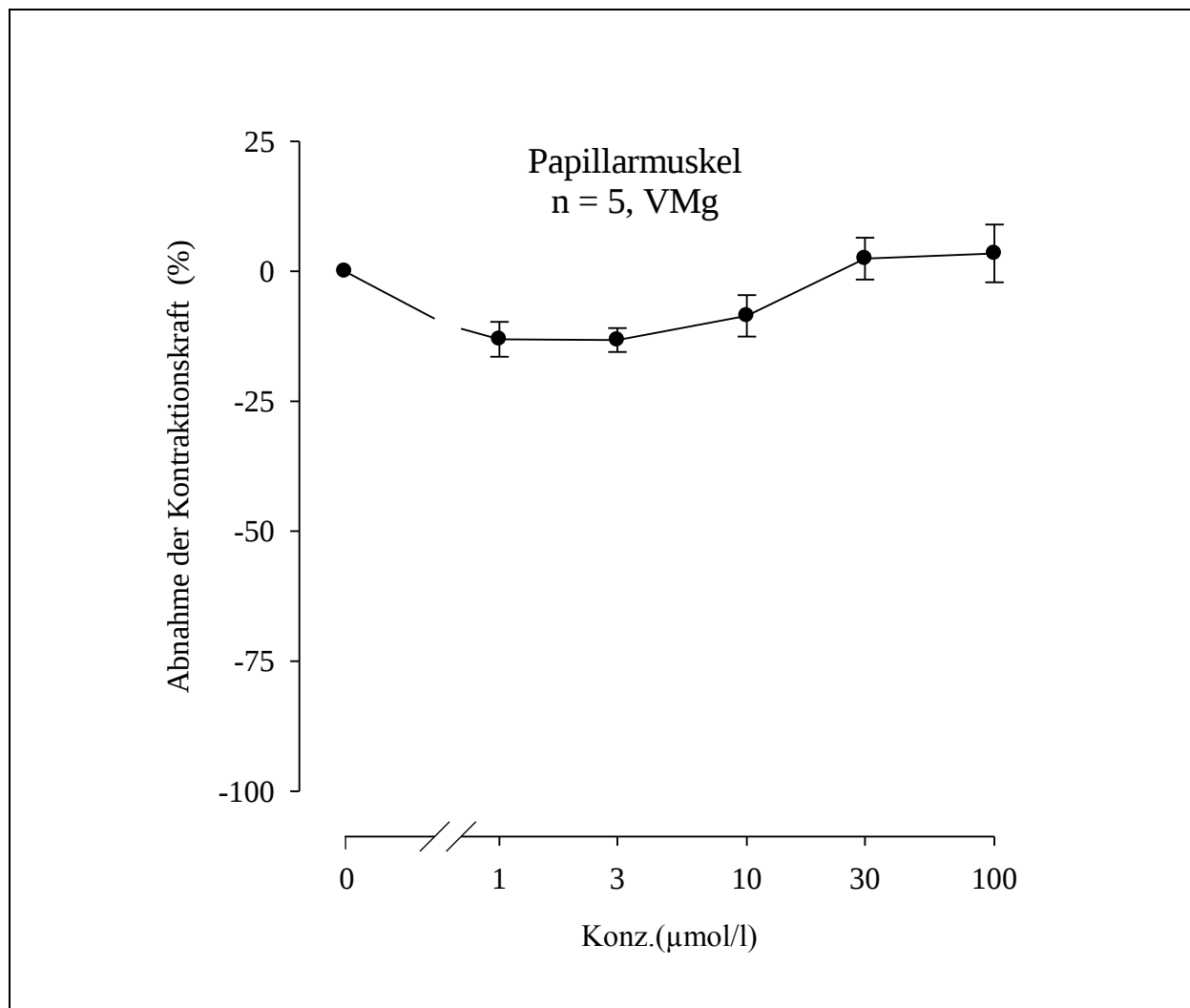


Abbildung 19

Legende zu Abbildung 19:

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve stellt die Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen der Stammlösung von VMg auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels graphisch dar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind an den schwarzen Punkten, die Standardfehler als vertikale Balken erkennbar.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionen eines elektrisch stimulierten Papillarmuskels unter der Einwirkung von VMg

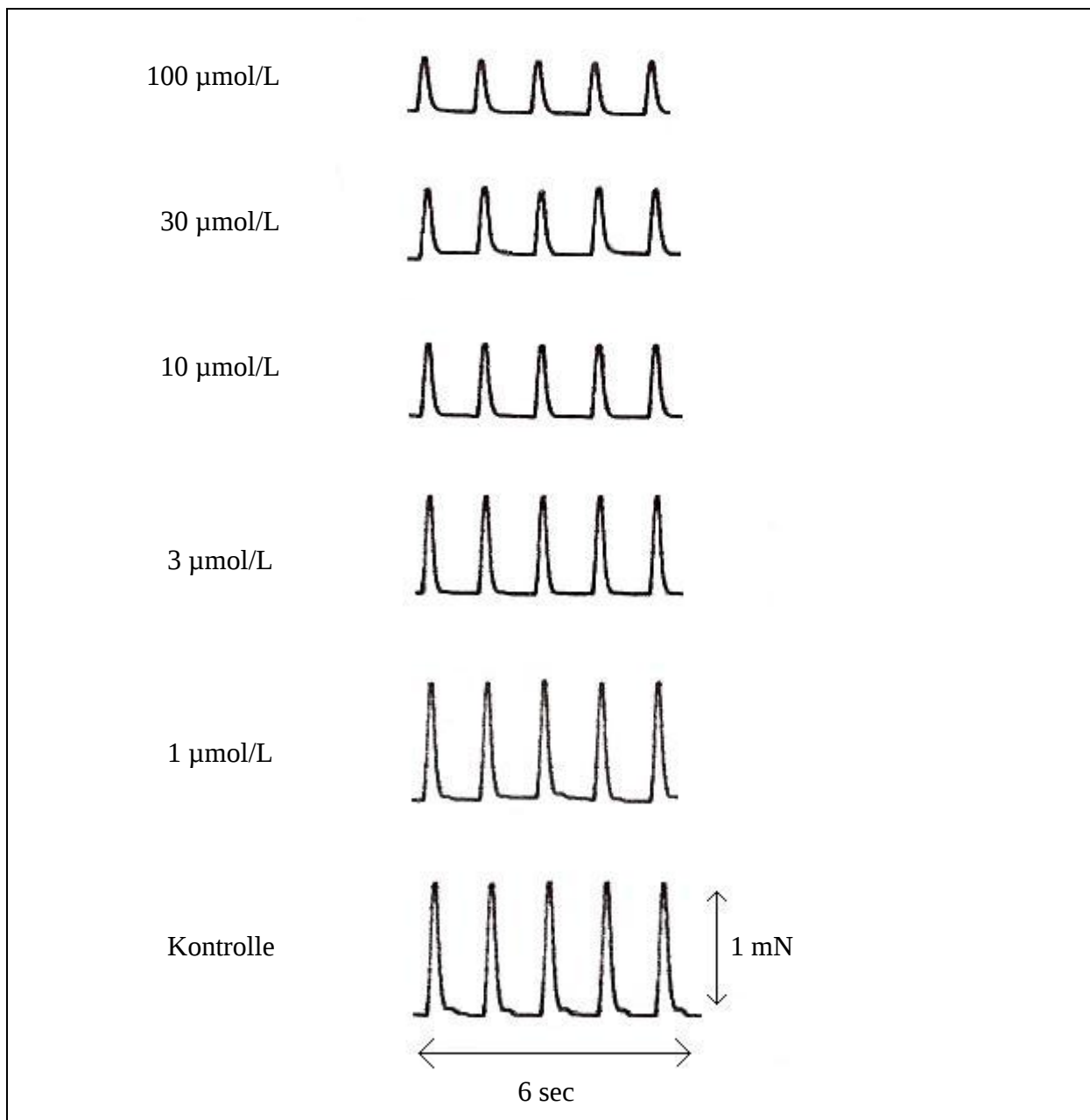


Abbildung 20

Legende zu Abbildung 20:

Diese Aufzeichnung des Schreibers zeigt die Kontraktionsamplituden eines isolierten und elektrisch stimulierten Papillarmuskels. An ihnen kann man die Änderung der Kontraktionskraft unter der Einwirkung der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz VMg erkennen. Wobei alle 45 Minuten die Konzentration gesteigert wurde, um so schließlich eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ im Organbad zu erreichen.

3.2.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Zur Untersuchung der Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft (f_c) wurde die Arteria pulmonalis wie in Kapitel 2.3.3 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben in die Versuchsanordnung II eingespannt.

Anschließend wurde das eingespannte Präparat der Arteria pulmonalis, nach einer 20-minütigen Anpassungsphase, mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung vorkontrahiert.

Nach der Kontrollphase, in der eine konstant-bleibende Kontraktion abgewartet wurde, und der Ermittlung des Kontrollwertes, konnte mit der stufenweisen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. In einem Abstand von 45 Minuten wurden so Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/L}$ im Organbad erreicht.

In Tabelle 10 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 4 Versuchen an der Arteria pulmonalis sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 21 (siehe Seite 51) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von VMg auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis abgelesen werden.

Tabelle 10: Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

VMg ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$13,21 \pm 1,21$	0 ± 0	4	—
1	$12,82 \pm 1,25$	$-3,06 \pm 0,84$	4	n.s.
3	$12,48 \pm 1,35$	$-5,96 \pm 2,16$	4	n.s.
10	$12,37 \pm 1,53$	$-7,22 \pm 3,77$	4	n.s.
30	$12,30 \pm 1,69$	$-8,07 \pm 5,30$	4	n.s.
100	$11,99 \pm 1,71$	$-10,51 \pm 5,96$	4	n.s.

Tabelle 10

Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von VMg bezogen auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

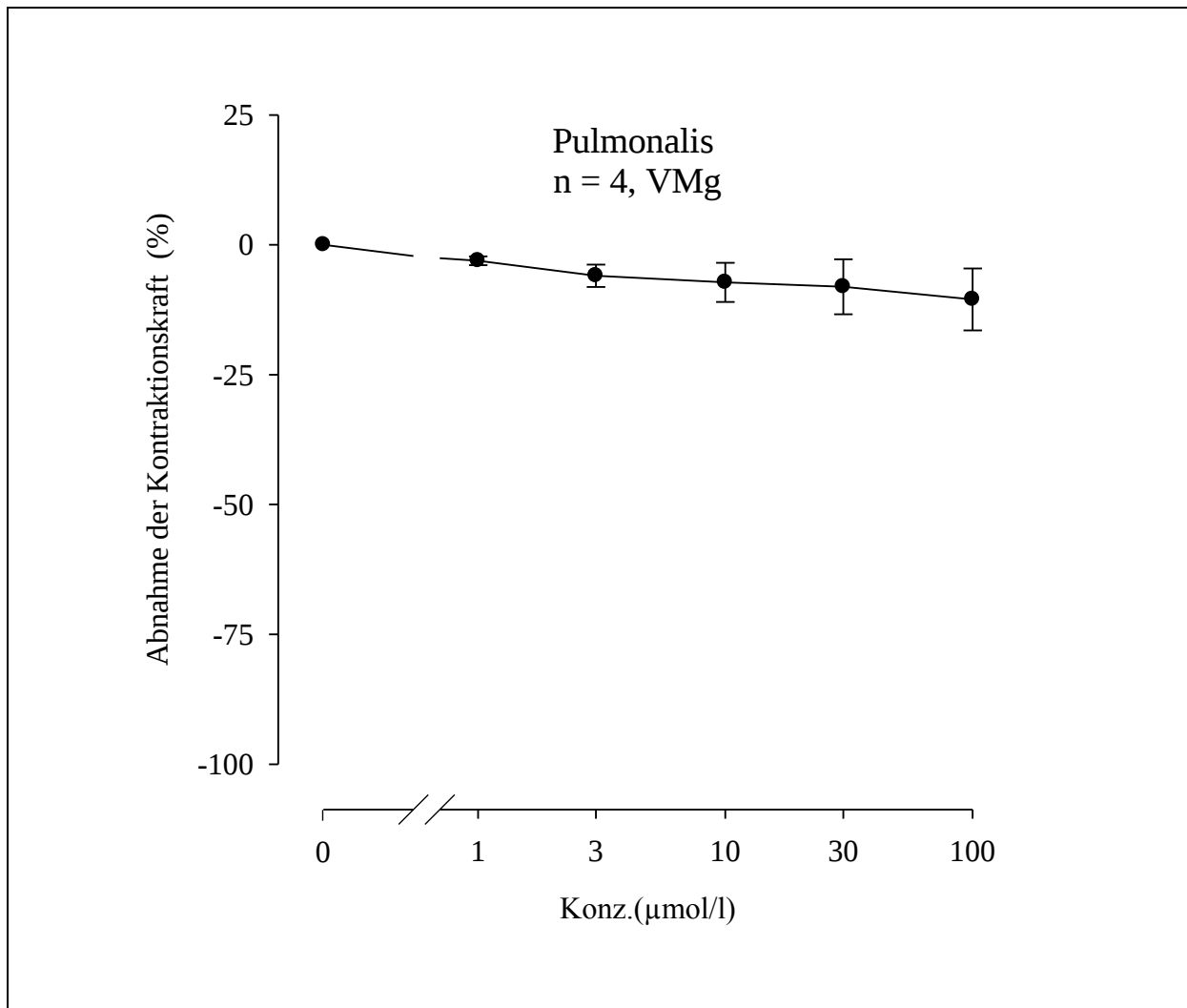


Abbildung 21

Legende zu Abbildung 21:

Aus dieser Graphik ist die, durch die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz ausgelöste, Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis erkennbar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte und deren Standardfehler (SEM) durch die vertikalen Balken veranschaulicht.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Arteria pulmonalis unter der Einwirkung von VMg

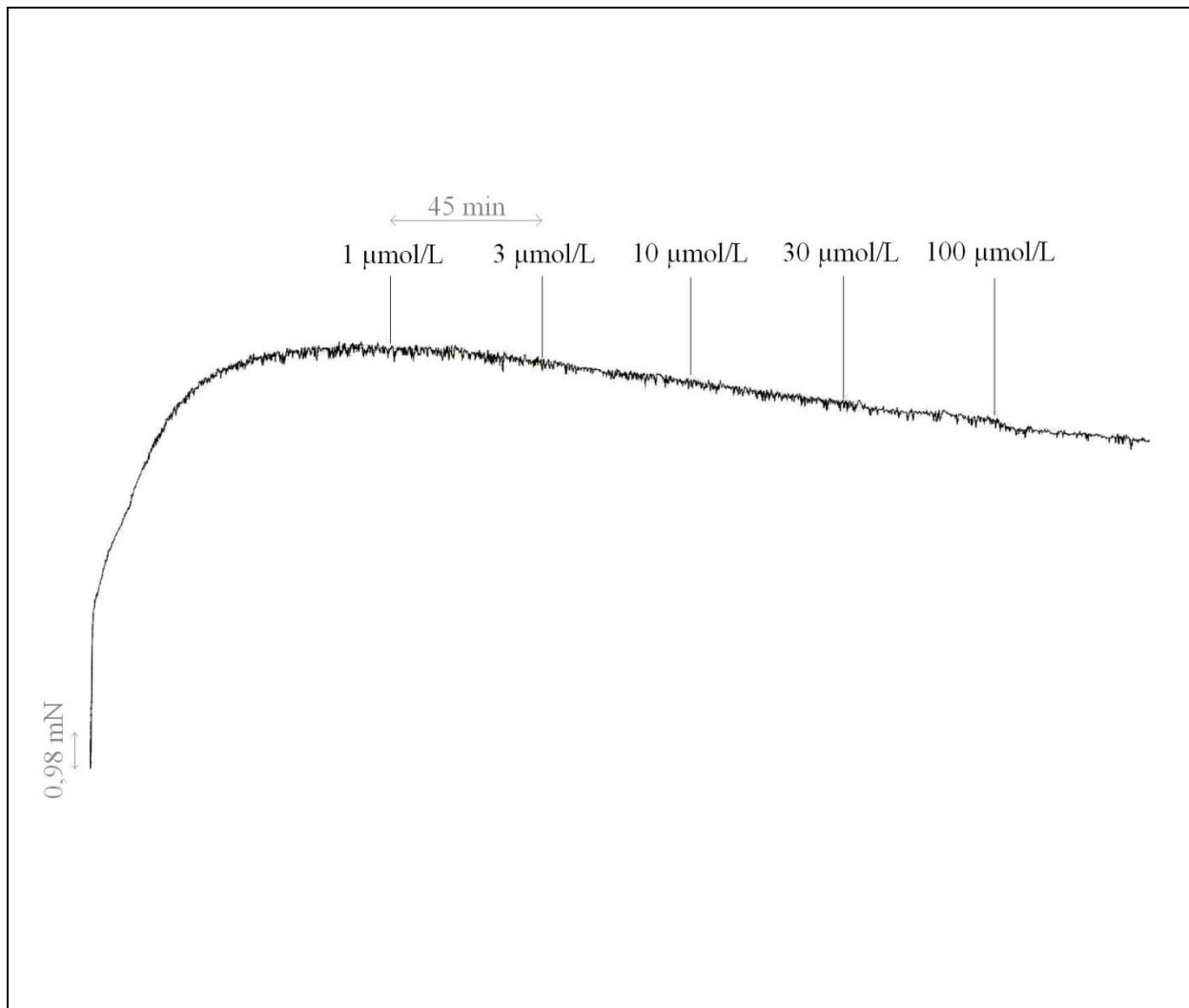


Abbildung 22

Legende zu Abbildung 22:

Diese Aufzeichnung durch den Schreiber zeigt die Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis unter dem Einfluss der Testsubstanz VMg. Zunächst wurde die Ausbildung eines konstanten Plateaus abgewartet, um so eine 100-prozentige Kontraktion zu gewährleisten und einen aussagekräftigen Kontrollwert zu erhalten. Dann wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad durch Zugabe der entsprechenden Volumina an Substanzlösung erhöht, so dass Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L auf das Versuchspräparat einwirkten.

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.2.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta

Um die Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft (f_c) der Aorta zu untersuchen, wurde die Aorta wie in Kapitel 2.3.4 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben in die Versuchsanordnung II eingespannt.

Nachdem eine 100-prozentige Kontraktion der Aorta durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung erreicht worden war und man so einen Kontrollwert erhielt, konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen wiederum 45 Minuten betrug.

In Tabelle 11 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 4 Versuchen an der Aorta sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 23 (siehe Seite 54) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten zu sehen.

Aus Tabelle und Kurve können also die Effekte der Testsubstanz VMg, in den unterschiedlichen Konzentrationen, auf die Kontraktionskraft der Aorta abgelesen werden.

Tabelle 11: Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft der Aorta

VMg ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$14,87 \pm 2,31$	0 ± 0	4	—
1	$14,70 \pm 2,31$	$-1,25 \pm 0,20$	4	n.s.
3	$14,63 \pm 2,15$	$-1,27 \pm 0,86$	4	n.s.
10	$14,70 \pm 2,15$	$-0,83 \pm 0,89$	4	n.s.
30	$14,39 \pm 2,05$	$-2,74 \pm 1,38$	4	n.s.
100	$13,89 \pm 1,74$	$-5,48 \pm 2,99$	4	n.s.

Tabelle 11

Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von VMg bezogen auf die Kontraktionskraft der Aorta

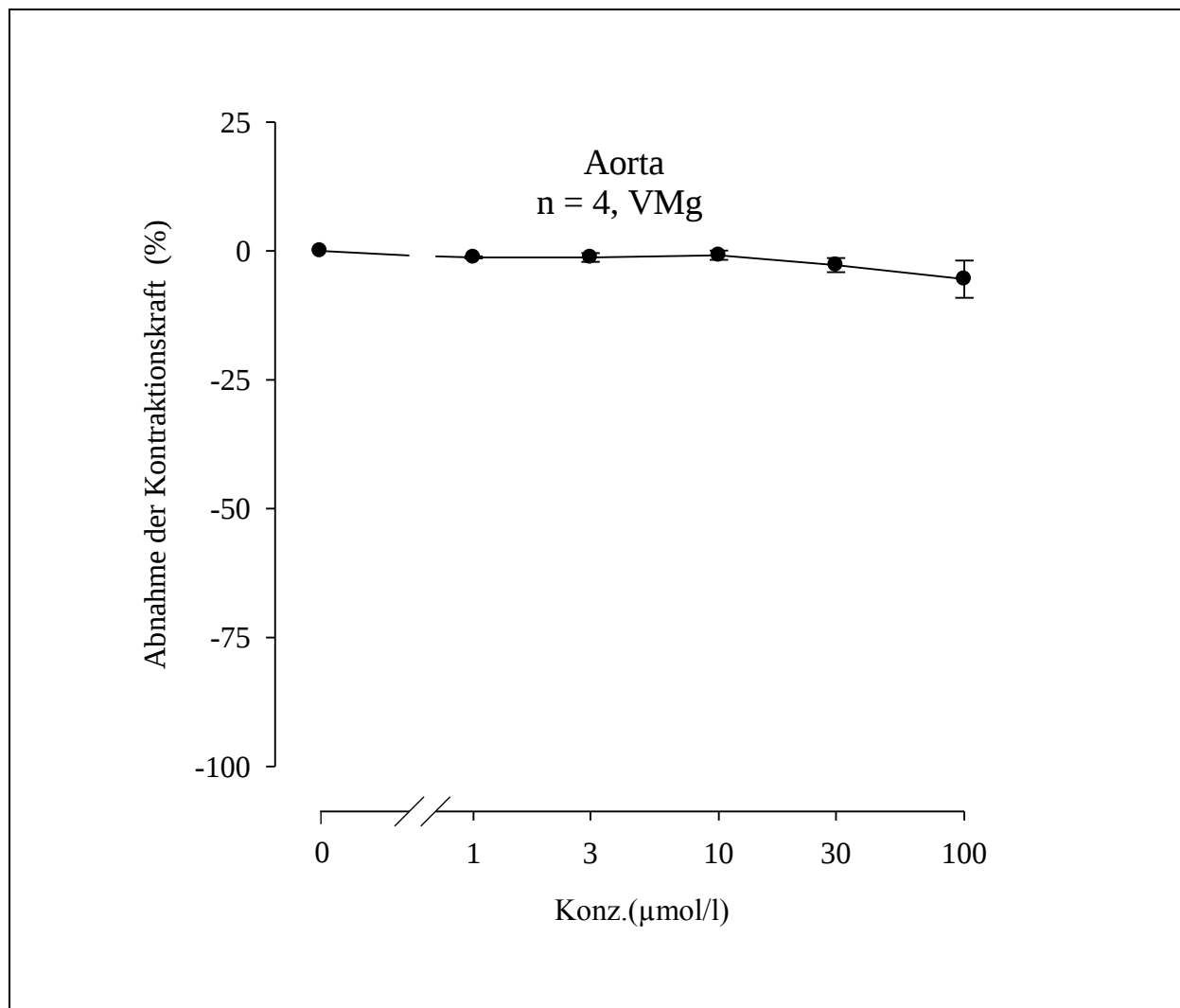


Abbildung 23

Legende zu Abbildung 23:

Diese graphische Darstellung veranschaulicht die Änderung der Kontraktionskraft der Aorta, ausgelöst durch die Testsubstanz VMg, deren Konzentration alle 45 Minuten gesteigert wurde.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte dargestellt, deren Standardabweichungen (SEM) sind an den Balken erkennbar.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta unter der Einwirkung von VMg

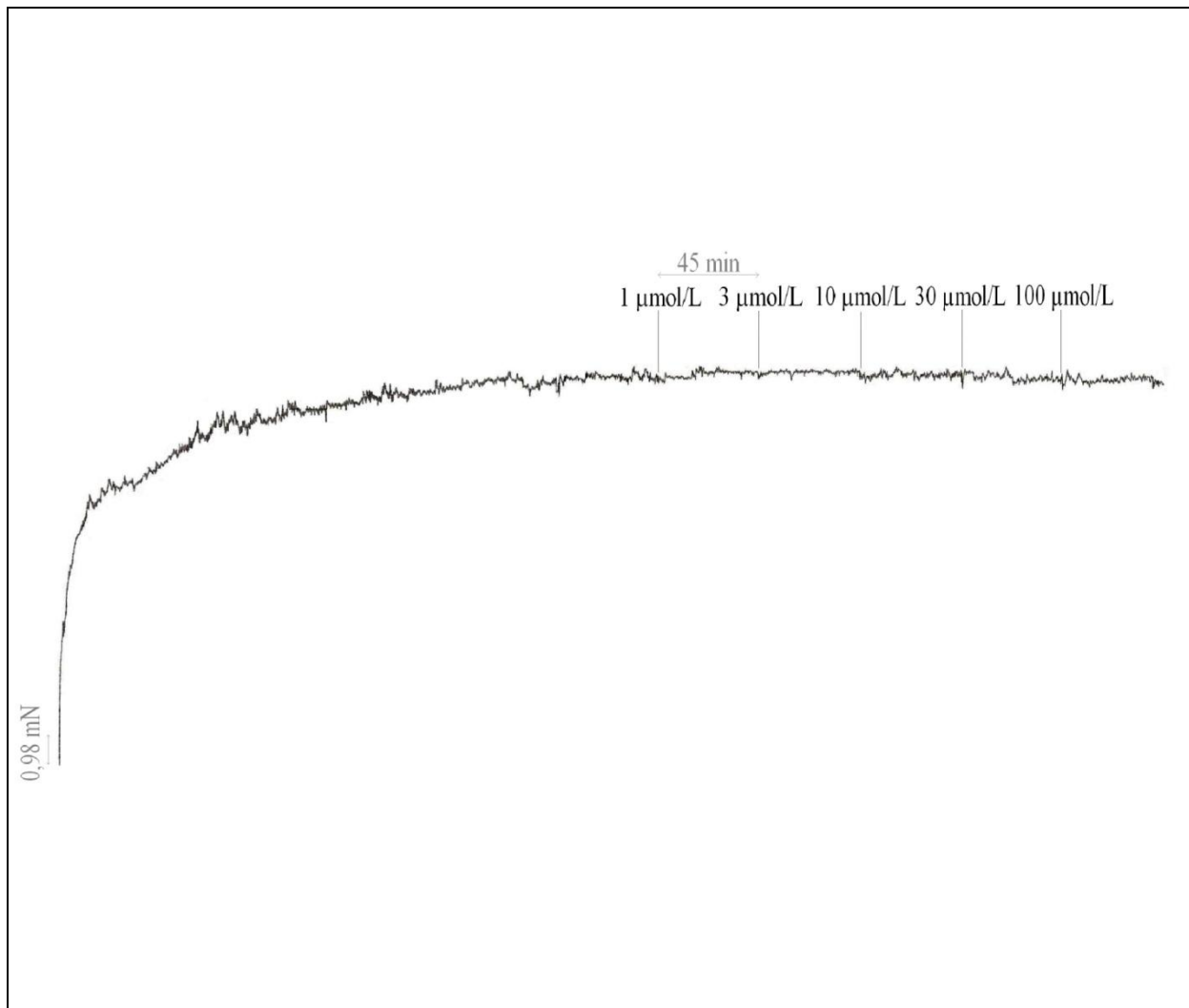


Abbildung 24

Legende zu Abbildung 24:

Zur Dokumentation des Einflusses der Testsubstanz VMg auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde diese Aufzeichnung durch den Schreiber festgehalten. Nach Ausbildung eines konstanten Plateaus wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad erhöht und so Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L erreicht.

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.2.5 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Zur Untersuchung der Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft (f_c) wurde das terminale Ileum wie in Kapitel 2.3.5 geschildert präpariert und wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben in die Versuchsanordnung II eingespannt.

Nach der 20-minütigen Anpassungsphase wurde die physiologische Nährlösung durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung ausgetauscht, und so eine 100-prozentige Kontraktion des Versuchspräparates erzielt.

Nach dem Konstantwerden der Kontraktionskraft, was an der Ausbildung eines konstanten Plateaus in der Aufzeichnung des Schreibers erkannt werden konnte, wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen.

In Tabelle 12 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 4 Versuchen am terminalen Ileum sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% Kontraktion entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

In Abbildung 25 (siehe Seite 57) ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu diesen Werten dargestellt.

Aus Tabelle und Kurve können also die Auswirkungen der Testsubstanz VMg in den unterschiedlichen Konzentrationen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums abgelesen werden.

Tabelle 12: Wirkung von VMg auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

VMg ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit P
0	$15,29 \pm 2,27$	0 ± 0	4	—
1	$15,37 \pm 2,25$	$+0,84 \pm 1,36$	4	n.s.
3	$15,20 \pm 2,31$	$-0,59 \pm 1,53$	4	n.s.
10	$15,14 \pm 2,22$	$-0,56 \pm 2,43$	4	n.s.
30	$14,51 \pm 2,19$	$-4,56 \pm 4,18$	4	n.s.
100	$14,67 \pm 2,07$	$-2,23 \pm 5,13$	4	n.s.

Tabelle 12

Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von VMg bezogen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

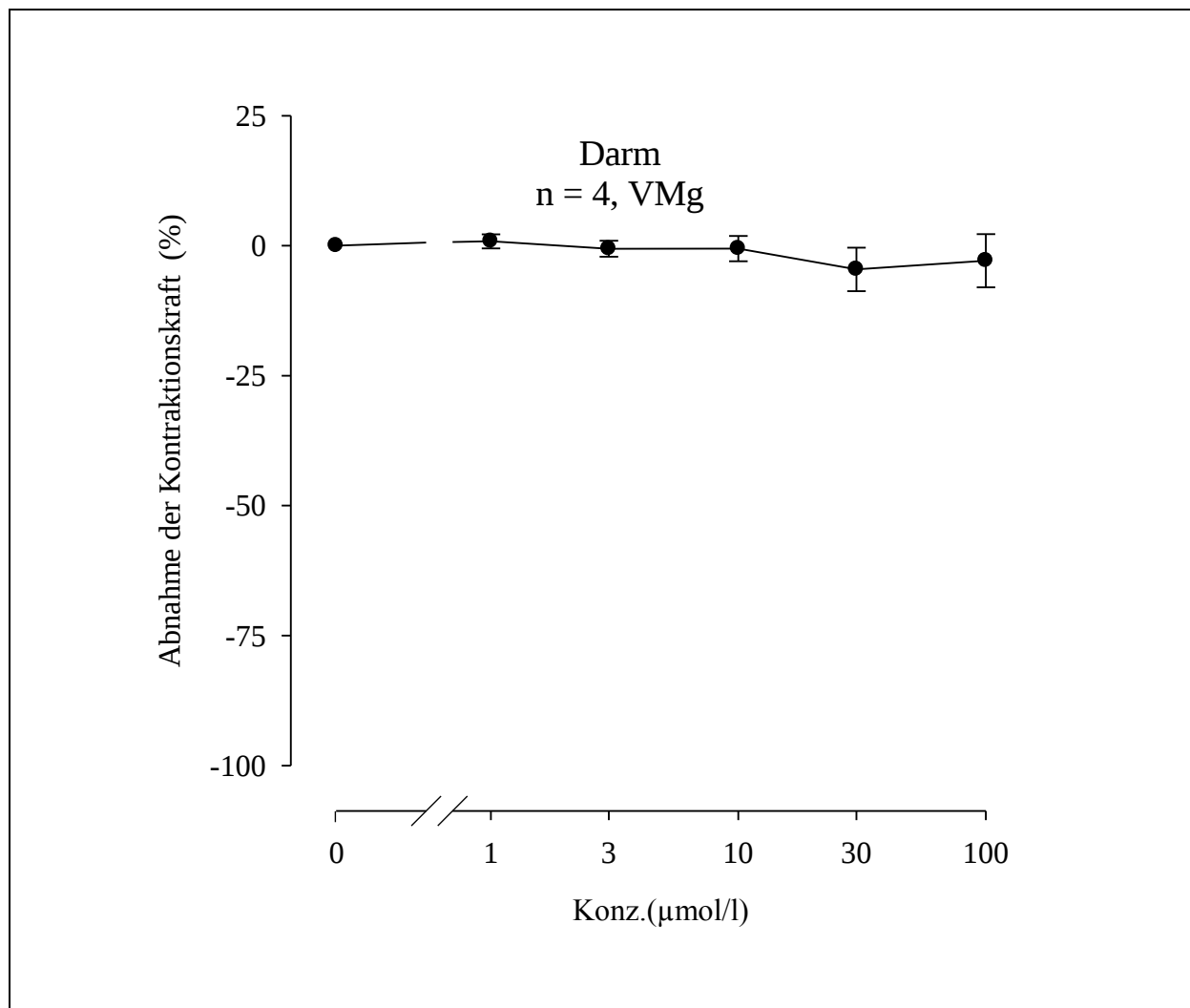


Abbildung 25

Legende zu Abbildung 25:

Aus dieser graphischen Darstellung ist die Wirkung der Testsubstanz VMg in den unterschiedlichen Konzentrationen auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums erkennbar.

Auf der x-Koordinate sind die Konzentrationen in µmol/L und auf der y-Koordinate die Änderung der Kontraktionskraft in % angegeben.

Die arithmetischen Mittelwerte sind als schwarze Punkte dargestellt, deren Standardabweichungen (SEM) sind an den senkrechten Balken erkennbar.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileums unter der Einwirkung von VMg

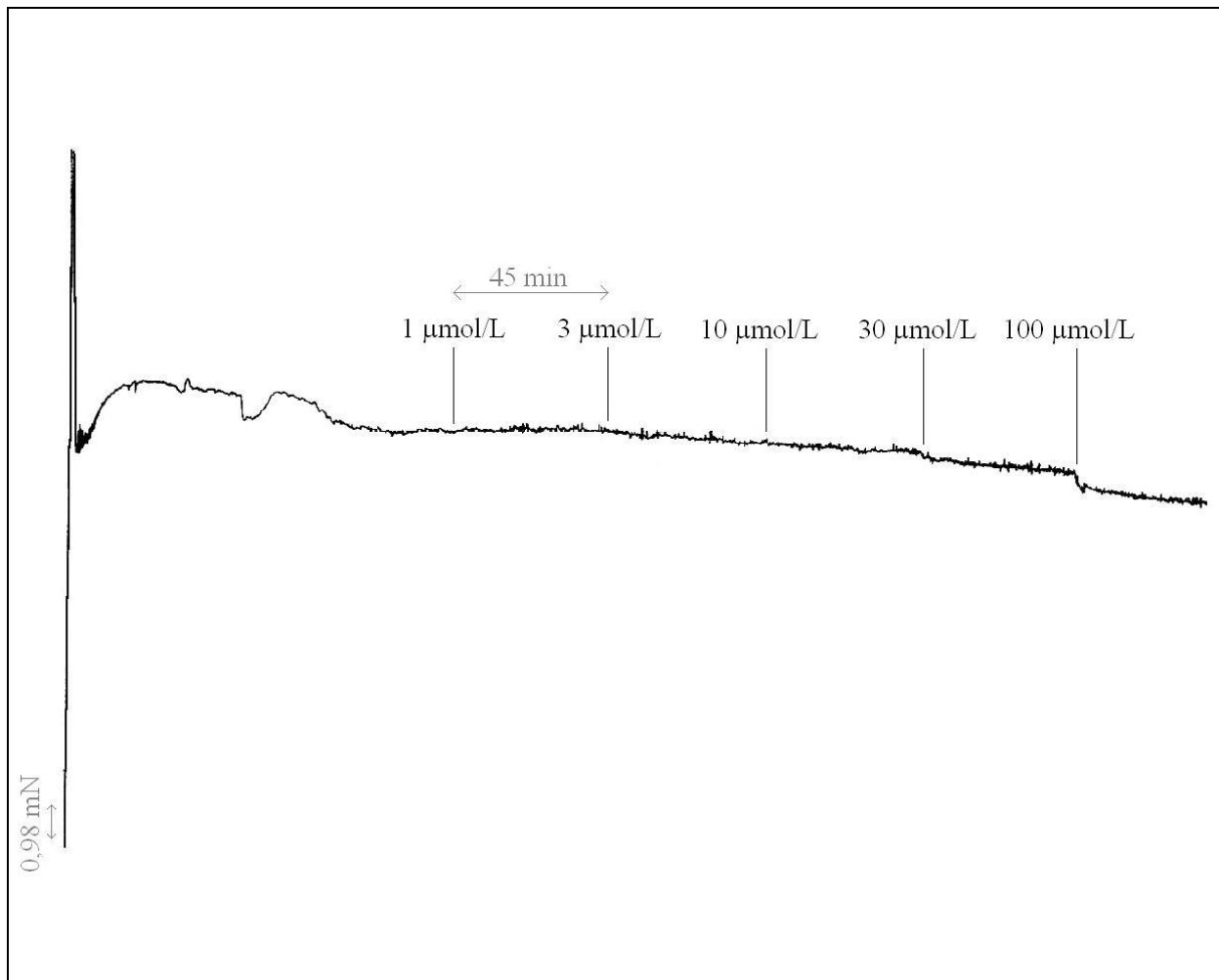


Abbildung 26

Legende zu Abbildung 26:

Diese durch den Schreiber aufgezeichnete Kontraktionskurve zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums unter dem Einfluss der Testsubstanz VMg.

Zunächst wurde die Ausbildung eines konstanten Plateaus abgewartet und so eine 100-prozentige Kontraktion garantiert und ein aussagekräftiger Kontrollwert erhalten. Dann wurde alle 45 Minuten die Konzentration der Testsubstanz im Organbad gesteigert, so dass Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L auf das Präparat des terminalen Ileums einwirkten.

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe in den entsprechenden Konzentrationen ist in der Originalaufzeichnung markiert.

3.3 Lösungsmittel DMSO

Aufgrund der Eigenwirkung des als Lösungsmittel für die Testsubstanzen WHG 57T und VMg verwendeten DMSO auf die isolierten Organe, musste das Ausmaß dieser Einflussnahme bestimmt werden, damit es dann von der Wirkung der Testsubstanzen unterschieden werden konnte.

Um das genaue Ausmaß der DMSO-Wirkung zu bestimmen, wurden Versuchsreihen an allen 5 Organen in gleicherweise wie mit den Testsubstanzen durchgeführt. Dabei wurde DMSO ebenfalls in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/L getestet, wobei die Einwirkzeit der einzelnen Konzentrationen 45 Minuten betrug.

3.3.1 Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

In Tabelle 13 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 3 Versuchen am Papillarmuskel sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

Tabelle 13: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

DMSO (µmol/L)	f_c ± SEM (mN)	f_c ± SEM (%)	Versuche (n)
0	0,47 ± 0,06	0 ± 0	3
1	0,46 ± 0,08	-3,70 ± 3,70	3
3	0,43 ± 0,07	-10,42 ± 3,84	3
10	0,36 ± 0,05	-23,79 ± 0,82	3
30	0,29 ± 0,03	-37,40 ± 2,32	3
100	0,25 ± 0,03	-45,95 ± 2,99	3

Tabelle 13

3.3.2 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

In Tabelle 14 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 3 Versuchen an der Arteria pulmonalis sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

Tabelle 14: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

DMSO ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)
0	$8,43 \pm 1,03$	0 ± 0	3
1	$8,62 \pm 0,93$	$+2,72 \pm 1,72$	3
3	$8,71 \pm 0,85$	$+4,01 \pm 3,05$	3
10	$8,69 \pm 0,96$	$+3,39 \pm 1,38$	3
30	$8,72 \pm 0,98$	$+3,74 \pm 1,24$	3
100	$8,66 \pm 1,00$	$+2,91 \pm 1,03$	3

Tabelle 14

3.3.3 Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta

In Tabelle 15 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 3 Versuchen an der Aorta sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

Tabelle 15: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)
0	$9,78 \pm 2,14$	0 ± 0	3
1	$10,00 \pm 2,23$	$+1,84 \pm 0,95$	3
3	$10,00 \pm 2,21$	$+1,93 \pm 0,91$	3
10	$9,95 \pm 2,20$	$+1,51 \pm 1,38$	3
30	$9,92 \pm 2,20$	$+1,09 \pm 2,46$	3
100	$9,83 \pm 2,15$	$+0,34 \pm 2,57$	3

Tabelle 15

3.3.4 Wirkung auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

In Tabelle 16 ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen von 3 Versuchen am terminalen Ileum sowohl in mN als auch als prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft – unter dem Gesichtspunkt dass der Kontrollwert 100% entspricht – angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

Tabelle 16: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

DMSO ($\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)
0	20,73 $\pm$ 3,56	0 $\pm$ 0	3
1	20,48 $\pm$ 3,65	-1,51 $\pm$ 0,64	3
3	19,99 $\pm$ 3,88	-4,65 $\pm$ 2,41	3
10	19,31 $\pm$ 4,08	-8,66 $\pm$ 4,03	3
30	18,74 $\pm$ 4,11	-11,59 $\pm$ 4,21	3
100	17,18 $\pm$ 3,92	-19,35 $\pm$ 4,32	3

Tabelle 16

4. Diskussion

4.1 Versuchspräparat rechter Vorhof

Aus den Versuchen am rechten Vorhof ergab sich, dass die Substanzen WHG 57T und VMg kaum einen Einfluss auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs hatten.

Die Testsubstanz WHG 57T vermochte in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ die Schlagfrequenz bloß um $1,68 \pm 2,90$ % gegenüber dem Kontrollwert zu erhöhen.

Auch die Testsubstanz VMg konnte die ursprüngliche Schlagfrequenz von $195 \pm 2,89$ Schläge/min kaum verändern, bei der höchsten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ betrug die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs $199 \pm 2,39$ Schläge/min und damit um nur $1,94 \pm 0,65$ % mehr als vor Zugabe der Testsubstanz.

Tabelle 17: Vergleich der Wirkung von WHG 57T und VMg auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Testsubstanz	$f \pm \text{SEM} (\%)$ (0 $\mu\text{mol/L}$)	$f \pm \text{SEM} (\%)$ (100 $\mu\text{mol/L}$)
WHG 57T	0 ± 0	$+1,68 \pm 2,90$
VMg	0 ± 0	$+1,94 \pm 0,65$

Tabelle 17

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle zeigt die beiden Testsubstanzen WHG 57T und VMg im Vergleich, es sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentuellen Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

4.2 Versuchspräparat Papillarmuskel

Bei den Versuchen am Papillarmuskel erwiesen sich die Testsubstanzen WHG 57T und VMg als nur wenig ergiebig, denn es konnte kein nennenswerter Einfluss der beiden Substanzen auf die Kontraktionskraft festgestellt werden.

Die Testsubstanz WHG 57T bewirkte in ihrer höchsten getesteten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ eine Erhöhung der Kontraktionskraft auf $0,59 \pm 0,06 \text{ mN}$, ausgehend von einem Kontrollwert von $0,58 \pm 0,07 \text{ mN}$, das entspricht einer Steigerung um $2,18 \pm 2,96 \%$.

Nach Zugabe der Testsubstanz VMg in der höchsten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$, erhöhte sich die Kontraktionskraft des Papillarmuskels von einem Kontrollwert von $1,14 \pm 0,44 \text{ mN}$ auf $1,20 \pm 0,46 \text{ mN}$, also um $3,44 \pm 5,57 \%$.

Tabelle 18: Vergleich der Wirkung von WHG 57T und VMg auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Testsubstanz	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (0 $\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (100 $\mu\text{mol/L}$)
WHG 57T	0 ± 0	$+2,18 \pm 2,96$
VMg	0 ± 0	$+3,44 \pm 5,57$

Tabelle 18

Legende zu Tabelle 18:

Die Tabelle zeigt die beiden Testsubstanzen WHG 57T und VMg im Vergleich, es sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentuellen Änderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

4.3 Versuchspräparat Arteria pulmonalis

Die Versuche an der Arteria pulmonalis ergaben, dass die Testsubstanzen WHG 57T und VMg eine nur minimale relaxierende Wirkung auf die Arteria pulmonalis ausüben.

Die Testsubstanz WHG 57T vermochte in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis um $16,55 \pm 2,87 \%$ zu reduzieren. Ausgehend von einer maximalen Vorkontraktion - erzielt durch Zugabe der 60 mmolaren KCl-Lösung – von $10,45 \pm 3,23 \text{ mN}$, reduzierte sich die Kontraktionskraft auf $8,79 \pm 2,81 \text{ mN}$.

Die Testsubstanz VMg zeigte in der Versuchsreihe eine noch schwächere Wirkung auf die Kontraktionskraft als die Substanz WHG 57T. Ausgehend von einer maximalen Vorkontraktion von $13,21 \pm 1,21 \text{ mN}$, reduzierte sich bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis auf $11,99 \pm 1,71 \text{ mN}$, das entspricht einer Reduktion um $10,51 \pm 5,96 \%$.

Tabelle 19: Vergleich der Wirkung von WHG 57T und VMg auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Testsubstanz	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (0 $\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (100 $\mu\text{mol/L}$)
WHG 57T	0 ± 0	$-16,55 \pm 2,87$
VMg	0 ± 0	$-10,51 \pm 5,96$

Tabelle 19

Legende zu Tabelle 19:

Die Tabelle zeigt die beiden Testsubstanzen WHG 57T und VMg im Vergleich, es sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentuellen Änderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

4.4 Versuchspräparat Aorta

Bei den Versuchen an der Aorta zeigte sich, dass sowohl die Testsubstanz WHG 57T als auch die Testsubstanz VMg eine nur äußerst geringe relaxierende Wirkung auf die Aorta besitzen.

Unter dem Einfluss der Testsubstanz WHG 57T in der Konzentration 100 $\mu\text{mol/L}$ reduzierte sich die Kontraktionskraft der Aorta von $6,62 \pm 0,56 \text{ mN}$ auf $6,39 \pm 0,79 \text{ mN}$, das entspricht lediglich einer Reduktion der Kontraktionskraft um $4,75 \pm 3,63 \%$.

Die Testsubstanz VMg konnte in ihrer höchsten getesteten Konzentration die Kontraktionskraft der vorkontrahierte Aorta um $5,48 \pm 2,99 \%$ verringern. Ausgehend von einer Kontraktionskraft von $14,87 \pm 2,31 \text{ mN}$ reduzierte sich bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ die Kontraktionskraft auf $13,89 \pm 1,74 \text{ mN}$.

Tabelle 20: Vergleich der Wirkung von WHG 57T und VMg auf die Kontraktionskraft der Aorta

Testsubstanz	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (0 $\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (100 $\mu\text{mol/L}$)
WHG 57T	0 ± 0	$-4,75 \pm 3,63$
VMg	0 ± 0	$-5,48 \pm 2,99$

Tabelle 20

Legende zu Tabelle 20:

Die Tabelle zeigt die beiden Testsubstanzen WHG 57T und VMg im Vergleich, es sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentuellen Änderung der Kontraktionskraft der Aorta angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

4.5 Versuchspräparat terminales Ileum

Die Versuche am terminalen Ileum ergaben dass, während die Testsubstanz WHG 57T eine schwach spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum besitzt, die Testsubstanz VMg die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des terminalen Ileums kaum zu beeinflussen vermag.

Bei der Versuchsreihe am terminalen Ileum zeigte die Testsubstanz WHG 57T eine spasmolytische Wirkung, doch auch hier konnte, wie in allen anderen Versuchsreihen mit den anderen untersuchten Organen, kein EC_{50} erreicht werden.

Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/L}$ der Testsubstanz WHG 57T kam es zu einer Reduktion der Kontraktionskraft um $42,45 \pm 4,37 \%$, denn ausgehend von einer maximalen Kontraktion von $12,42 \pm 1,37 \text{ mN}$, wurde die Kontraktionskraft auf $7,23 \pm 1,01 \text{ mN}$ verringert.

Diese leicht spasmolytische Wirkung könnte auf eine eventuelle Freisetzung von Schwefelwasserstoff aus der Substanz WHG 57T zurückzuführen sein. Die relaxierenden Effekte von WHG 57T könnten aber vermutlich auch durch eine calciumantagonistische Wirkung zu Stande kommen, da die Testsubstanz als möglicher Calciumkanalblocker konzipiert wurde.

Hingegen vermochte die Testsubstanz VMg in der höchsten untersuchten Konzentration die Kontraktionskraft des terminalen Ileums bloß um $2,23 \pm 5,13 \%$ zu reduzieren, obwohl auch bei dieser Substanz aufgrund der chemischen Struktur eine mögliche Schwefelwasserstoff-Freisetzung hätte erwartet werden können.

Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/L}$ konnte die maximale Kontraktion von $15,29 \pm 2,27 \text{ mN}$ auf $14,67 \pm 2,07 \text{ mN}$ verringert werden.

Tabelle 21: Vergleich der Wirkung von WHG 57T und VMg auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Testsubstanz	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (0 $\mu\text{mol/L}$)	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ (100 $\mu\text{mol/L}$)
WHG 57T	0 ± 0	$-42,45 \pm 4,37$
VMg	0 ± 0	$-2,23 \pm 5,13$

Tabelle 21

Legende zu Tabelle 21:

Die Tabelle zeigt die beiden Testsubstanzen WHG 57T und VMg im Vergleich, es sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentuellen Änderung der Kontraktionskraft des terminalen Ileums angegeben. Zusätzlich sind die zugehörigen Standardfehler (SEM) angeführt.

5. Zusammenfassung

Um die pharmakologische Wirkung zweier neuer Substanzen zu erforschen, wurden im Zuge der Diplomarbeit, diese Substanzen an isolierten Organen aus Meerschweinchen getestet.

Diese neu synthetisierten Substanzen, **WHG 57T** und **VMg**, wurden hinsichtlich einer möglichen spasmolytischen, vasodilatierenden, chronotropen bzw. inotropen Wirkung untersucht, indem sie an isolierten Präparaten des terminalen Ileums, der Aorta, der Arteria pulmonalis, des Vorhofs bzw. an präparierten Papillarmuskeln getestet wurden.

Um die Effekte der Testsubstanzen untersuchen zu können, wurden die Präparate in jeweils für den Versuch geeignete Apparaturen eingespannt, in denen das Organ durch Nährlösung und Gaszufuhr weiter am Leben gehalten werden und die Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf das Organ stattfinden sollte, indem eine Stammlösung der Substanz in steigenden Konzentrationen der Nährlösung zugesetzt wurde. Die Versuchsanordnung war außerdem mit einem Amplifier und einem Schreiber verbunden, so konnten alle Versuchsreihen dokumentiert und aufgrund dieser Originalaufzeichnungen ausgewertet werden.

Die Präparation der Organe, die immer gleich im Anschluss an die Tötung des Meerschweinchens erfolgte, sollte die Anbringung der isolierten Organe in den Versuchsanordnungen und die ordnungsgemäße Durchführung der Versuchsreihen ermöglichen.

Aus den Versuchsreihen ergab sich, dass die Substanz **WHG 57T** eine schwach spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileum besitzt, jedoch auf die anderen untersuchten Organe keine signifikanten Effekte aufweist.

Die Testsubstanz **VMg** erwies sich als nur wenig effektiv an allen getesteten Organen. Sowohl an den Herzpräparaten als auch an Aorta, Arteria pulmonalis und terminalem Ileum konnten keine nennenswerten Wirkungen nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2006) Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, Germany S. 188-189

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 28;237(3):527-31

Jacob C, Anwar A, Burkholz T (2008) Perspective on Recent Developments on Sulfur-Containing Agents and Hydrogen Sulfide Signaling. *Planta Med* 2008; 74: 1580–1592

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

Lippert H (2003) Lehrbuch Anatomie, 6. Auflage, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, Germany S. 53, 226, 235-236

Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Germany S. 805-806

Misler S, Stimulus transduction in metabolic sensor cells. In: *Cell Physiology Source Book* (1st ed.), edited by N. Sperelakis. San Diego, CA: Academic, 1995, chapt. 39, p. 523-536

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Germany S. 145-146, 543-544, 569, 571-572, 602

Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological Dissection of Multiple Types of Ca²⁺ Channel Currents in Rat Cerebellar Granule Neurons. *The Journal of Neuroscience*, April 1995, 15(4): 2995-3012

Schmidt RF, Lang F (2007) Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 30. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Germany S. 43, 56, 63-64, 72, 595, 620

Silbernagl S, Despopoulos A (2003) Taschenatlas der Physiologie, 6., korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany S. 32, 46, 62, 192-194

Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998) ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 274: C25-C37, 1998

Zhao W, Wang R (2002) H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H474-H480, 2002

7. Curriculum Vitae

Name: Nicola Hinteregger

Geburtsdatum: 29.7.1984

Geburtsort: Wien

1990-1993: Volksschule Ruckergasse, 1120 Wien

1993-1994: Volksschule Maria Enzersdorf

1994-1996: Sportgymnasium Maria Enzersdorf

1996-2002: BG Bachgasse, Mödling

2002-2009: Pharmaziestudium an der Hauptuniversität Wien

Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie, Wien

August 2002: Apotheke „Zur Mariahilf“, 1230 Wien

Februar 2003: Apotheke „Zur Mariahilf“, 1230 Wien
