



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

**Untersuchung der biologischen Aktivität der beiden neu synthetisierten Testsubstanzen WHGTeoT und SWS11HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin: Bernadette Händlhuber

Matrikelnummer: 0302703

Studienrichtung: A 449 Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. Christian Studenik

Wien, im August 2010

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken die mich im Laufe meines gesamten Studiums und während meiner Diplomarbeit unterstützt und begleitet haben.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, aussprechen. Danke, dass Ihr immer für mich da seid wenn ich Euch brauche. Ohne Eure moralische und finanzielle Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen.

Ein besonderer Dank gilt auch dem äußerst hilfsbereiten und freundlichen Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. Christian Studenik, der mir durch sein Engagement und Fachwissen immer zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker, Frau Dr. Gerda Brunhofer und Dr. Walter Granig für die Synthese und Bereitstellung der beiden Testsubstanzen bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich auch noch bei meinen lieben Kollegen bedanken, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Danke

|       |                                               |    |
|-------|-----------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung.....                               | 1  |
| 1.1   | Schwefelwasserstoff – H <sub>2</sub> S .....  | 1  |
| 1.1.1 | Allgemein.....                                | 1  |
| 1.1.2 | Herstellung.....                              | 2  |
| 1.1.3 | Giftwirkung.....                              | 2  |
| 1.1.4 | Wirkung .....                                 | 2  |
| 1.2   | Muskelgewebe.....                             | 3  |
| 1.2.1 | Quergestreifte Muskulatur .....               | 4  |
| 1.2.2 | Glatte Muskulatur .....                       | 4  |
| 1.2.3 | Herzmuskulatur.....                           | 5  |
| 2     | Ziel der Diplomarbeit.....                    | 6  |
| 3     | Material und Methodik .....                   | 7  |
| 3.1   | Versuchstiere.....                            | 7  |
| 3.2   | Isolierung und Präparation der Organe: .....  | 8  |
| 3.2.1 | Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof).....   | 9  |
| 3.2.2 | Musculus papillaris (Papillarmuskel) .....    | 9  |
| 3.2.3 | Arteria pulmonalis (Lungenarterie) .....      | 10 |
| 3.2.4 | Terminales Ileum (Darm) .....                 | 10 |
| 3.2.5 | Aorta descendens .....                        | 11 |
| 3.3   | Physiologische Nährstofflösung (Tyrode) ..... | 12 |
| 3.4   | Aufbau von Versuchsapparaturen: .....         | 13 |
| 3.4.1 | Allgemein.....                                | 13 |
| 3.4.2 | Apparatur A .....                             | 14 |
| 3.4.3 | Apparatur B.....                              | 16 |
| 3.4.4 | Kraftwandler, Verstärker und Schreiber .....  | 18 |

|       |                                                                                                                                      |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.5 | Sauerstoffversorgung .....                                                                                                           | 19 |
| 3.4.6 | Wasserbad .....                                                                                                                      | 20 |
| 3.5   | Versuchsablauf .....                                                                                                                 | 20 |
| 3.5.1 | Testsubstanzen .....                                                                                                                 | 21 |
| 3.5.2 | Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion.....                                                                                          | 24 |
| 3.5.3 | Versuchsablauf am rechten Vorhof .....                                                                                               | 24 |
| 3.5.4 | Versuchsablauf am Papillarmuskel.....                                                                                                | 25 |
| 3.5.5 | Versuchsablauf an der Aorta.....                                                                                                     | 26 |
| 3.5.6 | Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis.....                                                                                        | 28 |
| 3.5.7 | Versuchsablauf am terminalen Ileum .....                                                                                             | 28 |
| 3.6   | Wirkungsmechanismus von SWS11HCl an der Aorta descendens unter dem Einfluss von Glibenclamid, Nitro-L-Arginin und Phenylephrin ..... | 28 |
| 3.6.1 | Versuche von SWS11HCl mit Glibenclamid .....                                                                                         | 28 |
| 3.6.2 | Versuche von SWS11HCl mit Nitro-L-Arginin .....                                                                                      | 29 |
| 3.6.3 | Versuche von SWS11HCl mit Phenylephrin-HCl.....                                                                                      | 29 |
| 3.7   | Verwendete Agonisten bzw. Antagonisten .....                                                                                         | 31 |
| 3.7.1 | Glibenclamid.....                                                                                                                    | 31 |
| 3.7.2 | Nitro-L-Arginin.....                                                                                                                 | 32 |
| 3.7.3 | Phenylephrin .....                                                                                                                   | 33 |
| 3.8   | Auswertung der Versuchsreihen .....                                                                                                  | 33 |
| 3.8.1 | Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum .....                                                                      | 34 |
| 3.8.2 | Musculus papillaris .....                                                                                                            | 34 |
| 3.8.3 | Atrium cordis dextrum.....                                                                                                           | 35 |
| 3.9   | Statistik.....                                                                                                                       | 35 |
| 4     | Ergebnisse .....                                                                                                                     | 36 |
| 4.1   | Ergebnisse der Testsubstanz WHGTeoT .....                                                                                            | 36 |

|       |                                                                          |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1 | Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums ...  | 36 |
| 4.1.2 | Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis ..  | 40 |
| 4.1.3 | Wirkung von WHGTeoT auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs .....     | 43 |
| 4.1.4 | Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Aorta .....            | 46 |
| 4.1.5 | Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels .....  | 49 |
| 4.2   | Ergebnisse der Testsubstanz SWS11HCl .....                               | 53 |
| 4.2.1 | Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums...  | 53 |
| 4.2.2 | Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis..  | 56 |
| 4.2.3 | Wirkung von SWS11HCl auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes.....    | 59 |
| 4.2.4 | Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.....            | 63 |
| 4.2.5 | Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels ..... | 66 |
| 4.3   | Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS11HCl an der Aorta.....      | 69 |
| 4.3.1 | Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 µmol.....    | 69 |
| 4.3.2 | Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol...     | 72 |
| 4.3.3 | Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Nitro-L-Arginin .....        | 75 |
| 4.3.4 | Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid     | 78 |
| 5     | Diskussion.....                                                          | 82 |
| 5.1   | Allgemein .....                                                          | 82 |
| 5.2   | Wirkung auf die Herzmuskulatur .....                                     | 82 |
| 5.2.1 | Wirkung auf den rechten Vorhof .....                                     | 83 |
| 5.2.2 | Wirkung auf den Papillarmuskel .....                                     | 83 |
| 5.3   | Wirkung auf glattmuskuläre Organe .....                                  | 84 |
| 5.3.1 | Wirkung auf die Aorta .....                                              | 85 |
| 5.3.2 | Wirkung auf die Arteria pulmonalis .....                                 | 85 |
| 5.3.3 | Wirkung auf das terminale Ileum .....                                    | 86 |

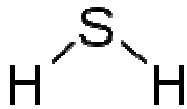
|       |                                                           |    |
|-------|-----------------------------------------------------------|----|
| 5.3.4 | Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Glibenclamid .....     | 86 |
| 5.3.5 | Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Nitro-L-Arginin .....  | 87 |
| 5.3.6 | Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Phenylephrin-HCl ..... | 87 |
| 6     | Zusammenfassung .....                                     | 88 |
| 7     | Literaturverzeichnis .....                                | 90 |
| 8     | Curriculum Vitae .....                                    | 93 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Schwefelwasserstoff – H<sub>2</sub>S

### 1.1.1 Allgemein

Abbildung 1 Struktur von Schwefelwasserstoff



MG = 34,08 g/mol

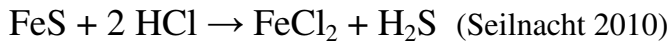
Schwefelwasserstoff oder Dihydrogensulfid ist ein typisch riechendes, stark toxisches Gas und besteht aus einem Schwefelmolekül und zwei Wasserstoffmolekülen.

Diese Verbindung hat einen sehr unangenehmen Geruch und wird bei Fäulnis und bakteriellen Zersetzungsprozessen von Proteinen, die aus schwefelhaltigen Aminosäuren bestehen, gebildet. Außerdem wird Schwefelwasserstoff auch in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers gebildet (Fiorucci et al. 2006). Schwefelwasserstoff kommt in der Umwelt in Mineralquellen und vulkanischen Gasen, zum Beispiel in geothermalen Quellen in Reykjavik oder im Yellowstone National Park vor (Loyd 2006, Martin et al.).

H<sub>2</sub>S ist ein brennbares Gas, bei Luftzufuhr verbrennt Schwefelwasserstoff unter blauer Flammenfärbung.

Die Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) von Dihydrogensulfid beträgt laut dem Kölner Institut für angewandte Umweltforschung 10 ml/m<sup>3</sup> bzw. 15 mg/m<sup>3</sup>.

### 1.1.2 Herstellung



Um Schwefelwasserstoff herzustellen, muss Eisen(II)-sulfid mit Salzsäure versetzt werden. Als Nebenprodukt entsteht dabei Eisen(II)-chlorid

### 1.1.3 Giftwirkung

Am häufigsten kommen Schwefelwasserstoffvergiftungen bei Arbeiten in Abwasserkanälen vor. Während das Gas in niedrigen Konzentrationen an seinem typischen Geruch leicht bemerkt werden kann, riecht es in höheren Konzentrationen süßlich (Mutschler et al. 2008). Bei Kontakt von  $\text{H}_2\text{S}$  mit Schleimhäuten (Rachen, Nase, Auge und Lunge) kommt es zu einer starken Reizung. Die vordergründige Toxizität beruht aber auf einer Zerstörung des Hämoglobins und in Folge einer Lähmung der Atmung (Warenycia et al. 1989; Beauchamp et al. 1984).

### 1.1.4 Wirkung

Dihydrogensulfid ist neben NO und CO ein wichtiger gasförmiger Botenstoff im menschlichen Körper (Pryor et al. 2006). Er spielt eine bedeutende Rolle für die Funktion des Gehirns und des kardiovaskulären Systems (Zhu et al. 2007; Moore et al. 2003). Die in vivo- und in vitro- Effekte von  $\text{H}_2\text{S}$  auf das kardiovaskuläre System sind unter anderem: gesenkter Blutdruck, kardioprotektive Eigenschaften (Sivarajah et al. 2006) und Dilatation der glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur (Koenitzer et al. 2007). Das freigesetzte  $\text{H}_2\text{S}$  führt zu einer Aktivierung spannungsabhängiger ATP-gesteuerter Kaliumkanäle, dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen und in Folge zu einer Blutgefäßerweiterung (Wang 2002; Zhao et al. 2001). In Neuronen stimuliert es die Produktion von cAMP und aktiviert somit cAMP-abhängige Prozesse.

Schwefelwasserstoff aktiviert auch NMDA-Rezeptoren (Kamoun 2004) und ist entscheidend für die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern. Au-



ßerdem verhindert  $\text{H}_2\text{S}$  oxidative Zellschäden durch das Abfangen von freien Radikalen (Qu et al. 2007).

Endogenes  $\text{H}_2\text{S}$  wird durch die zwei Enzyme Cystathionin  $\beta$ -synthase (CBS) und Cystathionin  $\gamma$ -lyase (CGL) in den Endothelzellen der Blutgefäße und in den glatten Muskelzellen gebildet. Beide Enzyme verwenden dabei die Aminosäure L-cystein als Substrat (Zhu et al. 2007).  $\text{H}_2\text{S}$  kann aber auch nicht-enzymatisch in den roten Blutzellen aus elementarem Schwefel gebildet werden (Searcy and Lee 1998).

Schwefelwasserstoff ist aber auch an einer Reihe pathologischer Geschehen beteiligt, wie zum Beispiel Schlaganfall und Alzheimer. Die Verhinderung einer Freisetzung von  $\text{H}_2\text{S}$  kann laut einer Studie von 2007 an der National University of Singapore möglicherweise zur Behandlung von Schlaganfall eingesetzt werden (Qu et al. 2007).

Benavides et al. (2007) berichten, dass die positive Wirkung von Knoblauch vermutlich auch auf  $\text{H}_2\text{S}$  als entscheidenden Faktor zurückzuführen ist.

Schon seit Jahrhunderten sind die positiven Effekte des Knoblauchs auf die Gesundheit bekannt. Der Verzehr von Knoblauch steht in Zusammenhang mit einer Reduktion von verschiedenen Risikofaktoren wie kardiovaskulären Erkrankungen, erhöhtem Blutdruck, erhöhtes Cholesterin und vermehrte Blutgerinnung (Banerjee and Maulik 2002). Der Fortschritt von kardiovaskulären Erkrankungen ist somit umgekehrt proportional mit dem Verzehr von Knoblauch. Die roten Blutzellen wandeln Polysulfide des Knoblauchs in  $\text{H}_2\text{S}$ , den endogenen, kardioprotektiven Botenstoff um (Benavides et al. 2007).

## **1.2 Muskelgewebe**

Es gibt vier große Gewebegruppen, das Epithelgewebe, das Binde- und Stützgewebe, das Muskelgewebe und das Nervengewebe.

Die Zellen des Muskelgewebes enthalten Myofibrillen, innerhalb der Muskelzelle liegende kontraktile Fasern, die für die Kontraktilität verantwortlich sind.

Muskeln sind wichtig für die Bewegung von Körperteilen und Organen, für die Gestaltveränderung und für die Fortbewegung. Alle Muskeln beziehen ihre Energie aus Nährstoffen, die über das Blut zu den Muskeln transportiert werden. Muskeln können sich nur zusammenziehen und erschlaffen, nicht jedoch selbstständig aktiv dehnen.

Nach funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten kann zwischen glatter Muskulatur, quergestreifter Muskulatur und Herzmuskulatur unterschieden werden (Campbell and Reece 2003).

### **1.2.1 Quergestreifte Muskulatur**

Das quergestreifte Muskelgewebe oder Skelettmuskelgewebe ist vor allem für die dem Willen unterworfenen aktiven Körperbewegungen verantwortlich und besteht aus regelmäßig angeordneten, dicht aneinander gelagerten Myofibrillen. Die Myofibrillen sind aus zwei Arten von Myofilamenten aufgebaut, dem Myosin (dicke Myofilamente) und dem Aktin (dünne Myofilamente). Die Querstreifung der Muskulatur wird bewirkt durch die Abwechslung von den dunkleren Myosinfilamenten und den helleren Aktinfilamenten. Bei der Kontraktion der Muskeln werden die Aktinfilamente zwischen die Myosinfilamente gezogen (Lippert 2000).

### **1.2.2 Glatte Muskulatur**

Die glatte Muskulatur ist nicht dem Willen unterworfen, sondern wird vom vegetativen Nervensystem gesteuert. Man findet sie im Bereich des Magen-Darm-Trakts, in den Luftwegen, in den Blut- und Lymphgefäßen, in einigen Organen des Urogenitaltrakts und in der Iris.

Glatte Muskeln bestehen aus lang gestreckten, locker gebündelten oder schichtförmig angeordneten Muskelzellen. Die parallele Lage der Myofibrillen, durch die die quergestreifte Muskulatur charakterisiert ist, fehlt.

Die glatte Muskulatur arbeitet eher langsam und eine Kontraktion kann ohne großen Energieverbrauch oft längere Zeit aufrechterhalten werden (Lippert 2000).

### 1.2.3 Herzmuskulatur

Die Herzmuskulatur hat eine Sonderstellung, sie ist ähnlich wie die Skelettmuskulatur aufgebaut und besitzt wie diese eine Querstreifung, sowie ein endoplasmatisches Retikulum zwischen den Myofibrillen. Sie unterliegt nicht dem Willen und ist zu Dauerleistungen befähigt.

Die Muskulatur des Herzens besitzt außerdem spezifische Zellen, die so genannten Schrittmacherzellen, die die Reizleitungszentren wie den Sinusknoten und den Atrioventrikularknoten bilden.

Eine Regeneration des Herzmuskels ist nicht möglich.

Das Herz gliedert sich in 2 Teile, das rechte und das linke Herz, die jeweils aus einem Vorhof und einer Kammer bestehen. Die 4 Hohlräume sind von unterschiedlich starken Muskelmassen umschlossen.

Die Blutbewegung wird durch die rhythmische Kontraktion und Erschlaffung der Herzmuskulatur bewirkt. Zunächst kontrahieren sich die beiden muskelschwachen Vorhöfe und tragen damit in geringem Maße zur Füllung der Kammern bei. Danach erfolgt die Kontraktion der beiden Kammern, wodurch das Blut in den Truncus pulmonalis bzw. die Aorta ausgetrieben wird.

Die Wände der 4 Herzabschnitte besitzen eine unterschiedliche Dicke. Beide Vorhöfe sind dünnwandig, ihre Wandstärke beträgt durchschnittlich 1,5 mm (Vorhöfe dienen weniger als aktive Pumpen). Die Wandstärke des rechten Ventrikels beträgt 2-4 mm, die des linken Ventrikels 8-11 mm. Diese Differenz in den Wandstärken entspricht den unterschiedlichen Leistungen der Ventrikel. Die linke Kammer hat einen etwa 5-mal größeren Druck zu entwickeln als die rechte.

Die Herzwand besteht aus drei Schichten, dem Endokard (Herzinnenhaut), dem Myokard (Herzmuskel) und dem Epikard (Herzaußenhaut) (Thews et al. 1999).

## 2 Ziel der Diplomarbeit

Im praktischen Teil der Diplomarbeit sollte die Wirkung der beiden vom Department für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisierten Substanzen WHGTeoT und SWS11HCl an isolierten und anschließend präparierten Organen von Meer-schweinchen getestet werden. Die verwendeten Organe der quergestreiften Muskulatur wa-ren Vorhof und Papillarmuskel, als glattmuskuläre Organe wurden Aorta, Arteria pulmona-lis und terminales Ileum verwendet. Am Darm wurde die spasmolytische Wirkung der bei-den Substanzen ausgetestet, an der Aorta und an der Pulmonalarterie die vasodilatatorische Wirkung. Die Versuche am Vorhof wurden durchgeführt um festzustellen, ob die Substan-zen eine Wirkung auf die Chronotropie hatten. Beim Papillarmuskel wurde die Wirkung auf die Inotropie untersucht.

Bei den einzelnen Versuchen wurde, wenn vorhanden, der  $EC_{50}$ -Wert, jene Konzentration bei der die Hälfte des Maximaleffektes erzielt wird, ermittelt. Bei dem Organ, bei dem der niedrigste  $EC_{50}$ -Wert zu eruieren war, wurde mittels eines Agonisten (Phenylephrin) und zweier verschiedener Antagonisten (Glibenclamid und Nitro-L-Arginin) der genaue Wir-kungsmechanismus der Testsubstanz untersucht.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Versuchstiere**

Die für die Diplomarbeit benötigten Versuche wurden an isolierten Organen von Meerschweinchen der Gattung DH (Inzucht) und TRIK (Auszucht) durchgeführt. Die verwendeten Meerschweinchen stammten allesamt aus der Labortierzucht der Universität Bratislava (Slowakei) in Dobrá Voda. Es wurden sowohl männliche, als auch weibliche Tiere für die Versuche herangezogen. Die Tiere waren wenige Wochen alt und wogen im Durchschnitt 400g. Die Mehrzahl der Versuche wurde an Albino-Meerschweinchen durchgeführt.

Da die Ionenkanäle der Meerschweinchen denen des Menschen sehr ähnlich sind, wurde mit den Organen dieser Tiere gearbeitet. Für die Versuche wurden 5 Organe herangezogen, an denen die Wirkung meiner Testsubstanzen untersucht wurde.

Die zur Austestung meiner Substanzen dienenden Organteile waren: Aorta, terminales Ileum, Arteria pulmonalis, Papillarmuskel und Vorhof.

Die Tötung der Meerschweinchen erfolgte durch Genickbruch, der einen schnellen Tod garantierte, anschließend wurde die Bauchdecke eröffnet und die benötigten Organe entnommen. Als erstes Organ wurde das Herz entnommen, dann der Darm und zum Schluss die Aorta. Aus dem Herz wurde, wie im nächsten Kapitel beschrieben, die Arteria pulmonalis, die Papillarmuskeln und der Vorhof herauspräpariert.

## 3.2 Isolierung und Präparation der Organe:

Abbildung 2 Mikroskop und Präparierbesteck



Als Hilfsmittel bei der Präparation dienten: ein Mikroskop, eine Petrischale, in der ein Kork zur Befestigung der Organe ausgelegt war, Pinzetten, Scheren, Federscheren, Präpariernadeln und eine Pasteurpipette.

Nach der Entnahme des Herzens, des Darms und der Aorta wurden diese in 3 verschiedene Gefäße gegeben, die jeweils mit einer Nährstofflösung (siehe physiologische Nährstofflösung Kapitel 3.3 ) befüllt waren und mit einem Sauerstoffgemisch (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast.

Es musste grundsätzlich immer darauf geachtet werden, dass sich die Präparate in ausreichend Nährstofflösung befanden und mit Oxymix (= Sauerstoffgemisch) versorgt wurden, da möglicherweise sonst die Funktion der Organe beeinträchtigt gewesen wäre und somit die Richtigkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet werden konnte.

Das Herz wurde unter dem Mikroskop präpariert, wobei zuerst umgebendes Fettgewebe, Bindegewebe und Teile der Lunge entfernt wurden. Anschließend wurden der Vorhof, die Pulmonalarterie und die Papillarmuskeln herauspräpariert.

### **3.2.1 Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)**

Das Herz gliedert sich in 2 Teile, das rechte und das linke Herz, die jeweils aus einem kleineren Vorhof und einer größeren Kammer bestehen. Die rhythmischen Aktionen des Herzens werden von elektrischen Erregungen ausgelöst, die normalerweise im Sinusknoten entstehen. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof und ist somit für die Herzfrequenz von großer Bedeutung.

Da das Herz sehr empfindlich ist, musste es unter ständiger Begasung in einer Elektrolytlösung präpariert werden. Zur Präparation wurde das Herz mit 2 Präpariernadeln im Kork der Petrischale fixiert. Anschließend wurde der rechte Vorhof entlang des Sulcus Coronarius vom Ventrikel getrennt. In weiterer Folge wurde der Vorhof wieder mit Hilfe von Nadeln in der Präparierschale befestigt und unter dem Mikroskop mit 2 Haken aus Silberdraht versehen. Zur Kennzeichnung der Ober- und Unterseite des Vorhofes wurden die Haken mit unterschiedlich farbigen Fäden angeknüpft. Die beiden Haken wurden jeweils mit 3 Knoten angebracht. Zur Befestigung des oberen Hakens wurde ein roter Faden gewählt, der Faden zur Markierung der Unterseite war schwarz.

Nach Anbringung beider Haken wurde der Vorhof bis zum Einhängen in die Apparatur in einem mit begaster Elektrolytlösung befülltem Becherglas aufbewahrt.

### **3.2.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel)**

In der rechten Herzkammer gibt es drei, in der linken nur zwei Papillarmuskeln. Am Beginn einer Kammersystole kommt es zur Kontraktion der Papillarmuskeln. Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft zu erforschen stellt der Papillarmuskel ein ideales Modell dar. Die verwendeten Papillarmuskeln durften nur einen maximalen Durchmesser von 0,87 mm (Koch-Weser 1963) aufweisen, deshalb waren die Papillarmuskeln des rechten Ventrikels zu bevorzugen, da diese kleiner waren. Bei der Präparation wurde die rechte Herzkammer von der Pulmonalarterie bis zur Herzspitze entlang des Septums geöffnet und aufgeklappt, um die Papillarmuskeln freizulegen. Zu beachten war, dass die Purkinje-Fasern, die ebenfalls eine Spontanaktivität aufweisen entfernt wurden, um eine Verfälschung des Versuchs zu vermeiden. An den einzelnen Papillarmuskeln musste wieder ein Silberhäkchen angebracht werden, um das Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen. Der

Haken wurde am Ansatz der Papillarmuskelsehne befestigt, anschließend wurde die Sehne durchschnitten und der Muskel herauspräpariert. Im Gegensatz zum Vorhof oder zum Darm wurden die Papillarmuskeln nur mit einem Haken versehen, da der Muskel an einer Seite in die Apparatur eingeklemmt werden musste. Die Haken für die Papillarmuskeln sollten nach Möglichkeit etwas kleiner sein als die der anderen Organe, um die Befestigung zu erleichtern. Die fertig präparierten Papillarmuskeln wurden bis zur weiteren Verwendung in ein Becherglas gegeben, welches mit Tyrode befüllt war und begast wurde.

### **3.2.3 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)**

Es gibt eine linke und eine rechte Arteria pulmonalis (Lungenarterie), beide gehören zum Lungenkreislauf und befördern sauerstoffarmes Blut, das durch die Atmung mit Sauerstoff angereichert wird.

Nachdem Vorhof und Papillarmuskel präpariert waren, wurde die Pulmonalarterie vom Herzen heraus präpariert. Da sich die Pulmonalarterie in 2 Äste aufteilt, musste relativ knapp am Herzen geschnitten werden, um ein möglichst langes Stück zu erhalten. Die Arteria pulmonalis wurde dann mit 2 Präpariernadeln am Kork in der Präparierschale befestigt und anschließend wurde sie nach Entfernung von Muskel- und Fettgewebe in dünne ringförmige Stücke geschnitten. Diese wurden dann wie üblich in einer begasten Nährstofflösung bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

### **3.2.4 Terminales Ileum (Darm)**

Der Dünndarm erstreckt sich vom Pylorus des Magens bis zum Dickdarm. Er gliedert sich in 3 Abschnitte: das Duodenum, das Jejunum und das Ileum.

Bei der Entnahme des terminalen Ileums war darauf zu achten, dass der Darm vorsichtig entnommen wurde und nicht zu stark gedehnt wurde, um eine Beschädigung zu verhindern. Es wurde das circa 20 cm vor dem Caecum gelegene Stück des terminalen Ileums verwendet. Nach der Entnahme wurde das obere, jejunale Ende mit einem schwarzen Faden zugeknüpft um später zwischen oberem und unterem Ende unterscheiden zu können. Anschließend wurde der Darm in ein mit Nährstofflösung befülltes Becherglas gegeben und mit Sau-



erstoffgemisch begast. Bei der Präparation wurde zuerst ein kurzes Stück (ca. 1cm) vom caecal gelegenen Ende des Darmes abgeschnitten und dieses Stück wie gewohnt unter dem Mikroskop und in einer Nährstofflösung liegend präpariert. Da der Darm nicht ganz so empfindlich ist wie die übrigen Organe, war es nicht unbedingt erforderlich den Darm während der Präparation mit Sauerstoff zu versorgen. Das Darmstück wurde mittels Nadeln am Kork der vorbereiteten Petrischale befestigt und in Folge an beiden Enden schräg abgeschnitten. Dann wurden die beiden Haken wie üblich mit den färbigen Nähseiden und durch Doppelknoten befestigt. Dabei war darauf zu achten, dass die Haken möglichst weit außen angeknüpft wurden, um zu gewährleisten, dass der Darm durchgängig war. Die Durchlässigkeit war notwendig, damit die Lösung der Testsubstanz auch die Darminnenseite erreichen konnte. Die Prüfung erfolgt mit einer Pipette, dabei wurde kontrolliert ob Luft, die man auf der einen Seite hinein bläst, auf der anderen Seite heraus perlt. Außerdem wurden so noch vorhandene Chymusreste entfernt. Der fertig präparierte Darm wurde bis zur Befestigung in der Apparatur in einem mit Tyrode befüllten Gefäß aufbewahrt.

### **3.2.5 Aorta descendens**

Die Hauptschlagader oder Aorta entspringt direkt aus dem Herzen und befördert sauerstoffreiches Blut. Nach der Tötung eines Meerschweinchens wurde der Thorax geöffnet, anschließend das Herz und der Darm und zum Schluss die Aorta entnommen. Vor der Entnahme musste aber noch die Lunge und das Zwerchfell entfernt werden. Bei der Isolierung der Aorta aus dem Versuchstier war es ratsam, nicht zu knapp an der Aorta, sondern nahe beim Rückgrat zu schneiden, um die Aorta nicht zu beschädigen. Außerdem war darauf zu achten, die Hauptschlagader nicht zu stark zu dehnen.

Bei der Präparation wurde die Aorta wieder in der Präparierschale, die mit Elektrolytlösung befüllt war und mit Oxymin begast wurde, mit Hilfe von zwei Nadeln im Kork befestigt. Anschließend wurden mit der Federschere vorsichtig alle anhaftenden Gewebeteile wie Fett- und Muskelgewebe weg geschnitten. In Folge wurde die gereinigte Aorta in 2-3 mm kleine ringförmige Stücke geschnitten und in Elektrolytlösung bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.3 Physiologische Nährstofflösung (Tyrode)

Die passende Elektrolytlösung ist die Grundvoraussetzung, um Versuche an isolierten Organen durchzuführen. Um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen, ist eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und eine optimale Temperatur von 37°C ebenfalls sehr entscheidend.

Bei der Herstellung der Tyrode, die eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung darstellte und nach der Vorschrift von Reiter (1967) hergestellt wurde, war die genaue Einwaage entscheidend, da sich die Elektrolytkonzentrationen im Körper auch innerhalb von engen Bereichen befinden müssen. Vor allem die  $K^+$ -Konzentration ist von großer Bedeutung, bereits geringe Konzentrationsüberschreitungen können drastische Folgen haben.

Die Tyrode wurde verwendet:

- § zur Herstellung der KCl-Lösung, die zur Kontraktion des Darmes bzw. der Aorta und der Pulmonalarterie verwendet wurde
- § zum Spülen der Organbäder morgens und abends
- § zur Befüllung der Organbäder
- § zur Aufbewahrung bzw. Zwischenlagerung der Präparate oder Organe in Bechergläsern
- § als Elektrolytlösung in Petrischalen während der Präparation

Bevor die Nährstofflösung hergestellt werden konnte, mussten Stammlösungen der einzelnen Komponenten bereitet werden. Die Stammlösungen wurden in größeren Mengen hergestellt und konnten bis zum Aufbrauchen verwendet werden, die Tyrode hingegen musste jeden Tag frisch bereitet werden. Dazu wurden NaCl, KCl,  $NaHCO_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$  und Glucose in einen 2 Liter Messkolben eingebracht und mit destilliertem Wasser auf ca. 2/3 des Endvolumens aufgefüllt. Im Anschluss wurde diese Lösung 20 Minuten mit Oxymix (Gasgemisch aus 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$ ) begast und erst danach konnte die  $CaCl_2$ -Lösung tropfenweise hinzugefügt werden (damit es zu keiner Ausfällung und somit zu einer Trübung kam). Anschließend wurde mit destilliertem Wasser bis zur 2 Liter Markierung aufgefüllt und geschüttelt.

**Abbildung 3 Zusammensetzung der Tyrode**

| Substanz                        | Molare Masse<br>(g/mol) | Stocklösung      | ml Stocklösung/<br>l Tyrode | mmol/l |
|---------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------------|--------|
| NaCl                            | 58,44                   | 1000,25 g / 5 l  | 33,60                       | 114,90 |
| KCl                             | 74,55                   | 50,33 g / 5 l    | 35,00                       | 4,73   |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 84,01                   | 125,00 g / 5 l   | 83,70                       | 24,90  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 120,37                  | 147,02 g / 5 l   | 3,20                        | 1,18   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 136,09                  | 62,00 g / 250 ml | 1,18                        | 1,18   |
| CaCl <sub>2</sub>               | 110,98                  | 34,00 g / 250 ml | 1,18                        | 3,20   |
| Glucose                         | 180,16                  | Reinsubstanz     | 1,98                        | 10,00  |

### 3.4 Aufbau von Versuchsaapparaturen:

#### 3.4.1 Allgemein

Die Versuche am Vorhof, an der Pulmonalarterie, am Darm und an der Aorta konnten am selben Typ von Apparatur durchgeführt werden (Apparatur A). Die Versuche am Papillarmuskel mussten an einer anderen Art von Apparatur erfolgen, da der Papillarmuskel elektrisch gereizt werden musste. (Apparatur B). Prinzipiell war das Funktionsprinzip der beiden Apparaturen gleich, sie unterschieden sich nur hinsichtlich Aufbau und Befestigungsmechanismus. Beide Apparaturen verfügten über ein Organ- und Wasserbad, sowie einen Kraftwandler, einen Amplifier und einen Schreiber. Außerdem mussten beide Apparaturen über eine Gaszufuhr verfügen.

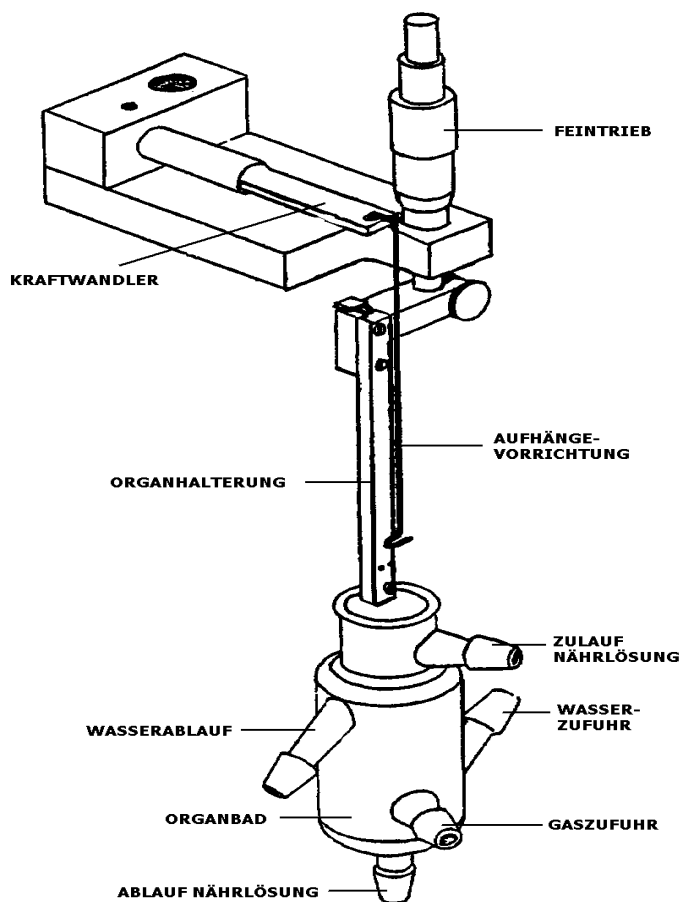
**Abbildung 4 Organbad**



### **3.4.2 Apparatur A**

Bei dieser Apparatur wurde das Organbad nicht in das Wasserbad eingetaucht, sondern das Gefäß war doppelwandig und das auf  $37 \pm 1$  °C temperierte Wasser wurde direkt durch das Gefäß durchgeleitet.

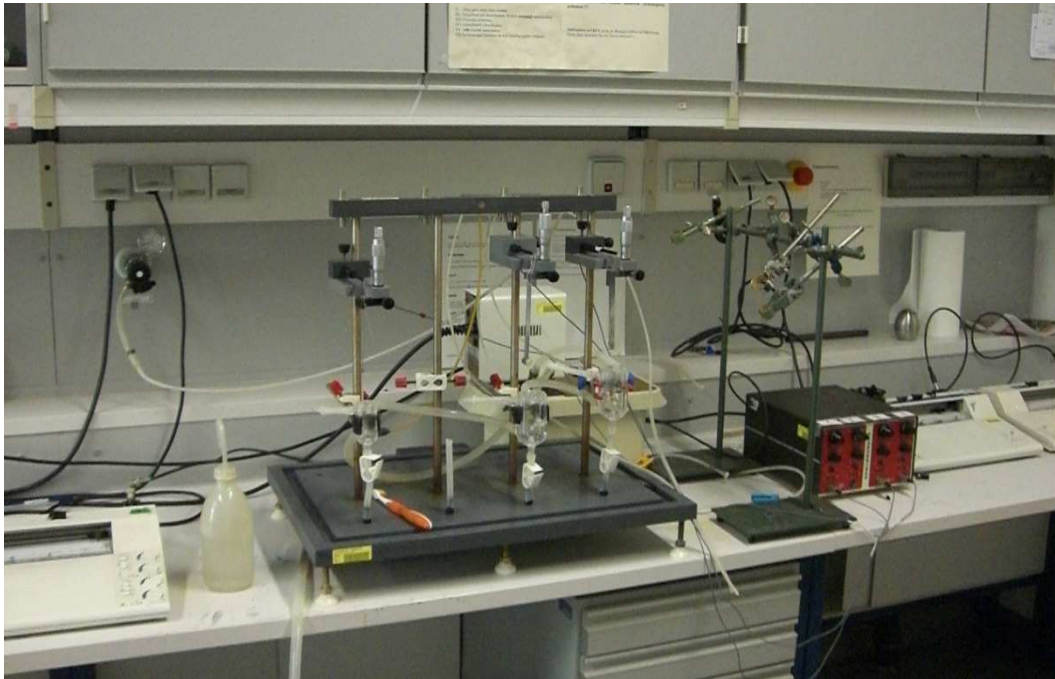
**Abbildung 5 Apparatur A**



Zu Beginn wurde das Gefäß mit destilliertem Wasser gespült, welches man ganz einfach durch einen Schlauch ablassen konnte. Dann wurde noch einmal mit Tyrode gespült, bevor schließlich endgültig Tyrode in das Gefäß eingefüllt wurde. Beim Vorhof war es wichtig, dass genau 25ml physiologische Nährstofflösung eingefüllt wurden, bei Aorta, Pulmonalarterie und Darm hingegen mussten es nur ungefähr 25 ml sein. Die Muskeln dieser 3 Organe wurden anschließend nämlich noch mit einer KCl-Lösung kontrahiert und erst dann war es wichtig, dass genau 25 ml KCl-Lösung eingefüllt wurden. An Aorta, Arteria pulmonalis und am Darm wurde getestet, ob der Wirkstoff relaxierend auf die kontrahierten Organe wirkte. Beim Vorhof wurde untersucht, ob die Substanzen die Herzfrequenz beeinflussten. Der Vorhof wurde dementsprechend nicht mit KCl-Lösung versetzt, sondern es wurde nur Tyrode eingefüllt. Um auch hier wieder körperähnliche Bedingungen zu schaffen, wurde das Organbad über einen am Gefäß angebrachten Schlauch mit dem Sauerstoffgemisch durchperlt. Das Präparat wurde an der Organhalterung befestigt, das heißt, es wurde zwischen 2 Silberdrähten, die hakenförmig gebogen waren, eingehängt. Der obere Haken war mit dem Kraftwandler verbunden. Beim Einhängen war darauf zu achten, dass das Organ nicht zu locker hing, aber auch nicht zu stark gespannt war, in beiden Fällen wäre die Messung verfälscht gewesen. Die Aorta und die Pulmonalarterie wurden, da sie ringförmig waren, direkt an den Einhängenvorrichtungen befestigt, Vorhof und Darm hingegen wurden mittels der befestigten Haken eingehängt.

Nach der Befestigung wurde das Organ in das mit Tyrode befüllte Organbad (25ml) getaucht und begast, um physiologische Bedingungen zu imitieren. Es war entscheidend, dass das Präparat vollständig mit Tyrode bedeckt war, anschließend wurde noch die benötigte Vorspannung eingestellt. Der Kraftwandler und der Amplifier (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments Sarasota, Florida, USA) waren wichtig, um die Kontraktion bzw. Relaxation des Organs zu erfassen, der Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Niederlande) diente der Aufzeichnung.

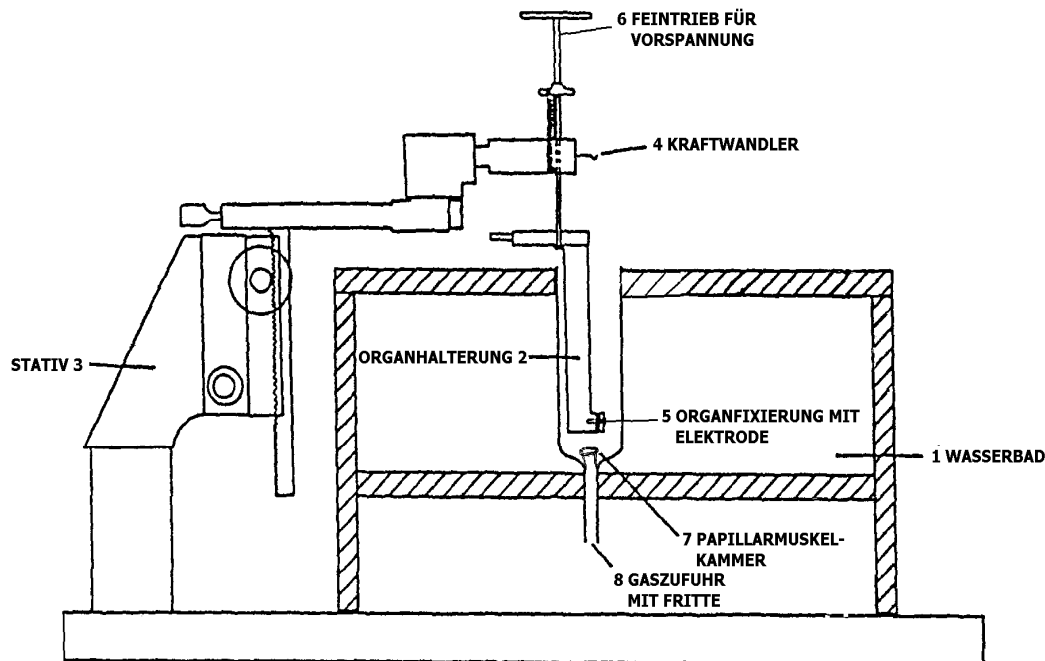
**Abbildung 6 Originalbild der Apparatur A**



### **3.4.3 Apparatur B**

Wie vorher erwähnt, wurde diese Apparatur für Versuche am Papillarmuskel verwendet. Bei diesem Typ von Apparatur war das Organbad nicht doppelwandig, sondern wurde das Organ direkt in das auf  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  erwärmte Wasserbad eingetaucht. Das Gefäß, in das das Präparat gehängt wurde hatte keine Öffnung, durch die man das Wasser oder die Tyrode ablassen konnte sondern man musste die Flüssigkeit mit Hilfe einer Spritze herausaugen.

Abbildung 7 Apparatur B

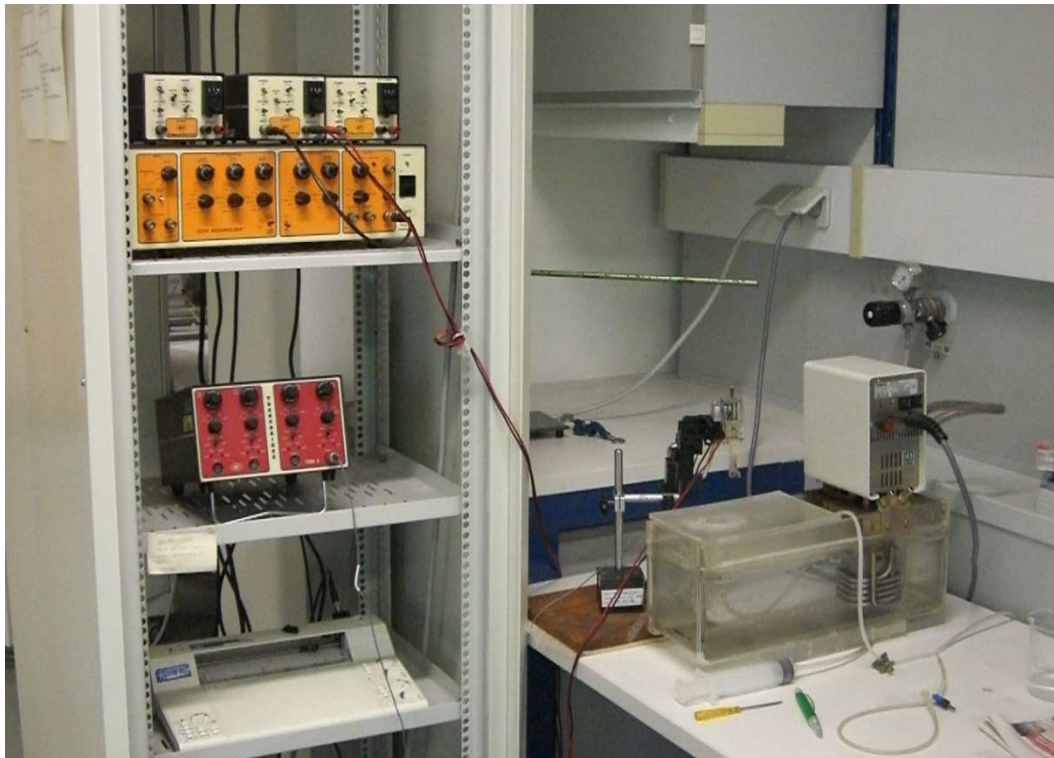


Auch bei Apparatur B wurde je einmal mit Aqua bidestillata und einmal mit Elektrolytlösung gespült, bevor man die 25 ml Tyrode, genau gemessen, in das Organbad einfüllte. Durch eine Glasfritte wurde das eingespannte Präparat von unten mit dem Sauerstoffgemisch versorgt, um physiologische Bedingungen zu imitieren. Wenn die Apparatur fertig vorbereitet war, das Wasserbad eine entsprechende Temperatur aufwies und das Gas eingeschaltet war, wurde der zuvor mit einem Haken präparierte Papillarmuskel möglichst rasch eingespannt. Der Haken wurde an der Organaufhängevorrichtung, die mit dem Kraftwandler verbunden war, eingehängt. Der Kraftwandler war notwendig, um die Kontraktionen des Muskels in elektrische Impulse umzuwandeln. Das freie Ende des Muskels wurde zwischen einer Plexiglasplatte und einer Platin-Kathode eingeklemmt. Durch diese Kathode, die aus Silberchlorid bestand, wurde der Muskel mit Hilfe eines Accupulser A310- Stimulus Isolator A360 (World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) gereizt. Der Hauptunterschied zu Apparatur A bestand in dieser Elektrode. Die Präparate, die in die Apparatur A eingebracht wurden, mussten nicht stimuliert werden.

Sobald der Muskel eingespannt war, wurde die Organhalterung in das Organbad abgesenkt, was mit Hilfe des Stativschlittens möglich war. Es war darauf zu achten, dass das Präparat

komplett in die Nährstofflösung eintauchte. Im Anschluss wurde mit Hilfe des Feintriebes zur Entwicklung der maximalen Kontraktionskraft noch die nötige Vorspannung eingestellt. Ebenfalls ein wichtiger Bestandteil dieser Apparatur waren ein Verstärker und ein Schreiber, der der Dokumentation diente.

**Abbildung 8 Originalbild der Apparatur B**



#### **3.4.4 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber**

Der Kraftwandler dient zur Umwandlung von Kontraktionskraft, einer rein mechanischen Größe die nicht registriert werden kann, in einen elektrischen Impuls. Dabei kommt es zu einer Dehnung und in Folge zu einer Änderung des Widerstandes des Messstreifens. Gemäß des Ohm'schen Gesetzes ( $I=U/R$ ) ändert sich proportional zur Änderung des Widerstandes die Stromstärke, bei gleich bleibender Spannung. Der Kraftwandler oder Transducer war ein Widerstandswandler mit Dehnungsmessstreifen in Wheatstone'scher Brückenschaltung (Typ AE875, Firma Aksjeselskapet, Horton, Norwegen). Die elektrischen Signale wurden



anschließend mit Hilfe eines Verstärkers oder Amplifiers (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments Sarasota, Florida, USA) verstärkt. Die Dokumentation der Signale erfolgte mit einem Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel, Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

### 3.4.5 Sauerstoffversorgung

Abbildung 9 Gaszufuhr



Die Sauerstoffversorgung war essentiell, um die Funktion der Organe aufrecht zu erhalten, vor allem bei den Herzpräparaten war eine ununterbrochene Sauerstoffzufuhr wichtig. Außerdem diente die Begasung auch der Durchmischung des Organbades, wodurch eine homogene Verteilung der Testsubstanzlösung erreicht wurde. Durch die Versorgung mit Oxy-mix wurde außerdem ein physiologischer pH-Wert von 7,2 – 7,4 sichergestellt.

Das verwendete Gasgemisch bestand zu 95 % aus Sauerstoff und zu 5 % aus Kohlendioxid.

Die Begasung hatte sowohl im Organbad als auch außerhalb, in der Petrischale oder in den Bechergläsern zu erfolgen.

### 3.4.6 Wasserbad

Abbildung 10 Wasserbad



Um eine möglichst konstante physiologische Temperatur zu erzielen, wurde ein Wasserbad mit eingebautem Thermostat verwendet. Die Versuche an Aorta, Darm, Pulmonalarterie und Vorhof wurden bei einer Wasserbadtemperatur von  $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Bei den Versuchen am Papillarmuskel wurde ein auf  $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiertes Wasser verwendet. Um die entsprechende Temperatur schon am Beginn des Versuches sicherzustellen, musste das Thermostat des Wasserbades circa eine halbe Stunde vor dem Einhängen des Präparates eingeschaltet werden.

## 3.5 Versuchsablauf

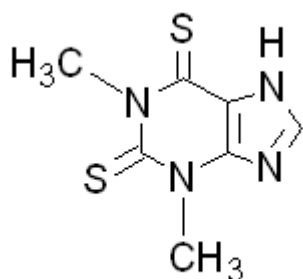
Da die Tests an Versuchstieren durchgeführt wurden, war mit leichten Schwankungen der Testergebnisse zu rechnen, deshalb war es umso wichtiger, Fehler, beziehungsweise Schwankungen in anderen Bereichen zu vermeiden. Um reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten mussten die Versuchsbedingungen jeden Tag gleich sein.

### 3.5.1 Testsubstanzen

Die von mir im Rahmen der Diplomarbeit untersuchten Substanzen WHGTeoT und SWS11HCL wurden am Department für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und von Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt.

#### 3.5.1.1 Testsubstanz WHGTeoT

Abbildung 11 Struktur der Testsubstanz WHGTeoT

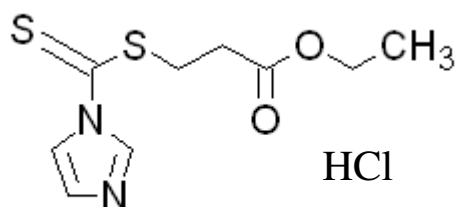


3,9-Dihydro-1,3-dimethyl-1H-purin-2,6-dithion

Molekulargewicht = 212,30

#### 3.5.1.2 Testsubstanz SWS11HCL

Abbildung 12 Struktur der Testsubstanz SWS11HCL



3-[(1H-Imidazol-1-ylthio)thio]-propionsäureethylester

Molekulargewicht = 280,84

Da die Substanz WHGTeoT nicht in destilliertem Wasser löslich ist, musste WHGTeoT in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse musste DMSO berücksichtigt werden, weil diese Substanz eine Eigenwirkung auf die Organe hatte.

Die zweite Testsubstanz SWS11HCl konnte in Aqua bidestillata gelöst werden, weshalb in Folge DMSO bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden musste.

Reines DMSO führte bei Applikation an Aorta und Pulmonalarterie zu einer Kontraktion der Organe. Um die unverfälschten Ergebnisse der Substanz WHGTeoT zu erhalten musste die Wirkung von DMSO subtrahiert werden. Die Wirkung von DMSO auf den Papillarmuskel und den Darm war konträr, sie führte zu einer Dilatation. Bei den Ergebnissen dieser Organe musste die Wirkung von DMSO addiert werden um die korrekten Ergebnisse zu erhalten.

**Abbildung 13 Stammlösungen**

| <b>Stammlösung</b> | <b>Volumen Organbad in ml</b> | <b>Einwaage für eine Endkonzentration von (100µmol/l) / Organbad</b> |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| WHGTeoT            | 25                            | 0,53 mg                                                              |
| WHGTeoT            | 8                             | 0,17 mg                                                              |
| SWS11HCl           | 25                            | 0,70 mg                                                              |
| SWS11HCl           | 8                             | 0,22 mg                                                              |

Die Substanz WHGTeoT wurde, wie bereits erwähnt, in 100 µl DMSO gelöst und SWS11HCl wurde in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. In Abhängigkeit der Größe des Organbades (25 ml oder 8 ml) wurde die entsprechende Menge Substanz eingewogen und mit 100µl des entsprechenden Lösungsmittels gelöst. Zur Berechnung der Einwaage in mg wurde die molare Masse herangezogen. Nach Zugabe der gesamten Substanzlösung ins Organbad, hatte dieses eine Konzentration von 100µmol/ l.

Die Lösungen der Testsubstanzen mussten an jedem Versuchstag frisch bereitete werden, bereits gelöste Substanzen konnten am nächsten Tag nicht mehr verwendet werden.

**Abbildung 14 Pipettierschema**

| <b>Zugegebene Menge</b> | <b>Konzentration / Organbad</b> |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1 $\mu$ l               | 1 $\mu$ mol / l                 |
| 2 $\mu$ l               | 3 $\mu$ mol / l                 |
| 7 $\mu$ l               | 10 $\mu$ mol / l                |
| 20 $\mu$ l              | 30 $\mu$ mol / l                |
| 70 $\mu$ l              | 100 $\mu$ mol / l               |

Sobald sich die Präparate an das umgebende Milieu gewöhnt hatten (die Herzfrequenz regelmäßig war, die Kontraktionskraft des Papillarmuskels konstant war und sich Aorta, Pulmonalarterie und Darm maximal kontrahiert hatten) konnte mit der Applikation der Substanzlösung begonnen werden. Zu Beginn wurde 1  $\mu$ l der Testsubstanzlösung vorsichtig ins Organbad eingebracht, dabei musste darauf geachtet werden, mit der Pipettenspitze nichts zu berühren, um den Versuch nicht zu stören. Nachdem die Lösung in das Organbad von Pulmonalarterie, Aorta und Darm gegeben wurde, war es ratsam, die Stelle am Papier des Schreibers zu markieren, um später die Berechnungen möglichst exakt durchführen zu können. Bei den Tests an Vorhof und Papillarmuskel, war eine Markierung nicht erforderlich, da bei diesen beiden Präparaten die Messung nicht permanent durch den Schreiber aufgezeichnet wurde, sondern der Schreiber nur alle 5 min aktiviert wurde.

Durch die Begasung des Präparates wurde gleichzeitig die homogene Verteilung der Substanzlösung sichergestellt.

Nach Zugabe der Testsubstanz wurde genau 45 min gewartet, in denen sich das Präparat abermals an die veränderten Gegebenheiten anpassen konnte. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die zweite Einspritzung durchgeführt. Nun wurden 2  $\mu$ l Substanzlösung in das Gefäß mit dem Präparat eingebracht, die Konzentration der Substanz im Organbad war somit 3  $\mu$ mol/l. Zwischen den einzelnen Einspritzungen wurden jeweils 45 min gewartet. Die Endkonzentration der Lösung im Organbad war 100  $\mu$ mol/l.

### 3.5.2 Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion

Eine Vorkontraktion wurde nur an Aorta, Darm und Arteria pulmonalis durchgeführt, die Herzpräparate mussten nicht vorkontrahiert werden. Die Vorkontraktion war notwendig, um die Wirkung der Testsubstanzen untersuchen zu können. Es wurde beobachtet, ob die Testsubstanzen WHGTeoT und SWS11HCl die kontrahierte glatte Muskulatur zu relaxieren oder dilatieren vermochten.

Es wurden 2 verschiedene KCl-Lösungen hergestellt, eine für Aorta und Arteria pulmonalis und eine eigene für das terminale Ileum. Die KCl-Lösung wurde täglich frisch aus der Tyrode bereitet.

#### 3.5.2.1 *Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion des terminalen Ileums*

Für die Vorkontraktion des Darms wurden 0,45 g KCl in einen 100 ml Messkolben eingewogen, dieser wurde dann wieder mit der physiologischen Nährstofflösung bis zur Markierung aufgefüllt und geschüttelt. Bei dieser Mischung handelte es sich um eine 60mmolare Lösung.

#### 3.5.2.2 *Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion von Aorta und Arteria pulmonalis*

In einen 100 ml Messkolben wurden 0,67 g KCl eingewogen und mit Tyrode bis zur Markierung aufgefüllt, diese Mischung stellte eine 90 mmolare Lösung dar.

### 3.5.3 Versuchsablauf am rechten Vorhof

Der fertig präparierte Vorhof musste besonders vorsichtig in der Aufhängevorrichtung befestigt werden. Dabei war darauf zu achten, dass der mit roter Nähseide angeknüpfte Haken oben eingehängt wurde und der mit schwarzer Nähseide befestigte Haken unten eingehängt wurde, um die Gegebenheiten im Körper möglichst genau nachzuempfinden. Bei der Befestigung musste außerdem darauf geachtet werden, dass der Vorhof nicht zu lange außerhalb der Nährstofflösung war und nicht zu stark gedehnt wurde, damit der Muskel nicht beschädigt wurde und folglich der Versuch verfälscht oder nicht mehr möglich wäre. Nach der Be-

festigung wurde der Vorhof in das mit Elektrolytlösung befüllte und begaste Organbad eingetaucht. Anschließend wurde der Schreiber aktiviert und der Stift auf die Nulllinie gestellt, dann wurde der Verstärker eingeschaltet. Dadurch kam es meistens wieder zu einer Entfernung des Stiftes von der Nulllinie, was wiederum korrigiert werden musste, dieses Mal jedoch mit dem Regler des Verstärkers. Die Stromstärke war auf 5 mV und die Geschwindigkeit auf 5 mm/ Sekunde zu regulieren. In weiterer Folge wurde eine Vorspannung von 10,4 mN mit Hilfe des Feintriebes eingestellt, um die maximale Kontraktionskraft zu erzielen. Dabei wurde der Stift des Schreibers wieder von der Nulllinie entfernt. Um den Stift abermals auf die Nulllinie zu bewegen, wurde wieder der Regler des Amplifiers betätigt. Durch die Elastizität der Präparate wurde der Stift im Laufe des Versuches meistens wieder leicht verstellt, zur Nachjustierung wurde der Feintrieb verwendet.

Nach der Einstellung der Geräte kam es zu einer mindestens 30minütigen Wartezeit, in der sich der Vorhof an die Bedingungen anpassen konnte. Nach Ablauf der Wartezeit konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden. Die Messungen wurden alle 5 min durchgeführt und mussten über eine Zeit von 12 Sekunden bzw. über eine Schreib-Strecke von 6 cm aufgezeichnet werden. Diese Messungen dienten der Kontrolle, ob sich die Herzfrequenz schon normalisiert hatte und regelmäßig war.

Die Herzfrequenz wurde errechnet, indem die Schlagfrequenz mit 5 multipliziert wurde. Sobald die Herzfrequenz für mindestens 15 min regelmäßig war, konnte mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden. Wie bereits vorher erwähnt, wurde die Lösung der Testsubstanz nach einem fixen Pipettierschema der Nährstofflösung des Organbades zugefügt.

#### **3.5.4 Versuchsablauf am Papillarmuskel**

Bevor der Papillarmuskel in die Apparatur eingehängt wurde, musste darauf geachtet werden dass genau 25 ml Tyrode in das Organbad eingefüllt waren, dass das Gas aufgedreht war und alle Geräte zurückgesetzt waren.

Der fertig präparierte Papillarmuskel wurde in der Apparatur mittels Silberdrahthaken befestigt und zwischen Plexiglas und Kathode platziert, dann wurde der Muskel zwischen den beiden Platten relativ fest eingeklemmt, indem eine Schraube mit Hilfe eines Schraubenziehers gedreht wurde. Der eingeklemmte Papillarmuskel wurde dann rasch in das Organbad

abgesenkt, um einen Sauerstoffmangel zu verhindern. Anschließend wurde, wie im Kapitel (3.5.3 Versuchsablauf am rechten Vorhof) beschrieben, der Schreiber aktiviert, der Stift auf die Nulllinie gestellt und der Amplifier eingeschaltet. Bei den Versuchen am Papillarmuskel wurde immer mit einer Stromstärke von 2 mV begonnen, falls diese jedoch nur zu einer schwachen Muskelkontraktion führte, konnte die Voltzahl gesteigert werden. Die Vorspannung, die mittels Feintrieb eingestellt wurde, hatte 3,92 mN zu betragen. Der Papillarmuskel hat im Gegensatz zum Vorhof kein Schrittmacherzentrum und musste deshalb mit Hilfe eines Reizgerätes (Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Isolator A360, World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) stimuliert werden. Die Stimulierung erfolgte elektrisch, durch Silberelektroden.

Bevor die Reizung ausgelöst wurde, musste ungefähr 15 min gewartet werden, damit sich der Muskel an die Umgebung anpassen konnte. Der Musculus papillaris wurde durch Rechteckimpulse von 3 ms Dauer bei einer Frequenz von 1 Hertz stimuliert. Die Stromstärke sollte so gewählt werden, dass sie 10 % über der Reizschwelle lag, bei der es zu ersten Muskelzuckungen kam. Wurde die Stromstärke zu hoch gewählt, kam es zu einer Entleerung der Katecholaminspeicher, des Muskels und somit zu verfälschten Ergebnissen oder sogar zum Absterben des Präparates. Wurde die Stromstärke jedoch zu niedrig gewählt, dann waren die Kontraktionen nicht messbar.

Nun wurde mindestens 45 Minuten gewartet, in dieser Zeit konnte sich der Papillarmuskel an das vorherrschende Milieu anpassen. Nach der Wartezeit wurde kontrolliert, ob die Amplituden der Kontraktionen konstant waren, das heißt es wurde gemessen ob sie die gleiche Länge aufwiesen. Wenn dies der Fall war, dann konnte mit dem Einspritzen der Substanz nach dem bereits erwähnten Pipettierschema begonnen werden. Die Messungen erfolgten sowohl während der Kontrollphase als auch während des Versuches alle 5 Minuten, dabei wurden jeweils 6 Amplituden mit dem Schreiber aufgezeichnet und die Länge der einzelnen Amplituden mit dem Lineal gemessen.

### **3.5.5 Versuchsablauf an der Aorta**

Da die Aorta bei der Präparation in ringförmige Stücke geschnitten wurde, mussten keine Haken angebracht werden, sondern die Aorta konnte direkt auf die hakenförmig gebogenen



Silberdrähte der Aufhängevorrichtung der Apparatur gehängt werden. Bei der Befestigung war es wichtig, möglichst vorsichtig vorzugehen, um die Aorta nicht zu beschädigen. Trotzdem musste ein guter Halt gewährleistet werden, denn falls sich die Aorta während des Versuches löste, musste der Versuch beendet oder eventuell neu gestartet werden, was ohnehin für alle Präparate galt.

Anschließend wurde die fixierte Aorta in das begaste und mit Nährstofflösung befüllte Organbad gesenkt. Die Temperatur des Wasserbades musste wieder 37 °C betragen, deshalb war es wichtig, die Wasserbäder immer circa 30 min vor der Befestigung der Organe einzuschalten, um zu gewährleisten, dass bei Versuchsbeginn die Temperatur schon erreicht war.

Die Aktivierung des Schreibers, die Korrektur des Stiftes und das Einschalten und Einstellen des Amplifiers erfolgte wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Die Einstellung der Vorspannung war aber bei den einzelnen Präparaten unterschiedlich, bei der Aorta wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 19,6 mN bei 10 mV angelegt. Dann folgte eine Anpassungsphase von 20 min, nach dieser wurde auf 20mV umgestellt und der Stift des Schreibers, falls erforderlich, mit dem Feintrieb auf die Nulllinie korrigiert. Nun konnte mit der Aufzeichnung begonnen werden. Die Tyrode des Organbades wurde über einen Schlauch abgelassen und durch 25 ml einer 90 mmolaren KCl-Lösung, welche der maximalen Kontraktion der Aorta diente, ersetzt.

Der Unterschied zwischen Aorta und Herzpräparaten bestand darin, dass bei der Aorta nicht nur alle 5 min die Messung aufgezeichnet wurde, sondern, dass der Schreiber permanent aufzeichnete. Die Dokumentation hatte die Form einer Kurve; sobald die Kurve in eine Gerade überging, d.h. die Kontraktion konstant war, konnte mit dem Versuch begonnen werden. Die Zeit, die bis zum Erreichen der Geraden verging, betrug im Durchschnitt 50 min.

Nach Erreichen der Geraden konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanzen begonnen werden. Die Plateauphase der Kurve entsprach der maximalen Kontraktionskraft und wurde als 100 % definiert. Durch die Substanzzugabe konnte es zu einer Änderung der Kontraktion kommen.

### **3.5.6 Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis**

Der Versuch an der Pulmonalarterie wurde analog zum Versuch an der Aorta durchgeführt, der einzige Unterschied bestand darin, dass hier mit 9,81 mN und bei 5 mV vorgespannt wurde, alle weiteren Schritte bis hin zur Dokumentation waren gleich.

### **3.5.7 Versuchsablauf am terminalen Ileum**

Die bei der Präparation am Darmstück befestigten Haken wurden in die Aufhängevorrichtung der Apparatur A eingehängt, dabei war zu beachten, dass der Haken, der mit dem roten Faden befestigt wurde, oben eingehängt werden musste. Außerdem war es wichtig, dass der Darm nicht zu stark gedehnt wurde und sich nicht zu lange außerhalb des Nährmediums befand. Nach der Befestigung wurde das terminale Ileum in das mit Oxymix durchperlte Organbad abgesenkt und die Aktivierung und Einstellung des Schreibers und Amplifiers hatte erneut zu erfolgen. An den Darm wurde eine Vorspannung von 4,9 mN bei einer Stromstärke von 5 mV angelegt. Nach einer 20 minütigen Anpassungsphase, wurde, falls nötig, der Stift des Schreibers wieder auf die Nulllinie gestellt und aktiviert. Dann wurde die Tyrodelösung abgelassen und die 60 mmolare KCl-Lösung für die Kontraktion des Darmes in das Organbad gegeben. Eine maximale Kontraktion war erreicht, sobald die Kurve, die vom Schreiber aufgezeichnet wurde, in eine Gerade überging, dies geschah frühestens nach 45 min. Bei konstanter Kontraktion konnte mit der Substanzzugabe laut Pipettierschema begonnen werden.

## **3.6 Wirkungsmechanismus von SWS11HCl an der Aorta descendens unter dem Einfluss von Glibenclamid, Nitro-L-Arginin und Phenylephrin**

### **3.6.1 Versuche von SWS11HCl mit Glibenclamid**

Das, wie bereits in Kapitel 3.2.5 beschrieben, präparierte Aortenstück wurde in das mit Oxymix begaste Organbad gehängt und auf 19,6 mN bei 10 mV vorgespannt. Nach einer

Anpassungszeit von 20 Minuten an das vorherrschende Medium wurde der Amplifier auf 5 mV gestellt und der Schreiber mit Hilfe des Feintriebes auf der Nulllinie platziert.

Um die Aufzeichnung des Wirkungsmechanismus zu starten, wurde der Schreiber mit der „Pen down“ – Taste abgesenkt. Anschließend wurde die Nährstofflösung über einen am Gefäß befindlichen Schlauch abgelassen und durch eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Wenn die Plateau-Phase erreicht wurde und somit eine maximale Kontraktion vorlag, konnte der Antagonist Glibenclamid zugesetzt werden. Von dem Antagonisten Glibenclamid wurden 2 getrennte Versuche durchgeführt und aufgezeichnet mit jeweils verschiedenen Konzentrationen, zum einen 30  $\mu\text{mol}$  und zum anderen 100  $\mu\text{mol}$ . Bei den Versuchen wurde zuerst Glibenclamid in der entsprechenden Konzentration zugesetzt und nach einer 45 minütigen Wartezeit wurden 20  $\mu\text{mol/l}$  der Substanz SWS11HCl hinzugefügt (Konzentration des  $\text{EC}_{50}$ - Wertes) und der Wirkungsmechanismus ermittelt.

### **3.6.2 Versuche von SWS11HCl mit Nitro-L-Arginin**

Bei diesem Versuch wurde wie gewohnt die Aorta eingespannt und die entsprechenden Geräte aktiviert. Nach der Anpassungsphase, dem Wechsel des Mediums und der Wartezeit bis zur maximalen Kontraktion wurde der Antagonist Nitro-L-Arginin zugesetzt. Bei Nitro-L-Arginin wurde nur eine Versuchsreihe mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol}$  durchgeführt. Nach einer Zeit von 45 Minuten wurde die Testsubstanz SWS11HCl in einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  hinzugefügt und die Wirkung dokumentiert.

### **3.6.3 Versuche von SWS11HCl mit Phenylephrin-HCl**

Bei Phenylephrin handelt es sich im Gegensatz zu Glibenclamid und Nitro-L-Arginin um einen Agonisten.

Bevor mit den Versuchen begonnen werden konnte, musste erst noch eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Die benötigten Konzentrationen waren 0,1; 0,3; 1; 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ . Bei diesen Versuchsreihen wurde die höchste Konzentration von Phenylephrin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) zu Beginn eingespritzt und die geringste Konzentration (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) wurde als letzte eingespritzt.

Der Versuch wurde wieder in der Apparatur A, an einem präparierten und bei 19,6 mN vorgespannten Aortenstück durchgeführt. Da bei diesem Versuch das Organbad ein Volumen von 18 ml aufwies, musste die Substanzeinwaage dem entsprechend angepasst werden. Nach einer 20 minütigen Wartezeit, in der sich die Aorta an das umgebende Milieu anpassen konnte, wurde die 10  $\mu\text{mol/l}$  Konzentration in die Nährstofflösung eingebracht und die Wirkungen jeweils 30 Sekunden mit Hilfe des Schreibers dokumentiert.

Nach jeder Einspritzung wurde das Organbad 2-mal mit Tyrode gespült und je 5 Minuten gewartet, bevor es ausgelassen und anschließend wieder auf 18 ml aufgefüllt wurde, dann wurde die nächste Konzentration von Phenylephrin eingebracht und wieder 30 Sekunden aufgezeichnet.

Die Dokumentationen dienten als Kontrollwerte für die Versuche mit dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert der Testsubstanz.

Nach der Aufzeichnung der Kontrollwerte wurden 20  $\mu\text{mol/l}$  von SWS11HCl der Nährstofflösung zugesetzt und 45 Minuten gewartet um die Einwirkung auf das Organ zu ermöglichen. Anschließend erfolgte wieder die Zugabe des Agonisten zum Medium, wobei wieder mit der höchsten Konzentration begonnen wurde und mit der geringsten Konzentration beendet wurde. Im Gegensatz zu den Kontrollwerten wurde bei den Spülvorgängen immer mit einer Tyrodelösung gespült, die mit 20  $\mu\text{mol}$  der Testsubstanz versetzt worden war.

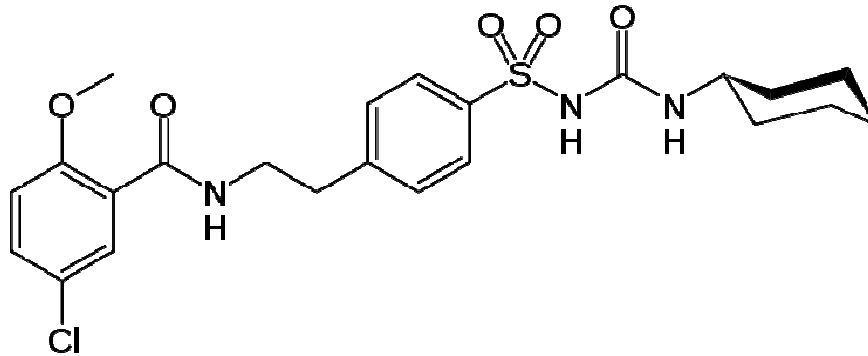
Bei dem Versuch mit dem Agonisten Phenylephrin-HCl war darauf zu achten, dass die Zeitabstände, vor allem der 10 Minuten-Rhythmus, exakt eingehalten wurde und dass die Substanzen jedes Mal ziemlich genau mit der gleichen Geschwindigkeit und an der selben Stelle, nahe des Aortapräparates in das Organbad eingebracht wurden, weil es sonst zu einer Veränderung der Ergebnisse kam.

Der Versuch gliederte sich in 3 Phasen, zum einen die Kontrollphase, im Anschluss die Einwirkung der Testsubstanz (45 Minuten) und zum Schluss die Auswaschphase.

## 3.7 Verwendete Agonisten bzw. Antagonisten

### 3.7.1 Glibenclamid

Abbildung 15 Struktur von Glibenclamid



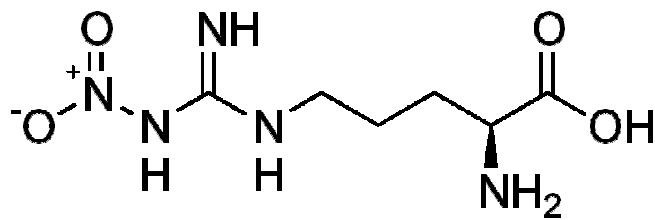
5 – Chlor – N – [2 – [4 – (cyclohexylcarbamoylsulfamoyl) phenyl] ethyl] – 2 – methoxybenzamid

MG = 494,00 g/ mol

Glibenclamid gehört zu den Sulfonylharnstoffen. Diese Substanzgruppe stimuliert die Insulinfreisetzung aus den B-Zellen der Bauchspeicheldrüse unabhängig vom Glucosespiegel des Blutes. Sulfonylharnstoffe sind nur wirksam, wenn die Insulinproduktion zumindest noch teilweise funktioniert, wie bei Typ 2-Diabetikern. Bei einem vollständigen Insulinmangel sind diese Wirkstoffe wirkungslos. Bei der Bindung von Glibenclamid an die SUR1-Untereinheit der B-Zelle kommt es zu einer Schließung der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Dies führt wiederum zu einer Depolarisation der Membran und in Folge zu einer Öffnung der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Dadurch kommt es zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die B-Zelle des Pankreas und die Insulinfreisetzung wird stimuliert (Aktories et al. 2005). Die mit Abstand wichtigste Nebenwirkung der Sulfonylharnstoffe ist die Gefahr einer Hypoglykämie. Um diese Nebenwirkung jedoch zu vermeiden, ist es wichtig, diese Wirkstoffgruppe einschleichend und in niedrigen Dosen zu verabreichen. Da eine Hypoglykämie auch mit einer unregelmäßigen Nahrungsaufnahme in Zusammenhang steht, ist verständlich, dass eine streng geregelte Nahrungsaufnahme die Gefahr eines hypoglykämischen Zustandes vermindert. Bei Vorhandensein einer Hypoglykämie ist es lebensnotwendig Glucose zu infundieren.

### 3.7.2 Nitro-L-Arginin

Abbildung 16 Struktur von Nitro-L-Arginin



(2S)-2-Amino-5-[[amino(nitramido)methylidene]amino]pentanoic acid

MG = 219,20 g/mol

Nitro-L-Arginin hemmt als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase die Stickstoffmonoxid-Freisetzung und verhindert somit eine NO vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur. Das freigesetzte NO stimuliert die Guanylylcyclase, die für die Bildung von cGMP verantwortlich ist. Cyclisches Guanosinmonophosphat führt zu einer Senkung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration und in Folge zu einer Senkung des Gefäßtonus.

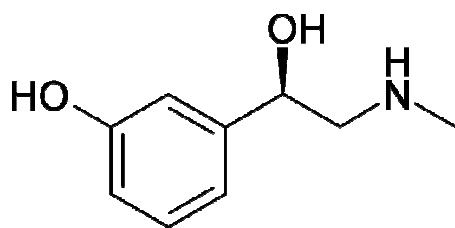
Durch Nitro-L-Arginin kommt es zu einer Abnahme der NO-Konzentration und damit zu einer Steigerung der Kontraktion der glatten Muskulatur des Gastrointestinal-Traktes. NO besitzt aber nicht nur gefäßerweiternde Eigenschaften, sondern es wirkt auch Thrombozytenaggregations-hemmend.

Stickstoffmonoxid besitzt 3 Isoformen:

- induzierbare Form (iNOs): kann als Antwort auf pathologische Stimuli hochreguliert werden und kommt in den peripheren Blutzellen, im Endothel und in der glatten Gefäßmuskulatur vor.
- Konstitutive, endotheliale Form (eNOs): dient der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und somit der Blutdruckregulation. Diese Form kommt im Endothel, in Kardiomyozyten und in Thrombozyten vor.
- Konstitutive, neuronale Form (nNOs): wird in den NO-produzierenden Neuronen gefunden (Mutschler et al. 2008).

### 3.7.3 Phenylephrin

Abbildung 17 Struktur von Phenylephrin



(R) – 1 – (3 – Hydroxyphenyl) – 2 – (methyldamino) ethanol

MG = 167,21 g/mol

Phenylephrin ist ein  $\alpha$ -Adrenozeptoragonist und wird hauptsächlich als Vasokonstriktor zur Schleimhautabschwellung bei Sinusitis, Konjunktivitis und Nasopharyngitis verwendet.

Phenylephrin ist dem Adrenalin strukturell sehr ähnlich und es wirkt auch direkt sympathomimetisch.

Aufgrund der Gefahr von systemischen Nebenwirkungen wie ventrikuläre Rhythmusstörungen und pektanginösen Beschwerden ist eine vorsichtige Dosierung erforderlich. Vor allem bei empfindlichen Patienten (Hypertoniker und Hyperthyreotiker) ist Vorsicht geboten (Mutschler et al. 2008).

## 3.8 Auswertung der Versuchsreihen

Bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel musste, wie bereits vorher erwähnt, die Eigenwirkung von Dimethylsulfoxid bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Die Substanz SWS11HCl wurde in destilliertem Wasser gelöst und somit konnten die Testergebnisse direkt verwendet werden. Die Substanz WHGTeoT wurde jedoch in DMSO gelöst und aus diesem Grund mussten die Testergebnisse entsprechend nach oben oder unten korrigiert werden.

### **3.8.1 Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum**

Die bei der Dokumentation durch den Schreiber erhaltene Kurve veranschaulichte das Verhalten der einzelnen Organe bei Zugabe der Testsubstanzen.

Die maximale Kontraktion der glatten Muskulatur, ausgelöst durch die Zugabe der KCl-Lösung ins Organbad, wurde dargestellt durch das Plateau zu Beginn der Kurve. Die Entfernung des Plateaus von der Nulllinie wurde mit dem Lineal gemessen und der erhaltene Wert (in cm) stellte die maximale Kontraktion und somit 100 % dar. In Folge wurden die Abstände nach 45 min Einwirkzeit der Substanzlösung am Organ gemessen. Dafür wurde kurz vor der Markierung, die bei der Einspritzung der nächst höheren Konzentration gesetzt wurde, gemessen. Führt die Substanz zu keiner Dilatation, dann war der Abstand gleich wie der Ausgangswert, wenn es jedoch zu einer Dilatation kam, dann war die Entfernung zur Nulllinie geringer und die Kontraktion lag unter 100 %. Es wurde jeweils die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft in Bezug auf den 100 %igen Plateauwert ermittelt.

Die Abstände der einzelnen Messungen mussten aber noch mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert werden, um die Ergebnisse in mN zu erhalten. Dazu wurde bei einer Einstellung von 5 mV nur mit 0,98 multipliziert. Bei einer Einstellung von 2 mV musste zusätzlich noch mit 0,4 multipliziert werden und bei 10 mV war noch mit 2 zu multiplizieren.

### **3.8.2 Musculus papillaris**

Am Musculus papillaris wurde ebenfalls die Kontraktionskraft untersucht. Im Gegensatz zu den gerade beschriebenen Präparaten erfolgte eine Dokumentation der Messung nur alle 5 min und nicht permanent. Bei den Versuchen am Papillarmuskel wurden jeweils 6 Amplituden erfasst und diese anschließend wieder mit dem Lineal abgemessen. Der Durchschnittswert der 6 Amplituden wurde bestimmt und mit dem Eichfaktor multipliziert.

Die Durchschnittslänge der letzten Kontrollmessung stellte den Vergleichswert dar und wurde als 100 % betrachtet. Jeweils die Amplituden der letzten Messung (nach 45 Minuten) der verschiedenen Konzentrationen wurden mit der Kontrollmessung verglichen und die



prozentuelle Abnahme oder Zunahme berechnet. Die Testsubstanzen konnten entweder positiv inotrop oder negativ inotrop auf den Papillarmuskel wirken.

### **3.8.3 Atrium cordis dextrum**

Bei den Versuchen am rechten Vorhof wurde ermittelt, wie sich die Substanzen auf die Herzfrequenz auswirkten. Die Messungen wurden auch hier nur alle 5 Minuten aufgezeichnet und nicht permanent. Die letzte Kontrollmessung stellte wieder den Vergleichswert mit 100 % dar. Mit diesem Vergleichswert wurden jeweils die letzten Messungen aller übrigen Konzentrationen verglichen und der Prozentsatz ermittelt. Ein Prozentsatz über 100 deutete auf eine positiv chronotrope Substanz hin, ein Prozentsatz unter 100 wurde erzielt bei einer negativ chronotrop wirkenden Substanz.

## **3.9 Statistik**

Da die Testsubstanz WHGTeoT in DMSO gelöst wurde, musste, wie bereits erwähnt, die Eigenwirkung von DMSO berücksichtigt werden. Von den Werten der Testsubstanzen musste DMSO organabhängig entweder subtrahiert oder addiert werden.

Von den erhaltenen Messwerten einer Versuchsreihe wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler gebildet. Aus diesen Werten wurde dann eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, bei der auf der y-Achse die Kontraktionskraft- bzw. die Schlagfrequenzänderungen aufgetragen wurden und auf der x-Achse logarithmisch die verwendeten Testsubstanzkonzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Mit Hilfe des Programms Sigma Plot wurde eine graphische Darstellung erstellt, aus der eine eventuell vorhandene  $\text{EC}_{50}$  abgelesen werden konnte. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert definierte die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$ , bei der es zu einer Senkung der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes kam. Die Signifikanz der Messergebnisse wurde ebenfalls beurteilt und zwar mit dem Student-t-Test, dabei wurden Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ( $P < 0,05$ ) bzw. weniger als 1 % ( $P < 0,01$ ) als signifikant eingestuft und Werte, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1 % ( $P < 0,001$ ) hatten, wurden als hochsignifikant klassifiziert.

## 4 Ergebnisse

Die Wirkungen der Testsubstanzen WHGTeoT und SWS11HCl auf isolierte Organe von Meerschweinchen sind Thema des folgenden Kapitels.

Die Tests wurden, wie schon mehrmals erwähnt, am Vorhof, Papillarmuskel, Aorta, Pulmonalarterie und Darm durchgeführt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden mindestens 5 Tests pro Organ und Wirkstoff durchgeführt. Bei der Substanz WHGTeoT, die in DMSO gelöst wurde, war die Eigenwirkung von DMSO zu berücksichtigen. Von den Messergebnissen wurde sowohl der Mittelwert, als auch die Standardabweichung gebildet.

Aus den erhaltenen Daten wurden anschließend Konzentrations-Wirkungskurven sämtlicher Organe erstellt.

### 4.1 Ergebnisse der Testsubstanz WHGTeoT

#### 4.1.1 Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Zur Untersuchung der Auswirkung von WHGTeoT auf die Kontraktion des Darmes, wurde wie bereits in Kapitel 3.5.7 beschrieben, ein präpariertes Darmstück in der Apparatur A befestigt. Nach den entsprechenden Vorbereitungen und der Vorspannung des Organs bei 4,9 mN folgte die Anpassungsphase des Darmes an das Medium. Im Anschluss an diese 20 minütige Anpassung wurde die Elektrolytlösung abgelassen und durch eine 60 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Die KCl-Lösung wurde verwendet um eine maximale Kontraktion hervorzurufen. Die Kontraktion äußerte sich in der Aufzeichnung des Schreibers in einer konstanten Plateauphase. Erst nach Erreichen dieser Plateau- bzw. Kontrollphase konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden. Der Abstand in Zentimeter zwischen Nulllinie und Kontrollphase wurde als 100 % bewertet und diente als Vergleich mit den übrigen Ab-

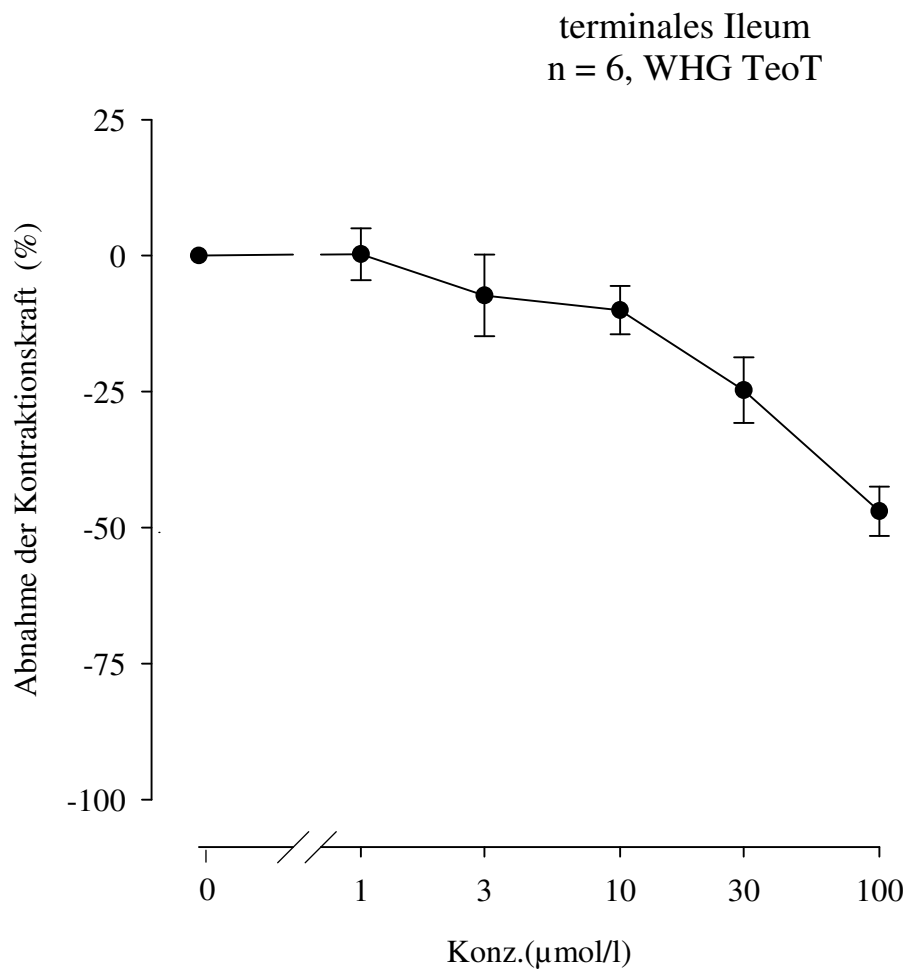
ständen. Durch die Testsubstanz kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, was im kurvenförmigen Verlauf der Grafik zu erkennen war.

In Folge wurden noch die Mittelwerte und die Standardfehler der Testergebnisse berechnet, die in nachfolgender Tabelle dargestellt sind.

**Abbildung 18 Wirkung von WHGTeoT auf das terminale Ileum**

| <b>WHGTeoT<br/>[μmol/l]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[mN]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                   | 9,09 ± 1,83                         | 00,00 ± 0,00                       | 6                                  | -                                      |
| 1                           | 9,15 ± 1,99                         | 0,27 ± 4,77                        | 6                                  | n.s.                                   |
| 3                           | 8,53 ± 1,96                         | -7,32 ± 7,50                       | 6                                  | n.s.                                   |
| 10                          | 8,42 ± 1,99                         | -10 ± 4,46                         | 6                                  | n.s.                                   |
| 30                          | 7,26 ± 1,93                         | -24,72 ± 6,01                      | 6                                  | 0,01                                   |
| 100                         | 5,27 ± 1,40                         | -46,98 ± 4,51                      | 6                                  | 0,001                                  |

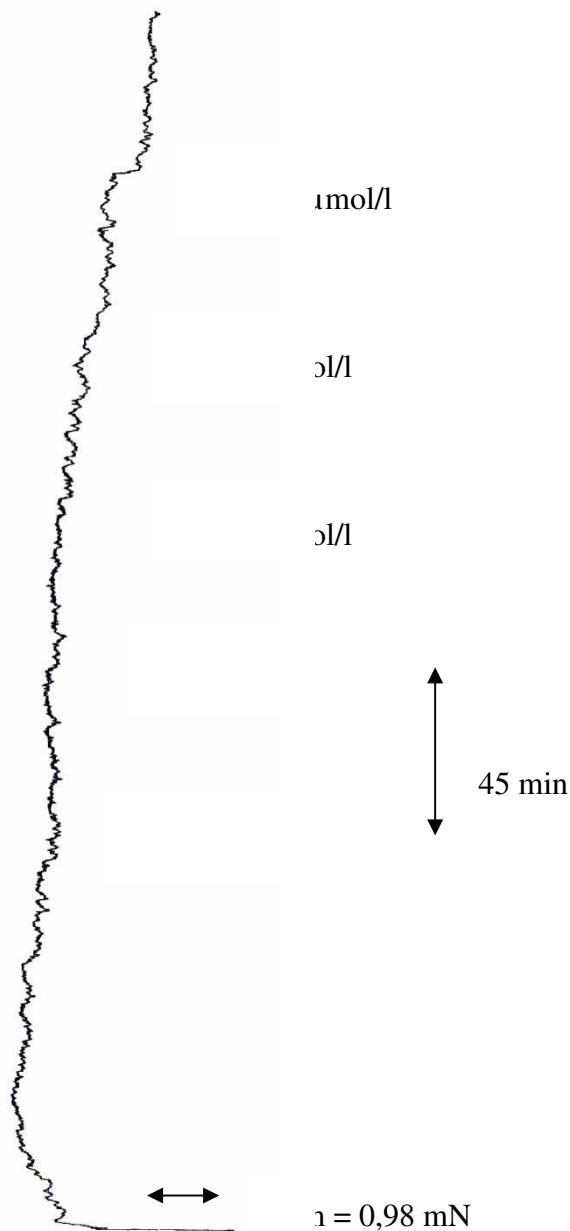
Abbildung 19 Konzentrations-Wirkungskurve von WHGTeoT am terminalen Ileum



Die Darstellung zeigt die Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums. Auf der x-Achse wurde logarithmisch die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen jeweils die Mittelwerte dar und die senkrechten Striche durch die Punkte stellen die Standardfehler dar. Sind die Striche kurz, dann bedeutet das, dass der Standardfehler nur gering ist, bei längeren Strichen ist die Abweichung demnach höher.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums, vor allem ab der  $10 \mu\text{mol/l}$  Konzentration kommt es zu einer steilen Abnahme. Mit der Testsubstanz WHGTeoT konnte kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert erzielt werden.

**Abbildung 20 Originaldokumentation der Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums**



Die Aufzeichnung entspricht der vorher beschriebenen Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum durch WHGTeoT. Grundsätzlich verläuft die Kurve relativ flach bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ , erst dann kommt es zu einer deutlicheren Abnahme der Kontraktionskraft, ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  verläuft die Kurve steiler. Die Substanzzugabe erfolgte alle 45 min.

#### 4.1.2 Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

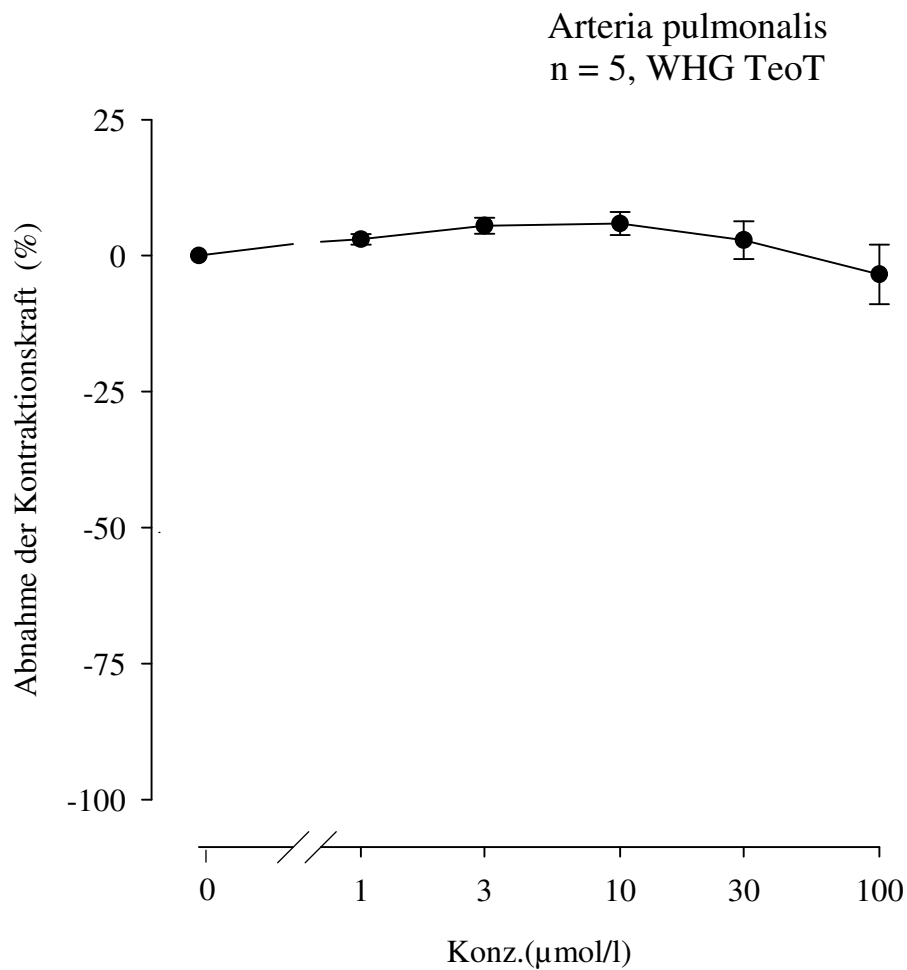
Das ringförmige Teilstück der Arteria pulmonalis wurde - wie bereits in Kapitel 3.5.6 beschrieben - in die Versuchsapparatur A eingehängt und vorgespannt. Nach einer 20 minütigen Anpassungsphase wurde die Nährstofflösung abgelassen und durch eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Durch die KCl-Lösung wurde eine maximale Kontraktion ausgelöst, die in der Dokumentation das Kontrollplateau darstellte. Sobald die Kontraktion konstant war, frühestens jedoch nach 45 min, konnte mit der kumulativen Einspritzung der Testsubstanzlösung begonnen werden. Der Abstand zwischen Kontrollplateau und Nulllinie wurde wieder als 100 % -Wert festgelegt und die restlichen Werte wurden in Relation dazu gesetzt. Um aussagekräftige Ergebnisse über die Kontraktionskraft zu erhalten, wurden mehrere Versuche durchgeführt. Durch die Abnahme der Kontraktionskraft, nahm die mittels Schreiber durchgeführte Aufzeichnung, einen kurvenförmigen Verlauf.

Die nachfolgende Tabelle enthält die errechneten Mittelwerte und Standardfehler, sowohl in mN als auch in Prozent.

Abbildung 21 Wirkung von WHGTeoT auf die Arteria pulmonalis

| WHGTeoT<br>[μmol/l] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[mN] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[%] | Anzahl der<br>Versuche [n] | Irrtumswahrscheinlichkeit<br>P |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Kontrolle           | 13,44 ± 1,95                 | 00,00 ± 0,00                | 5                          | -                              |
| 1                   | 13,77 ± 1,94                 | 3,01 ± 0,99                 | 5                          | n.s.                           |
| 3                   | 14,08 ± 1,95                 | 5,50 ± 1,45                 | 5                          | n.s.                           |
| 10                  | 14,11 ± 1,94                 | 5,89 ± 2,11                 | 5                          | n.s.                           |
| 30                  | 13,71 ± 1,93                 | 2,86 ± 3,49                 | 5                          | n.s.                           |
| 100                 | 12,98 ± 2,00                 | -3,43 ± 5,44                | 5                          | n.s.                           |

Abbildung 22 Konzentrations-Wirkungskurve von WHGTeoT an der Arteria pulmonalis

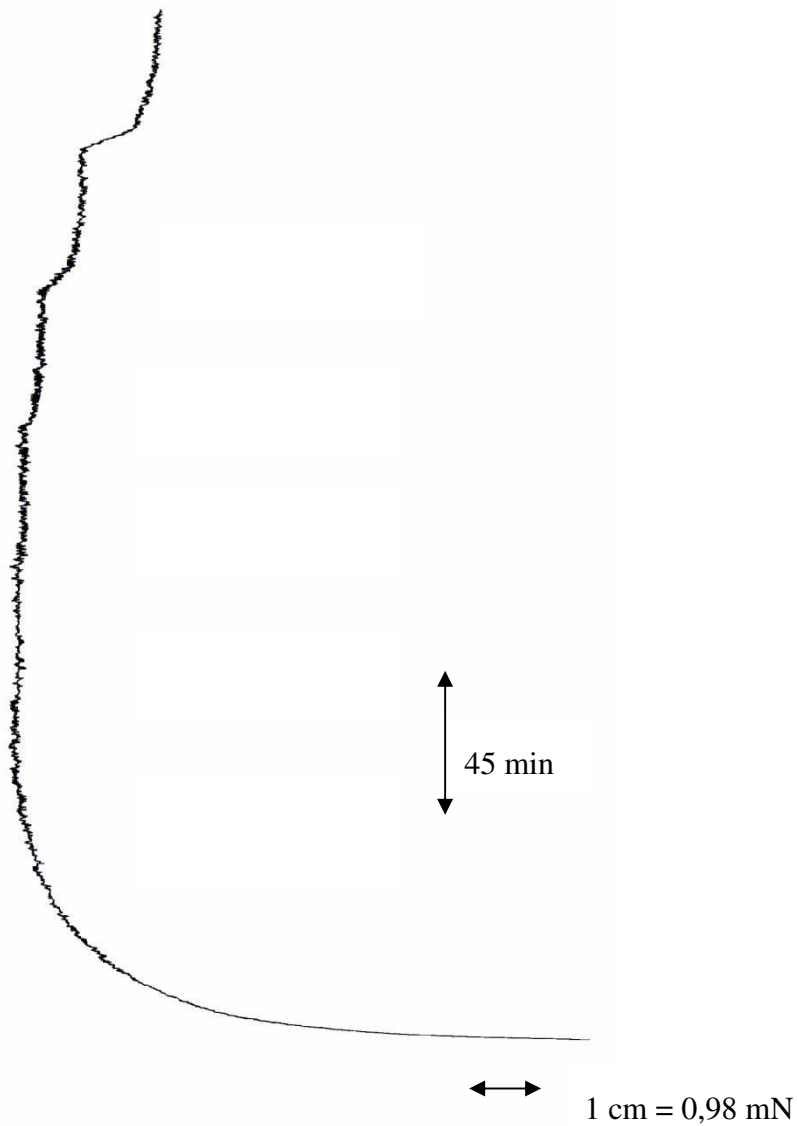


Auf die Abszisse wurde logarithmisch die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  eingetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die Mittelwerte der 5 durchgeführten Versuche dar. Die von den Punkten senkrecht ausgehenden Striche, veranschaulichen den Standardfehler. Kurze Striche deuten auf einen geringen Standardfehler hin, lange Striche kennzeichnen eine größere Streuung der Ergebnisse.

Die graphische Darstellung zeigt, wie bereits vorher beschrieben wurde, eine relativ flache Kurve, das heißt, es kam nur zu einer minimalen Abnahme der Kontraktionskraft.

Ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert konnte mit der Substanz nicht erreicht werden.

**Abbildung 23 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis**



Die vom Schreiber dokumentierte Grafik zeigt eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis nach Applikation von WHGTeoT. Die Substanzzugabe erfolgte im Zeitabstand von 45 min und wurde durchgeführt bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . Bis zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu keiner Änderung der Kontraktionskraft, erst ab 10  $\mu\text{mol/l}$  war eine leichte aber deutliche Kontraktionskraftabnahme sichtbar. Bei 30  $\mu\text{mol/l}$  war die Abnahme dann steiler.



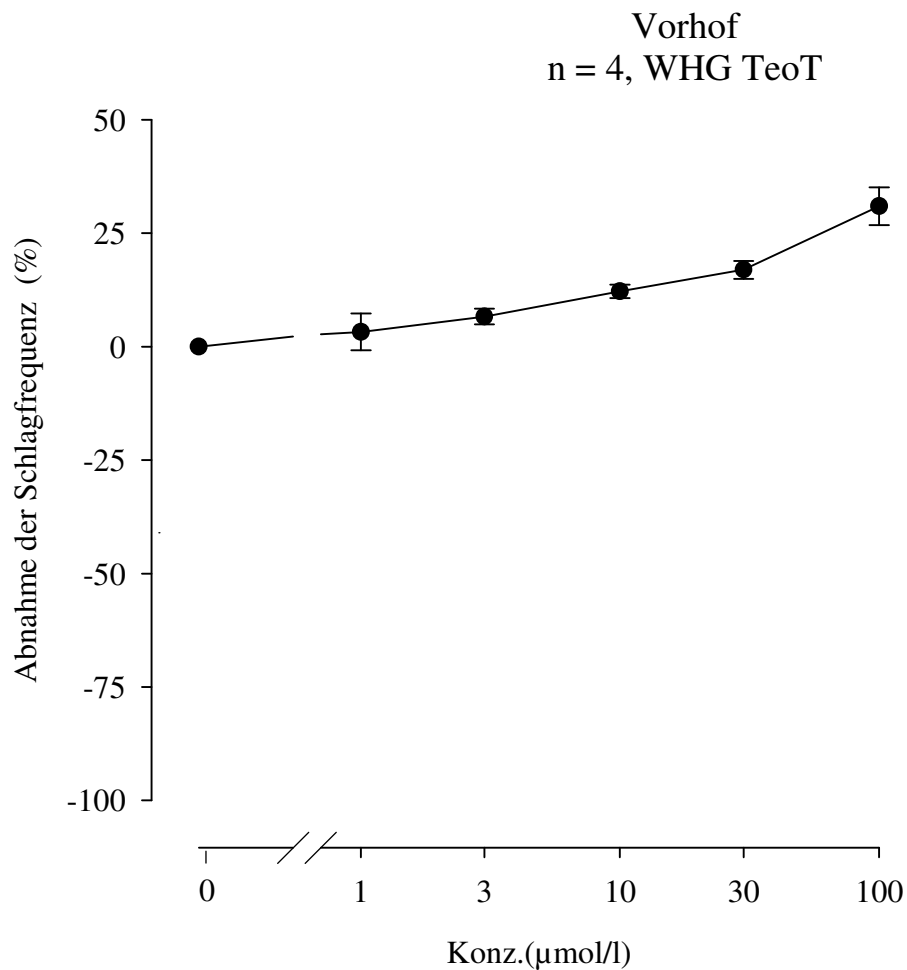
### 4.1.3 Wirkung von WHGTeoT auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Der Vorhof wurde verwendet, um die Auswirkungen der Testsubstanz WHGTeoT auf die Herzfrequenz zu untersuchen. Wie bereits in Kapitel 3.5.3 ausführlich erläutert, wurde der fertig präparierte Vorhof in die Apparatur A eingehängt und vorgespannt. Nach einer Dauer von ungefähr 20 Minuten, in der sich der Vorhof an das umgebende Milieu anpassen konnte, wurde mit den Kontrollmessungen begonnen, dabei wurde alle 5 min die Herzfrequenz mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet. Die Messung erfolgte über einen Bereich von 6 cm, das entsprach genau 12 Sekunden. Bei der Messung wurde überprüft ob die Herzfrequenz konstant war. Die konstante Herzfrequenz wurde als Kontrollmessung herangezogen und entsprach 100 %. Anschließend konnte mit der Einspritzung der Testsubstanzlösung begonnen werden. Die Testsubstanz WHGTeoT wurde im Abstand von 45 Minuten in das Organbad eingebracht. Die Messungen wurden wie gewohnt alle 5 min für je 12 Sekunden aufgezeichnet. Um die Herzfrequenz pro Minute zu erhalten musste die Herzfrequenz mit 5 multipliziert werden. Die Konzentrationen die jeweils auf das Organ einwirkten waren 1, 3, 10, 30, und 100  $\mu\text{mol/l}$ . Für aussagekräftige Ergebnisse, mussten die Versuche mehrmals wiederholt werden, aus den erhaltenen Werten wurden anschließend die Mittelwerte und die Standardfehler ermittelt, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind.

**Abbildung 24 Wirkung von WHGTeoT auf den rechten Vorhof**

| <b>WHGTeoT<br/>[<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>[mN]</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                                         | $221 \pm 15,46$                                 | $00,00 \pm 0,00$                               | 4                                  | -                                      |
| 1                                                 | $227 \pm 11,46$                                 | $3,25 \pm 4,04$                                | 4                                  | n.s.                                   |
| 3                                                 | $235 \pm 13,62$                                 | $6,63 \pm 1,75$                                | 4                                  | n.s.                                   |
| 10                                                | $248 \pm 15,80$                                 | $12,19 \pm 1,47$                               | 4                                  | n.s.                                   |
| 30                                                | $258 \pm 15,35$                                 | $16,94 \pm 1,96$                               | 4                                  | n.s.                                   |
| 100                                               | $288 \pm 11,13$                                 | $30,95 \pm 4,15$                               | 4                                  | n.s.                                   |

Abbildung 25 Konzentrations-Wirkungskurve von WHGTeoT am rechten Vorhof

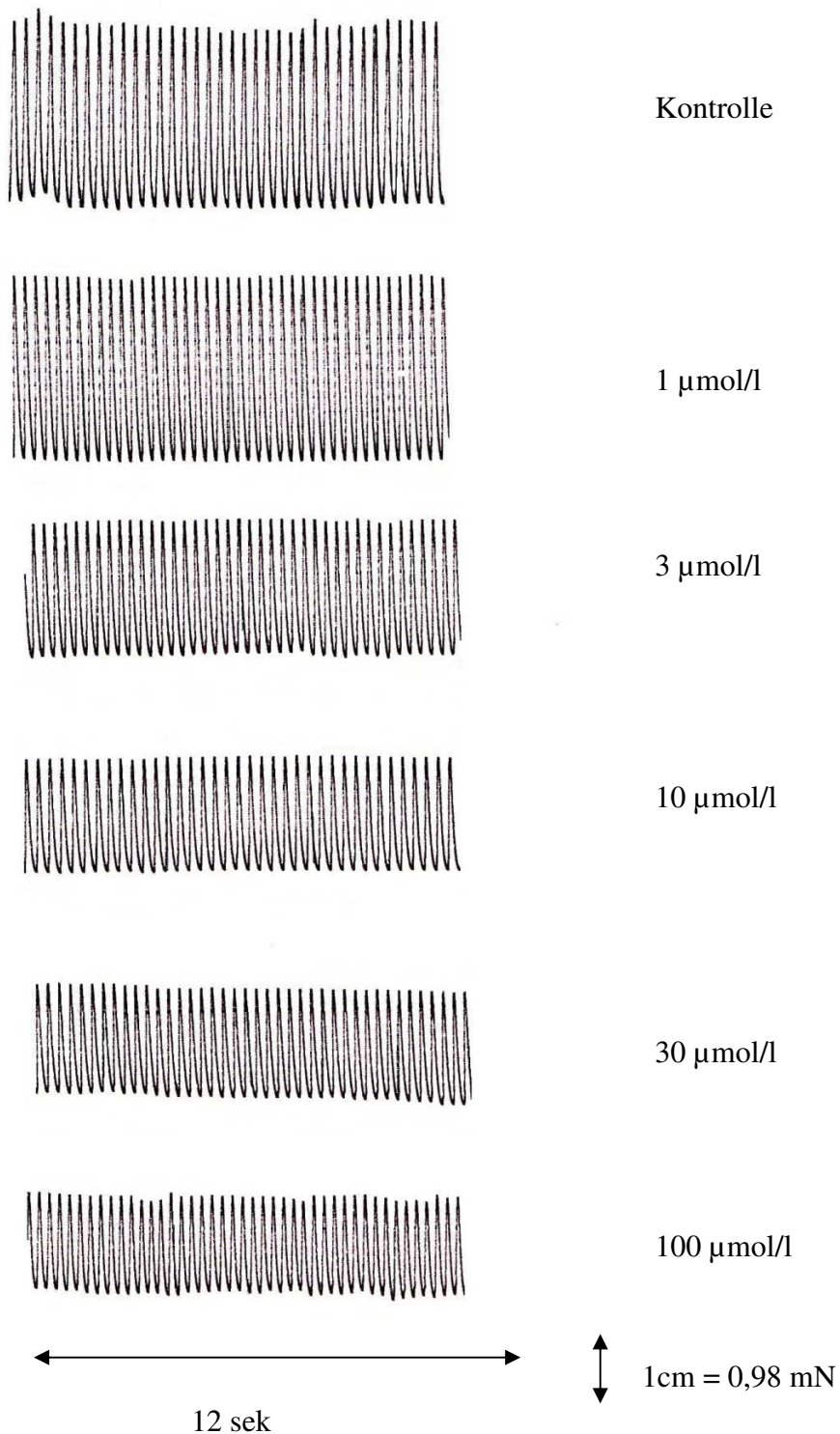


Wie auf den ersten Blick aus der Grafik zu erkennen ist, verursachte die Testsubstanz WHGTeoT eine Steigerung der Herzfrequenz, die Substanz wirkte somit positiv chronotrop.

Auf der Abszisse wurde die logarithmische Konzentration von WHGTeoT in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der Ordinate die Änderung der Schlagfrequenz in Prozent, daraus wurde die Konzentrations-Wirkungskurve gebildet. Die Punkte dienen der Darstellung der Mittelwerte, die von den Mittelwerten ausgehenden Linien stellen die Standardfehler dar.

Die Grafik zeigt, dass es bereits ab der ersten Verabreichung der Testsubstanz zu einer leichten Steigerung der Herzfrequenz kam, ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  stieg die Schlagfrequenz etwas steiler an.

Abbildung 26 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGTeoT auf die Herzfrequenz des Vorhofs



Unter dem Einfluss von WHGTeoT auf den Vorhof zeigt sich eine leichte Steigerung der Schlagfrequenz. Die Zugabe der Testsubstanzen in den steigenden Konzentrationen erfolgte jeweils in einem Abstand von 45 Minuten.

#### 4.1.4 Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Aorta

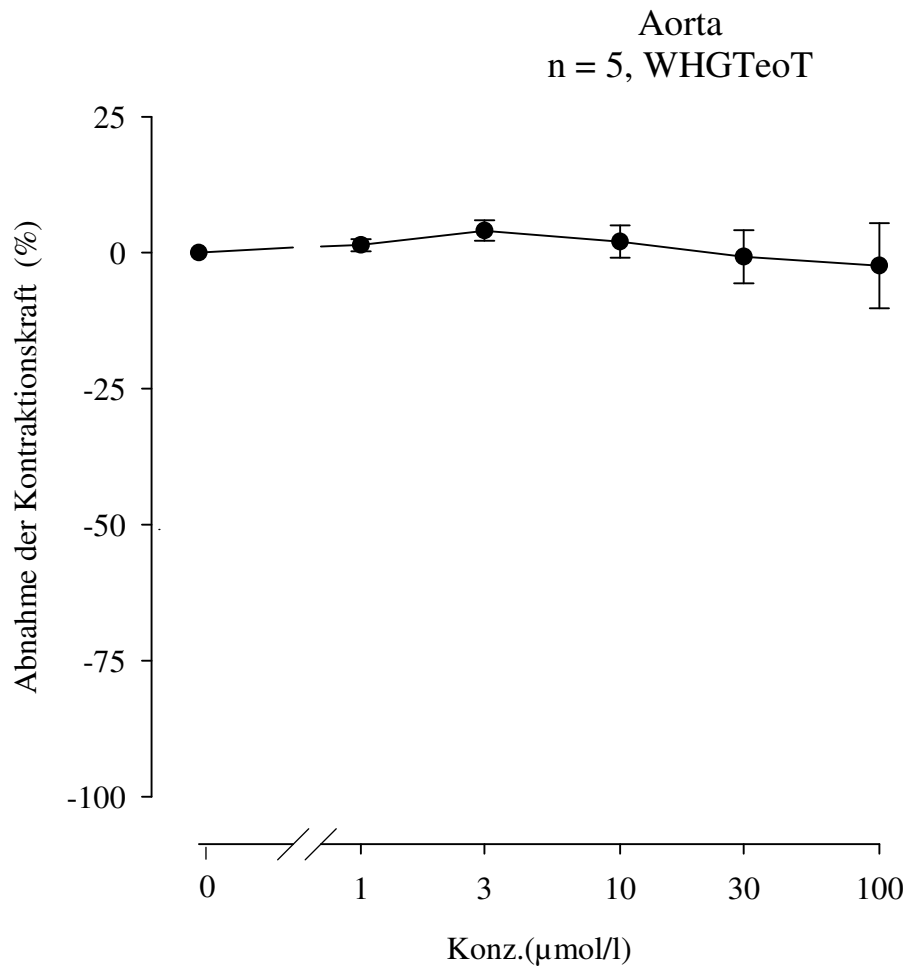
Die Wirkung der Testsubstanz WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde in 5 Versuchen ermittelt. Das ringförmige Teilstück der Aorta wurde in der Apparatur A fixiert und die Geräte, wie in Kapitel 3.5.5 bereits beschrieben, aktiviert. Nach einer Anpassungsphase von 20 Minuten wurde die Aorta mit einer 90 mmolaren KCl-Lösung kontrahiert, anschließend wurde gewartet, bis die Aorta eine maximale Kontraktion aufwies, mindestens jedoch 45 Minuten. Sobald ein konstantes Kontrollplateau erreicht wurde, das als Vergleich zu den übrigen Konzentrationen diente, konnte mit der Testsubstanzzugabe begonnen werden. Die Substanz WHGTeoT wurde in steigender Konzentration alle 45 min in das Organbad eingebracht.

Aus den 5 Versuchen wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und die Standardfehler (SEM), in Bezug auf den Kontrollwert, berechnet und in nachfolgender Tabelle dargestellt. Die Kontraktionskraft wird sowohl in mN als auch in % angeführt.

Abbildung 27 Wirkung von WHGTeoT auf die Aorta descendens

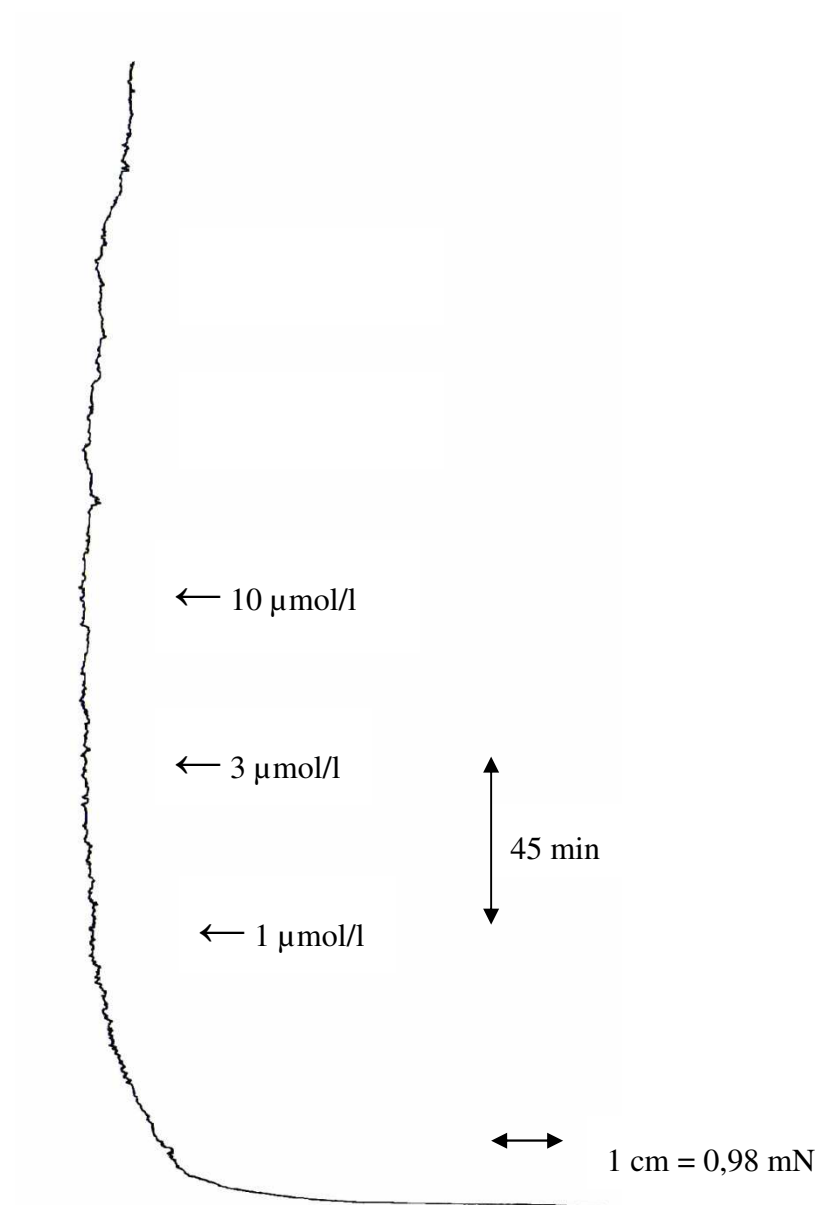
| WHGTeoT<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[mN] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[%] | Anzahl der<br>Versuche [n] | Irrtumswahrscheinlichkeit<br>P |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Kontrolle                        | $13,46 \pm 4,18$             | $00,00 \pm 0,00$            | 5                          | -                              |
| 1                                | $13,70 \pm 4,33$             | $1,4 \pm 1,12$              | 5                          | n.s.                           |
| 3                                | $14,15 \pm 4,53$             | $4,07 \pm 1,89$             | 5                          | n.s.                           |
| 10                               | $14,06 \pm 4,71$             | $2,05 \pm 2,95$             | 5                          | n.s.                           |
| 30                               | $13,82 \pm 4,73$             | $- 0,72 \pm 4,89$           | 5                          | n.s.                           |
| 100                              | $13,79 \pm 4,90$             | $- 2,37 \pm 7,82$           | 5                          | n.s.                           |

Abbildung 28 Konzentrations-Wirkungskurve von WHGTeoT an der Aorta



Auf der x-Achse wurde die logarithmische Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  und auf der y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt. Die Grafik zeigt, dass es durch die Applikation von WHGTeoT an der Aorta zu keiner signifikanten Änderung der Kontraktionskraft kam. WHGTeoT hat demzufolge keine Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta. Die Punkte der Grafik zeigen die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen und die senkrechten Striche durch die Punkte, zeigen die Standardfehler.

Abbildung 29 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Aorta



Die Abbildung bestätigt, dass die Testsubstanz WHGTeoT keine deutliche Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta aufweist.

#### **4.1.5 Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels**

Der Papillarmuskel wurde, wie bereits in Kapitel 3.5.4 beschrieben, präpariert und in die Versuchsanordnung B eingespannt. Anschließend wurden die Geräte aktiviert und der Muskel auf 3,92 mN vorgespannt, nach einer kurzen Wartezeit in der sich der Muskel an das umgebende Milieu anpassen konnte, wurde mit den Kontrollmessungen begonnen. Die Kontrollmessungen dienten der Überprüfung, ob die Kontraktionskraft schon konstant war und man mit der Substanzzugabe beginnen konnte. Dazu wurden die Amplituden der Messungen, die alle 5 Minuten aufgezeichnet wurden, mit Hilfe eines Lineals abgemessen. Wenn die Amplituden konstant lang waren, konnte mit der Substanzzugabe, nach dem im Kapitel 3.5 beschriebenen Pipettierschema, begonnen werden. Diese Amplituden stellten den Kontrollwert dar, mit dem dann sämtliche Konzentrationen verglichen wurden. Zur Umrechnung der Amplituden in mN musste mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert werden, außerdem musste meistens noch mit 0,4 multipliziert werden, da die Messungen in der Regel bei 2 mV durchgeführt wurden. Wenn die Messung bei 5 mV durchgeführt wurde, reichte es, wenn man das Ergebnis mit dem Eichfaktor multiplizierte.

Die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler der einzelnen Konzentrationen wurden in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

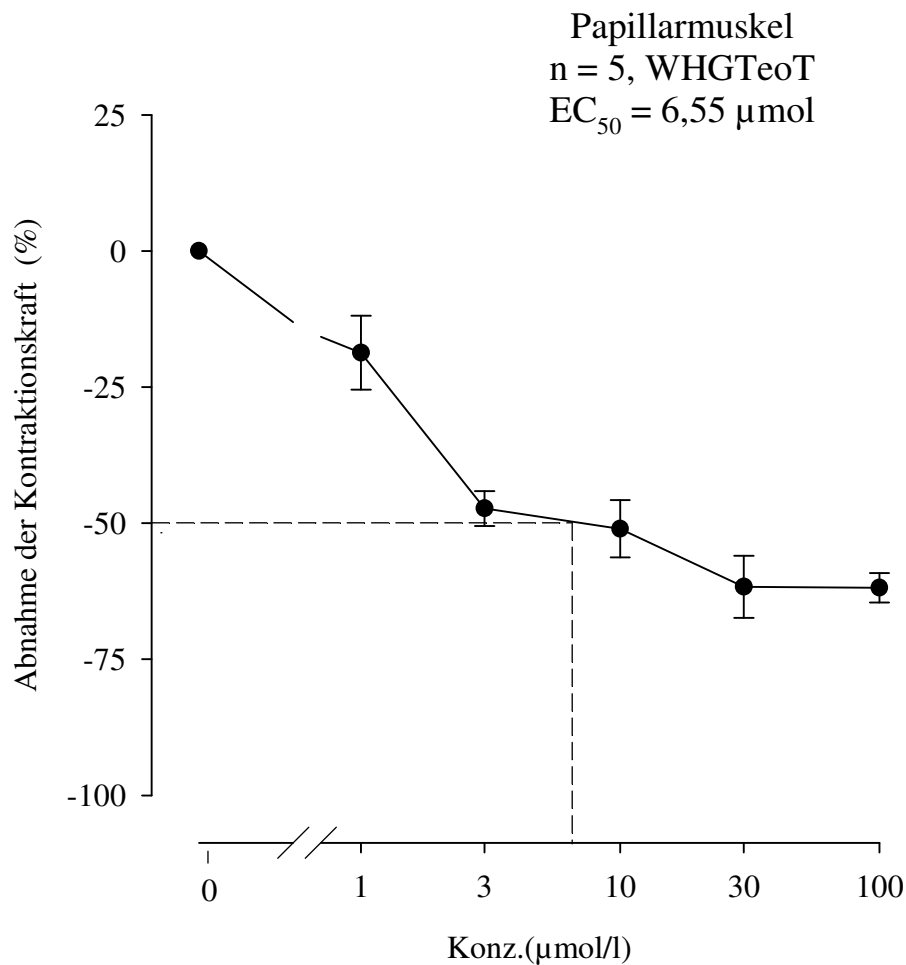
Aufgrund des großen Einflusses von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels konnte ein  $EC_{50}$ -Wert bei einer Konzentration von 6,55  $\mu\text{mol/l}$  erreicht werden.

**Abbildung 30 Wirkung von WHGTeoT auf den Papillarmuskel**

| <b>WHGTeoT<br/>[μmol/l]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[mN]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                   | 1,3 ± 0,49                          | 00,00 ± 0,00                       | 5                                  | -                                      |
| 1                           | 1,13 ± 0,51                         | - 18,68 ± 6,81                     | 5                                  | 0,05                                   |
| 3                           | 0,70 ± 0,26                         | - 47,31 ± 3,22                     | 5                                  | 0,001                                  |
| 10                          | 0,67 ± 0,28                         | - 51,05 ± 5,26                     | 5                                  | 0,001                                  |
| 30                          | 0,53 ± 0,26                         | - 61,70 ± 5,68                     | 5                                  | 0,001                                  |
| 100                         | 0,52 ± 0,22                         | - 61,89 ± 2,72                     | 5                                  | 0,001                                  |



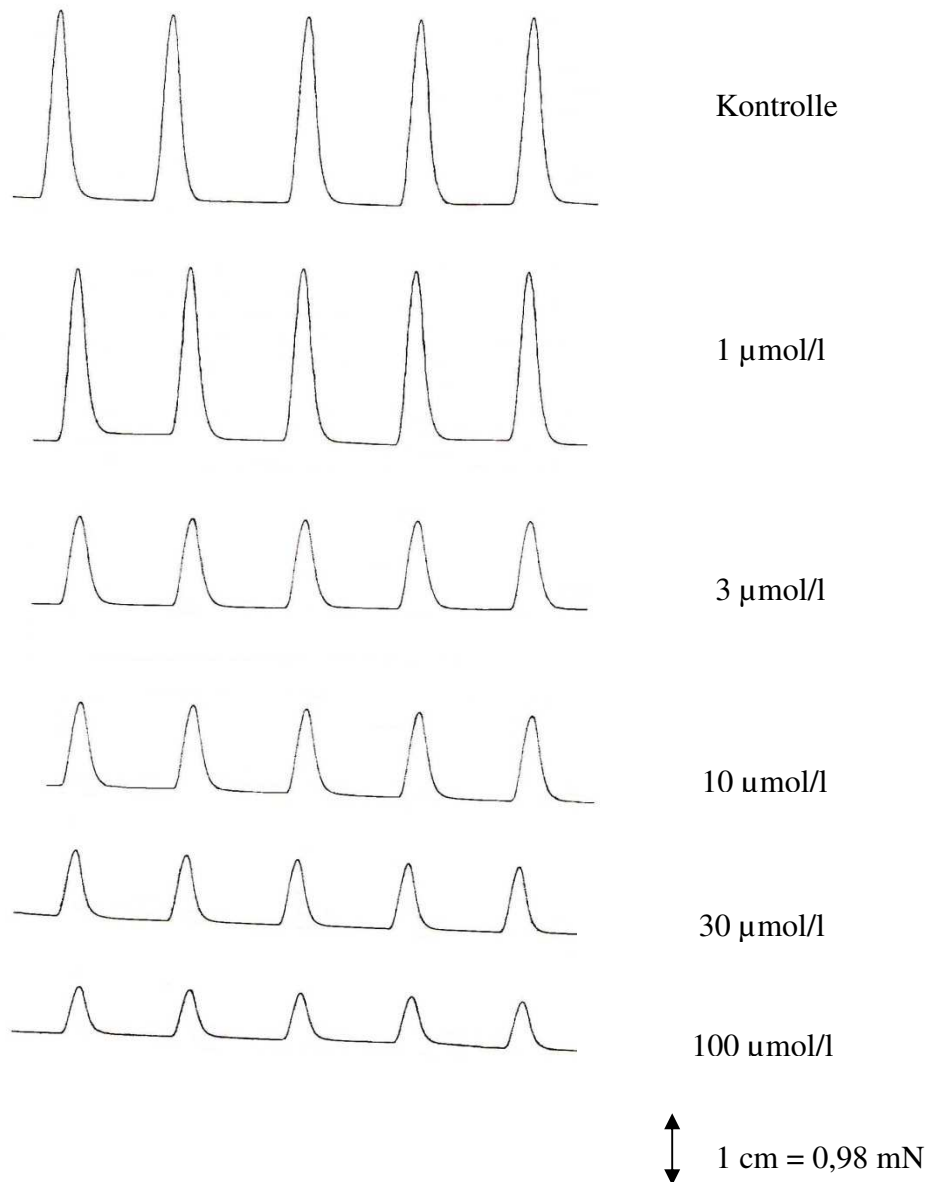
Abbildung 31 Konzentrations-Wirkungskurve von WHGTeoT am Papillarmuskel



Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen von WHGTeoT logarithmisch aufgetragen und auf der Ordinate die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Punkte markieren die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanzen, die durch die Punkte verlaufenden Striche beziehen sich auf den Standardfehler. Es wurden 5 Versuche durchgeführt, die alle zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels führten. Der EC<sub>50</sub> Wert von WHGTeoT liegt bei 6,55 µmol/l, das heißt bei dieser Konzentration kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um die Hälfte.

**Abbildung 32 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels**



In einem Intervall von 45 Minuten wurden die Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l gemessen und dokumentiert.

An der Grafik lässt sich deutlich erkennen, dass es unter der Anwendung von WHGTeoT zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kam. Die Amplituden der einzelnen Konzentrationen wurden immer kleiner mit zunehmender Konzentration. Die Substanz hatte demzufolge einen negativ inotropen Effekt.

## 4.2 Ergebnisse der Testsubstanz SWS11HCl

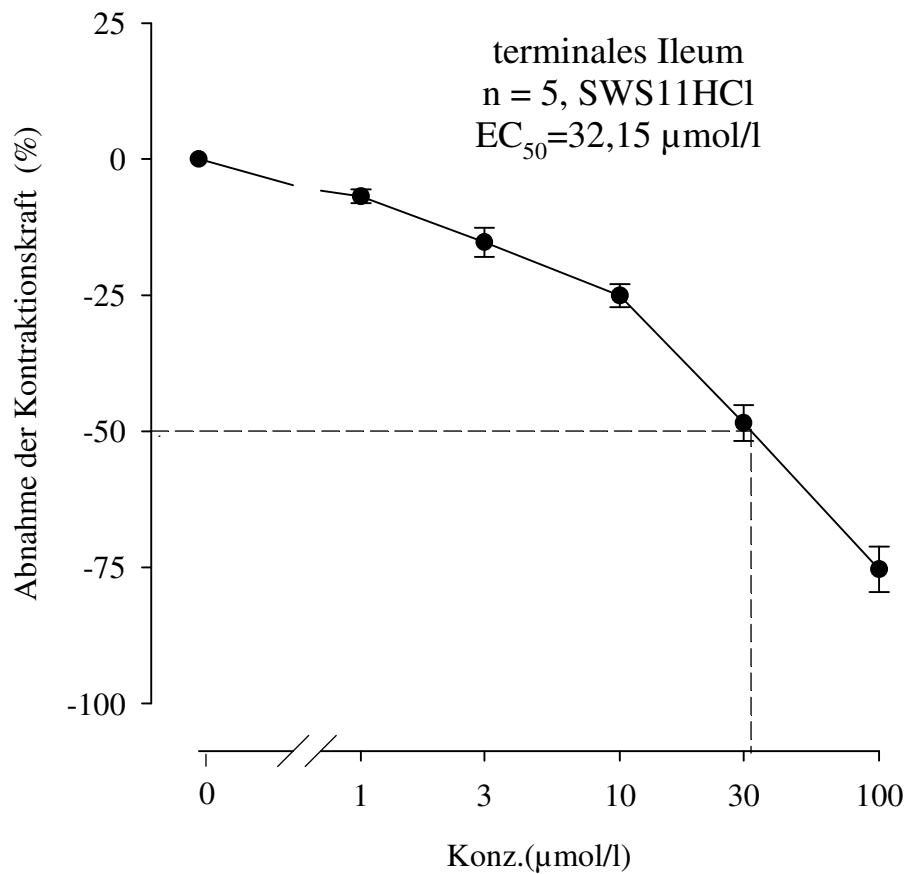
### 4.2.1 Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Zur Untersuchung der Auswirkung von WHGTeoT auf die Kontraktion des Darmes, wurde wie bereits in Kapitel 3.5.7 beschrieben, ein präpariertes Darmstück in der Apparatur A befestigt. Nach den entsprechenden Vorbereitungen und der Vorspannung des Organs bei 4,9 mN, folgte die Anpassungsphase des Darmes an das Medium. Im Anschluss an diese 20 Minuten wurde die Elektrolytlösung abgelassen und durch eine 60 mmolare Kaliumchlorid-Lösung ersetzt. Die KCl-Lösung wurde verwendet, um eine maximale Kontraktion hervorzurufen. Die Kontraktion äußerte sich in der Aufzeichnung des Schreibers in einer konstanten Plateauphase, erst nach Erreichen dieser Plateau- bzw. Kontrollphase konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden. Der Abstand in Zentimeter zwischen Nulllinie und Kontrollphase wurde als 100 % bewertet und diente als Vergleich mit den übrigen Abständen. Durch die Testsubstanz kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, was im kurvenförmigen Verlauf der Grafik zu erkennen ist. In Folge wurden noch die Mittelwerte und die Standardfehler der Testergebnisse berechnet, die in nachfolgender Tabelle dargestellt sind.

**Abbildung 33 Wirkung von SWS11HCl auf das terminale Ileum**

| <b>SWS11HCl<br/>[μmol/l]</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>[mN]</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                    | 10,72 ± 1,68                                    | 00,00 ± 0,00                                   | 5                                  | -                                      |
| 1                            | 9,99 ± 1,56                                     | -6,84 ± 1,26                                   | 5                                  | 0,05                                   |
| 3                            | 9,12 ± 1,48                                     | -15,29 ± 2,65                                  | 5                                  | 0,05                                   |
| 10                           | 7,98 ± 1,16                                     | -25,09 ± 2,11                                  | 5                                  | 0,01                                   |
| 30                           | 5,4 ± 0,67                                      | -48,48 ± 3,29                                  | 5                                  | 0,001                                  |
| 100                          | 2,51 ± 0,34                                     | -75,34 ± 4,17                                  | 5                                  | 0,001                                  |

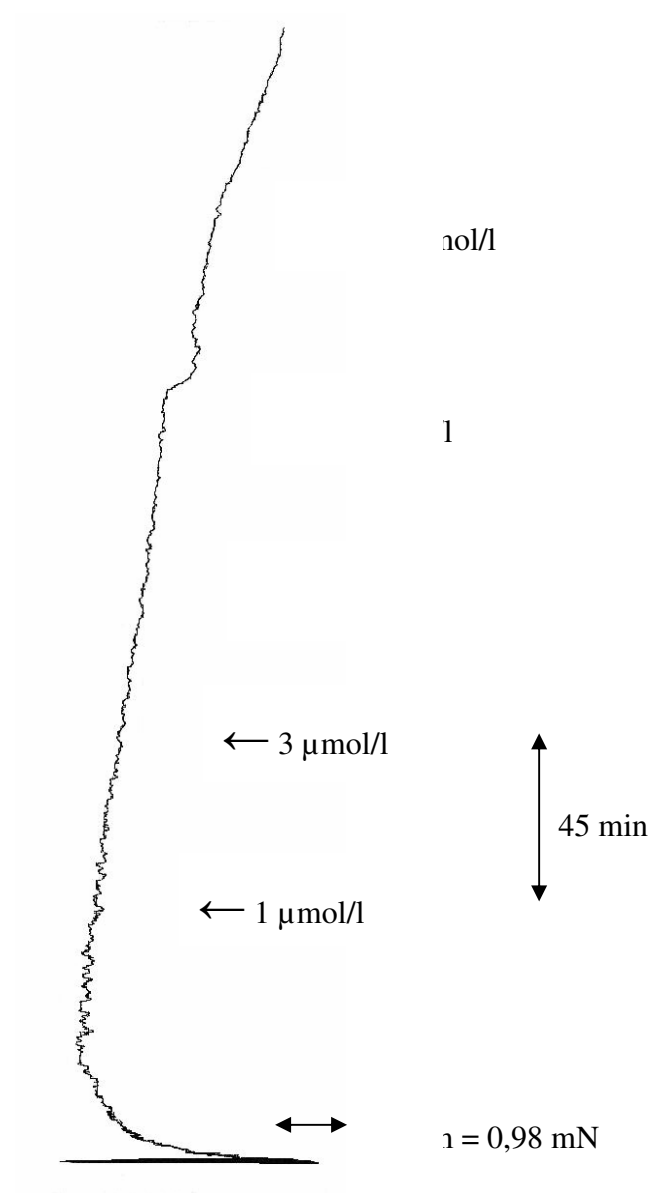
Abbildung 34 Konzentrations-Wirkungskurve von SWS11HCl am terminalen Ileum



Die Darstellung zeigt die Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums. Auf der x-Achse wurde logarithmisch die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen jeweils die Mittelwerte dar und die senkrechten Striche durch die Punkte stellen die Standardfehler dar. Sind die Striche kurz, dann bedeutet das, dass der Standardfehler nur gering ist, bei längeren Strichen ist die Abweichung demnach höher.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums, vor allem ab der 10 µmol/l Konzentration kommt es zu einer sehr steilen Abnahme. Mit der Testsubstanz SWS11HCl wurde ein EC<sub>50</sub>-Wert bei 32,15 µmol/l erreicht.

**Abbildung 35 Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums**



Die Dokumentation durch den Schreiber gibt deutlich den Einfluss von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des Darmes wieder. Die Aufzeichnung entspricht der vorher beschriebenen Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum durch SWS11HCl. Grundsätzlich verläuft die Kurve relativ flach bis zu einer Konzentration von 10 µmol/l, erst dann kommt es zu einer deutlicheren Abnahme der Kontraktionskraft, ab einer Konzentration von 30 µmol/l verläuft die Kurve steiler. Die Substanzzugabe erfolgte alle 45 min.

#### 4.2.2 Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

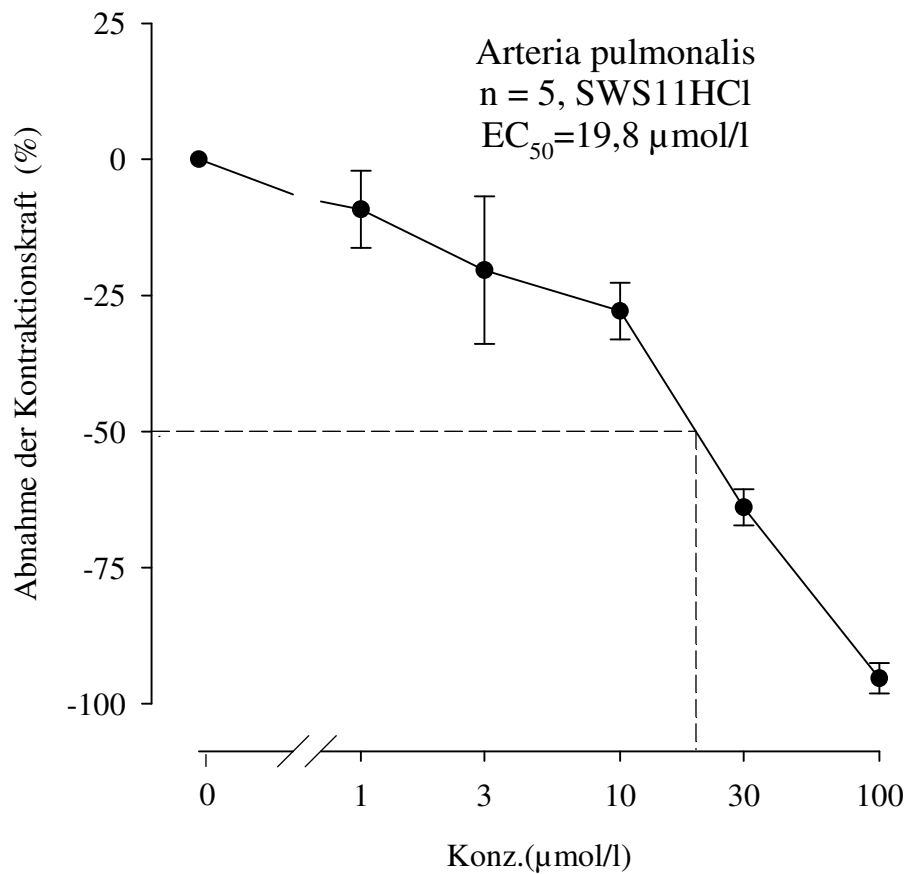
Das ringförmige Teilstück der Arteria pulmonalis wurde wie bereits in Kapitel 3.5.6 beschrieben in die Versuchsapparatur A eingehängt und vorgespannt. Nach einer 20 minütigen Anpassungsphase wurde die Nährstofflösung abgelassen und durch eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Durch die KCl-Lösung wurde eine maximale Kontraktion ausgelöst, die in der Dokumentation das Kontrollplateau darstellte. Sobald die Kontraktion konstant war, frühestens jedoch nach 45 min, konnte mit der kumulativen Einspritzung der Testsubstanzlösung begonnen werden. Der Abstand zwischen Kontrollplateau und Nulllinie wurde wieder als 100 % -Wert festgelegt und die restlichen Werte wurden in Relation dazu gesetzt. Um aussagekräftige Ergebnisse über die Kontraktionskraft zu erhalten, wurden mehrere Versuche durchgeführt. Durch die Abnahme der Kontraktionskraft nahm die mittels Schreiber durchgeführte Aufzeichnung einen kurvenförmigen Verlauf.

Die nachfolgende Tabelle enthält die errechneten Mittelwerte und Standardfehler, sowohl in mN als auch in Prozent.

Abbildung 36 Wirkung von SWS11HCl auf die Arteria pulmonalis

| <b>SWS11HCl<br/>[μmol/l]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[mN]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                    | 15,34 ± 2,84                        | 00,00 ± 0,00                       | 5                                  | -                                      |
| 1                            | 13,37 ± 1,98                        | -9,20 ± 7,07                       | 5                                  | n.s.                                   |
| 3                            | 11,13 ± 2,23                        | -20,36 ± 13,54                     | 5                                  | n.s.                                   |
| 10                           | 10,71 ± 1,61                        | -27,86 ± 5,21                      | 5                                  | 0,05                                   |
| 30                           | 5,60 ± 1,21                         | -63,91 ± 3,32                      | 5                                  | 0,001                                  |
| 100                          | 1,0 ± 0,67                          | -95,23 ± 2,80                      | 5                                  | 0,001                                  |

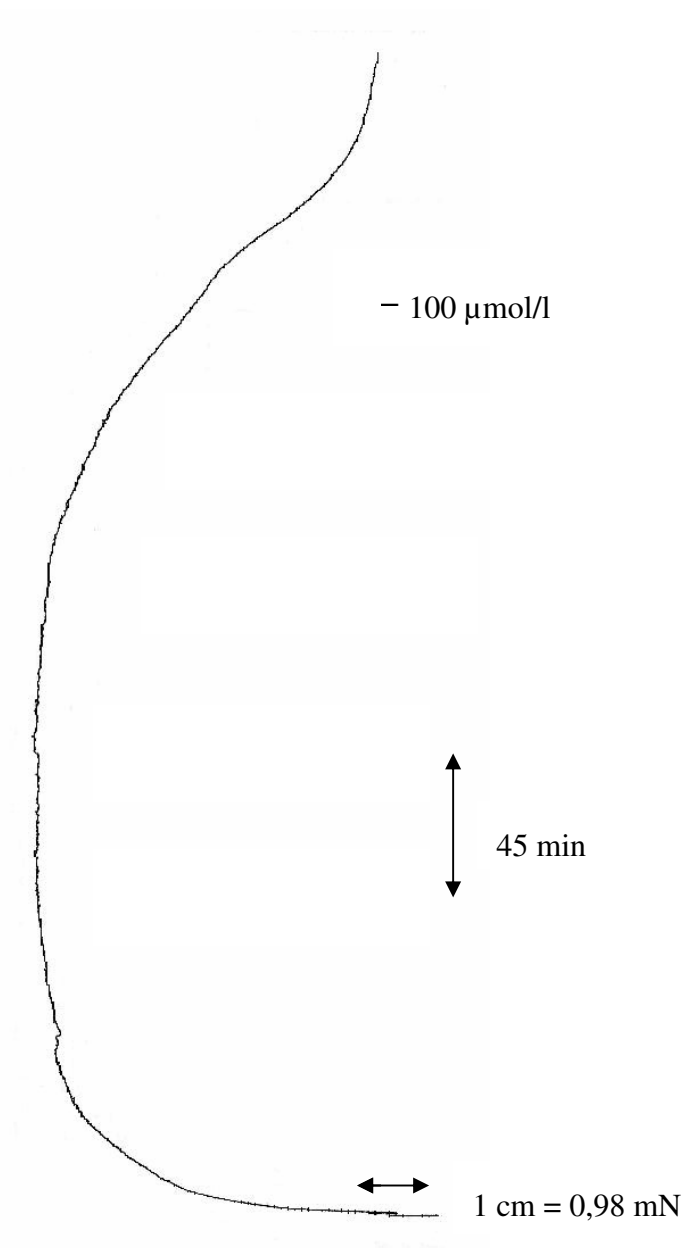
Abbildung 37 Konzentrations-Wirkungskurve von SWS11HCl an der Arteria pulmonalis



Auf die Abszisse wurde logarithmisch die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  eingetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die Mittelwerte der 5 durchgeführten Versuche dar. Die von den Punkten senkrecht ausgehenden Striche, veranschaulichen den Standardfehler. Kurze Striche deuten auf einen geringen Standardfehler hin, lange Striche kennzeichnen eine größere Streuung der Ergebnisse.

Die graphische Darstellung zeigt, dass die Substanz SWS11HCl eine überaus starke Wirkung auf die Arteria pulmonalis ausübt. Bereits geringe Konzentrationen verursachen eine deutliche Wirkung, ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kommt es dann zu einer massiven Abnahme der Kontraktionskraft. Mit der Substanz SWS11HCl konnte ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 19,8  $\mu\text{mol/l}$  erreicht werden, das heißt, bei dieser Konzentration kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um die Hälfte.

**Abbildung 38: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis**



Die vom Schreiber dokumentierte Grafik zeigt eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis nach Applikation von SWS11HCl. Die Substanzzugabe erfolgte im Zeitabstand von 45 min und wurde durchgeführt bis zu einer Endkonzentration von 100 µmol/l. Bei einer Konzentration von 10 µmol/l war nur eine leichte Kontraktionskraftabnahme sichtbar. Ab 30 µmol/l kam es dann zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft.



#### **4.2.3 Wirkung von SWS11HCl auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes**

Der Vorhof wurde verwendet, um die Auswirkungen der Testsubstanz WHGTeoT auf die Herzfrequenz zu untersuchen.

Wie bereits im Kapitel 3.5.3 ausführlich erläutert wurde, wurde der fertig präparierte Vorhof in die Apparatur A eingehängt und vorgespannt.

Nach einer Dauer von ungefähr 20 Minuten, in der sich der Vorhof an das umgebende Milieu anpassen konnte, wurde mit den Kontrollmessungen begonnen. Dabei wurde alle 5 min die Herzfrequenz mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet. Die Messung erfolgte über einen Bereich von 6 cm, das entsprach genau 12 Sekunden. Bei der Messung wurde überprüft, ob die Herzfrequenz schon konstant war. Die konstante Herzfrequenz wurde als Kontrollmessung herangezogen und entsprach 100 %. Anschließend konnte mit der Einspritzung der Testsubstanzlösung begonnen werden. Die Testsubstanz SWS11HCl wurde im Abstand von 45 Minuten in das Organbad eingebracht. Die Messungen wurden wie gewohnt alle 5 min für je 12 Sekunden aufgezeichnet. Um die Herzfrequenz pro Minute zu erhalten musste die Herzfrequenz mit 5 multipliziert werden.

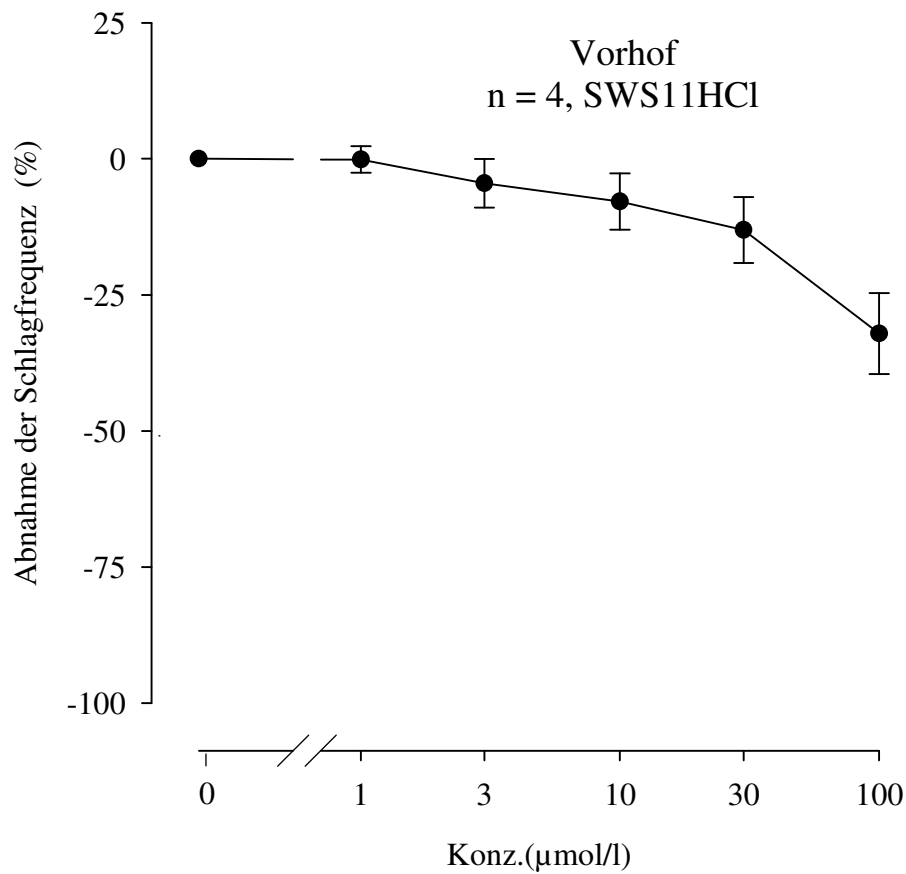
Die Konzentrationen, die jeweils auf das Organ einwirkten, waren 1, 3, 10, 30, und 100  $\mu\text{mol/l}$ .

Für aussagekräftige Ergebnisse mussten die Versuche mehrmals wiederholt werden, aus den erhaltenen Werten wurden anschließend die Mittelwerte und die Standardfehler, sowohl in mN als auch in Prozent, ermittelt, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind.

**Abbildung 39 Wirkung von SWS11HCl auf den rechten Vorhof**

| <b>SWS11HCl<br/>[μmol/l]</b> | <b>f<sub>c</sub> ±SEM<br/>[mN]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                    | 240 ± 10,61                        | 00,00 ± 0,00                       | 4                                  | -                                      |
| 1                            | 240 ± 13,99                        | -0,15 ± 2,43                       | 4                                  | n.s.                                   |
| 3                            | 230 ± 18,82                        | -4,52 ± 4,49                       | 4                                  | n.s.                                   |
| 10                           | 223 ± 20,87                        | -7,86 ± 5,17                       | 4                                  | n.s.                                   |
| 30                           | 210 ± 22,08                        | -13,09 ± 6,03                      | 4                                  | n.s.                                   |
| 100                          | 164 ± 21,93                        | -32,11 ± 7,42                      | 4                                  | 0,01                                   |

Abbildung 40 Konzentrations-Wirkungskurve von SWS11HCl am rechten Vorhof

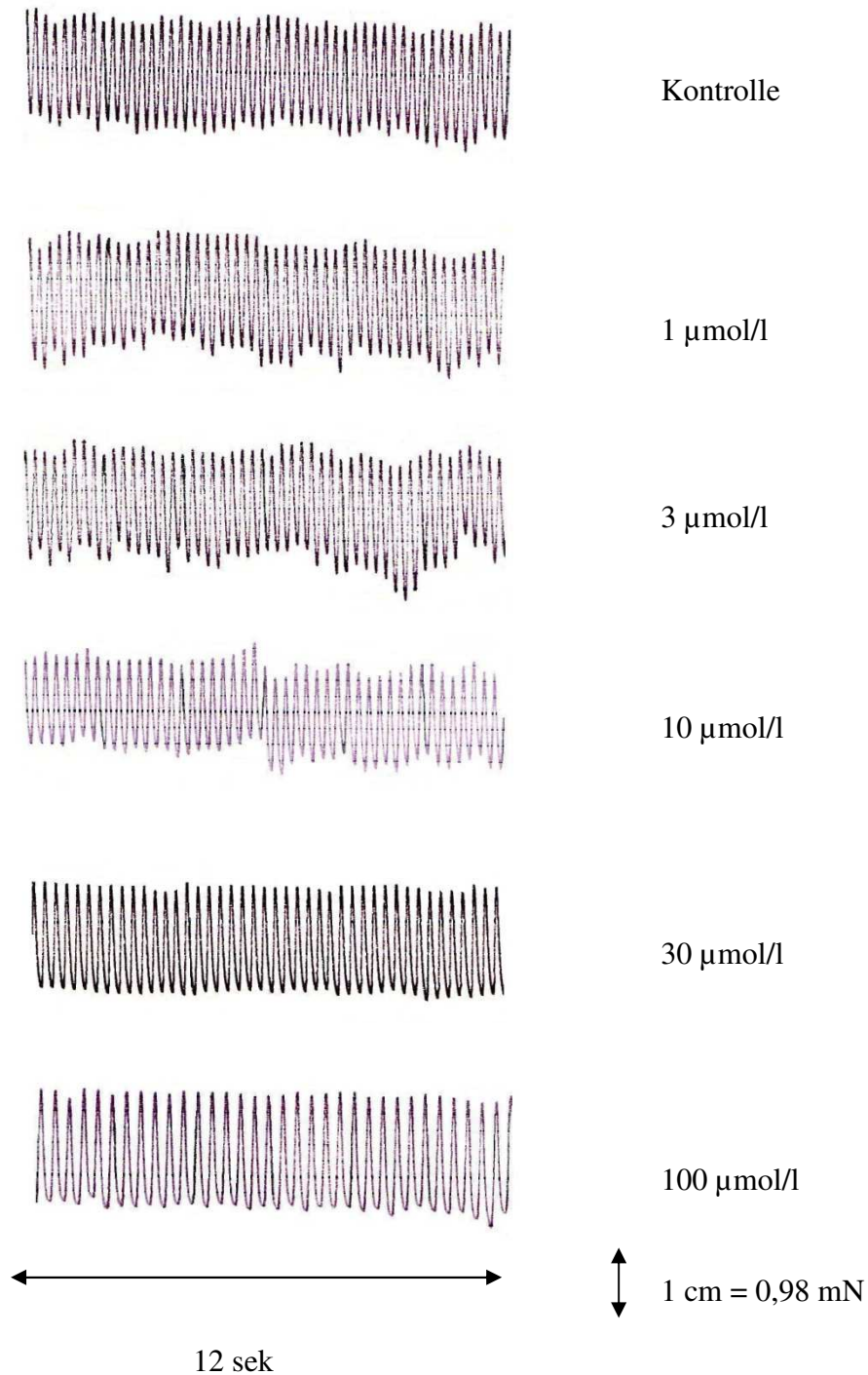


Wie in der Grafik zu erkennen ist, verursachte die Testsubstanz SWS11HCl eine Abnahme der Herzfrequenz, die Substanz wirkte somit negativ chronotrop.

Auf der Abszisse wurde die logarithmische Konzentration von WHGTeoT in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der Ordinate die Schlagfrequenzänderung in Prozent, daraus wurde die Konzentrations-Wirkungskurve gebildet. Die Punkte dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die von den Mittelwerten ausgehenden Linien stellen die Standardfehler dar.

Die Grafik zeigt, dass es bereits ab der ersten Verabreichung der Testsubstanz zu einer leichten Senkung der Herzfrequenz kam, ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  sank die Schlagfrequenz etwas steiler ab.

Abbildung 41 Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS11HCl auf die Herzfrequenz des Vorhofs



Unter dem Einfluss von SWS11HCl auf den Vorhof zeigt sich eine Senkung der Schlagfrequenz um circa ein Drittel. Die Zugabe der Testsubstanzen in den steigenden Konzentrationen erfolgte jeweils in einem Abstand von 45 Minuten.

#### 4.2.4 Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

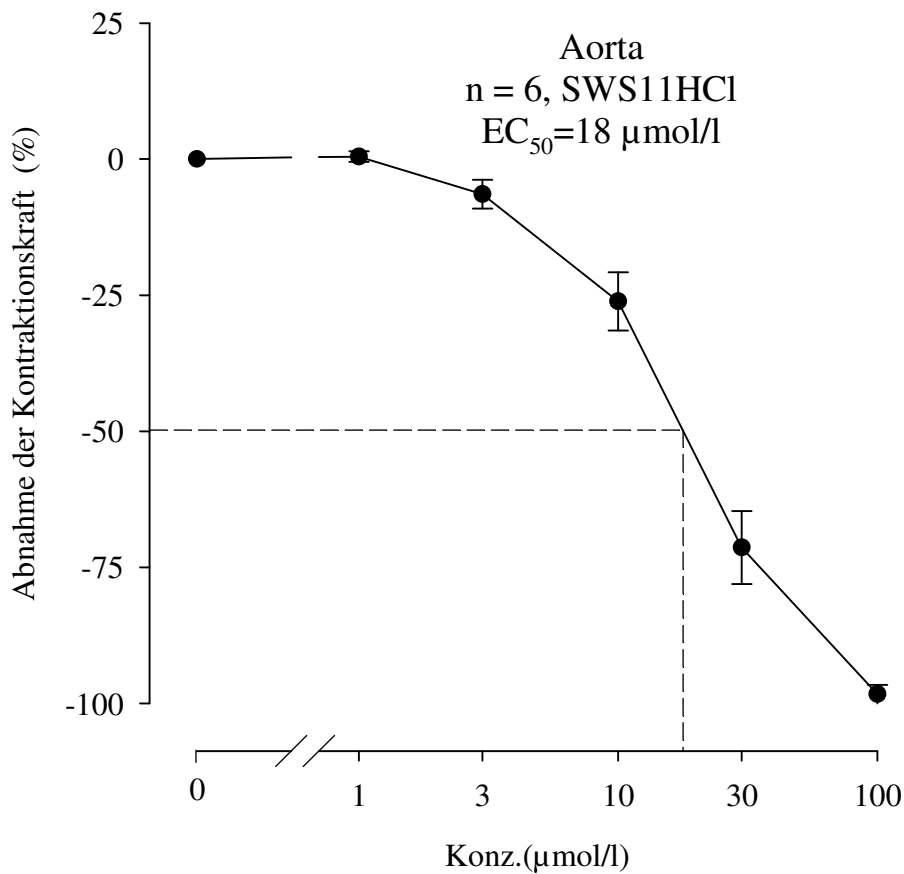
Die Wirkung der Testsubstanz SWS11HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde in 5 Versuchen ermittelt. Das ringförmige Teilstück der Aorta wurde in der Apparatur A fixiert und die Geräte, wie im Kapitel 3.5.5 bereits beschrieben, aktiviert. Nach einer Anpassungsphase von 20 Minuten wurde die Aorta mit einer 90 mmolaren KCl-Lösung kontrahiert. Anschließend wurde gewartet, bis die Aorta eine maximale Kontraktion aufwies, mindestens jedoch 45 Minuten. Sobald ein konstantes Kontrollplateau erreicht wurde, das als Vergleich zu den übrigen Konzentrationen diente, konnte mit der Testsubstanzzugabe begonnen werden. Die Substanz SWS11HCl wurde in steigender Konzentration alle 45 min in das Organbad eingebracht.

Aus den 5 Versuchen wurden jeweils die arithmetische Mittelwerte ( $f_c$ ) und die Standardfehler (SEM), in Bezug auf den Kontrollwert berechnet und in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Abbildung 42 Wirkung von SWS11HCl auf die Aorta descendens

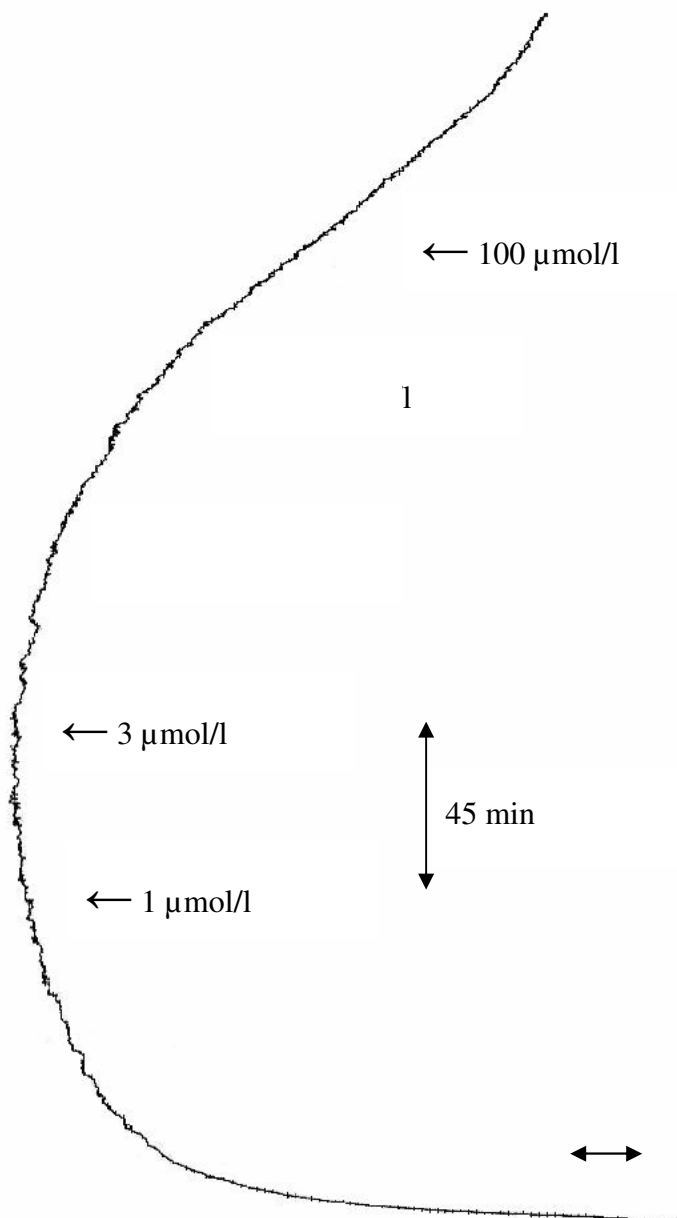
| SWS11HCl<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[mN] | $f_c \pm \text{SEM}$<br>[%] | Anzahl der<br>Versuche [n] | Irrtumswahrscheinlichkeit<br>P |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Kontrolle                         | $10,87 \pm 1,28$             | $00,00 \pm 0,00$            | 6                          | -                              |
| 1                                 | $10,92 \pm 1,30$             | $0,47 \pm 0,99$             | 6                          | n.s.                           |
| 3                                 | $10,19 \pm 1,28$             | $-6,45 \pm 2,66$            | 6                          | 0,01                           |
| 10                                | $8,06 \pm 1,21$              | $-26,14 \pm 5,35$           | 6                          | 0,001                          |
| 30                                | $3,37 \pm 1,05$              | $-71,34 \pm 6,72$           | 6                          | 0,001                          |
| 100                               | $0,25 \pm 0,25$              | $-98,30 \pm 1,70$           | 6                          | 0,001                          |

**Abbildung 43 Konzentrations-Wirkungskurve von SWS11HCl an der Aorta**



Auf der x-Achse wurde die logarithmische Konzentration der Testsubstanz in µmol/l und auf der y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt. Die Grafik zeigt, dass es durch die Applikation von SWS11HCl an der Aorta zu einer signifikanten Änderung der Kontraktionskraft kommt. SWS11HCl hat demzufolge eine starke Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta. Bereits ab der zweiten Einspritzung kam es zu einer deutlichen Kontraktionskraftabnahme, ab einer Konzentration von 10 µmol/l verlief die Kurve noch steiler. Die Punkte der Grafik zeigen die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen und die senkrechten Striche durch die Punkte zeigen die Standardfehler. Mit der Testsubstanz SWS11HCl konnte an der Aorta ein EC<sub>50</sub>-Wert erreicht werden der bei 18 µmol/l liegt.

Abbildung 44 Originalaufzeichnung der Wirkung von WHGTeoT auf die Kontraktionskraft der Aorta



Diese Abbildung bestätigt, dass die Testsubstanz SWS11HCl eine starke Wirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta aufweist. Ab einer Substanzkonzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  sank die Kurve erst leicht und bei 10  $\mu\text{mol/l}$  immer stärker ab. SWS11HCl hat somit eine dilatierende Wirkung auf die Aorta descendens.

#### 4.2.5 Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

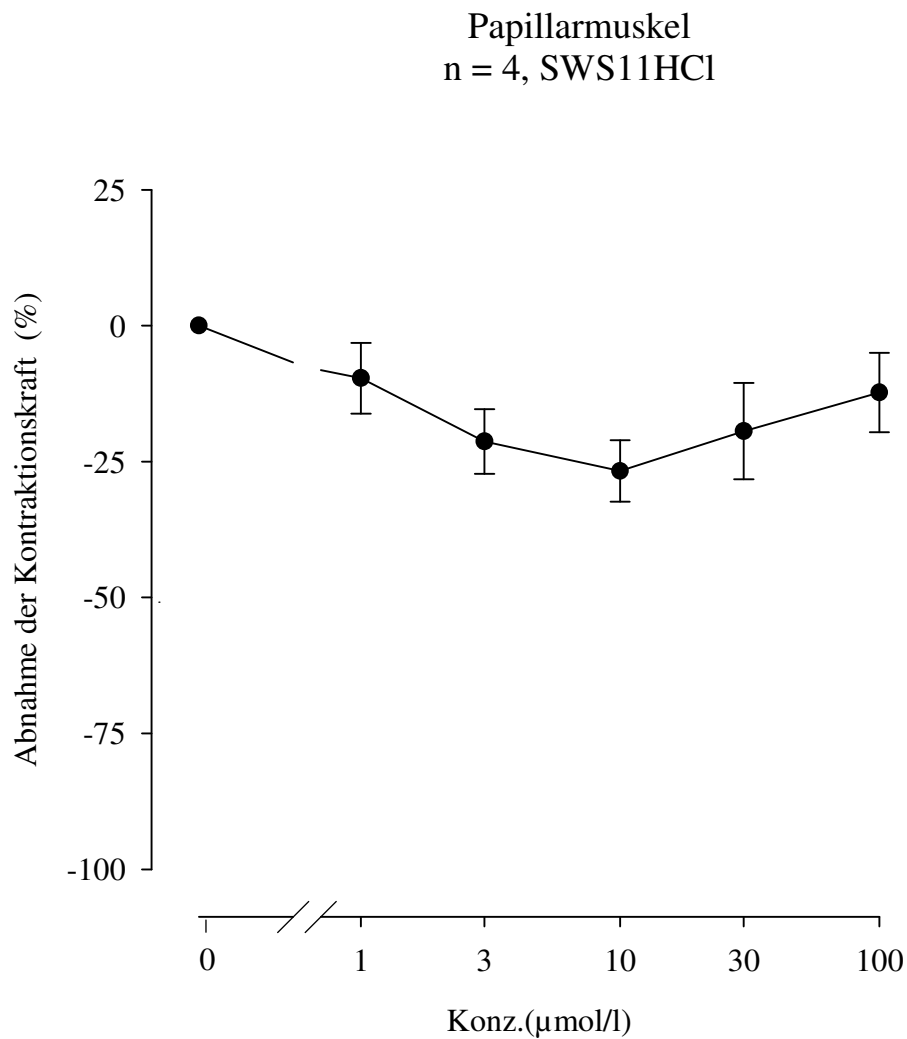
Der Papillarmuskel wurde, wie bereits in Kapitel 3.5.4 beschrieben, präpariert und in die Versuchsanordnung B eingespannt. Anschließend wurden die Geräte aktiviert und der Muskel auf 3,92 mN vorgespannt. Nach einer kurzen Wartezeit, in der sich der Muskel an das umgebende Milieu anpassen konnte, wurde mit den Kontrollmessungen begonnen. Die Kontrollmessungen dienten der Überprüfung, ob die Kontraktionskraft schon konstant war und man mit der Substanzzugabe beginnen konnte. Dazu wurden die Amplituden der Messungen, die alle 5 Minuten aufgezeichnet wurden, mit Hilfe eines Lineals abgemessen. Wenn die Amplituden konstant lang waren konnte mit der Substanzzugabe, nach dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Pipettierschema, begonnen werden. Diese Amplituden stellten den Kontrollwert dar, mit dem dann sämtliche Konzentrationen verglichen wurden. Zur Umrechnung der Amplituden in mN musste mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert werden, außerdem musste meistens noch mit 0,4 multipliziert werden, da die Messungen in der Regel bei 2 mV durchgeführt wurden. Wenn die Messung bei 5 mV durchgeführt wurde, reichte es, wenn man das Ergebnis mit dem Eichfaktor multiplizierte. Die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler der einzelnen Konzentrationen wurden in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

**Abbildung 45 Wirkung von SWS11HCl auf den Papillarmuskel**

| <b>SWS11HCl<br/>[μmol/l ]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[mN]</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>[%]</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche [n]</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                     | 1,02 ± 0,33                         | 00,00 ± 0,00                       | 4                                  | -                                      |
| 1                             | 0,97 ± 0,38                         | -9,67 ± 6,51                       | 4                                  | n.s.                                   |
| 3                             | 0,86 ± 0,36                         | -21,32 ± 5,95                      | 4                                  | n.s.                                   |
| 10                            | 0,80 ± 0,34                         | -26,74 ± 5,66                      | 4                                  | n.s.                                   |
| 30                            | 0,87 ± 0,36                         | -19,40 ± 8,84                      | 4                                  | n.s.                                   |
| 100                           | 0,93 ± 0,36                         | -12,31 ± 7,29                      | 4                                  | n.s.                                   |



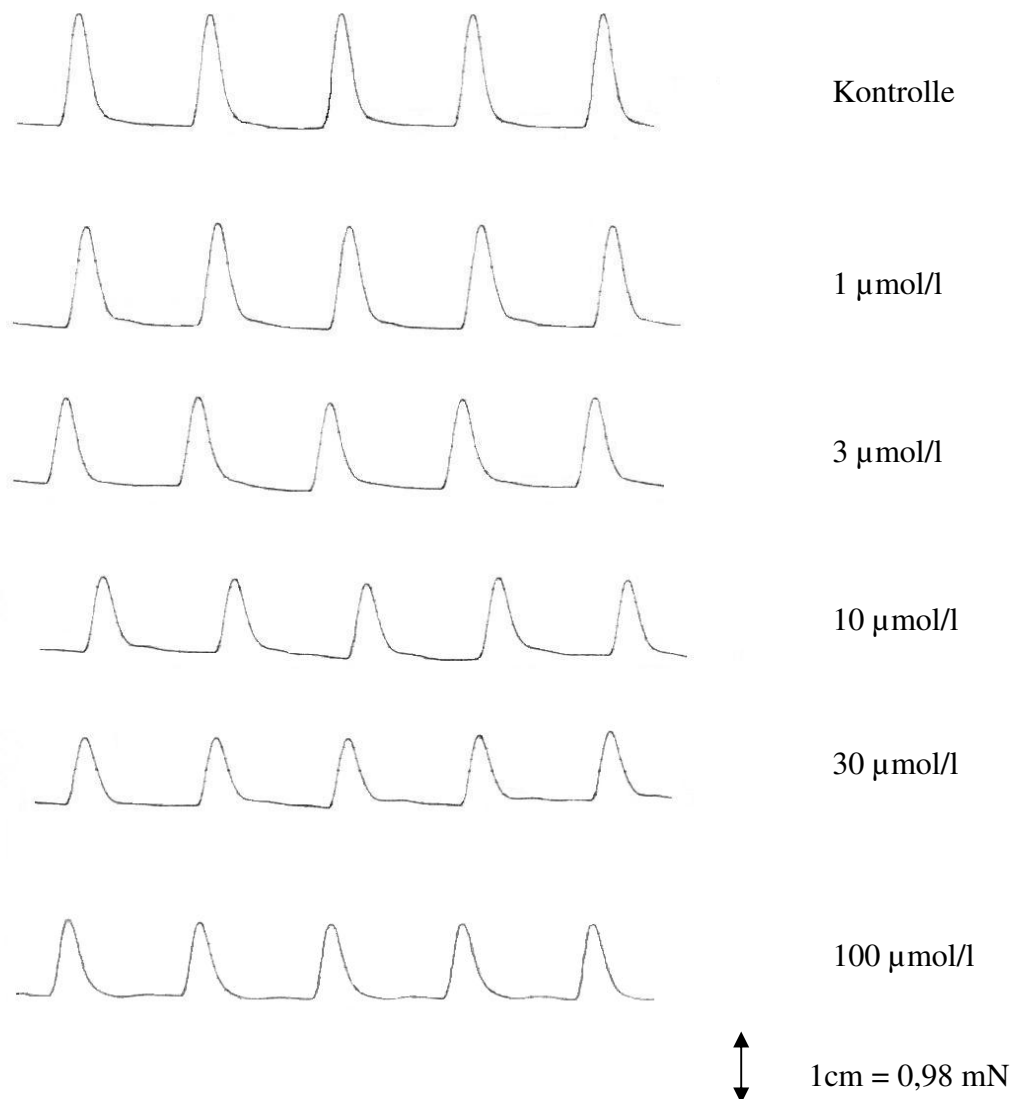
Abbildung 46 Konzentrations-Wirkungskurve von SWS11HCl am Papillarmuskel



Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen von SWS11HCl logarithmisch aufgetragen und auf der Ordinate die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Punkte markieren die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanzen, die durch die Punkte verlaufenden Striche beziehen sich auf den Standardfehler. Es wurden 4 Versuche durchgeführt. Die Grafik zeigt, dass es zu Beginn zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft kam, bei einer Konzentration von 10 µmol/l stieg die Kontraktionskraft jedoch wieder an und erreicht bei 100 µmol/l wieder annähernd den Anfangswert.

**Abbildung 47 Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS11HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels**



Wie an der Grafik zu erkennen ist, kam es unter der Anwendung von SWS11HCl am Papillarmuskel zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  sank die Länge der Amplituden kontinuierlich ab. Bei einer Erhöhung der Testsubstanzkonzentration wurden die Amplituden jedoch wieder größer. Die Aufzeichnung zeigt, dass die Substanz in Summe zu einer leichten Senkung der Kontraktionskraft führte.

### 4.3 Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS11HCl an der Aorta

Um genauer auf den Wirkungsmechanismus der Testsubstanz SWS11HCl an der Aorta descendens einzugehen, wurde die Wirkung in Kombination mit 1 Agonisten (Phenylephrin) und 2 Antagonisten (Glibenclamid und Nitro-L-Arginin) erforscht.

#### 4.3.1 Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 $\mu\text{mol}$

Glibenclamid ist ein  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalblocker und wird verwendet um beurteilen zu können, ob die Testsubstanz SWS11HCl auf die ATP-abhängigen Kaliumkanäle der Aorta wirkt.

Nach einer maximalen Kontraktion der Aorta wurden 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid in das Organbad gegeben und 45 Minuten gewartet. Anschließend wurden 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl hinzugefügt. Die Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  wurde verwendet weil diese den  $\text{EC}_{50}$ -Wert darstellt.

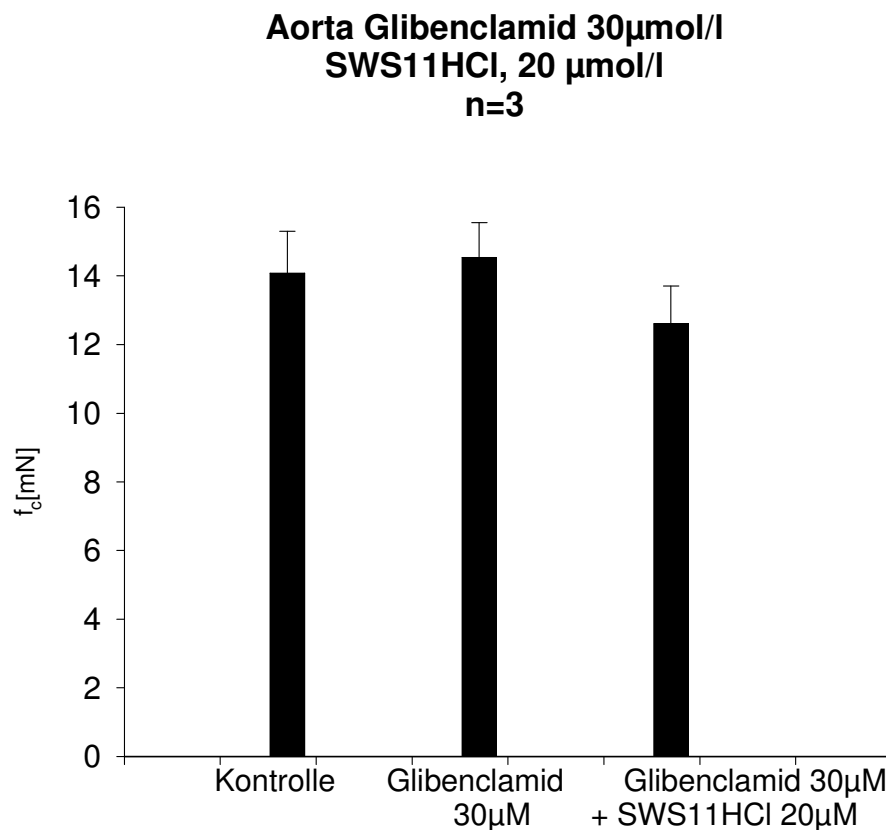
Es wurden insgesamt drei Versuche durchgeführt, bei denen jeweils die Kontraktionsänderungen mittels Schreiber dokumentiert wurden.

**Abbildung 48 Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid auf die Aorta descendens in Kombination mit 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl**

| Konz. ( $\mu\text{mol/l}$ )     | $f_c \pm \text{SEM}$<br>(mN) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit<br>P |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Kontrolle                       | $14,08 \pm 1,22$             | 3                     | -                              |
| 30 $\mu\text{mol}$ Glibenclamid | $14,54 \pm 1,01$             | 3                     | -                              |
| + 20 $\mu\text{mol}$ SWS11HCl   | $12,61 \pm 1,10$             | 3                     | n.s.                           |

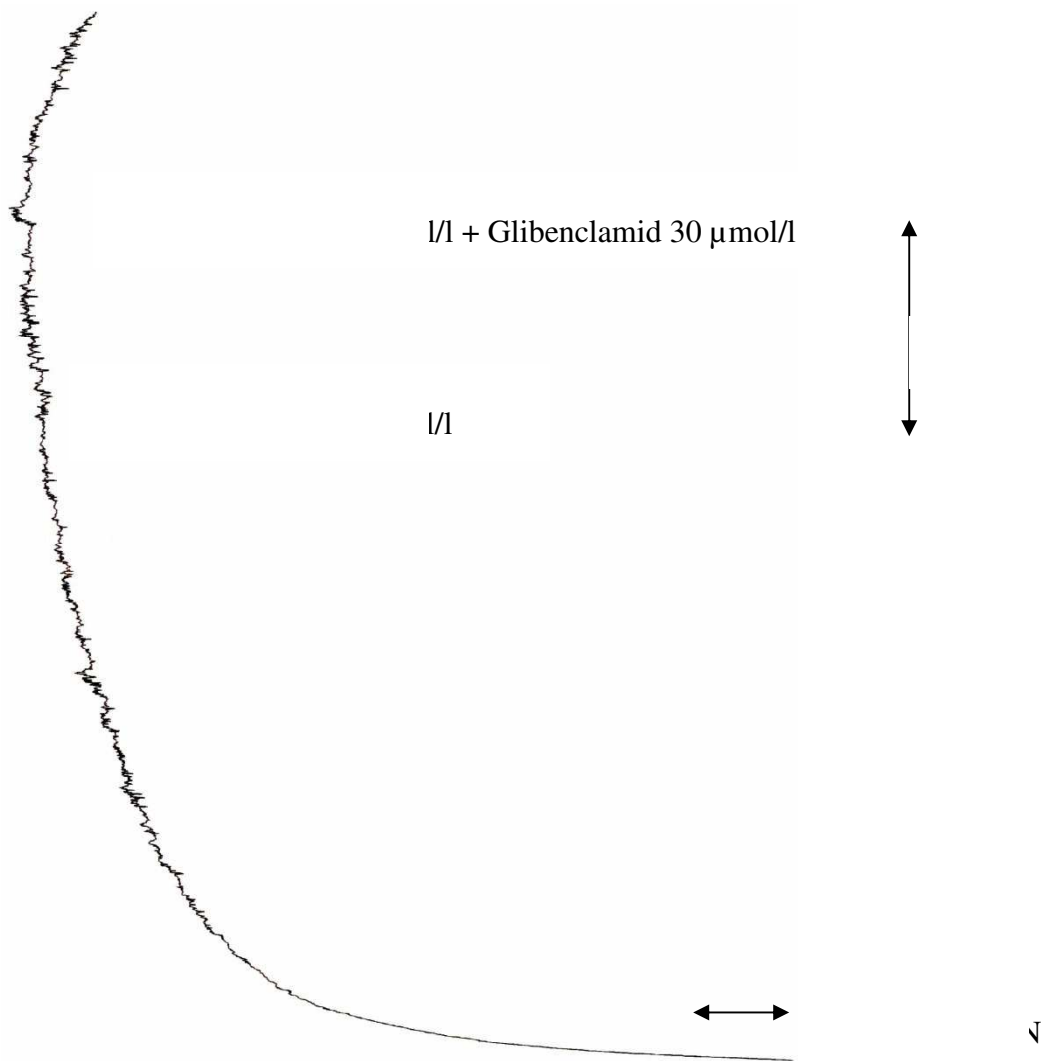
In der Tabelle sind die aus drei Versuchen ermittelten arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) inklusive Standardfehler (SEM) der Kontrollphase, der Glibenclamidphase und der Glibenclamid-SWS11HCl-Phase in mN angegeben.

**Abbildung 49** Graphische Darstellung der Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid in Kombination von 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens



Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN. Der erste Balken der Abbildung stellt die Kontrolle dar, die anderen beiden zeigen die Änderung der Kontraktionskraft an der Aorta descendens durch Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und durch die Kombination von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl. Die Balken werden aus den Mittelwerten der drei Versuche gebildet und die über den Balken dargestellten Striche markieren die Standardabweichungen.

**Abbildung 50 Originalaufzeichnung der Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und der Kombination von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens**



Die Abbildung zeigt die Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und die Folgen nach zusätzlicher Zufuhr von 20  $\mu\text{mol/l}$  der Testsubstanz SWS11HCl. Bei der Zugabe des Agonisten Glibenclamid kommt es zu einer leichten Kontraktionszunahme. Die Zufuhr der Testsubstanz äußert sich in einer leichten Dilatation der Aorta. Die beiden Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

#### 4.3.2 Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol

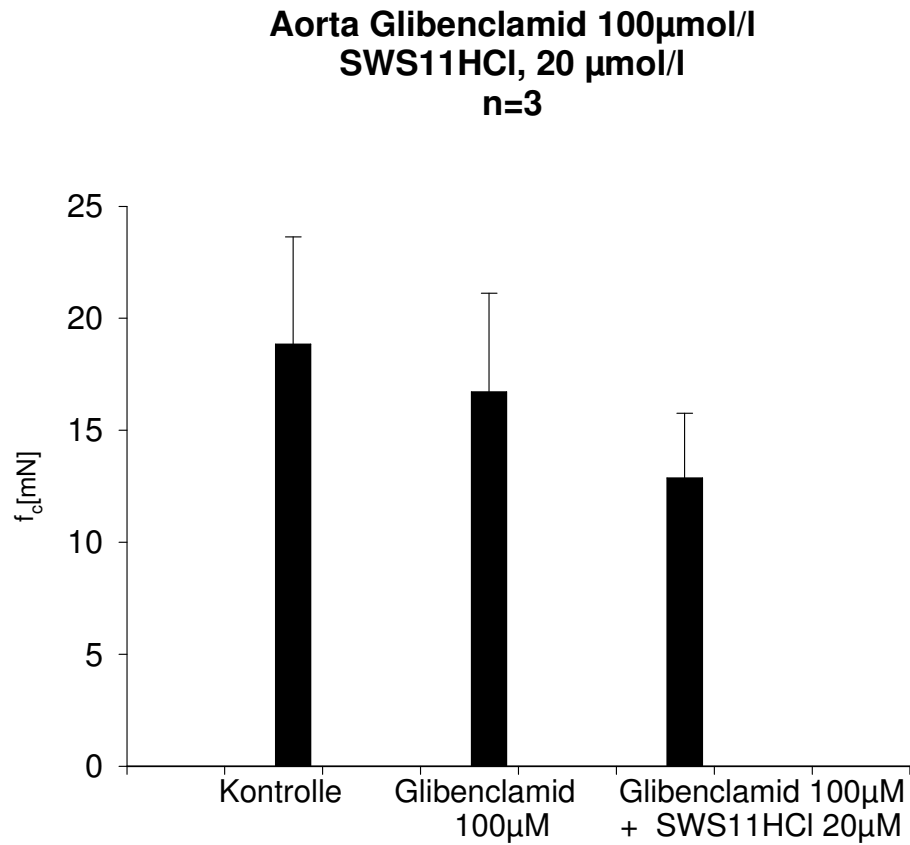
Bei den 3 Versuchen mit 100 µmol/l des Agonisten Glibenclamid an der Aorta descendens wurde, wie bereits zuvor, die Wirkung von SWS11HCl auf die ATP-abhängigen Kaliumkanäle untersucht. Nach maximaler Kontraktion des Organs wurde wieder Glibenclamid zugesetzt, dieses Mal jedoch nicht 30 µmol/l, sondern eine Konzentration von 100 µmol/l, nach 45 min wurde dann die Testsubstanz SWS11HCl hinzugefügt.

**Abbildung 51 Wirkung von 100 µmol/l Glibenclamid alleine und in Kombination mit 20 µmol/l SWS11HCl auf die Aorta descendens**

| <b>Konz. (µmol/l)</b>      | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b>Anzahl der Ver-<br/>suche n</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Kontrolle                  | $18,85 \pm 4,98$                                | 3                                  | -                                      |
| 100 µmol Gli-<br>benclamid | $16,72 \pm 4,40$                                | 3                                  | n.s.                                   |
| + 20 µmol<br>SWS11HCl      | $12,87 \pm 2,89$                                | 3                                  | 0,05                                   |

Die Tabelle gibt die aus 3 Versuchen ermittelten arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und deren Standardabweichungen (SEM) an.

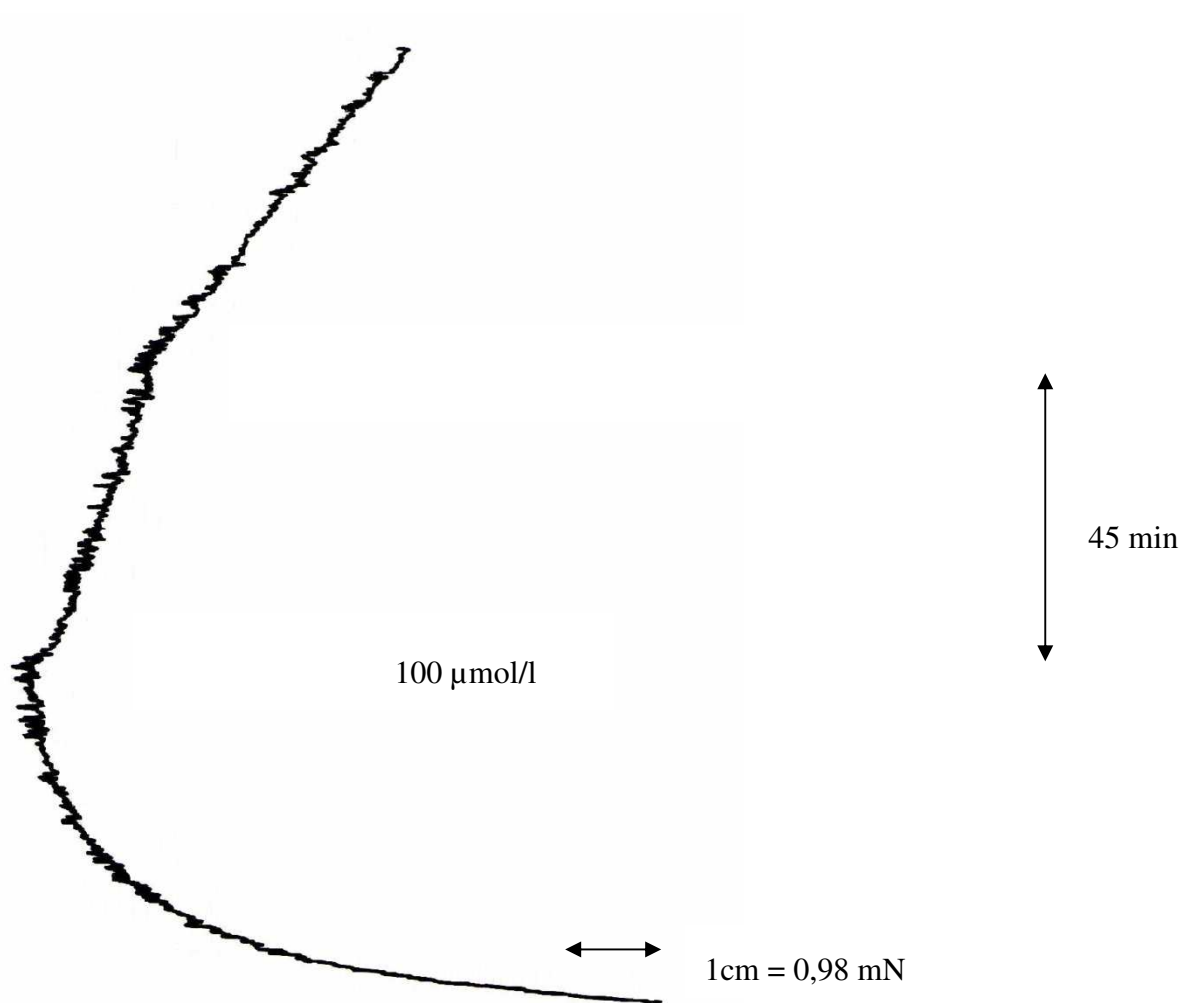
**Abbildung 52 Graphische Darstellung der Wirkung von 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid alleine und in Kombination von 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens**



In diesem Diagramm wurden auf der Abszisse die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in  $\mu\text{mol/l}$  und auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN aufgetragen. Die schwarzen Balken spiegeln den Effekt von Glibenclamid 100  $\mu\text{mol/l}$  und die anschließend hinzugefügte Testsubstanz im Vergleich zur Kontrolle wieder.

Die Balken werden aus den Mittelwerten der drei durchgeführten Versuche gebildet. Die strichförmige Verlängerung über den Balken stellt die Standardabweichung dar.

**Abbildung 53 Originalaufzeichnung der Wirkung von 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und anschließend in Kombination mit 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens**



Die Dokumentation durch den Schreiber zeigt deutlich, dass es bei einer Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Durch die Zugabe von 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl konnte die Aorta descendens sogar noch weiter dilatiert werden.

Die Substanzzugabe wird durch die Pfeile markiert.



#### 4.3.3 Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Nitro-L-Arginin

Der Versuch mit Nitro-L-Arginin wurde durchgeführt um festzustellen, ob die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz SWS11HCl auf die Aorta über das NO-System zustande kommt. Nach Erreichen einer maximalen Kontraktion durch die Kaliumchloridlösung wurde der Antagonist Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  dem Organbad zugesetzt.

Nach einer Anpassungsphase der Aorta an das umgebende Milieu von 45 min, konnte die Testsubstanz SWS11HCl in einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  eingespritzt werden.

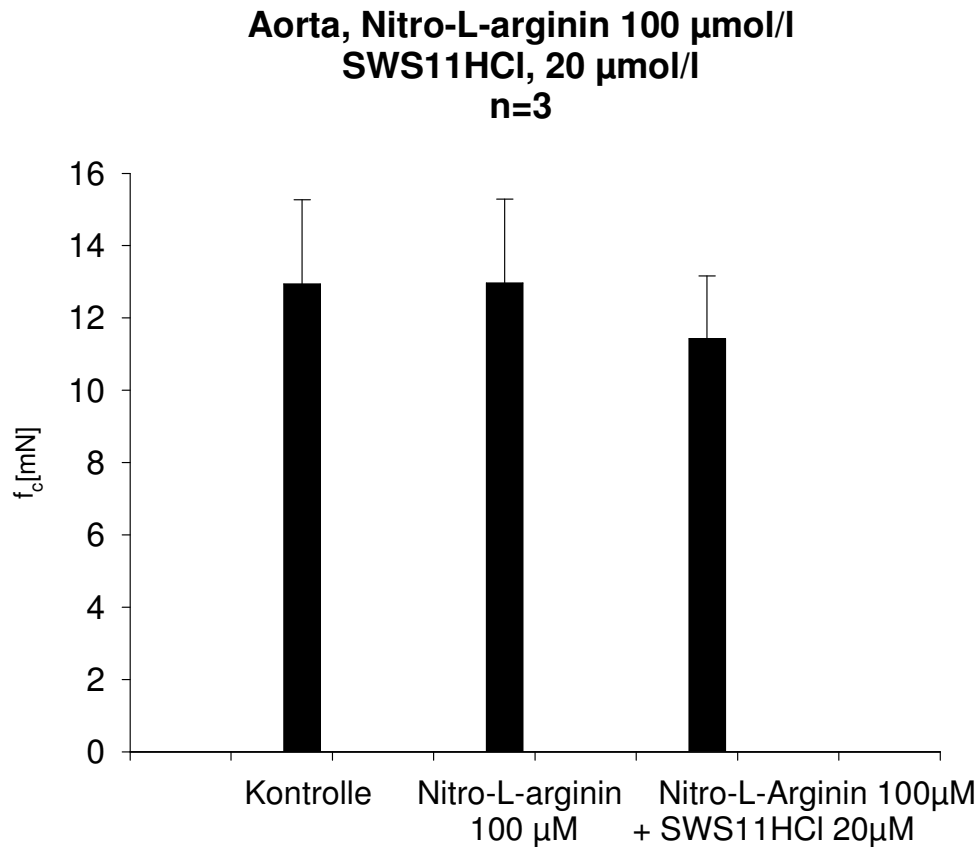
Der Kontrollwert betrug bei einer maximalen Kontraktion  $12,94 \pm 2,33$  mN, durch die Zugabe von 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin konnte eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft auf  $12,97 \pm 2,32$  mN erzielt werden, die allerdings keine Signifikanz besaß. Nach einer Zugabe von SWS11HCl war eine deutliche Dilatation der Aorta auf  $11,43 \pm 1,73$  mN sichtbar. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde der Versuch 3-mal wiederholt.

**Abbildung 54 Wirkung von Nitro-L-Arginin alleine und in Kombination mit 3  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens**

| Konz. ( $\mu\text{mol/l}$ )         | $f_c \pm \text{SEM}$<br>(mN) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit<br>P |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Kontrolle                           | $12,94 \pm 2,33$             | 3                     | -                              |
| 100 $\mu\text{mol}$ Nitro-L-Arginin | $12,97 \pm 2,32$             | 3                     | n.s.                           |
| + 20 $\mu\text{mol}$ SWS11HCl       | $11,43 \pm 1,73$             | 3                     | n.s.                           |

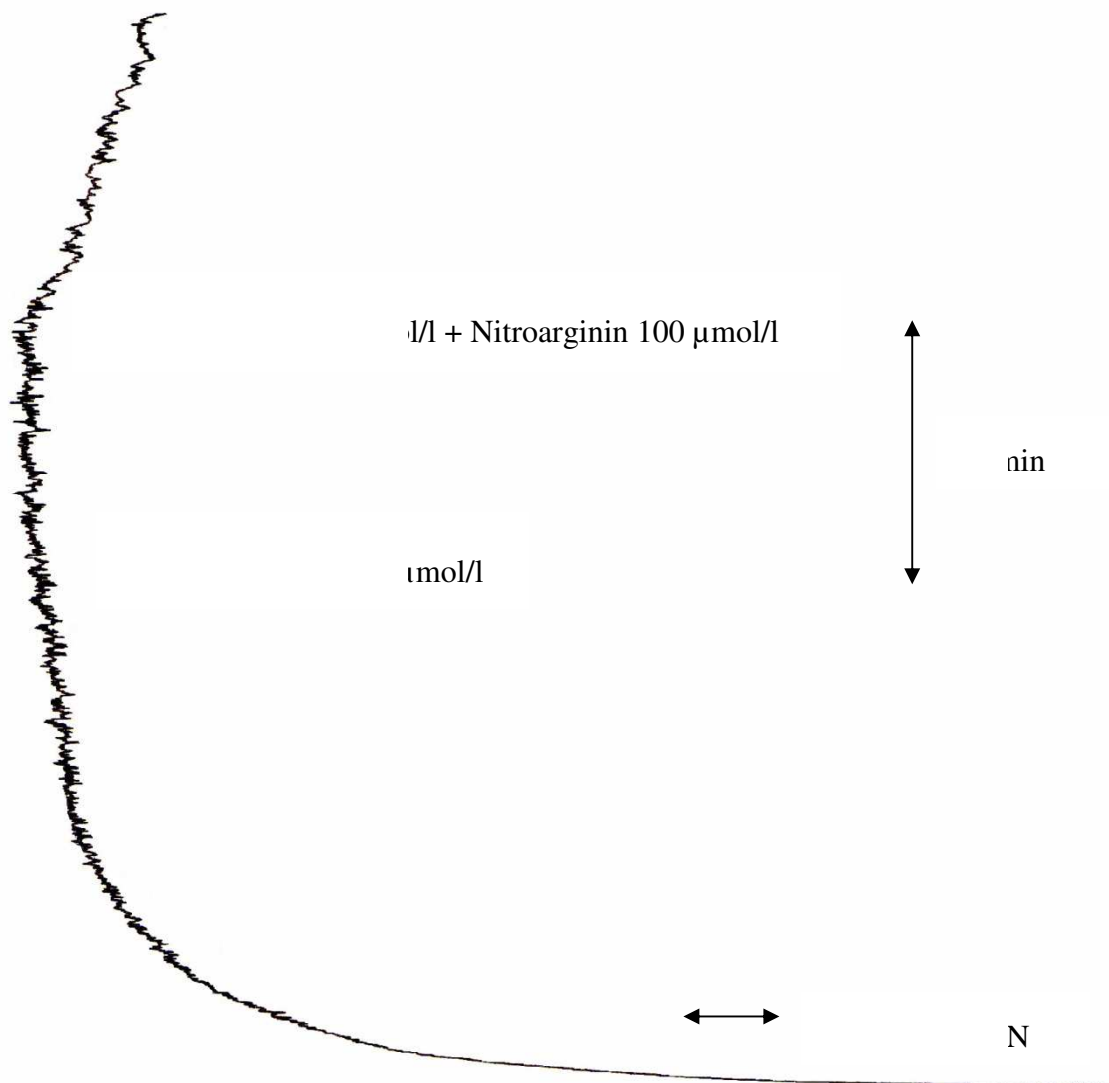
In der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und deren Standardfehler (SEM) die aus den 3 Versuchen ermittelt wurden dargestellt.

**Abbildung 55** Graphische Darstellung der Wirkung von Nitro-L-Arginin alleine und in Kombination mit 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens



Die Balken symbolisieren die aus den 4 Versuchen gebildeten arithmetischen Mittelwerte, deren Standardabweichungen werden als Striche über den Balken dargestellt. Die Grafik zeigt die Kontraktion der Aorta in der Kontrollphase, nach Zugabe von 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin und nach einer zusätzlichen Zugabe von 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl. Die Konzentrationen der jeweiligen Substanzen werden auf der Abszisse in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben und die Kontraktionskraft wurde in mN auf der Ordinate aufgetragen.

**Abbildung 56 Originalaufzeichnung der Wirkung von Nitro-L-Arginin alleine und anschließend in Kombination mit 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl auf die Aorta descendens**



An der Aufzeichnung lässt sich ablesen, dass es nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin in das Organbad zu einer minimalen Steigerung der Kontraktionskraft kommt. Eine anschließende Zugabe der Testsubstanz SWS11HCl führte wieder zu einer Dilatation der Aorta.

Die jeweiligen Injektionen der Substanzen werden durch die Pfeile symbolisiert.

#### 4.3.4 Wirkung von SWS11HCl unter dem Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid

Um den Wirkungsmechanismus der Testsubstanz SWS11HCl zu erforschen, wurden die Substanzen Glibenclamid, Nitro-L-Arginin sowie Phenylephrin-HCl verwendet. Bei dem Versuch mit Phenylephrin-HCl wurde untersucht, ob SWS11HCl sympathomimetische Vorgänge der Aorta descendens hemmt und somit die vasodilatierende Wirkung erzielt wurde. Bevor mit den Versuchen begonnen werden konnte, musste, wie bereits in Kapitel 3.6.3 erwähnt, eine Verdünnungsreihe von Phenylephrinhydrochlorid mit den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3 und 10 hergestellt werden. Diese Konzentrationen dienten im Anschluss bei den Versuchen als Kontrollwerte. Danach wurde die Testsubstanz SWS11HCl in einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  ( $\text{EC}_{50}$ -Wert) dem Organbad zugesetzt und wiederum die verschiedenen Konzentrationen des Agonisten Phenylephrin-HCl injiziert. Die einzelnen Injektionen erfolgten in einem Intervall von 10 Minuten. Die Kombination Phenylephrin-HCl und SWS11HCl führte bei den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1 und 3 zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kam es jedoch zu einer leichten Kontraktionskraftzunahme.

**Abbildung 57 Wirkung von Phenylephrin-HCl auf die Aorta descendens**

| <b>Phenylephrin HCl<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>) Kontrolle</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b>Anzahl der Versuche n</b> |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|
| 0,1 $\mu\text{M}$                                                    | $0,41 \pm 0,24$                                 | 3                            |
| 0,3 $\mu\text{M}$                                                    | $1,39 \pm 0,26$                                 | 3                            |
| 1 $\mu\text{M}$                                                      | $4,04 \pm 0,76$                                 | 3                            |
| 3 $\mu\text{M}$                                                      | $7,56 \pm 1,13$                                 | 3                            |
| 10 $\mu\text{M}$                                                     | $10,32 \pm 0,57$                                | 3                            |

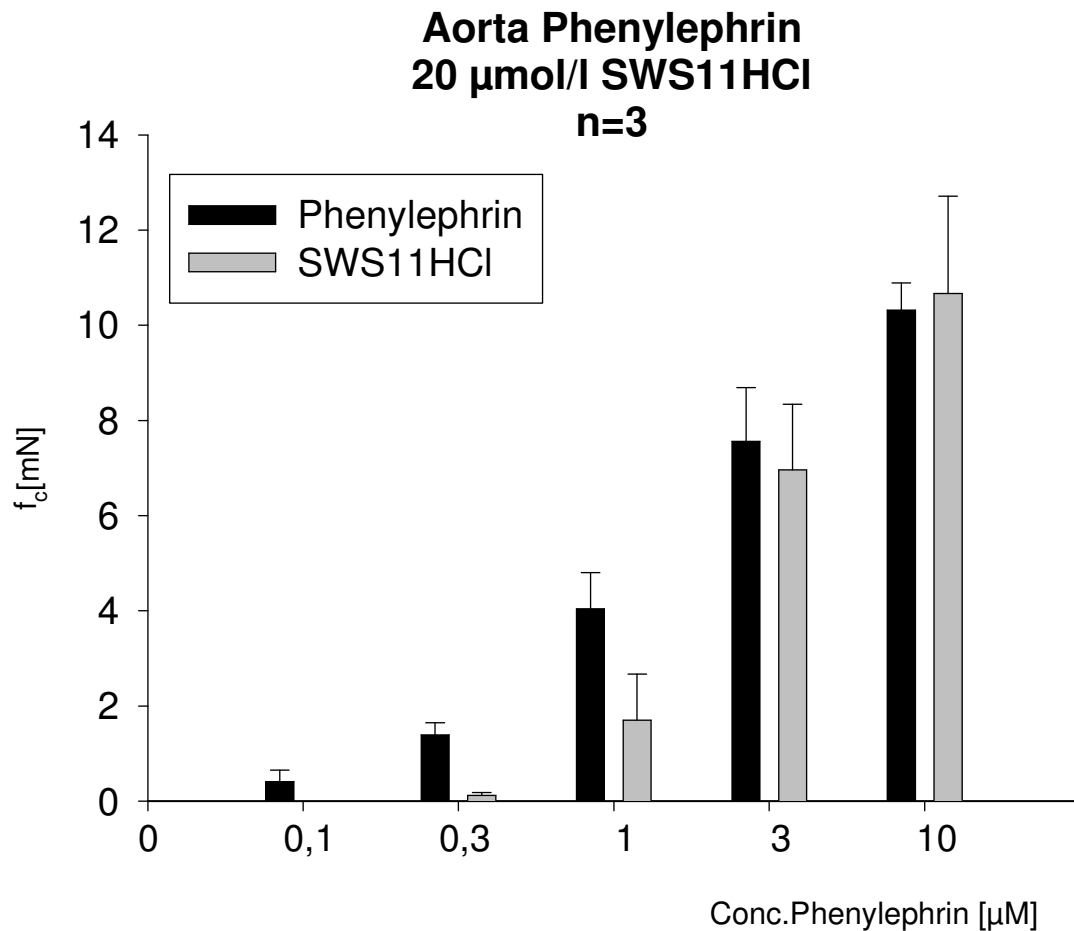
In der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und deren Standardfehler (SEM) von Phenylephrin-HCl, welches als Referenzsubstanz dient, dargestellt.

**Abbildung 58 Wirkung von 20 µmol/l SWS11HCl in Kombination mit Phenylephrin-HCl auf die Aorta descendens**

| <b>SWS11HCl<br/>(20mol/l) + Pheny-<br/>lephrin HCl</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b>Anzahl der Ver-<br/>suche n</b> | <b>Irrtumswahrscheinlichkeit<br/>P</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| 0,1 µM                                                 | 0 ± 0                                           | 3                                  | 0,01                                   |
| 0,3 µM                                                 | 0,12 ± 0,06                                     | 3                                  | 0,01                                   |
| 1 µM                                                   | 1,7 ± 0,97                                      | 3                                  | 0,01                                   |
| 3 µM                                                   | 6,96 ± 1,38                                     | 3                                  | n.s.                                   |
| 10 µM                                                  | 10,67 ± 2,04                                    | 3                                  | n.s.                                   |

In dieser Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und Standardfehler (SEM), die sich aus den drei Versuchen der Kombination von Phenylephrin 100 µmol/l mit der Testsubstanz SWS11HCl 20 µmol/l ergaben, zusammengefasst.

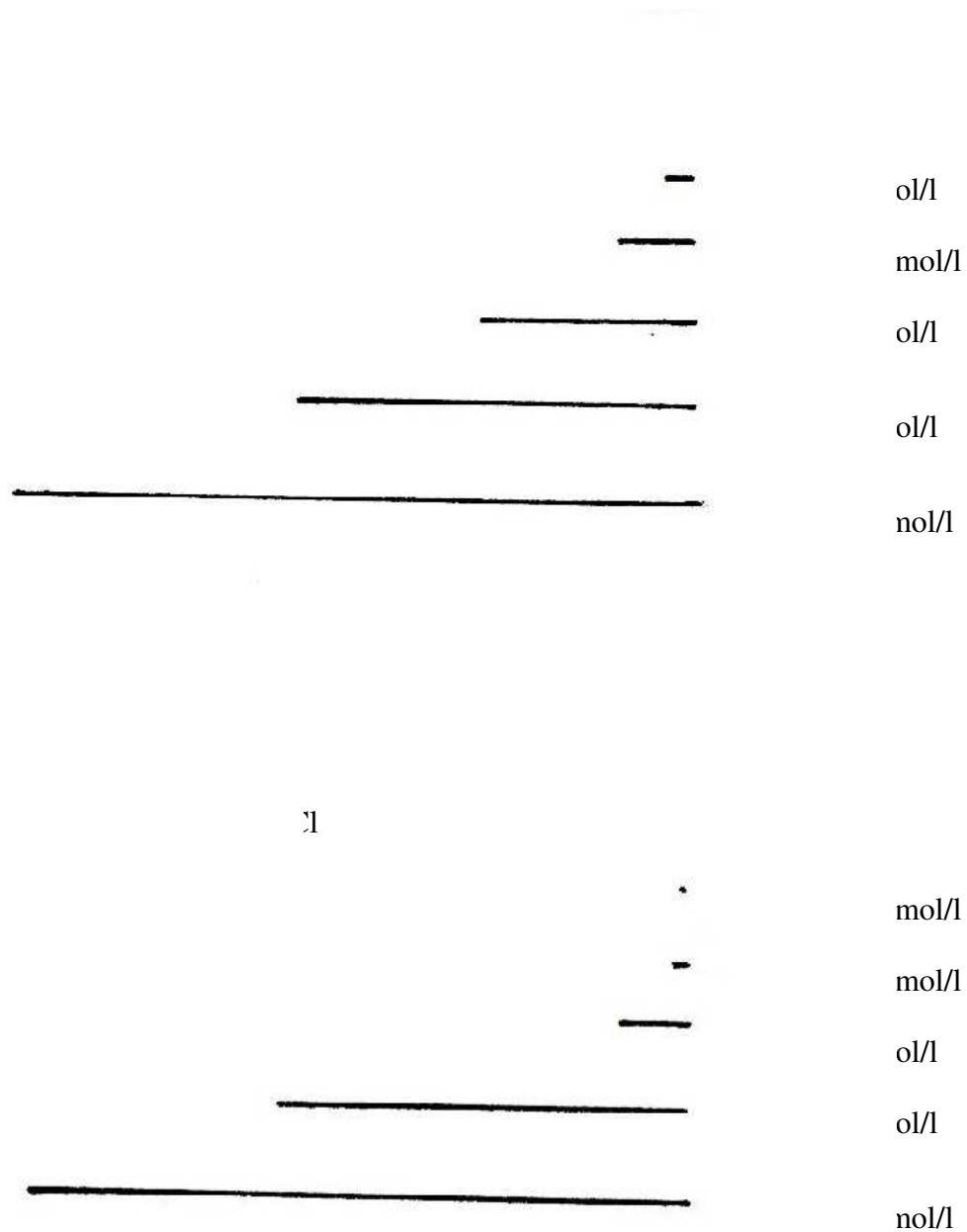
**Abbildung 59** Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrin-HCl auf die Aorta descendens in Kombination mit 20  $\mu\text{mol/l}$  SWS11HCl



Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen von Phenylephrinhydrochlorid in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der Ordinate die Kontraktionskraft der Aorta descendens in mN. Die arithmetischen Mittelwerte sind in dieser Grafik als Balken dargestellt und deren Standardfehler werden durch die strichförmigen Verlängerungen über den Balken symbolisiert.

Die schwarzen Balken markieren die Mittelwerte der drei Versuche mit Phenylephrin-HCl und die grauen Balken markieren die Werte der Kombination Phenylephrin-HCl und SWS11HCl.

**Abbildung 60 Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrin-HCl alleine und anschließend in Kombination mit 20  $\mu$ mol/l SWS11HCl auf die Aorta descendens**



Diese beiden Abbildungen zeigen die unterschiedliche Kontraktionskraft der Aorta descendens. Die obere Grafik stellt die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen von Phenylephrin dar und dient somit als Referenzwert. Die untere Abbildung zeigt die Wirkung von Phenylephrin-HCl in Kombination mit der Testsubstanz SWS11HCl.

Die Pfeile markieren die Substanzzugabe des Agonisten Phenylephrin in den verschiedenen Konzentrationen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemein

Ziel der Diplomarbeit war es, herauszufinden, ob die beiden Substanzen WHGTeoT und SWS11HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen eine Wirkung hervorriefen. Die verwendeten Organe waren: Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum, Musculus papillaris und Atrium cordis dextrum. Alle Organe besitzen eine glatte Muskulatur mit Ausnahme von Vorhof und Papillarmuskel, diese beiden nehmen eine Zwischenstellung zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur ein.

Die Versuche wurden, wie bereits ausführlich im Kapitel 3.4 erläutert, an 2 verschiedenen Versuchsaapparaturen durchgeführt. Zuvor mussten die Organe noch entsprechend präpariert werden. Auf den kommenden Seiten wird aufgrund der gesammelten Ergebnisse auf die unterschiedliche Wirkung der Testsubstanzen eingegangen.

### 5.2 Wirkung auf die Herzmuskulatur

Die beiden Herzpräparate die verwendet wurden, der rechte Vorhof und die Papillarmuskeln, haben eine Zwischenstellung zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur.

Die Kontrollwerte waren erforderlich, um die Wirkungen der Substanzen zu untersuchen. Es wurde getestet, ob es zu einer Änderung der Schlagfrequenz am Vorhof, oder zu einer Kontraktionsänderung am Papillarmuskel kam.

| <b>Organpräparat</b> | <b>WHGTeoT <math>f_c</math> (%)<br/>± SEM bei 100<br/><math>\mu\text{mol/l}</math></b> | <b><math>\text{EC}_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>SWS11HCl <math>f_c</math> (%)<br/>± SEM bei 100<br/><math>\mu\text{mol/l}</math></b> | <b><math>\text{EC}_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Rechter Vorhof       | $30,95 \pm 4,15$                                                                       | -                                                                 | $-32,11 \pm 7,42$                                                                       | -                                                                 |
| Papillarmuskel       | $-61,89 \pm 2,72$                                                                      | $6,55 \mu\text{mol/l}$                                            | $-12,31 \pm 7,29$                                                                       | -                                                                 |



Aus der Tabelle lässt sich deutlich erkennen, dass es bei der Applikation von WHGTeoT auf den rechten Vorhof zu einer Steigerung der Schlagfrequenz kommt. Auf den Papillarmuskel wirkt WHGTeoT jedoch stark negativ inotrop, die Testsubstanz erreicht sogar einen EC<sub>50</sub>-Wert, der bei 6,55 µmol/l liegt. SWS11HCl wirkt auf den Vorhof negativ inotrop und bei Applikation auf den Papillarmuskel kommt es zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft. Ein EC<sub>50</sub>-Wert wird jedoch mit SWS11HCl auf die Herzmuskulatur nicht erreicht.

### **5.2.1 Wirkung auf den rechten Vorhof**

Aufgrund der 4 Versuche von WHGTeoT am Vorhof wurde ein Kontrollwert von  $221 \pm 15,46$  Schläge pro Minute ermittelt. Durch die Einspritzung von WHGTeoT in das Organbad kam es zu einer stetigen Steigerung der Herzfrequenz. Nach der Applikation von 100 µmol/l der Testsubstanz stieg die Schlagfrequenz auf  $288 \pm 11,13$  Schläge pro Minute.

Bei der Testsubstanz SWS11HCl wurden ebenfalls 4 Versuche durchgeführt, um den Kontrollwert zu ermitteln, dieser lag bei  $240 \pm 10,61$  Schläge pro Minute. Die Abnahme der Schlagfrequenz war bei den Konzentrationen 1, 3, 10 und 30 µmol/l noch eher schwach ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 100 µmol/l der Testsubstanz SWS11HCl kam es zu einer signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz auf  $164 \pm 21,93$  Schläge pro Minute. SWS11HCl hatte somit eine deutliche negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof.

### **5.2.2 Wirkung auf den Papillarmuskel**

Bei der Testsubstanz WHGTeoT wurde als Kontrolle in 5 Versuchen ein Durchschnittswert von  $1,3 \pm 0,49$  mN ermittelt. Durch die Zugabe von WHGTeoT in die Nährstofflösung des Papillarmuskels wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft erzielt. Ab einer Testsubstanzkonzentration von 1 µmol/l wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 bzw. 0,001 eine Signifikanz festgestellt. Mit dieser Substanz konnte ein EC<sub>50</sub>-Wert bei 6,55 µmol/l ermittelt werden.

Bei der Substanz SWS11HCl wurde eine Amplitude von  $1,02 \pm 0,33$  mN als Vergleichs- oder Kontrollwert herangezogen, dieser wurde als Durchschnittswert von 4 Versuchen ermittelt. Bis zu einer Konzentration von 10 µmol/l kam es zu einer stetigen Abnahme der

Kontraktionskraft, ab 30  $\mu\text{mol/l}$  stieg die Kontraktionskraft des Papillarmuskels wieder an, der Endwert lag aber dennoch mit  $0,93 \pm 0,36 \text{ mN}$  unter dem Anfangswert. Mit SWS11HCl konnte kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert am Papillarmuskel erreicht werden. Die erhaltenen Werte waren alle nicht signifikant.

### 5.3 Wirkung auf glattemuskuläre Organe

Als glattemuskuläre Organe wurden Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum verwendet.

Bevor mit den Versuchen begonnen werden konnte, mussten die Organe maximal kontrahiert werden. Dies wurde erreicht durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung beim Versuch am terminalen Ileum. Bei der Aorta und der Arteria pulmonalis wurde eine 90 mmolare KCl-Lösung verwendet. Sobald eine maximale Kontraktion vorlag konnte untersucht werden, ob die Testsubstanzen eine Dilatation an den entsprechenden Organen hervorriefen.

| Organpräparat      | WHGTeoT $f_c$ (%)<br>$\pm \text{SEM bei } 100 \mu\text{mol/l}$ | $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) | SWS11HCl $f_c$ (%)<br>$\pm \text{SEM bei } 100 \mu\text{mol/l}$ | $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Aorta              | $-2,37 \pm 7,82$                                               | -                                      | $-98,30 \pm 1,70$                                               | 18 $\mu\text{mol/l}$                   |
| Arteria pulmonalis | $-3,43 \pm 5,44$                                               | -                                      | $-95,23 \pm 2,80$                                               | 19,8 $\mu\text{mol/l}$                 |
| Terminales Ileum   | $-46,98 \pm 4,51$                                              | -                                      | $-75,34 \pm 4,17$                                               | 32,15 $\mu\text{mol/l}$                |

An der Tabelle ist deutlich zu erkennen, dass SWS11HCl wesentlich stärker auf die glatte Muskulatur wirkt als WHGTeoT. Obwohl WHGTeoT vor allem auf das terminale Ileum eine deutliche Wirkung aufweist, konnte für keines der drei Organe eine  $\text{EC}_{50}$ -Konzentration errechnet werden.

Die Testsubstanz SWS11HCl hat eine deutlich stärkere Wirkung auf die glatte Muskulatur als auf die Herzmuskulatur. An beiden Herzpräparaten konnte kein EC<sub>50</sub>-Wert erzielt werden, im Gegensatz dazu führte SWS11HCl an Aorta, Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft und es konnte in allen drei Fällen ein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden. An der Aorta war der Effekt am meisten ausgeprägt, ein EC<sub>50</sub>-Wert wurde bereits bei einer Konzentration von 18 µmol/l erreicht.

### **5.3.1 Wirkung auf die Aorta**

Der Kontrollwert der Testsubstanz WHGTeoT bei einer maximalen Kontraktion betrug  $13,46 \pm 4,18$  mN. Die Zugabe von WHGTeoT in das Organbad hatte keine signifikante Auswirkung auf die Kontraktionskraft der Aorta. Der Endwert bei einer Konzentration von 100 µmol/l lag bei  $13,79 \pm 4,90$  mN und war fast identisch mit dem 100%-Wert. Es konnte bei keiner Konzentration eine Signifikanz festgestellt werden.

Zur Berechnung des Vergleichswertes wurden 6 Versuche herangezogen. Ab einem Kontrollwert von  $10,87 \pm 1,28$  mN konnte mit der Einspritzung der Testsubstanz SWS11HCl begonnen werden. Bereits ab einer Konzentration von 3 µmol/l konnte eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft festgestellt werden. Bei der Endkonzentration von 100 µmol/l war die Aorta fast vollständig dilatiert ( $0,25 \pm 0,25$ ). Als EC<sub>50</sub>-Wert wurden 18 µmol/l ermittelt. Ab einer Konzentration von 3 µmol/l waren die Werte als signifikant einzustufen.

### **5.3.2 Wirkung auf die Arteria pulmonalis**

Der Zusatz von WHGTeoT zum Organbad erfolgte ab einem Vergleichswert von  $13,44 \pm 1,95$  mN. Es wurden kumulativ die Konzentrationen 1, 2, 7, 20, 70 µmol/l zugesetzt und jeweils die Wirkung auf die Arteria pulmonalis beurteilt. Um aussagekräftige Werte zu erhalten, wurden 5 Versuchsreihen durchgeführt. Die Testsubstanz führte zu keiner deutlichen Veränderung der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis. Außerdem zeigten die erhaltenen Werte keine Signifikanz.

Bei der Testsubstanz SWS11HCl wurden ebenfalls 5 Versuchsreihen durchgeführt. Der ermittelte Kontrollwert wurde mit  $15,34 \pm 2,84$  mN festgelegt. Die Substanz führte bereits ab

einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft um  $-95,23 \pm 2,80 \%$ .

SWS11HCl hatte somit einen enormen vasodilatierenden Effekt auf die Arteria pulmonalis. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 bzw. 0,001 bei den Konzentrationen 10 bzw. 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  konnte eine Signifikanz festgestellt werden. Ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert wurde bei 19,8  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

### **5.3.3 Wirkung auf das terminale Ileum**

Die Substanz WHGTeoT löste eine Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum aus. Als Kontrollwert wurde mit Hilfe von 6 Versuchen ein Wert von  $9,09 \pm 1,83 \text{ mN}$  festgelegt. Der Endwert bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  betrug  $5,27 \pm 1,40 \text{ mN}$ , was einer Abnahme von  $-46,98 \pm 4,51 \%$  entsprach. Ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert konnte mit WHGTeoT nicht erreicht werden. Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  zeigten die Werte eine Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 bzw. 0,001.

SWS11HCl führt zu einer deutlichen Spasmolyse des terminalen Ileums.

Ab einem Wert von  $10,72 \pm 1,68 \text{ mN}$  konnte mit der kumulativen Testsubstanzzugabe begonnen werden. Bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  konnte eine Signifikanz festgestellt werden. Ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert wurde bei einer Konzentration von 32,15  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Um die Wirkung von SWS11HCl auf das terminale Ileum zu untersuchen, wurden 5 Versuche durchgeführt.

### **5.3.4 Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Glibenclamid**

Um den Wirkungsmechanismus von SWS11HCl zu untersuchen, wurde der Antagonist Glibenclamid in zwei verschiedenen Konzentrationen (30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$ ) zugesetzt.

Es wurden jeweils 3 Versuche von den beiden unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die dilatierende Wirkung von SWS11HCl auf die Aorta durch die Öffnung von ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen zustande kam.

SWS11HCl wurde in einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  zugefügt, diese Konzentration entsprach dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert.

Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid führte SWS11HCl zu keiner deutlichen Änderung der Kontraktionskraft der Aorta. Erst bei einer Konzentration des Antagonisten von 100  $\mu\text{mol/l}$  war eine deutliche Dilatation der Aorta durch SWS11HCl erkennbar. Der starke Einfluss der Testsubstanz SWS11HCl konnte somit nicht exklusiv über eine Öffnung der  $\text{K}^+$ -Kanäle erklärt werden.

### **5.3.5 Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Nitro-L-Arginin**

Nitro-L-Arginin, ein Inhibitor des Stickstoffmonoxid-Systems wurde dem Organbad in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  zugefügt. Es wurde zugesetzt, um die Aorta maximal zu kontrahieren. Nach einer 45 minütigen Wartezeit wurde die Wirksubstanz SWS11HCl in die Nährstofflösung injiziert. Durch diese Substanzzugabe konnte keine signifikante Dilatation der Aorta descendens ausgelöst werden. Die Ergebnisse der 3 Versuche wurden nicht als signifikant eingestuft und verdeutlichen, dass die vasodilatierende Wirkung von SWS11HCl nicht durch eine NO-Freisetzung vermittelt wurde.

### **5.3.6 Wirkung von SWS11HCl gemeinsam mit Phenylephrin-HCl**

Bei den Versuchen mit Phenylephrinhydrochlorid und SWS11HCl wurde die sympathomimetische Wirkung der Testsubstanz untersucht. Der Agonist Phenylephrin, ein  $\alpha$ -Sympathomimetikum, wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,3; 1; 3 und 10  $\mu\text{mol/l}$ ) in die Nährstofflösung injiziert. Anschließend wurde die Testsubstanz SWS11HCl zugesetzt. Eine signifikante  $\alpha$ -blockierende bzw. dilatierende Wirkung von SWS11HCl auf die Aorta descendens konnte nur bei einer Konzentration von 0,3 und 1  $\mu\text{mol/l}$  festgestellt werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht von großer Bedeutung.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Wirkung der Testsubstanz SWS11HCl vermutlich durch eine Öffnung der Kaliumkanäle zustande kommen könnte.

## 6 Zusammenfassung

Während dieser Diplomarbeit wurden die Substanzen WHGTeoT und SWS11HCl auf ihre Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet.

Bei den verwendeten Organen handelte es sich um solche mit glatter Muskulatur (Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum) und um Herzmuskulatur (Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten waren mehrere Versuchsreihen erforderlich, bei denen die Testsubstanzen in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 appliziert wurden.

Bei den Versuchsreihen am Vorhof wurde untersucht, ob die beiden Testsubstanzen eine Veränderung der Schlagfrequenz hervorriefen, bei den übrigen Präparaten wurde eine Änderung der Kontraktionskraft untersucht.

Bei der Anwendung an den Herzpräparaten führte die Testsubstanz WHGTeoT zu einer deutlichen Wirkung. Am rechten Vorhof kam es zu einer Steigerung der Schlagfrequenz und bei einer Applikation am Papillarmuskel kam es zu einer starken Senkung der Kontraktionskraft, es wurde sogar ein  $EC_{50}$ -Wert bei  $6,55 \mu\text{mol/l}$  erreicht. Ab einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  waren die Ergebnisse signifikant.

WHGTeoT hatte somit eine positiv chronotrope und eine starke negativ inotrope Wirkung auf die Herzpräparate.

Auf die glatte Muskulatur der Aorta descendens und die Arteria pulmonalis hatte die Substanz WHGTeoT jedoch kaum eine Wirkung. Die erhaltenen Werte hatten keine Signifikanz und es konnte kein  $EC_{50}$ -Wert errechnet werden.

Auf das terminale Ileum hingegen übte die Testsubstanz WHGTeoT eine stärkere Wirkung aus. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um  $-46,98 \pm 4,51 \%$  und die Werte waren signifikant.

Die Testsubstanz SWS11HCl bewirkte am rechten Vorhof vor allem bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  eine deutliche Schlagfrequenzsenkung. Nach der Applikation der Testsubstanz am Papillarmuskel kam es zu einer leichten Senkung der Kontraktionskraft. Die erhal-

tenen Werte waren alle nicht signifikant und es wurde in beiden Fällen kein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

Auf die glattmuskulären Organe hatte die Wirksubstanz SWS11HCl einen wesentlich stärkeren Effekt als auf die Herzmuskulatur. SWS11HCl führte nach Applikation an Aorta, Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft. In allen 3 Fällen wurde sogar ein EC<sub>50</sub>-Wert eruiert. An der Aorta und der Arteria pulmonalis war bereits ab einer geringen Konzentration der Testsubstanz ein deutlicher vasodilatierender Effekt sichtbar. Aufgrund der starken Dilatation der Aorta wurde der Wirkungsmechanismus von SWS11HCl mit Hilfe der beiden Antagonisten Glibenclamid und Nitro-L-Arginin und mit dem Agonisten Phenylephrin untersucht. Die hervorgerufene Relaxation wird vermutlich durch eine Öffnung der K<sup>+</sup>-Kanäle verursacht. An dem Darmpräparat konnte ebenfalls eine statistisch signifikante spasmolytische Wirkung festgestellt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München

Banerjee SK, Maulik SK (2002) Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. Nutrition journal 1:4

Beauchamp Jr RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. Crit Rev Toxicol 13:25-97

Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulphide mediates the vasoactivity of garlic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(46):17907-8

Campbell NA, Reece JB (2003) Biologie. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/ Berlin

Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL (2006) The Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract and Liver. Gastroenterology 131(1):259-271

Kamoun P (2004) Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. Amino Acids 26(3):243-254



Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-USmar VM, Lancaster JR Jr, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O<sub>2</sub>-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4):H1953-60

Lippert H (2000) *Lehrbuch Anatomie*. 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München

Lloyd D (2006) Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger? *Trends in Microbiology* 40(10):456-462.

Martin, R.S. et al. High-temperature mixtures of magmatic and atmospheric gases. *Geochem. Geophys. Geosy.* (in press)

Moore PK, Bhatia M, Moolchala S (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24:609-611

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2006) *Arzneimittelwirkungen kompakt*. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2008) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(3):R491-511

Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PTH (2008) Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int* 52:155-165.

Searcy DG, Lee SH (1998) Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool* 282(3):310-322

Sivarajah A, McDonald MC, Thiernemann C (2006) The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 26(2):154-61

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16 (13):1792-1798

Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francorn DM, Taylor JD, Dieken FP (1989) Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem. Pharmacol* 38: 973-981.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016

Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK (2007) Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol* 102(1):261-268

## 8 Curriculum Vitae

**Name:** Bernadette Händlhuber

**Adresse:** Webgasse 37/1/22  
1060 Wien

**E-Mail:** b.haendlhuber@gmx.at

**Geburtstag/-ort:** 04.07.1984, Grieskirchen (OÖ)

**Staatsbürgerschaft:** Österreich

**Familie:**

|         |                                            |
|---------|--------------------------------------------|
| Vater:  | Dr. Georg Händlhuber<br>Amtstierarzt       |
| Mutter: | Maria Händlhuber<br>Dipl. Krankenschwester |
| Bruder: | Christoph Händlhuber<br>Student            |

**Schulausbildung:**

|             |                                                                                              |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1990 – 1994 | Volksschule Pichl                                                                            |
| 1994 – 1998 | Bundesrealgymnasium Brucknerstr. Wels                                                        |
| 1998 - 2003 | HBLA Wels                                                                                    |
| seit 2003   | Pharmaziestudium in Wien                                                                     |
| Juni 2009   | Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien |

**Praktika:**

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| August 2004 | Klinikum Kreuzschwestern Wels GmbH  |
| Juli 2005   | Heilborn Apotheke, Bad Schallerbach |
| August 2006 | Richter Pharma Logistik, Wels       |
| Juli 2007   | Falken-Apotheke, Wels               |
| Juli 2008   | Adler-Apotheke Fritsch & CoKG, Wels |
| August 2009 | Adler-Apotheke Fritsch & CoKG, Wels |