



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Bestimmung der Wirkstärke von zwei neu synthetisierten Dianiliden
(WHG 40 und WHG 44) an isolierten Organen von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Andreas Gökler
Matrikel-Nummer:	9814316
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Wien, am

25.09.2008

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die kompetente Betreuung, für die Hilfe bei so manchen Problemen und für die positive Art, die das Arbeiten im Labor sehr erleichtert hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Peter Höflich für seine Unterstützung in allen technischen Belangen und für die vielen aufbauenden Worte.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Studienkollegen und Freund Willi bedanken, der mich während des gesamten Studiums begleitet hat. Danke für die Motivation und für die unzähligen gemeinsam verbrachten Lernstunden.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Günter und Heidi, die mich im Laufe meines Studiums nicht nur finanziell, sondern vor allem stets auch emotional unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Bruder Johannes, für seinen moralischen Beistand.

Meiner Lebensgefährtin Susi möchte ich besonders großen Dank aussprechen. Vor allem für ihre liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und ihr Verständnis für meinen Weg.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. ZIELSETZUNG	1
1.2. ERREGUNGSBILDUNG UND ERREGUNGSLEITUNG IM HERZEN	2
1.3. AKTIONSPOTENTIAL	3
1.4. SPANNUNGSABHÄNGIGE IONENKANÄLE	4
1.5. CALCIUMANTAGONISTEN	6
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 8
2.1. VERSUCHSTIERE.....	8
2.2. ENTNAHME UND PRÄPARATION DER ZU UNTERSUCHENDEN ORGANE.....	9
2.2.1. Entnahme und Präparation der Aorta.....	9
2.2.2. Entnahme und Präparation der Arteria pulmonalis.....	9
2.2.3. Entnahme und Präparation des terminalen Ileums	10
2.2.4. Entnahme und Präparation der Papillarmuskeln.....	11
2.2.5. Entnahme und Präparation des rechten Vorhofs	11
2.3. PHYSIOLOGISCHE NÄHRLÖSUNG	12
2.3.1. Nährlösung für die Aorta, Arteria pulmonalis, das terminale Ileum, den Papillarmuskel und den rechten Vorhof.....	12
2.4. VERSUCHSANORDNUNG	13
2.4.1. Versuchsanordnung A.....	13
2.4.2. Versuchsanordnung B.....	15
2.4.3. Kraftwandler.....	18
2.4.4. Begasung	18
2.5. VERSUCHSABLAUF	19
2.5.1. Versuchsablauf Aorta	19
2.5.2. Versuchsablauf Arteria pulmonalis	19
2.5.3. Versuchsablauf terminales Ileum.....	20
2.5.4. Versuchsablauf Papillarmuskel	20
2.5.5. Versuchsablauf Vorhof.....	21
2.6. UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	22
2.7. AUSWERTUNG UND STATISTIK	24

3. ERGEBNISSE	26
3.1. WIRKUNG DER TESTSUBSTANZ WHG 40 AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN	26
3.1.1. <i>Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta.....</i>	26
3.1.2. <i>Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis.....</i>	29
3.1.3. <i>Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums</i>	32
3.1.4. <i>Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels</i>	35
3.1.5. <i>Wirkung von WHG 40 auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs</i>	38
3.2. WIRKUNG DER TESTSUBSTANZ WHG 44 AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN	41
3.2.1. <i>Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta.....</i>	41
3.2.2. <i>Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis.....</i>	44
3.2.3. <i>Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums</i>	47
3.2.4. <i>Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels</i>	50
3.2.5. <i>Wirkung von WHG 44 auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs</i>	53
3.3. EINFLUSS DES LÖSUNGSMITTELS DIMETHYLSULFOXID (DMSO) AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN.....	56
3.3.1. <i>Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta.....</i>	57
3.3.2. <i>Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....</i>	58
3.3.3. <i>Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums</i>	59
3.3.4. <i>Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels</i>	60
3.3.5. <i>Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs</i>	61
4. DISKUSSION	62
4.1. STRUKTURVERGLEICH	62
4.2. VERSUCHE AN DEN ISOLIERTEN ORGANEN	64
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	68
7. CURRICULUM VITAE	70

1. EINLEITUNG

1.1. ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden zwei neu synthetisierte Dianilide auf ihre pharmakologische Wirkung untersucht. Die beiden Testsubstanzen mit der Bezeichnung WHG 40 und WHG 44 wurden am Department für Medizinische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Beide Testsubstanzen wiesen gemeinsame Teilstrukturen mit dem Calciumkanalblocker Diltiazem auf.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die Testsubstanzen WHG 40 und WHG 44 eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur erwirken. Dies wurde an den Organen Aorta, Arteria pulmonalis und an dem terminalen Ileum getestet. Am Vorhof wurde untersucht ob die beiden Testsubstanzen eine positiv oder negativ chronotrope Wirkung hervorrufen. An den Präparaten des Papillarmuskels wurde auf mögliche positiv oder negativ inotrope Effekte getestet.

1.2. ERREGUNGSBILDUNG UND ERREGUNGSLEITUNG IM HERZEN

Herzmuskelfasern besitzen die Eigenschaft der Erregbarkeit. Erregungen werden in Form von Aktionspotentialen weitergeleitet. Fasern des Erregungsbildungs- und Erregungsleitsystems können weiters spontan Erregungen bilden. Im Sinusknoten entstehen Erregungen, die die rhythmischen Aktionen des Herzens auslösen. Dies ist die Voraussetzung für Selbststeuerung der Herzschlagfolge, die so genannte Autorhythmie oder Automatie.

Die Erregung breitet sich vom Sinusknoten, der sich im rechten Vorhof befindet, über das Arbeitsmyocard beider Vorhöfe mit einer Geschwindigkeit von 0,6-1 m/s aus, und geht weiter in den Atrioventrikularknoten (AV Knoten), der am Boden des rechten Vorhofs in Nähe des Septums lokalisiert ist. Aufgrund des geringen Faserdurchmessers und dem nicht vorhandenen schnellen Natriumeinstroms ist die Geschwindigkeit der Erregungsübertragung im AV Knoten wesentlich niedriger. Dies verursacht eine Verzögerung bei der AV Übertragung und stellt somit sicher, dass erst nach Ende der Vorhofsystole die Kammerkontraktion beginnen kann.

Ausgehend vom AV Knoten gelangt die Erregung weiter zu dem Stamm des His'schen Bündels. Dieser ist die einzige Verbindung zwischen den Vorhöfen und den Kammern, die Erregungen weiterleiten kann. In weiterer Folge teilt sich das His'sche Bündel in die Tawara Schenkel auf, die in linken und rechten Kammerschenkel unterteilt werden. Der linke Schenkel spaltet sich noch in einen vorderen und hinteren Faszikel auf. Beide Schenkel verlaufen in Richtung des Papillarmuskels. Die Erregung gelangt weiter zu den Purkinje Fasern, die die Endaufzweigung des Systems bilden, und die Erregung auf das Kammermyocard übertragen. Aufgrund des großen Faserdurchmessers wird die Strecke von dem His'schen Bündel zu den Purkinje Fasern mit einer sehr hohen Leitgeschwindigkeit zurückgelegt. Das Alles oder Nichts Gesetz der Erregungsausbreitung sagt aus, dass alle Myokardfasern sehr schnell nacheinander von der Erregung erfasst werden, wofür die gap junctions verantwortlich sind. Die Aktivierung der gesamten Herzmuskulatur ist somit in weniger als 0,1 Sekunden abgeschlossen (Thews et al. 1999).

1.3. AKTIONSPOTENTIAL

Das Aktionspotential ist die Veränderung des Membranpotentials im Laufe einer Herzaktion. Es entsteht in Folge von Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen verschiedener Ionenein- und Ausströme.

Ausgelöst wird es durch eine lokale Depolarisation, die mindestens 15mV betragen muss. Bei überschreiten dieses Werts erfolgt der Ablauf der weiteren Änderung des Membranpotentials selbstständig. Zuerst findet, bis die initiale Spitze erreicht ist (30mV), ein schneller Potentialanstieg statt. Darauf folgt die Repolarisationsphase, in der ein länger anhaltendes Plateau entsteht, was für die Herzmuskelfaser typisch ist. Im Anschluss darauf stellt sich wieder ein Ruhepotential ein. Die Herzfrequenz bestimmt die Zeitspanne, über die das Aktionspotential andauert. Bei langsamer Frequenz hält das Aktionspotential knapp doppelt so lange an (400 ms) als bei niedriger Schlagfrequenz. Im Vorhof ist es kürzer als jenes in der Arbeitsmuskulatur in den Ventrikeln.

Durch Öffnung schneller Natriumkanäle wird der Anstieg des Potentials ausgelöst. Diese Öffnung ist nur von kurzer Dauer, da eine sehr rasche Inaktivierung der schnellen Natriumkanäle erfolgt, was in weiterer Folge zu einer Teilpolarisation führt. Die längere Öffnung der langsamen Calciumkanäle vom L-Typ und die verringerte Leitfähigkeit für Kaliumionen verursachen die typische Plateauphase. Somit gleichen sich die Effekte des langsamen Calciumeinstroms und die des Kaliumausstroms annähernd aus. Ein alleiniger Ausstrom von Kationen findet erst wieder statt, wenn die Leitfähigkeit von Calcium soweit absinkt, dass sie die während dieser Zeit herabgesetzte Leitfähigkeit von Kalium unterschreitet, wodurch dann die Repolarisation eingeleitet wird. Die dadurch auftretende Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit führt anschließend zu einer vollständigen Repolarisation. Die Leitfähigkeit für Kalium ist nach Abschluss des Aktionspotentials konstant hoch, wodurch der Wert des Ruhepotentials beständig bleibt, bis eine weitere Erregung erneut ein Aktionspotential auslöst.

Durch Blockade von Natriumkanälen kann die Depolarisationsphase verlängert werden, die Hemmung von Kaliumkanälen führt hingegen zu einer längeren Repolarisationsphase und somit zu einem verlängerten Aktionspotential. Die Hemmung des potentialabhängigen Einstroms ist durch Calciumkanalblocker möglich (Thews et al. 1999).

1.4. SPANNUNGSABHÄNGIGE IONENKANÄLE

Ionenkanäle kommen in der Zellmembran vor und werden von Proteinen gebildet. Man unterscheidet entsprechend der Ionen, für welche die Ionenkanäle meist selektiv sind, Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridkanäle. Weiters werden spannungsabhängige Kanäle von ligandengesteuerten Kanälen unterschieden, da Kanäle nicht nur ionenselektiv, sondern auch selektiv bezüglich ihres Öffnungsmechanismus sind. Durch Konformationsänderungen der Kanalproteine können diese geöffnet oder geschlossen werden.

Da Ionenkanäle unterschiedliche Ladungsverteilung und Geometrie besitzen, können meistens während deren Öffnung nur bestimmte Ionen diffundieren. Damit überhaupt ein Ionenfluß stattfinden kann, ist eine Konzentrationsdifferenz auf beiden Seiten der Membran notwendig. Während des Ruhepotentials weist der intrazelluläre Raum gegenüber dem extrazellulären Raum ein negatives Potential auf. Verantwortlich dafür sind verschiedene Ionenkonzentrationen im inneren und äußeren Raum der Zelle, die vor allem durch die Na^+/K^+ -ATPase gesteuert werden. Kaliumströme diffundieren durch die Membran nach Außen, Natrium und Calciumströme fließen ins Zellinnere. Wenn Ionen fließen entsteht ein elektrischer Gradient, da sie eine gegenteilige Ladung zurücklassen.

Entgegen dem Konzentrationsgefälle werden Ionen über Ionenpumpen transportiert. Im Gegensatz zu passiven Transportprozessen, die zwischen Innen und Außenraum aufgrund von Konzentrationsdifferenzen ablaufen, handelt es sich hier um einen aktiven Transportmechanismus. Dieser aktive Mechanismus ist nötig, um die ein und ausgeströmten Ionen wieder durch die Membran zurückzutransportieren. Die dafür nötige Transportenergie wird über die Spaltung von Adenosintriphosphat bereitgestellt. Die Na^+/K^+ -ATPase pumpt eingeströmtes Natrium wieder aus der Zelle hinaus und ausgeströmtes Kalium wieder ins Zellinnere zurück, wobei 3 Natriumionen gegen 2 Kaliumionen transportiert werden. Der Transport von Calcium nach Außen wird über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschmechanismus gesteuert, wobei 3 Natriumionen gegen 1 Calciumion transportiert werden (Mutschler et al. 2001).

Natriumkanäle sind langgestreckte Glykoproteinkomplexe, die aus einer α -, einer β_1 - und einer β_2 - Untereinheit bestehen. Die α Untereinheit stellt den eigentlichen Kanal dar und ist in vier identische Domänen unterteilt. Jedes Kanalprotein weist im Inneren eine mit Wasser

gefüllte Pore auf, durch die das Passieren von Natriumionen stattfinden kann. Die Natriumkanäle sind selektiv für Natriumionen permeabel, da sowohl durch negative Festladungen der Durchtritt von Anionen abgewehrt wird, als auch durch spezielle Filter das Eindringen von anderen Kationen verhindert wird.

Der Natriumkanal ist während der Ruhephase des Aktionspotentials geschlossen. Infolge von Depolarisation der Membran findet eine Ladungsverschiebung im Inneren des Kanalproteins statt, was zu einer Konformationsänderung des Moleküls führt. Dadurch wird der Kanal torähnlich wieder geöffnet. Durch Schließen eines zweiten Tores, dem Inaktivierungstor, wird der Einstrom von Natrium abgebrochen und die Repolarisationsphase beginnt. Natriumkanäle sind nach dem Schließen vorerst inaktiv und erlangen erst während der Repolarisationsphase einen geschlossenen aktivierbaren Zustand wieder. Erst nach dieser Reaktivierung kann erneut eine Depolarisation ausgelöst werden.

Purkinje Fasern und Papillarmuskeln weisen eine schnellere Depolarisationsrate auf, die durch die Aktivierung des Natriumkanals verursacht wird. Die Schrittmacherzellen haben eine langsame Depolarisationsrate, da hier der Natriumkanal im inaktiven Zustand vorliegt (Thews et al. 1999).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle Öffnen oder Schließen durch Veränderung des Membranpotentials (Hille 1992). Im Unterschied zu den Natriumkanälen öffnen und schließen sich die Kaliumkanäle der Nervenfasern, besonders während der Repolarisationsphase, ständig. Somit können sie innerhalb der Dauer des Aktionspotentials aktiviert werden. Kaliumkanäle anderer Typen unterscheiden sich von denen der Nervenfasern dadurch, dass sie auch einen inaktiven Zustand annehmen können oder von der intrazellulären Calciumkonzentration gesteuert werden (Thews et al. 1999).

Calciumkanäle können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Einerseits in spannungsabhängige Kanäle, durch die der Einstrom von extrazellulärem Calcium ermöglicht wird, andererseits in Kanäle, die für die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol verantwortlich sind (Nayler 1992).

Calciumkanäle, bei denen ein kurzer Calciumeinstrom beobachtet wurde, wurden als T-Typ („transient-type“) bezeichnet. Diejenigen, die einen langen Einstrom aufwiesen, erhielten die Bezeichnung L-Typ („long lasting-type“) (Reuter 1986). Weiters gibt es noch N-Typ

Calciumkanäle („neuronal-type“) und Calciumkanäle vom P-Typ, die in den Zellen der Purkinje Fasern zu finden sind. Calciumkanäle vom L-Typ und N-Typ sind für deren Aktivierung auf stärkere Depolarisation angewiesen als Calciumkanäle vom T-Typ, welche schon bei relativ niedrigem Membranpotenzial aktiviert werden. Die Inaktivierung der Calciumkanäle vom T-Typ erfolgt sehr rasch, während Calciumkanäle vom L-Typ nur sehr langsam inaktiviert werden. L-Typ Calciumkanäle sind weit verbreitet und für den Einstrom von Calcium in die Membran von größter Bedeutung, da sie eine sehr hohe Leitfähigkeit für Calcium besitzen (Oberdisse et al. 2001). Spannungsabhängige Calciumkanäle, besonders die des L-Typs, sind entscheidend für die Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur, wo sie bevorzugt anzufinden sind. Die Hemmung des Calciumeinstroms durch die Calciumkanäle des L-Typs ist mit Calciumantagonisten möglich (Thews et al. 1999).

1.5. CALCIUMANTAGONISTEN

Calciumantagonisten sind Substanzen, die den Calciumeinstrom durch die Membran teilweise vermindern. Dies erfolgt durch Hemmung des Calciumeinstroms durch den L-Typ Calciumkanal, wodurch auch die heute übliche Bezeichnung Calciumkanalblocker nachvollziehbar ist. Die Gemeinsamkeit der Calciumantagonisten liegt darin, dass alle an die α_{1c} Untereinheit des L-Kanals binden. Aufgrund struktureller Unterschiede ist die Bindungsstelle jedoch verschieden, wodurch man drei Verbindungen unterscheiden kann: Verbindungen des 1,4- Dihydropyridin-Typs (Nifedipin-Typ), Verbindungen des Verapamil-Typs und Verbindungen des Diltiazem-Typs. Obwohl diese drei Typen strukturell stark variieren, lässt sich als Gemeinsamkeit feststellen, dass die Verstoffwechselung aller Calciumkanalblocker durch CYP3A4 erfolgt. Dadurch kann es mit Substanzen, die auf dieses Enzym hemmend oder stimulierend wirken, zu Wechselwirkungen kommen. Dies betrifft vor allem Pharmaka, die auf das Herz-Kreislaufsystem wirken, da diese über CYP3A4 biotransformiert werden.

Durch Abnahme der Konzentration an Calciumionen im Zellinneren bewirken die drei Typen am Herzen eine Verringerung der Aktivität der calciumabhängigen Myosin ATPase, wodurch weniger Phosphat umgesetzt wird und sich der Verbrauch von Sauerstoff verringert. Weiters erfolgt an der glatten Muskulatur eine Abnahme des Gefäßmuskeltonus, wodurch es zu einer Vasodilatation kommt. Somit bewirken Calciumantagonisten, dass die Herzarbeit durch Hemmung der elektrischen Kopplung und durch Erniedrigung der Kontraktilität direkt

verringert wird. Weiters entlasten sie indirekt das Herz, indem die Nachlast und in geringem Ausmaß auch die Vorlast reduziert wird.

Die Calciumkanalblocker vom Verapamil Typ und Diltiazem weisen als Gemeinsamkeit auf, dass sie am Sinusknoten negativ chronotrop und am AV-Knoten negativ dromotrop wirken. Somit können diese beiden Typen bei tachykarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen eingesetzt werden. Generell sind Calciumantagonisten bei koronarer Herzkrankheit zur Anfallsprophylaxe und zur Intervalltherapie sowie akut bei spastischen Angina Zuständen indiziert. Darüber hinaus finden sie breiten Einsatz in der Therapie der Hypertonie (Mutschler et al. 2001).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Meerschweinchen. Das Körpergewicht der Tiere betrug zwischen 250 und 600 Gramm. Für die Versuche wurden die isolierten Organe dieser Tiere verwendet. Bezogen wurden diese Versuchstiere aus dem Forschungsinstitut für Labortierkunde und Labortiergenetik in Himberg (Himberg, Österreich, Stamm DH), und aus dem Department für Toxikologie und Labortierzucht in Dobra Voda (Universität Bratislava, Slowakei, Stamm DH und TRIK). Die Meerschweinchen wurden mittels Genickschlag getötet, wodurch ein schmerzfreier und schneller Tod garantiert werden konnte. Um einen möglichst konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des Dünndarms beizubehalten, war es für die Versuchsdurchführung wichtig, nüchterne Meerschweinchen zu verwenden.

Außerdem war zu beachten, dass die Explantation des Herzens, seiner Gefäße und des Darms rasch erfolgten, um einen Mangel an Sauerstoff sowie eine Koagulation des Blutes im Herzen zu verhindern. Das explantierte Herz wurde anschließend thorako- und laparotomiert und in einer mit Oxy mix (95% Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid) durchperlten Nährlösung zwischengelagert, wodurch das Auftreten einer Hypoxie verhindert werden konnte.

Insgesamt wurden Versuche an 5 verschiedenen Organen durchgeführt (Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum, Papillarmuskel und Vorhof), wobei die Präparation der Organe unter dem Mikroskop (Zeiss, Jena) erfolgte. Hierfür wurden die Organe in einer mit Kork ausgelegten und mit Nährlösung gefüllten Petrischale eingebracht. Bei der Präparation der Papillarmuskeln war es weiters von Bedeutung, dass die Nährlösung in der Petrischale noch zusätzlich mit Oxy mix durchperlt wurde. Aufbewahrt wurden die fertig präparierten Organe in einer mit Oxy mix perfundierten Nährlösung.

2.2. ENTNAHME UND PRÄPARATION DER ZU UNTERSUCHENDEN ORGANE

2.2.1. Entnahme und Präparation der Aorta

Um die Aorta entnehmen zu können, musste zuerst dem getöteten Meerschweinchen mit einer Schere der Thorax geöffnet und rasch das Herz entnommen werden. Weiters musste man Lunge und Zwerchfell entfernen, um zur Aorta zu gelangen. Diese befindet sich entlang des Rückrades des Meerschweinchens. Mithilfe von einer Pinzette und einer Schere konnte man nun ein etwa drei Zentimeter langes Stück der thorkalen Aorta entfernen, und vorübergehend in einem Becherglas, welches mit physiologischer Nährlösung (Tyrode) gefüllt war, zwischenlagern.

Da die entnommene Aorta noch von anhaftendem Muskel und Fettgewebe gereinigt werden musste, wurde diese in einer mit Kork ausgelegten und mit Nährlösung gefüllten Petrischale mit Präpariernadeln fixiert. Anschließend konnte mit der Entfernung des Muskel- und Fettgewebes unter dem Mikroskop begonnen werden. Dabei war es wichtig, die Aorta weder zu beschädigen noch zu überdehnen. Nach erfolgter Reinigung der Aorta wurde diese in mehrere etwa drei Millimeter lange ringförmige Stücke geschnitten. Diese wurden bis zu Versuchsbeginn in einem mit Nährlösung gefüllten Becherglas, in welches zusätzlich Oxymix eingeleitet wurde, aufbewahrt. Diese präparierten Aortastücke wurden anschließend in die Versuchsaapparaturen eingespannt.

2.2.2. Entnahme und Präparation der Arteria pulmonalis

Wichtig für die Präparation der Arteria pulmonalis war eine rasche Explantation des Herzens. Dieses wurde sofort nach der Entnahme in einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale fixiert. Zusätzlich wurde in die Nährlösung Oxymix eingeleitet. Nach erfolgter Reinigung des Herzens von Perikarp, Teilen der Lunge und Fettresten unter dem Mikroskop, wurde die Arteria pulmonalis so nahe als möglich am Herzen entnommen, wobei nur das etwa 10 Millimeter lange Stück bis zur Aufteilung in linke und rechte Arteria pulmonalis verwendet wurde.

Die Arteria pulmonalis wurde anschließend in einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale mit Präpariernadeln fixiert und unter dem Mikroskop von noch vorhandenem Muskel und Fettgewebe befreit. Nach der Reinigung wurde die Arteria pulmonalis mithilfe einer Federschere in mehrere, etwa drei Millimeter große ringförmige Stücke geschnitten und bis zu Versuchsbeginn wieder in Nährlösung aufbewahrt. Diese Stücke wurden später in die Versuchsaapparaturen eingespannt.

2.2.3. Entnahme und Präparation des terminalen Ileums

Das Abdomen wurde, nach erfolgter Entnahme des Herzens und der thorakalen Gefäße, mit Hilfe einer Schere in Längsrichtung vorsichtig aufgeschnitten. Anschließend konnte man jenen Teil des Darms entnehmen, der vor dem Caecum lag. Es wurden etwa fünfzehn Zentimeter des terminalen Ileums entnommen, wobei das aboral gelegene Ende mit einem roten Faden markiert wurde. Der isolierte Teil wurde bis zur weiteren Präparation in einem mit Nährlösung befüllten und begasten Becherglas aufbewahrt.

Bei der folgenden Präparation wurden in etwa zwei Zentimeter große Stücke des Ileums abgeschnitten und in eine mit Nährlösung gefüllte Petrischale gebracht, die mit einem Korkboden ausgelegt war. Anschließend wurden die Stücke mit Präpariernadeln von der Innenseite nach Außen durchstochen und am Korkboden fixiert. Wichtig hierbei war die Unterscheidung der Ober- und Unterseite des Ileums, wofür man sich mit zwei unterschiedlich gefärbten Bindefäden behalf. Nach der Reinigung der Darmstücke wurden zwei Silberdrahthaken am jejunalen und am caecalen Ende mit Hilfe der Bindefäden fixiert, um die Stücke anschließend in die Versuchsaapparatur einbringen zu können. Bei der Befestigung der Haken war zu beachten, dass noch eine möglichst große Öffnung des Ileums auf beiden Seiten erhalten blieb. Das konnte man erreichen, indem man die Darmstücke schräg abschnitt. Die freibleibende Öffnung gewährleistete das Einwirken der Testsubstanz auf die Darmschleimhaut von allen Seiten.

2.2.4. Entnahme und Präparation der Papillarmuskeln

Um die Entnahme der Papillarmuskeln zu ermöglichen, musste zuerst der rechte Ventrikel des Herzens von der Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet werden. Anschließend wurde dieser aufgeklappt und mit Präpariernadeln fixiert. Da die Purkinje Fasern Herzschrittmacherfähigkeiten aufwiesen und durch ihre Spontanaktivität den Versuchsablauf stören hätten können, mussten diese entfernt werden. Anschließend wurde am Ansatz jedes Muskels ein Silberdrahthaken mit Hilfe eines Bindefadens fixiert. Nun wurde die Sehne durchtrennt und die Muskeln konnten vorsichtig isoliert werden. Nur Muskeln mit einem Durchmesser von weniger als 0,87 Millimeter wurden verwendet, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu garantieren (Koch-Weser 1963). Die präparierten Muskeln wurden in einem mit physiologischer Nährlösung gefüllten Becherglas, welches mit Oxymix begast wurde, aufbewahrt. Zu Versuchsbeginn wurden die Muskeln in die Apparatur eingespannt.

2.2.5. Entnahme und Präparation des rechten Vorhofs

Das zu Beginn explantierte Herz wurde in eine mit Nährlösung gefüllte Petrischale, welche zusätzlich begast wurde, gebracht. Unter dem Mikroskop wurden Lungen- und Fettgewebe sowie das Perikard mit Hilfe einer Federschere entfernt. Um das Herz am oberen und unteren Ende zu fixieren wurden Präpariernadeln verwendet, wobei das Herz hierbei nicht überdehnt oder verletzt werden durfte. Vor allem der Sinusknoten, der sich im rechten Vorhof befindet, war besonders empfindlich. Anschließend wurde der rechte Vorhof entlang des Succus coronarius von den Ventrikeln abgetrennt. An der Spitze und am Fettgewebe wurden 2 Silberdrahthaken mit Hilfe eines Bindefadens angebracht, um den Vorhof anschließend in die Apparatur einspannen zu können. Hierbei war es wichtig, dass das Fettgewebe in der Apparatur nach oben zeigte. Um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, musste während der Isolierung mit Oxymix begast werden.

2.3. PHYSIOLOGISCHE NÄHRLÖSUNG

2.3.1. Nährlösung für die Aorta, Arteria pulmonalis, das terminale Ileum, den Papillarmuskel und den rechten Vorhof

Die Herstellung der verwendeten physiologischen Nährlösung erfolgte nach der Vorschrift von Reiter (1967) und entsprach einer modifizierten Krebs-Henseleit Lösung.

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung

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

Um einen erfolgreichen Ablauf der Versuche zu garantieren, wurde die Tyrode (Nährlösung) täglich frisch zubereitet. Die entsprechende Menge der einzelnen Komponenten wurde, wie in der Tabelle ersichtlich, mit Ausnahme von CaCl₂, in einen zwei Liter fassenden Messkolben gefüllt. Dieser wurde dann mit Aqua bidestillata bis knapp vor die Markierung des Kolbens aufgefüllt. Anschließend wurde die Tyrode für mindestens zehn Minuten mit Oxymix begast und erst danach tropfenweise und sehr langsam CaCl₂ hinzugefügt, um das Ausfällen der schwerlöslichen Calciumsalze zu verhindern. Zum Abschluss wurde mit Aqua bidestillata bis zur Markierung aufgefüllt und der Kolben mehrmals geschwenkt, um eine homogene Mischung zu erhalten.

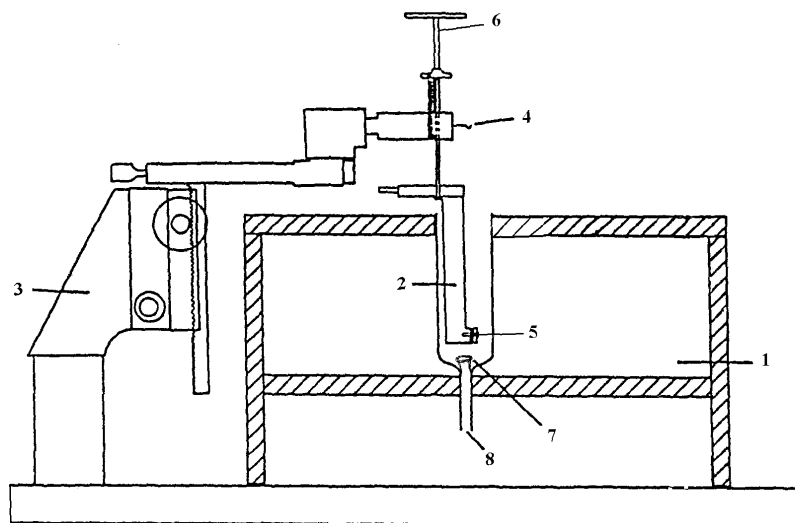
Während der Versuche wurde die Nährlösung kontinuierlich mit Oxymix begast, um einen konstanten pH-Wert und eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff garantieren zu können.

2.4. VERSUCHSANORDNUNG

Für die während dieser Diplomarbeit durchgeführten Organversuche standen zwei Versuchsapparaturen (A, B) zur Auswahl, wobei beide dasselbe Funktionsprinzip hatten. Für Versuche am Papillarmuskel wurde ausschließlich Apparatur A verwendet, für die Versuche an den anderen Organen konnten sowohl Apparatur A als auch B verwendet werden. Für einen erfolgreichen Ablauf der Versuche waren stabile physiologische Bedingungen bezüglich pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffversorgung notwendig.

2.4.1. Versuchsapparatur A

Abbildung 1: Aufbau der Versuchsapparatur A



1. Wasserbad
2. Organhalterung
3. Stativ
4. Aufhängevorrichtung für das Organ
5. Fixierung mit Elektrode
6. Muskelkammer
7. Gaszufuhr mit Fritte

Die Versuchsanordnung A setzte sich aus einem Wasserbad, einer Heizspirale, einem Thermostat, einer Muskelkammer, einer Glasfritte, einem Stativ, einem Stativschlitten, einer Muskelhalterung, einem Kraftwandler, einer Aufhängevorrichtung sowie einem Feintrieb zusammen. Das Wasserbad bestand aus Acrylglas und war mit Aqua bidestillata befüllt. Die Temperatur des Wasserbades wurde mittels Heizspirale und Thermostat bei Versuchen mit dem Papillarmuskel auf $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, bei allen anderen Versuchen auf $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten.

Das Kammervolumen der Muskelkammer betrug zweiundzwanzig Milliliter. Die Muskelkammer wurde mit physiologischer Nährlösung befüllt, welche über eine Glasfritte permanent begast wurde, und in das Wasserbad eingetaucht.

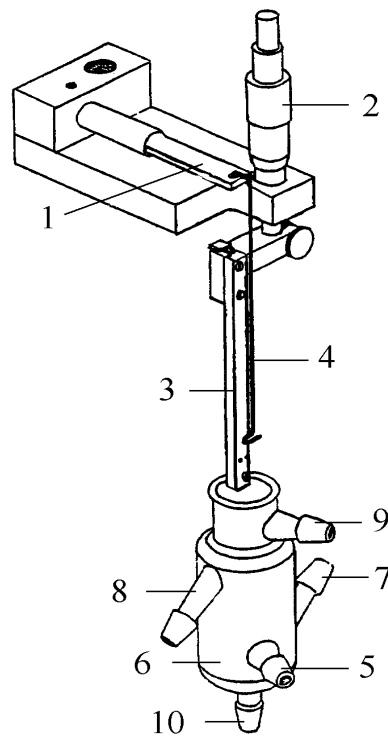
Das Begasen war notwendig, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung und einen physiologischen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 zu gewährleisten.

Mittels einer Spritze wurde die Muskelkammer gereinigt und mit Nährlösung befüllt. Die bereits mit Silberdrahthaken präparierten Organe wurden an der Aufhängevorrichtung befestigt, welche mit dem Kraftwandler verbunden war. Die jeweils freien Enden der Präparate wurden in die beiden Plexiglasscheibchen der Muskelhalterung eingeklemmt. Dabei war zu beachten, dass die Organe auf der Kathode, einem Silberchloridplättchen, aufliegen. Um eine ausreichende Versorgung der Organe mit Sauerstoff sicherzustellen, musste das Einspannen der Organe möglichst rasch erfolgen. Besonders wichtig war es auch darauf zu achten, dass es beim Einspannen zu keiner Überdehnung der Organe kam. Mithilfe des Stativschlittens wurde die Muskelhalterung nun soweit in das Organbad abgesenkt, bis das Präparat vollständig von Nährlösung umgeben war. Anschließend konnte man mittels Feintrieb die spezifische Vorspannung einstellen, wodurch die maximale Kontraktionskraft erreicht wurde.

Zur Messung der isometrischen Kontraktion wurde ein Kraftwandler, der die Kontraktion in einen Stromimpuls transformierte, und ein Verstärker (Transbridge TM 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) verwendet. Mit einem Schreiber (Flatbed Recorder BD 112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Holland) wurde die Kontraktionsamplitude der Präparate beziehungsweise die Frequenz der spontan schlagenden Vorhöfe auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

2.4.2. Versuchsapparatur B

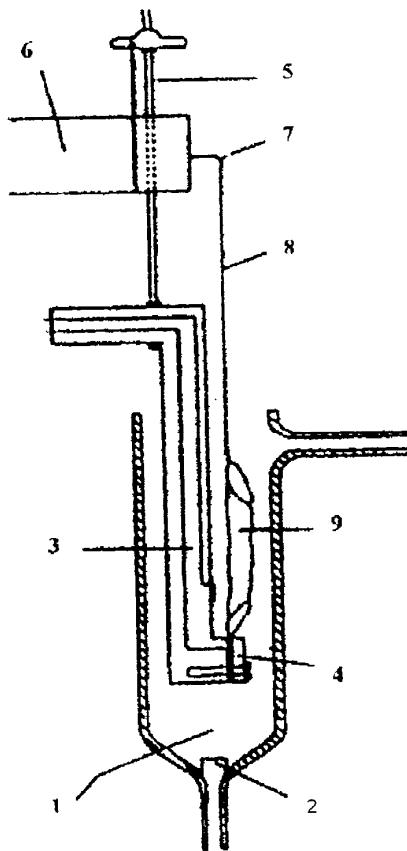
Abbildung 2: Aufbau der Versuchsapparatur B



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

Die Versuchsanordnung B bestand aus einem Kraftwandler, einem Mikrometer, einer Organhalterung, einer Aufhängevorrichtung, einer Gaszufuhr und einem Organbad. Im Vergleich zu Apparatur A wurden hier die Präparate anders fixiert. Weiters war bei dieser Versuchsanordnung nicht das Organbad von einem Wasserbad umgeben. Das Organbad bestand hier aus einer doppelwandigen Glasschicht, in dessen Zwischenraum sich Aqua bidestillata befand. Mittels Heizspirale und Thermostat wurde das Wasser auf konstante 37 ± 1 °C erwärmt, um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren. Für die Versuche wurden zwei unterschiedlich große Organbäder verwendet, wobei das eine ein Fassungsvermögen von fünfundzwanzig Milliliter besaß, das andere acht Milliliter. In der Bauweise gab es keine Unterschiede. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung und einen physiologischen pH-Wert zu gewährleisten, wurde die sich im Organbad befindende Nährlösung mit Hilfe einer Fritte mit Oxymix begast. Über einen Schlauch, der mit dem Organbad verbunden war und mittels einer Klemme verschlossen werden konnte, war es möglich, die Nährlösung abzulassen und bei Bedarf auszuwechseln. Die ringförmigen Präparate der Aorta und der Arteria pulmonalis wurden zwischen zwei Drähten eingespannt, wobei der eine Silberdraht am Steg befestigt war, der andere an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers. Die Präparate des Ileums und der rechte Vorhof wurden mittels Silberdrahthaken befestigt. Ein rasches Einspannen und Absenken des Präparates war auch hier unbedingt erforderlich. Die Vorspannung wurde über das Mikrometer eingestellt, um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen. Ein Kraftwandler und ein Verstärker (Transbridge TM 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) wurden für die Messung der Kontraktionskraft verwendet. Die Messergebnisse wurden mit einem Schreiber (Flatbed Recorder BD 112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Holland) aufgezeichnet.

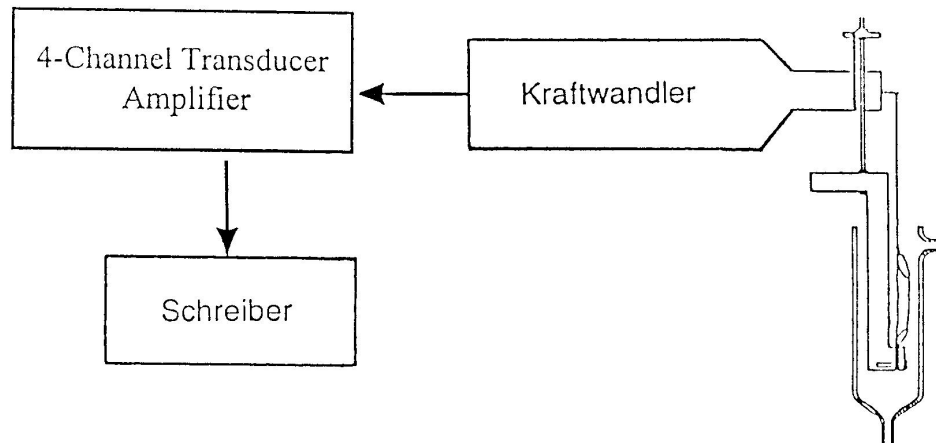
Abbildung 3: Organbad mit eingespanntem Präparat



1. Muskelkammer
2. Gaszufuhr mit Fritte
3. Muskelhalterung
4. Muskelfixierung mit Elektrode
5. Feintrieb
6. Kraftwandler
7. Aufhängevorrichtung
8. Silberchloriddraht
9. Präparat

2.4.3. Kraftwandler

Abbildung 4: Kraftwandler und Registrierung



Die Kontraktionskraft wurde von einem Koppelglied erfasst und vom Kraftwandler in ein elektrisches Signal transferiert. Zur Verstärkung dieses Signals wurde ein Verstärker der Firma World Precision Instruments (Sarasota, Florida, USA) verwendet.

Mithilfe eines Schreibers erfolgte die Aufzeichnung der Versuchsergebnisse auf Millimeterpapier.

2.4.4. Begasung

Im Versuchsraum befanden sich mehrere Gasventile, von denen Schläuche zu den Versuchssapparaturen führten. Das Gas wurde über eine zentrale Gasflasche eingeleitet. Um den Gasstrom gleichmäßig in den Organbädern verteilen zu können waren an den Schlauchenden Glasfritten montiert. Mittels an den Schläuchen angebrachten Schraubklemmen konnte die austretende Gasmenge reguliert werden, wobei darauf zu achten war, dass das Gas nicht mit einer zu hohen Geschwindigkeit in das Organbad eintrat, da dies die Kontraktion der Organe beeinflussen hätte können. Die Begasung war von Bedeutung für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Präparate. Weiters konnte durch die Begasung ein physiologischer pH-Wert sichergestellt werden und eine gleichmäßige Verteilung der eingespritzten Testsubstanzen im Organbad erzielt werden.

2.5. VERSUCHSABLAUF

2.5.1. Versuchsablauf Aorta

Am Kraftwandler waren zwei an den Enden L-förmig gebogene, je nach Organgröße unterschiedlich lange Silberdrähte befestigt, zwischen die die ringförmigen Präparate der Aorta eingespannt wurden. Mit Hilfe des Stativschlittens wurde die Organhalterung in das auf 37 °C erwärmte Organbad, welches mit Elektrolytlösung befüllt war, abgetaucht. Anschließend wurde mit dem Mikrometer auf 19,6 mN vorgespannt und der Verstärker und der Schreiber in Betrieb genommen. Mittels Verstärker konnte man die Nulllinie auf dem Millimeterpapier festlegen. Es folgte eine etwa zwanzig Minuten andauernde Anpassungszeit, in der sich das Präparat an die gegebenen Bedingungen gewöhnen konnte. Eventuell auftretende Abweichungen von der Nulllinie während dieser Zeit wurden mittels Mikrometer nachkorrigiert.

Anschließend wurde die sich im Organbad befindliche Tyrode durch eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Zur Herstellung der KCl-Lösung wurden 0,67 g KCl in 100 ml Nährlösung gelöst. Das Austauschen der Nährlösung war nötig, da dadurch eine maximale Kontraktion des Präparats erzielt wurde und somit die Abnahme der Kontraktionskraft bestimmt werden konnte. Nach etwa neunzig Minuten stellte sich ein konstantes Plateau ein, welches der maximalen Kontraktion entsprach. Es folgte die Zugabe der zuvor in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelösten Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen, wobei mit der niedrigsten begonnen wurde. Die einzelnen Konzentrationsstufen betrugen ein, zwei, sieben, zwanzig und siebzig µl und wurden im Abstand von 45 Minuten mittels Pipette kumulativ ins Organbad injiziert. Die Kontraktionsveränderungen des Organs wurden während der gesamten Dauer des Versuchs vom Schreiber aufgezeichnet.

2.5.2. Versuchsablauf Arteria pulmonalis

Der Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis entsprach im Prinzip jenem der Aorta. Der einzige Unterschied bestand in der Vorspannung, die bei der Arteria pulmonalis 9,81mN betrug.

2.5.3. Versuchsablauf terminales Ileum

An den beiden Enden des Darmstückes wurden zwei Silberdrahthaken angebracht, mit deren Hilfe das Organ anschließend an den Vorrichtungen der Apparatur befestigt werden konnte. Wichtig für einen erfolgreichen Versuchsablauf war, dass das jejunale Ende hinauf und das caecale Ende abwärts gerichtet war. Das terminale Ileum wurde anschließend mittels Stativschlitten in das auf 37 °C vortemperierte Organbad, das mit Tyrode befüllt war, abgesenkt. Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet und eine Vorspannung von 4,9 mN angelegt.

Während der Anpassungszeit auftretende Abweichungen von der Nulllinie wurden mit Hilfe des Feintriebs der Stellschraube nachkorrigiert, bis keine größeren Schwankungen mehr auftraten. Um die Abnahme der Kontraktionskraft bestimmen zu können, war eine maximale Kontraktion des Präparates notwendig. Dies erzielte man, indem man die physiologische Nährlösung gegen eine 60 mmolare KCl-Lösung austauschte. Diese wurde hergestellt, indem 0,45 g KCl in 100 ml Nährlösung gelöst wurden.

Nach Erreichen eines konstanten Plateaus konnte mit der Zugabe der zuvor in DMSO gelösten Testsubstanz begonnen werden. Mit der niedrigsten Konzentration beginnend wurden im Abstand von 45 Minuten die übrigen Konzentrationen eingespritzt. Die Kontraktionsveränderungen wurden mit dem Schreiber aufgezeichnet.

2.5.4. Versuchsablauf Papillarmuskel

Am Papillarmuskel wurde ein Silberdrahthaken befestigt, über den der Muskel an der Aufhängevorrichtung der Apparatur eingehängt wurde. Das freie untere Ende des Muskels wurde in die Organhalterung eingeklemmt um einen Kontakt zur Reizelektrode herzustellen. Anschließend wurde der Steg, an dem der Muskel befestigt war, in das mit Nährlösung befüllte und vorgeheizte Organbad eingetaucht. Die angelegte Vorspannung betrug 3,92 mN und wurde im Laufe des Versuchs immer wieder nachjustiert, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Der Papillarmuskel musste durch einen elektrischen Reiz zur Kontraktion angeregt werden, da er von sich aus nicht selbstständig schlagen konnte, im Gegensatz zum Vorhof, welcher aufgrund des Sinusknotens eine Spontanaktivität aufwies. Die Reizung erfolgte mittels des Reizgeräts Accupulser A310 (World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) über

Silberchloridionen. Der Papillarmuskel wurde mit einer Frequenz von einem Hertz und einer Dauer von drei Millisekunden mittels Rechteckimpulsen gereizt. Damit eine regelmäßige Kontraktion erreicht werden konnte, musste die Stromstärke so gering als möglich eingestellt werden. Eine permanente Überschreitung der Schwellenstromstärke hätte zu einer Entleerung der endogenen Catecholaminspeicher des Muskels und somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt (Furchgott et al. 1959). Mit dem injizieren der Testsubstanz konnte erst begonnen werden, nachdem in der Anpassungszeit eine konstante Amplitudenlänge erreicht worden war. Im Abstand von 45 Minuten wurde die Konzentration der Testsubstanz erhöht. Mit Hilfe eines Schreibers wurden im Abstand von fünf Minuten, über eine Dauer von drei Kontraktionen die Amplituden registriert.

2.5.5. Versuchsablauf Vorhof

Am rechten Vorhof war ein Silberdrahthaken befestigt, über das das Organ in die Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt wurde. Das lose Ende des Vorhofes wurde in die Organhalterung eingeklemmt, womit der Kontakt zur Reizelektrode sichergestellt wurde. Anschließend wurde das Organ in das vorgewärmte Organbad, welches zuvor mit Tyrode befüllt wurde, abgesenkt. Schreiber und Verstärker wurden eingeschaltet, und eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt, wobei diese Spannung mit Hilfe des Mikrometers regelmäßig nachjustiert werden musste. Die Schlagfrequenz des Vorhofes wurde im Abstand von fünf Minuten kontrolliert, solange bis die Schläge regelmäßig und konstant waren. Erst dann konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. Mit der kleinsten Konzentration beginnend wurde alle 45 Minuten injiziert. Die Schlagfrequenz wurde alle fünf Minuten kontrolliert und gemessen.

2.6. UNTERSUCHTE SUBSTANZEN

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden zwei Testsubstanzen mit der Bezeichnung WHG 40 und WHG 44 untersucht. Diese wurden am Department für Medizinische Chemie an der Universität Wien neu synthetisiert.

Beide Substanzen sind strukturell verwandt mit dem Calciumantagonisten Diltiazem. Es wurden die pharmakologischen Wirkungen der beiden Testsubstanzen an den isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht und die Ergebnisse anschließend miteinander verglichen.

Getestet wurde die Wirkung der Substanzen auf die Herzmuskelpräparate Papillarmuskel und rechter Vorhof sowie die Wirkung auf die glatte Muskulatur der Arteria pulmonalis, des terminalen Ileums und der Aorta.

Da beide zu untersuchende Testsubstanzen kristallin waren, wurden sie in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) im Ultraschallbad angelöst, leicht erwärmt und konnten anschließend mittels Pipette dem Organbad zugeführt werden. Diese Stammlösung wurde täglich frisch hergestellt, wobei immer dieselbe Menge an Substanz und Lösungsmittel verwendet wurde. Die Einwaage der Substanz wurde so gewählt, dass im Organbad durch stetig ansteigende Zugabe der Stammlösung eine Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Bei der Einwaage mussten die unterschiedlichen Kammervolumina der Organbäder berücksichtigt werden.

Im Laufe der Versuche wurden folgende Konzentrationsstufen erreicht: 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$. Die jeweilige Substanz wurde im Abstand von 45 Minuten mittels Finnpiquette in das Organbad injiziert, wobei die Volumina der Stammlösung ständig erhöht wurden. Folgende Volumina wurden jeweils nach 45 Minuten injiziert: 1 μl , 2 μl , 7 μl , 20 μl und zuletzt 70 μl , was dann einer Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ entsprach.

Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz WHG 40:

Bezeichnung: WHG 40

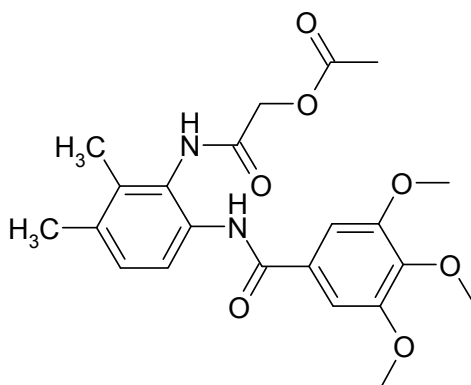
Molekulargewicht: 430,46 g/mol

Nomenklatur: 3-{2,3-dimethyl-6-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

Löslichkeit: unlöslich in Wasser, gut löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Farbe: weiß

Strukturformel:



Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz WHG 44:

Bezeichnung: WHG 44

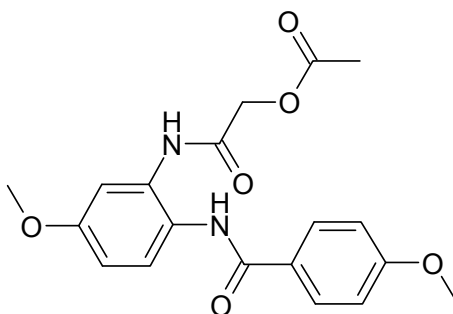
Molekulargewicht: 372,38 g/mol

Nomenklatur: 3-{5-methoxy-2-[(4-methoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

Löslichkeit: unlöslich in Wasser, gut löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Farbe: weiß

Strukturformel:



2.7. AUSWERTUNG UND STATISTIK

Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum:

Als Messgröße bei der Auswertung der Versuchsreihen diene die Kontraktionskraft (f_c) in Millinewton. Mit einem Lineal wurden aus der aufgezeichneten Kontraktionskurve der Kontrollwert und die Messwerte, die man alle 45 Minuten erhielt, möglichst exakt abgelesen und anschließend mit dem Eichungsfaktor der Versuchsanordnung multipliziert. Dadurch konnten genaue Messwerte in mN ermittelt werden. Die Wirkung des Lösungsmittels musste jedoch berücksichtigt werden und von den erhaltenen Werten abgezogen werden. Die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft durch kumulative Einwirkung der Testsubstanzen gegenüber dem Kontrollwert konnte so ermittelt werden.

Papillarmuskel:

Bei den Versuchsreihen des Papillarmuskels konnte die Änderung der Kontraktionskraft (f_c) durch kumulative Einwirkung der Testsubstanzen ermittelt werden. Mittels Lineal wurden die aufgezeichneten Amplituden abgelesen und mit dem Eichfaktor der Versuchsanordnung multipliziert. Von den ermittelten Werten musste noch die Wirkung des Lösungsmittels abgezogen werden, damit diese anschließend dem Kontrollwert, der als 100 % angenommen wurde, gegenübergestellt werden konnten.

Rechter Vorhof:

Bei den Versuchsreihen des Vorhofs wurde die Änderung der Schlagfrequenz ermittelt. Als Messgröße diene die Anzahl der Schläge des Vorhofs pro Minute. Mittels des Schreibgerätes, welches einen Papiervorschub von 5 mm/s besaß, wurde die Schlagfrequenz innerhalb von zwölf Sekunden aufgezeichnet. Dies entsprach auf dem Papier einer Strecke von sechs Zentimetern. Durch Multiplikation mit dem Faktor fünf konnten die Schläge pro Minute errechnet werden. Von den errechneten Werten musste die Wirkung des Lösungsmittels abgezogen werden. Die Messwerte wurden mit Hilfe des Kontrollwerts, der 100% gleichgesetzt wurde, als Prozentwerte ermittelt.

Für die statistische Auswertung wurden die ermittelten Messdaten der verschiedenen Versuchsreihen verwendet. Die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM = standard error of mean) mussten berechnet werden. Die Änderungen der Messgrößen (Kontraktionskraft f_c und Schlagfrequenz f) wurden in Prozent ausgedrückt. Der Student-t-Test lieferte Aussagen über Veränderungen durch die Testsubstanzen im Vergleich zum Kontrollwert. Dadurch konnte die Beurteilung der Messergebnisse in Bezug der statistischen Signifikanz durchgeführt werden, und weiters die Irrtumswahrscheinlichkeit P ermittelt werden. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) beziehungsweise $< 1\%$ ($P < 0,01$) wurden die Unterschiede als signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant gesehen.

Für eine optimale Darstellung der Ergebnisse wurden die statistisch ausgearbeiteten Daten der verschiedenen Versuchsreihen in Konzentrations- Wirkungskurven übertragen, was eine graphische Betrachtung ermöglichte. Die Veränderungen der Kontraktionskraft beziehungsweise der Schlagfrequenz wurden in Prozent auf die Ordinate aufgetragen. Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen wurden in $\mu\text{mol/l}$ logarithmisch auf die Abszisse aufgetragen. Die schwarzen Punkte auf den Kurven geben den arithmetischen Mittelwert aus n Versuchen und die vertikalen Balken die Standardfehler an.

Aus der Konzentrations- Wirkungskurve wurde graphisch der EC_{50} -Wert ermittelt. Der Wert gibt die Konzentration an, bei der die Kontraktionskraft oder die Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwerts absinkt.

3. ERGEBNISSE

3.1. WIRKUNG DER TESTSUBSTANZ WHG 40 AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN

3.1.1. Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde an fünf Präparaten getestet. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der Aorta stimuliert. Nach Erreichen eines konstanten Kontrollwerts konnte im Abstand von 45 Minuten mit der Zugabe der Substanz begonnen werden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der relaxierende Effekt auf die glatte Muskulatur der Aorta von WHG 40 ermittelt werden. Die Auswertung der Testsubstanzversuche erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche.

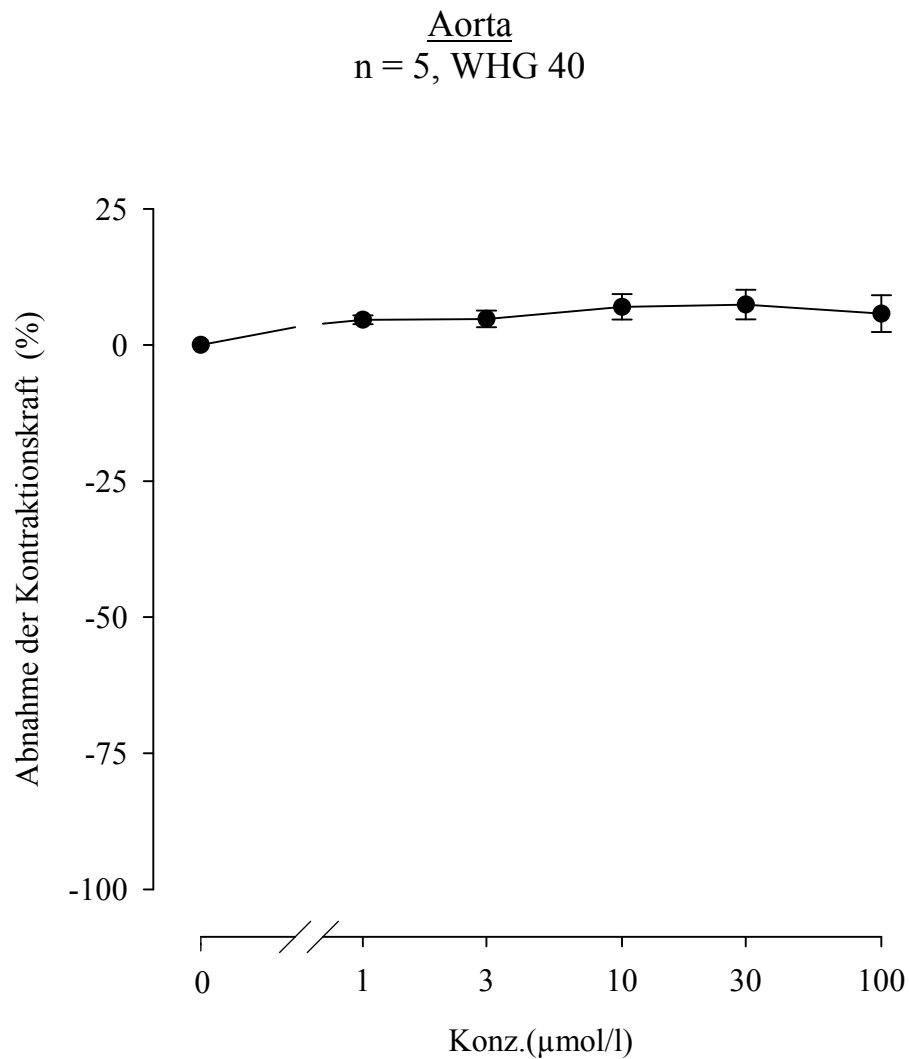
Tabelle 2: Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

WHG 40 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$30,78 \pm 7,37$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$32,20 \pm 7,56$	$4,63 \pm 0,81$	5	n.s.
3	$32,03 \pm 7,60$	$4,78 \pm 1,53$	5	n.s.
10	$32,66 \pm 7,78$	$7,00 \pm 2,35$	5	n.s.
30	$32,67 \pm 7,72$	$7,42 \pm 2,72$	5	n.s.
100	$32,30 \pm 7,82$	$5,75 \pm 3,39$	5	n.s.

Legende zu Tabelle 2:

In Tabelle 2 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) sowie deren Standardfehler (SEM) sowohl in mN, als auch prozentual ersichtlich.

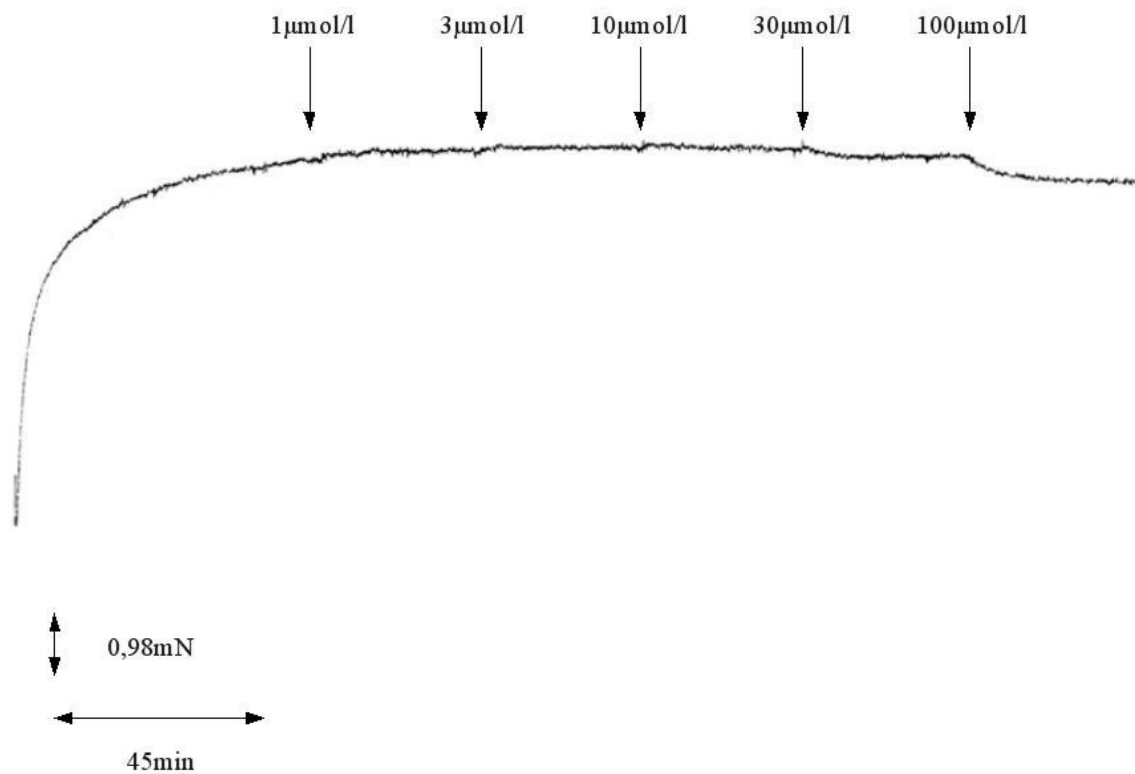
Abbildung 5: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 40 bezüglich Aorta



Legende zu Abbildung 5:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 40 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 6: Originalabbildung der Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der Aorta



Legende zu Abbildung 6:

Der Kurvenverlauf ergibt sich durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 40 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Aorta, was deren Relaxierung zur Folge hatte. Die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten.

3.1.2. Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis wurde an fünf Präparaten überprüft. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der Arteria pulmonalis stimuliert. Nachdem ein konstanter Kontrollwert erreicht wurde, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Konzentrationen im Abstand von 45 Minuten erhöht wurden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der relaxierende Effekt auf die Arteria pulmonalis von WHG 40 festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche erfolgte die Auswertung der Testsubstanzversuche.

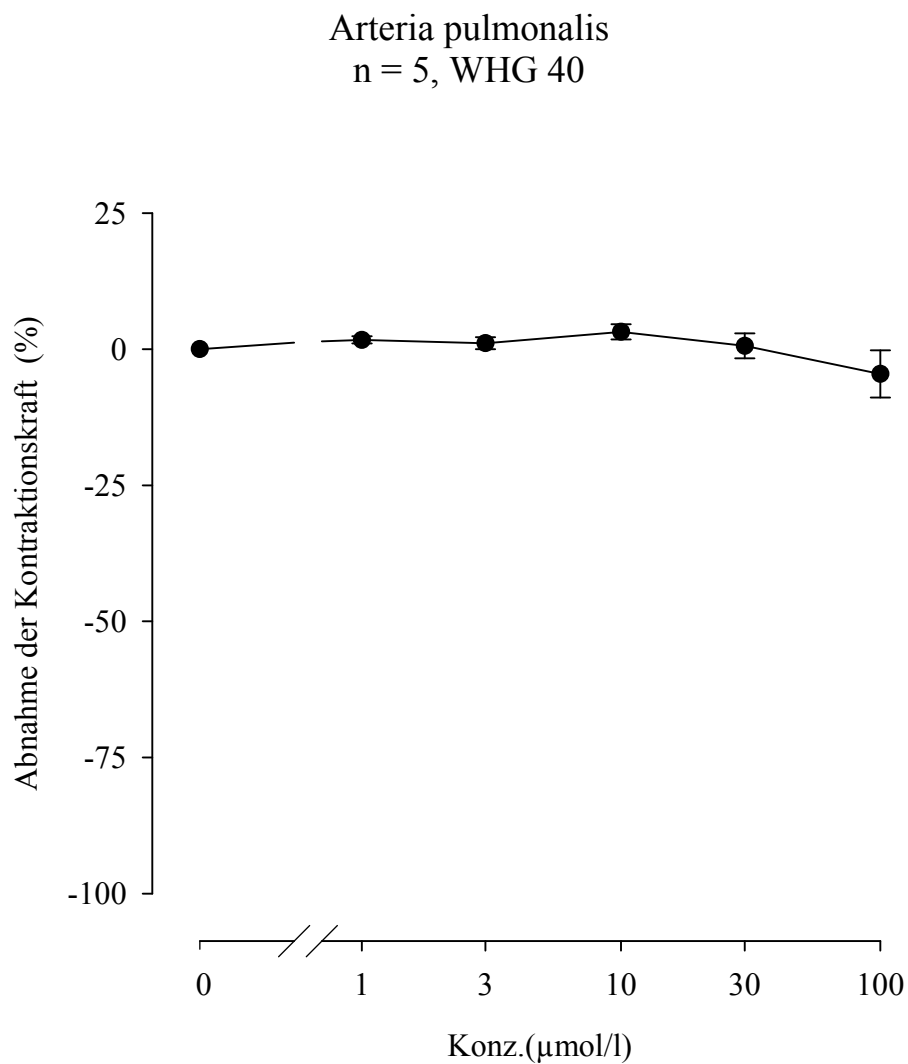
Tabelle 3: Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis

WHG 40 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$37,85 \pm 8,17$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$38,44 \pm 8,26$	$1,71 \pm 0,64$	5	n.s.
3	$38,22 \pm 8,24$	$1,10 \pm 1,10$	5	n.s.
10	$39,01 \pm 8,39$	$3,19 \pm 1,39$	5	n.s.
30	$38,38 \pm 8,58$	$0,59 \pm 2,29$	5	n.s.
100	$35,88 \pm 8,82$	$-8,14 \pm 4,84$	5	n.s.

Legende zu Tabelle 3:

In Tabelle 3 sind Konzentrationsangaben, Irrtumswahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung in mN und in Prozent dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.

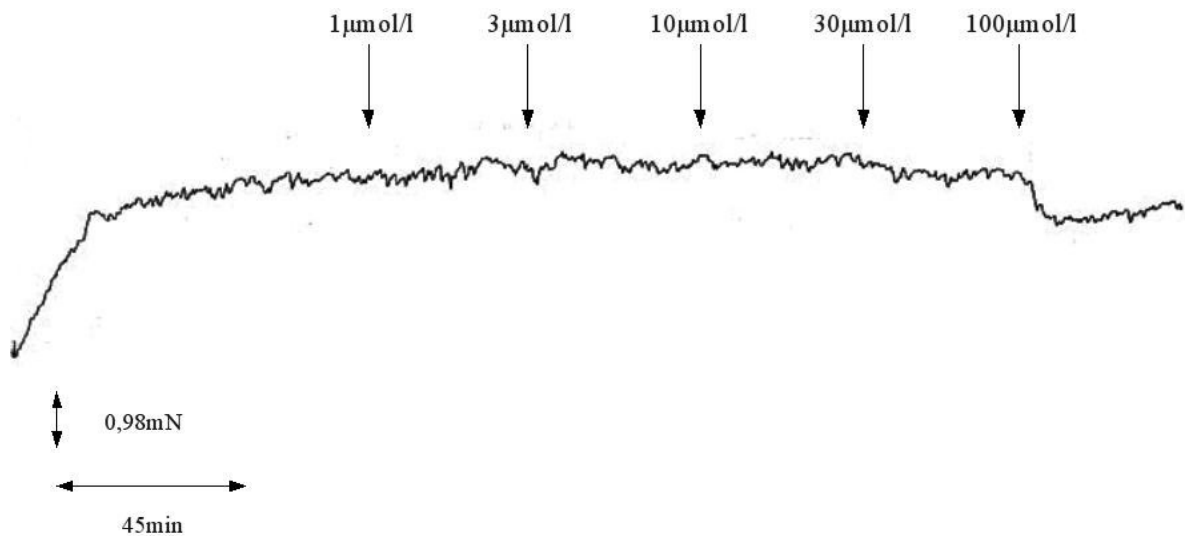
Abbildung 7: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 40 bezüglich Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 7:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 40 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 8: Originalabbildung der Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 8:

Der Kurvenverlauf zeigt die Relaxierung der Arteria pulmonalis durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 40 in unterschiedlichen Konzentrationen. Im Abstand von 45 Minuten erfolgte die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz.

3.1.3. Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums wurde an sechs Präparaten ermittelt. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der präparierten Darmstücke stimuliert. Nach Erreichen eines konstanten Kontrollwerts konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$, die im Abstand von 45 Minuten injiziert wurden, konnte der relaxierende Effekt auf die Präparate des terminalen Ileums von WHG 40 ermittelt werden. Bei der Auswertung der Testsubstanzversuche wurden die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche berücksichtigt.

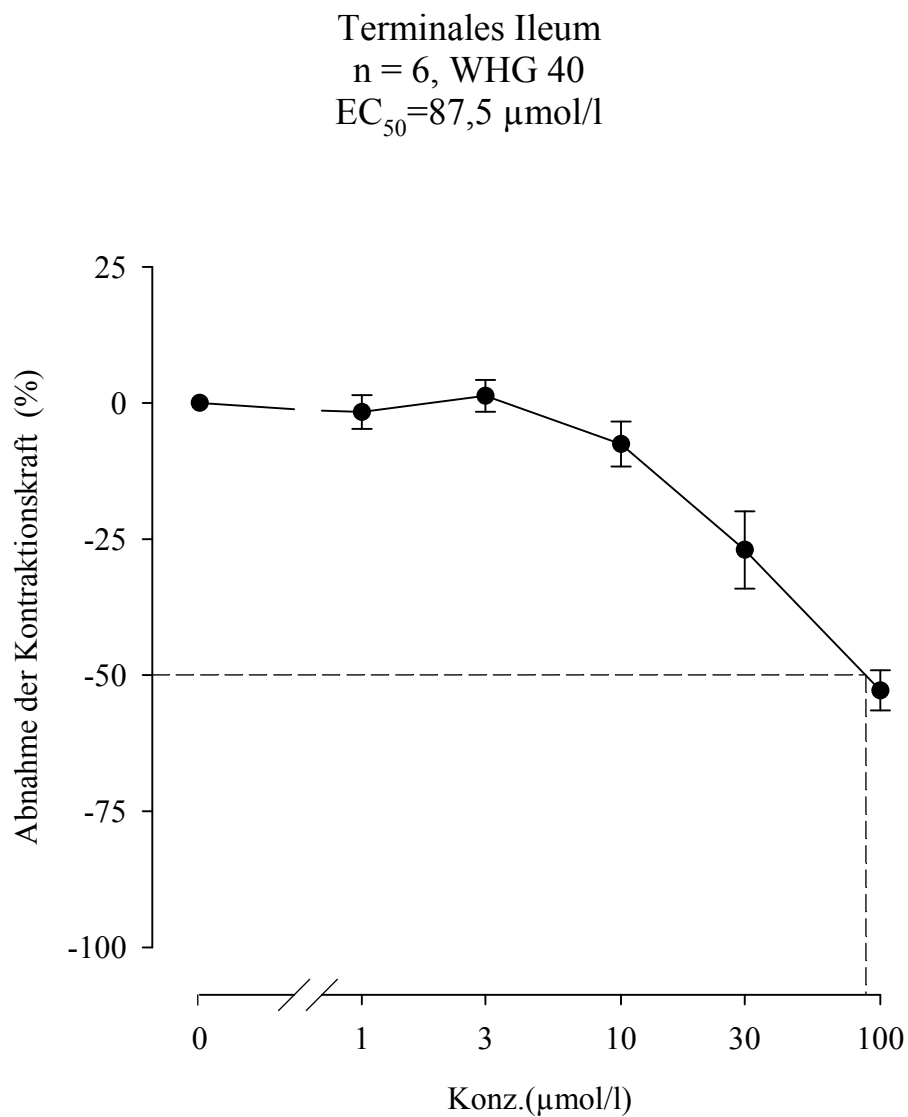
Tabelle 4: Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

WHG 40 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$10,59 \pm 2,56$	$0,0 \pm 0$	6	/
1	$10,55 \pm 2,60$	$-1,65 \pm 3,11$	6	n.s.
3	$10,82 \pm 2,70$	$1,31 \pm 2,93$	6	n.s.
10	$9,91 \pm 2,56$	$-7,55 \pm 4,12$	6	n.s.
30	$8,12 \pm 2,38$	$-27,00 \pm 7,12$	6	0,01
100	$5,57 \pm 1,30$	$-52,80 \pm 3,69$	6	0,01

Legende zu Tabelle 4:

In Tabelle 4 werden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) bei verschiedenen Testkonzentrationen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von 6 Versuchen wiedergegeben.

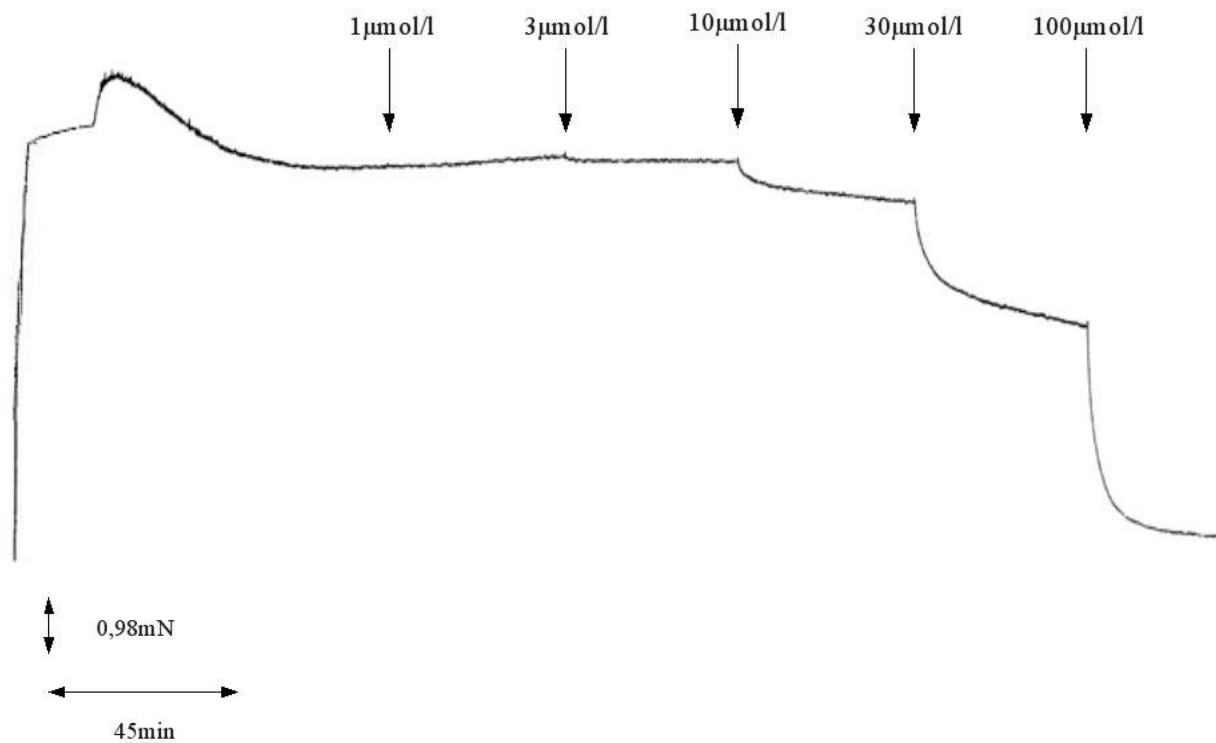
Abbildung 9: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 40 bezüglich terminales Ileum



Legende zu Abbildung 9:

Die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 40 in $\mu\text{mol/l}$ sind auf der x-Achse dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse abgebildet. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 10: Originalabbildung der Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 10:

Durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 40 in unterschiedlichen Konzentrationen auf das terminale Ileum ergibt sich der Kurvenverlauf. Durch Zugabe der Testsubstanz, die im Abstand von 45 Minuten in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurde, kam es zur Relaxierung des terminalen Ileums.

3.1.4. Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels

Der inotrope Effekt der Testsubstanz WHG 40 auf isolierte und elektrisch stimulierte Papillarmuskeln wurde an vier Präparaten überprüft. Nachdem ein konstanter Kontrollwert erreicht wurde, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Konzentrationen im Abstand von 45 Minuten erhöht wurden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der inotrope Effekt auf den Papillarmuskel festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche erfolgte die Auswertung der Testsubstanzversuche.

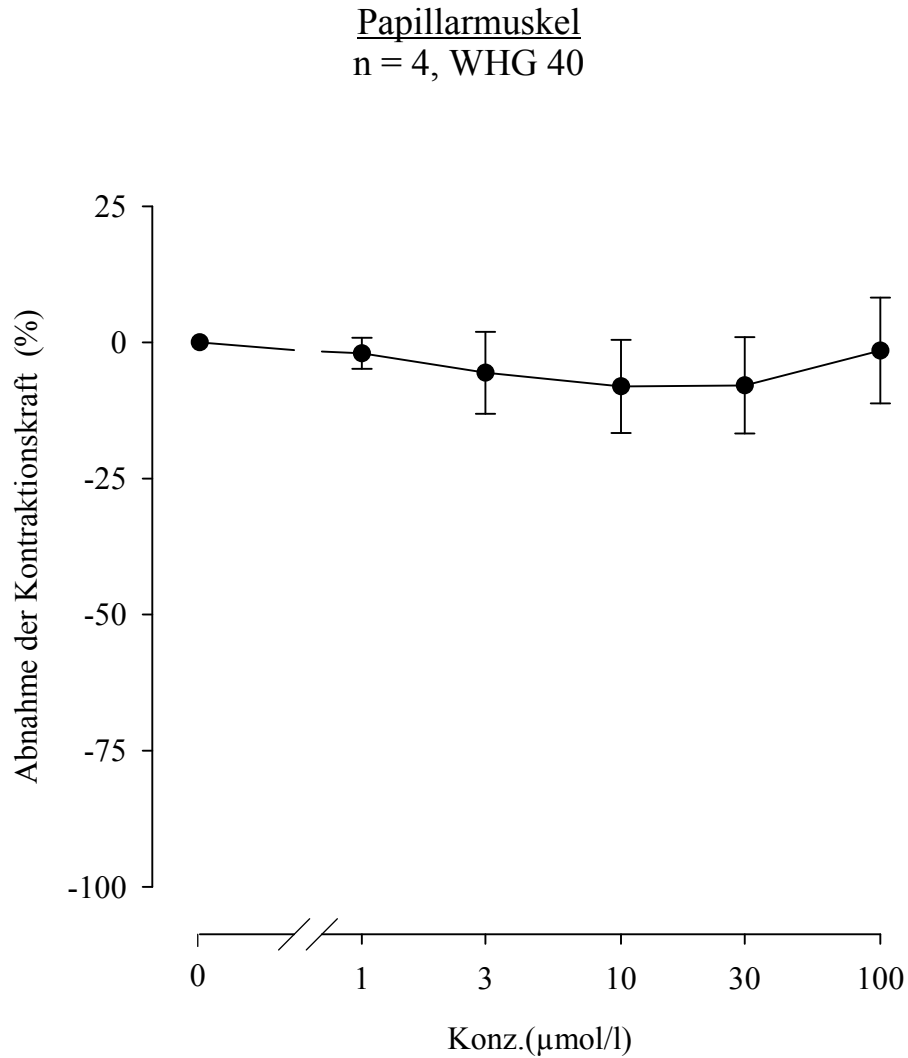
Tabelle 5: Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels

WHG 40 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$1,23 \pm 0,48$	$0,0 \pm 0$	4	/
1	$1,21 \pm 0,46$	$-2,00 \pm 2,85$	4	n.s.
3	$1,11 \pm 0,37$	$-5,58 \pm 7,53$	4	n.s.
10	$1,06 \pm 0,33$	$-8,09 \pm 8,56$	4	n.s.
30	$1,06 \pm 0,32$	$-7,89 \pm 8,83$	4	n.s.
100	$1,18 \pm 0,42$	$-1,50 \pm 9,73$	4	n.s.

Legende zu Tabelle 5:

In Tabelle 5 sind Konzentrationsangaben, Irrtumswahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung in mN und in Prozent dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.

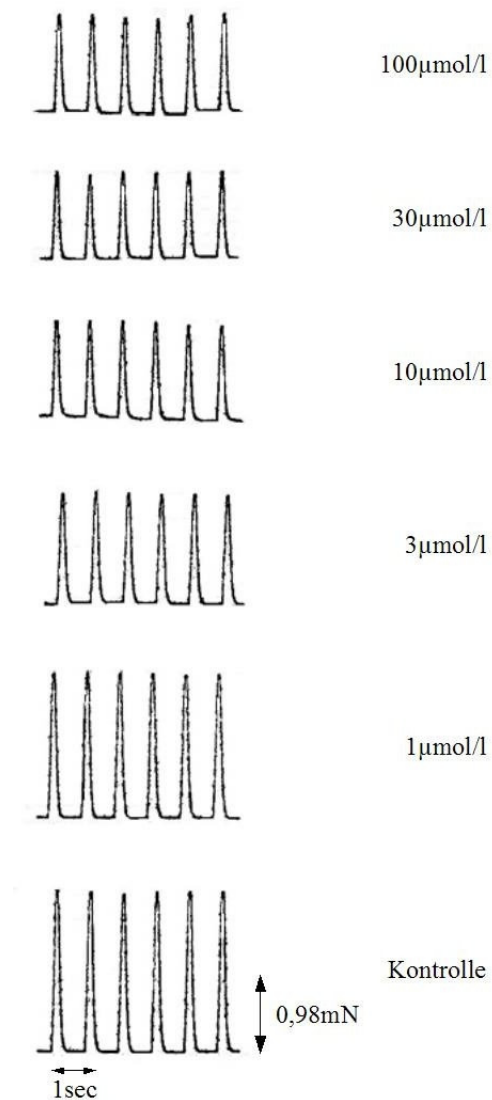
Abbildung 11: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 40 bezüglich der isolierten und elektrisch stimulierten Papillarmuskeln



Legende zu Abbildung 11:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 40 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 12: Originalabbildung der Wirkung von WHG 40 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels



Legende zu Abbildung 12:

Durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 40 auf den Papillarmuskel in unterschiedlichen Konzentrationen nahm die Kontraktionskraft im Vergleich zum Kontrollwert geringfügig ab. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten in unterschiedlichen Konzentrationen.

3.1.5. Wirkung von WHG 40 auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs

Bei den Versuchen am spontan schlagenden rechten Vorhof wurde der chronotrope Effekt der Testsubstanz WHG 40 untersucht. Bevor mit den Versuchen begonnen werden konnte, musste die Schlagfrequenz des Vorhofs annähernd konstant sein. Daraufhin konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Die Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden im Abstand von 45 Minuten in das Organbad injiziert. Im Abstand von fünf Minuten wurde die Schlagfrequenz während der gesamten Versuchsdauer aufgezeichnet. Bei der Auswertung der Testsubstanzversuche mussten die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche nicht berücksichtigt werden.

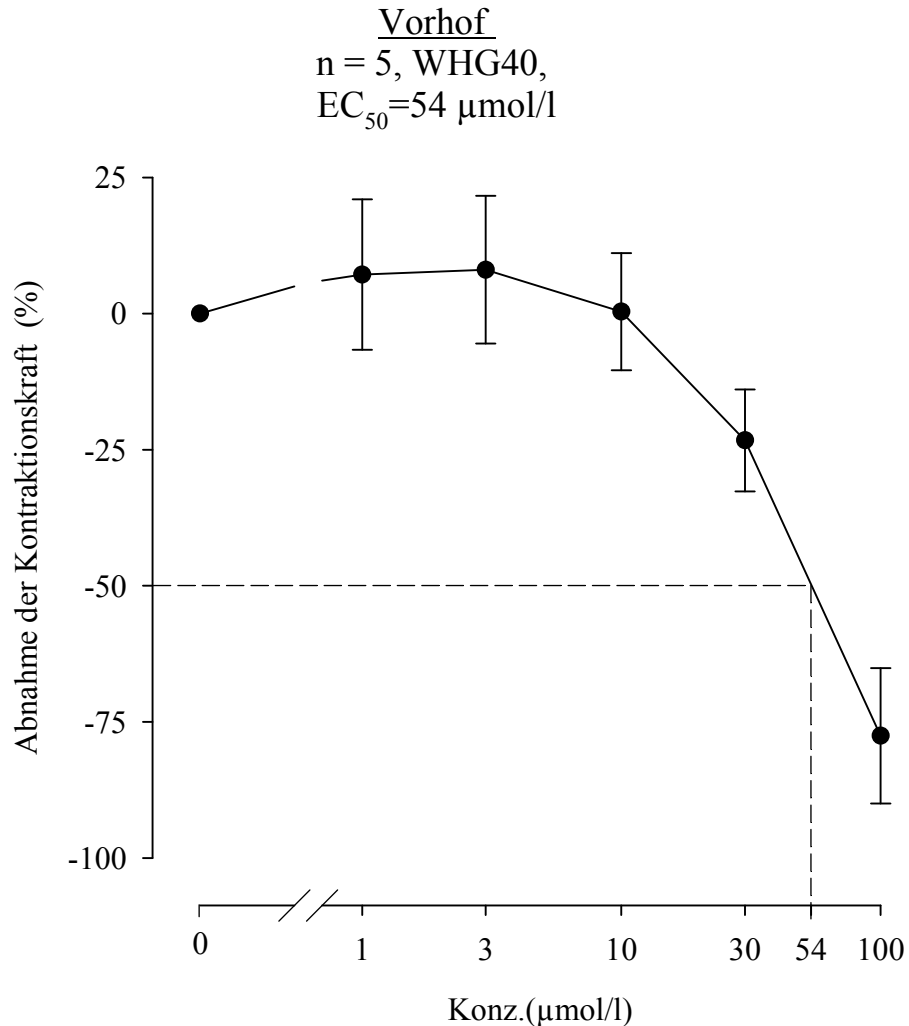
Tabelle 6: Wirkung der Testsubstanz WHG 40 auf die Schlagfrequenz des isolierten Vorhofs

WHG 40 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$201,00 \pm 25,42$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$201,43 \pm 10,36$	$7,18 \pm 13,82$	5	n.s.
3	$203,43 \pm 10,60$	$8,06 \pm 13,56$	5	n.s.
10	$190,87 \pm 12,56$	$0,35 \pm 10,75$	5	n.s.
30	$144,76 \pm 8,52$	$-23,29 \pm 9,37$	5	0,05
100	$54,08 \pm 29,24$	$-77,56 \pm 12,45$	5	0,01

Legende zu Tabelle 6:

Tabelle 6 gibt die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) mit ihren Standardfehlern (SEM) bei verschiedenen Testkonzentrationen aus insgesamt 5 Versuchen wieder. Weiters ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) dargestellt.

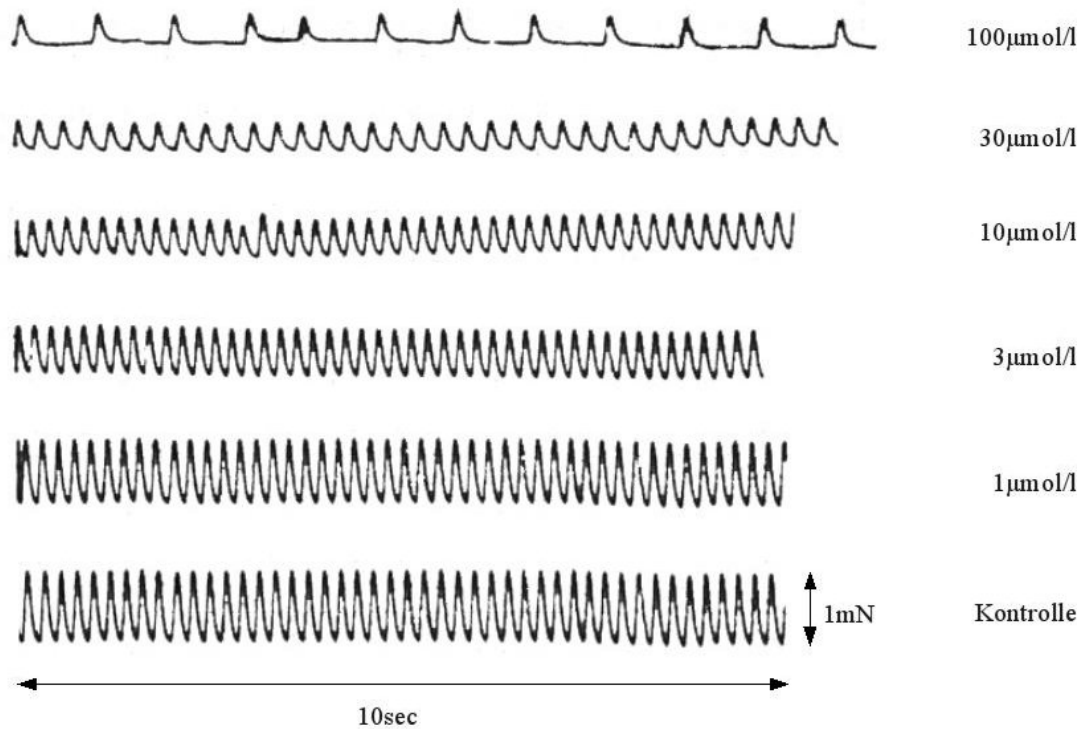
Abbildung 13: Konzentrations- Wirkungskurve des chronotropen Effekts von WHG 40 auf den isolierten, rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 13:

Der Kurvenverlauf zeigt die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz des Vorhofs durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 40 in unterschiedlichen Konzentrationen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 40 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Schlagfrequenz in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte auf dem Graphen geben die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 14: Originalabbildung der Wirkung von WHG 40 auf die Schlagfrequenz des isolierten, rechten Vorhofs



Legende zu Abbildung 14:

Die Abbildung verdeutlicht die konzentrationsabhängige Abnahme der Schlagfrequenz eines isolierten, rechten Vorhofs. Die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten.

3.2. WIRKUNG DER TESTSUBSTANZ WHG 44 AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN

3.2.1. Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde an fünf Präparaten getestet. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der Aorta stimuliert. Nach Erreichen eines konstanten Kontrollwerts konnte im Abstand von 45 Minuten mit der Substanzzugabe begonnen werden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der relaxierende Effekt auf die Gefäßmuskulatur der Aorta von WHG 44 ermittelt werden. Die Auswertung der Testsubstanzversuche erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche.

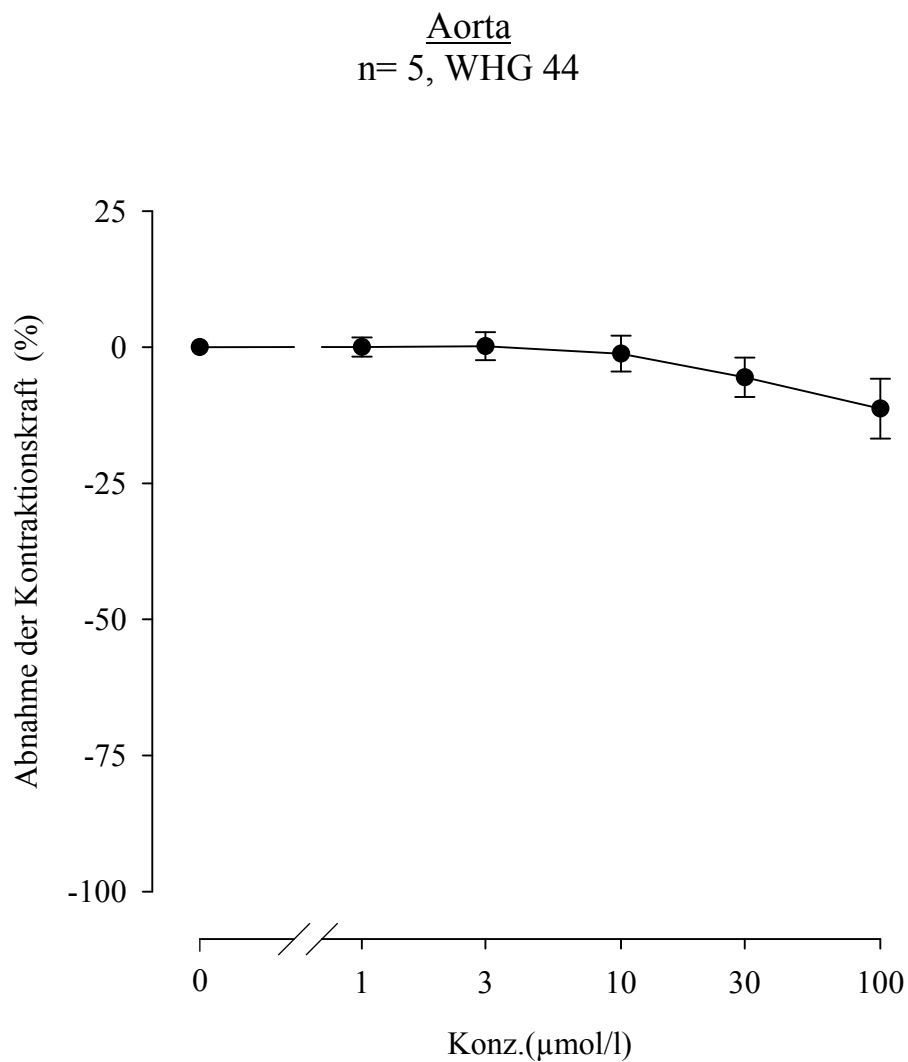
Tabelle 7: Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

WHG 44 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$10,00 \pm 1,73$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$9,92 \pm 1,62$	$0,04 \pm 1,75$	5	n.s.
3	$9,88 \pm 1,54$	$0,18 \pm 2,59$	5	n.s.
10	$9,71 \pm 1,47$	$-1,18 \pm 3,31$	5	n.s.
30	$9,28 \pm 1,38$	$-5,53 \pm 3,62$	5	n.s.
100	$8,58 \pm 1,10$	$-11,30 \pm 5,50$	5	n.s.

Legende zu Tabelle 7:

In Tabelle 3 sind Konzentrationsangaben, Irrtumswahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung in mN und in Prozent dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.

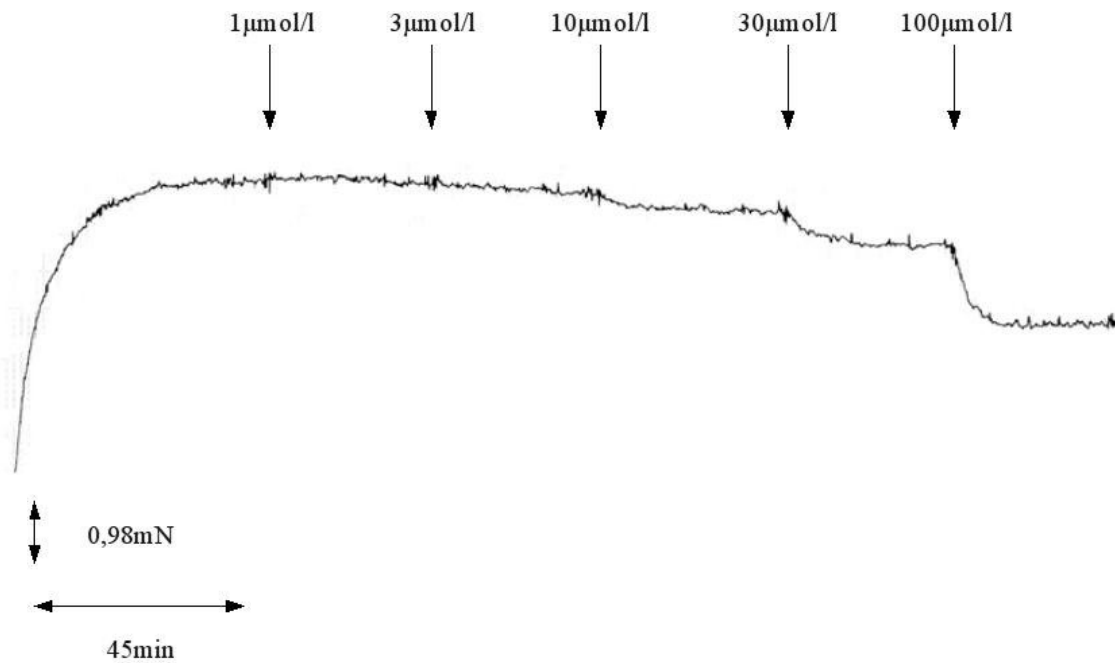
Abbildung 15: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 44 bezüglich Aorta



Legende zu Abbildung 15:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 44 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 16: Originalabbildung der Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der Aorta



Legende zu Abbildung 16:

Der Kurvenverlauf ergibt sich durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 44 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Aorta, was deren Relaxierung zur Folge hatte. Die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten.

3.2.2. Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis wurde an fünf Präparaten überprüft. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der Arteria pulmonalis stimuliert. Nachdem ein konstanter Kontrollwert erreicht wurde, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Konzentrationen im Abstand von 45 Minuten erhöht wurden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der relaxierende Effekt auf die Arteria pulmonalis von WHG 44 festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche erfolgte die Auswertung der Testsubstanzversuche.

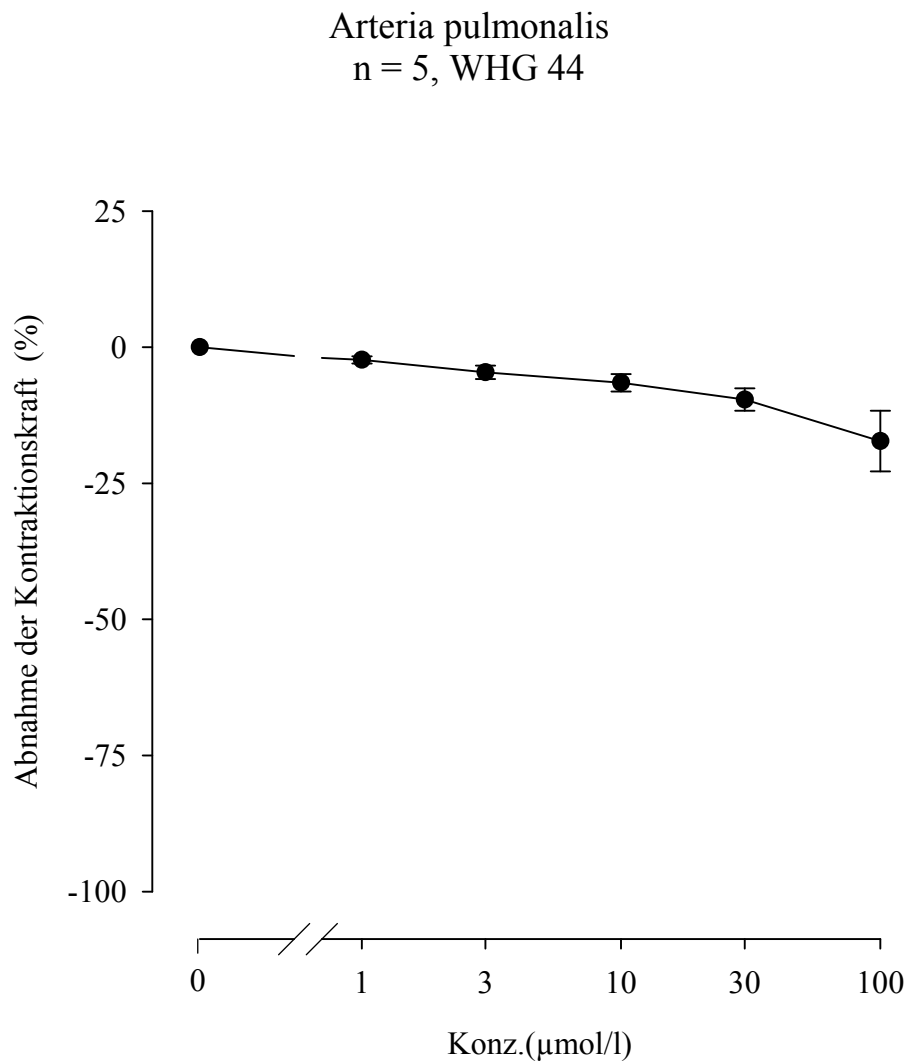
Tabelle 8: Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis

WHG 44 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$17,54 \pm 2,39$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$17,12 \pm 2,32$	$-2,34 \pm 0,64$	5	n.s.
3	$16,67 \pm 2,22$	$-4,62 \pm 1,24$	5	n.s.
10	$16,31 \pm 2,14$	$-6,53 \pm 1,61$	5	n.s.
30	$15,75 \pm 2,06$	$-9,62 \pm 2,07$	5	n.s.
100	$14,35 \pm 1,83$	$-17,25 \pm 2,80$	5	n.s.

Legende zu Tabelle 8:

In Tabelle 8 werden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) bei verschiedenen Testkonzentrationen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von 5 Versuchen wiedergegeben.

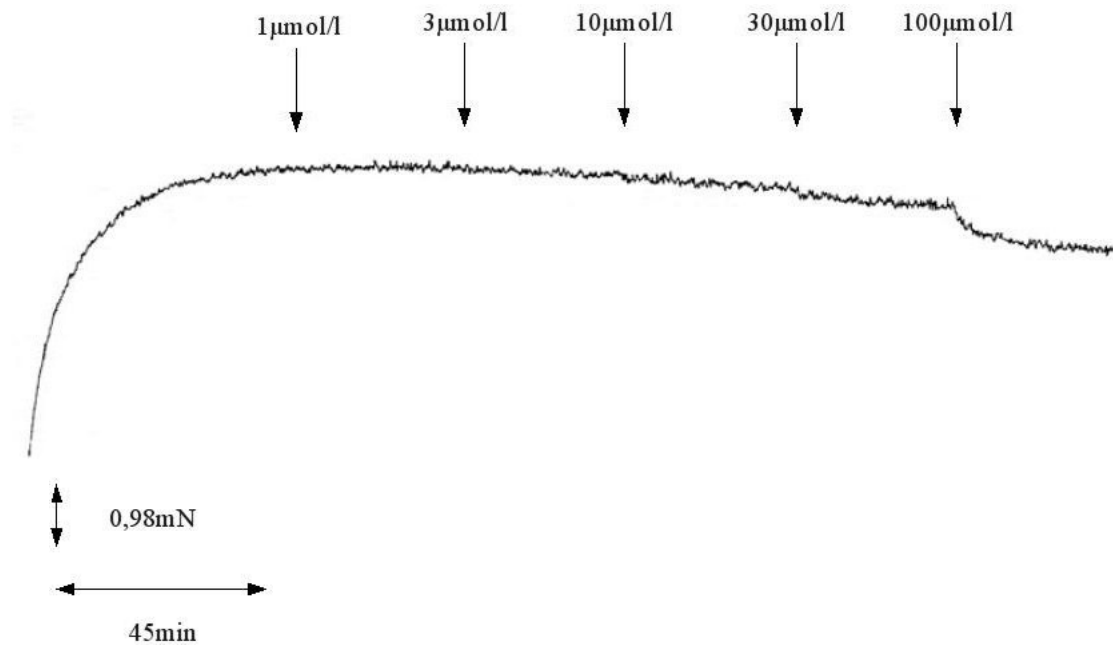
Abbildung 17: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 44 bezüglich Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 17:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 44 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 18: Originalabbildung der Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 18:

Der Kurvenverlauf zeigt die Relaxierung der Arteria pulmonalis durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 44 in unterschiedlichen Konzentrationen. Im Abstand von 45 Minuten erfolgte die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz.

3.2.3. Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums

Die Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums wurde an fünf Präparaten ermittelt. Mittels 90 mmolarer KCl-Lösung wurde die Vorkontraktion der präparierten Darmstücke stimuliert. Nach Erreichen eines konstanten Kontrollwerts konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$, die im Abstand von 45 Minuten injiziert wurden, konnte der relaxierende Effekt auf die Präparate des terminalen Ileums von WHG 44 ermittelt werden. Bei der Auswertung der Testsubstanzversuche wurden die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche berücksichtigt.

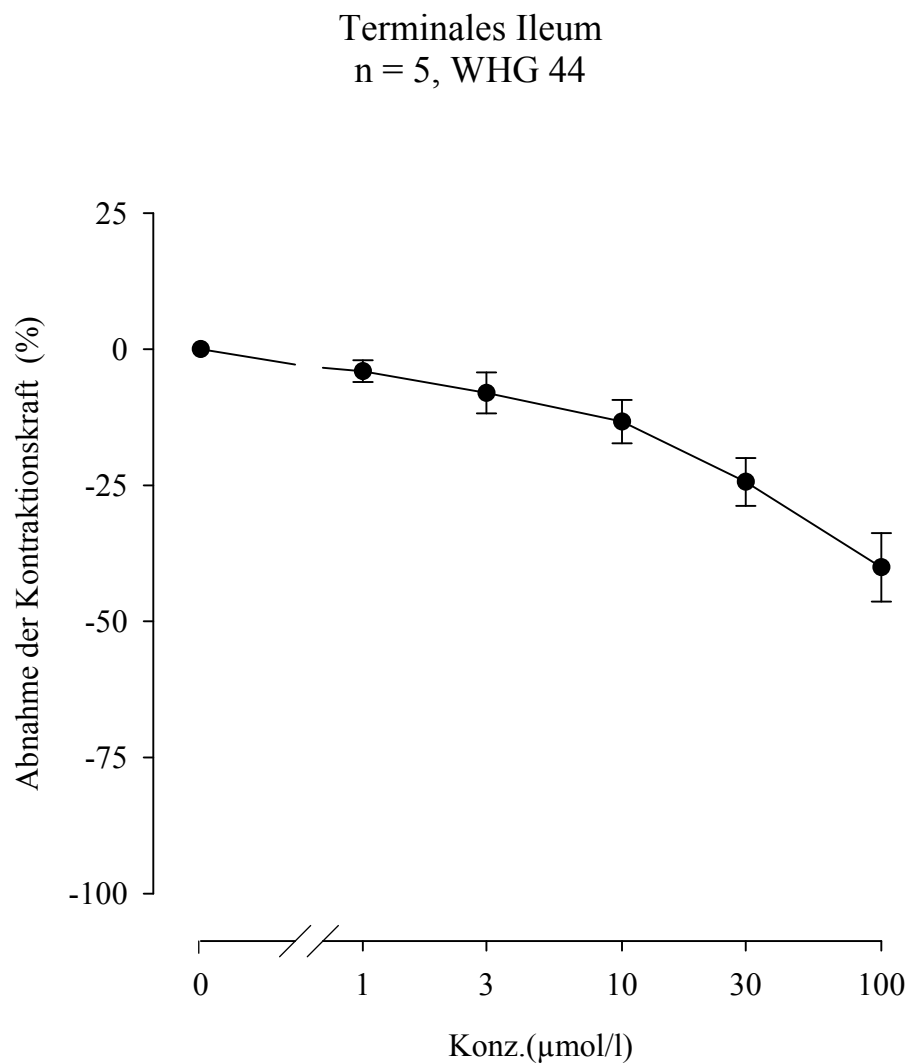
Tabelle 9: Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

WHG 44 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$12,71 \pm 1,34$	$0,0 \pm 0$	5	/
1	$12,14 \pm 1,11$	$-4,04 \pm 2,00$	5	n.s.
3	$11,61 \pm 1,04$	$-8,03 \pm 3,76$	5	n.s.
10	$10,99 \pm 1,12$	$-13,29 \pm 3,98$	5	n.s.
30	$9,66 \pm 1,19$	$-24,39 \pm 4,38$	5	0,05
100	$7,78 \pm 1,33$	$-40,08 \pm 6,27$	5	0,01

Legende zu Tabelle 9:

In Tabelle 9 werden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) bei verschiedenen Testkonzentrationen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von 5 Versuchen wiedergegeben.

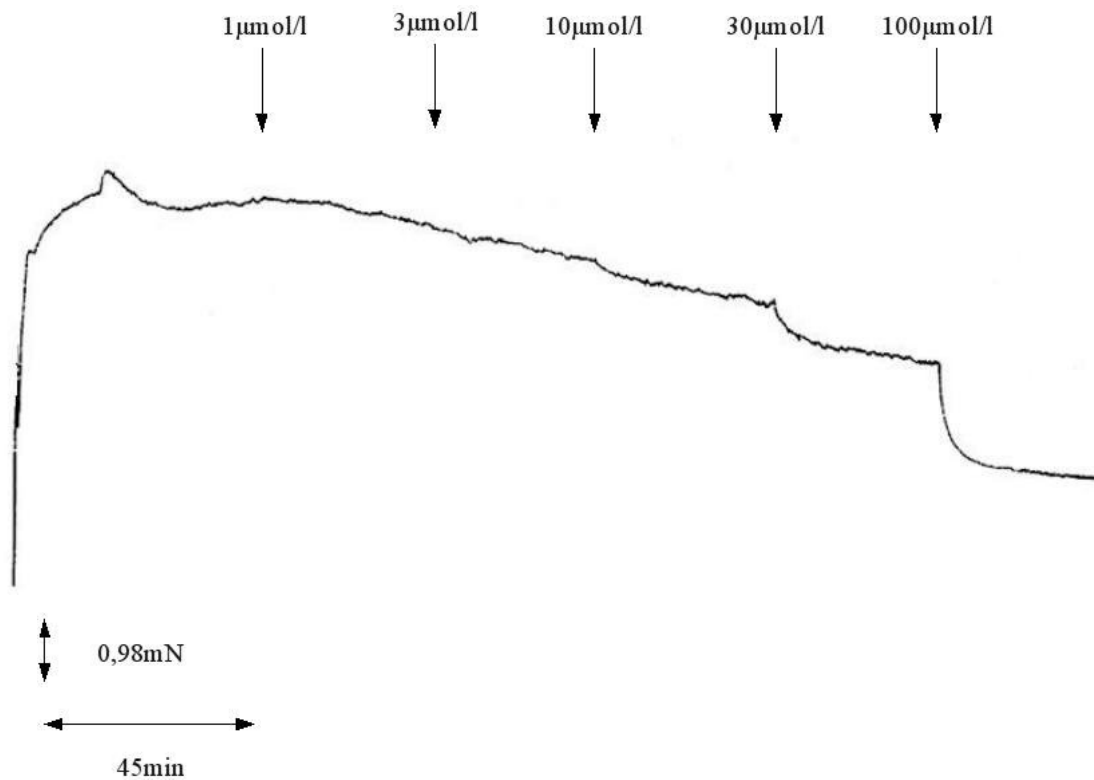
Abbildung 19: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 44 bezüglich terminales Ileum



Legende zu Abbildung 19:

Die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 44 in µmol/l sind auf der x-Achse dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse abgebildet. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 20: Originalabbildung der Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 20:

Durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 44 in unterschiedlichen Konzentrationen auf das terminale Ileum ergibt sich der Kurvenverlauf. Durch Zugabe der Testsubstanz, die im Abstand von 45 Minuten in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurde, kam es zur Relaxierung des terminalen Ileums.

3.2.4. Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels

Der inotrope Effekt der Testsubstanz WHG 44 auf isolierte und elektrisch stimulierte Papillarmuskeln wurde an vier Präparaten getestet. Nach Erreichen eines konstanten Kontrollwerts, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden, wobei die Konzentrationen im Abstand von 45 Minuten erhöht wurden. Bei Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte anschließend der inotrope Effekt auf den Papillarmuskel festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lösungsmittelversuche erfolgte die Auswertung der Testsubstanzversuche.

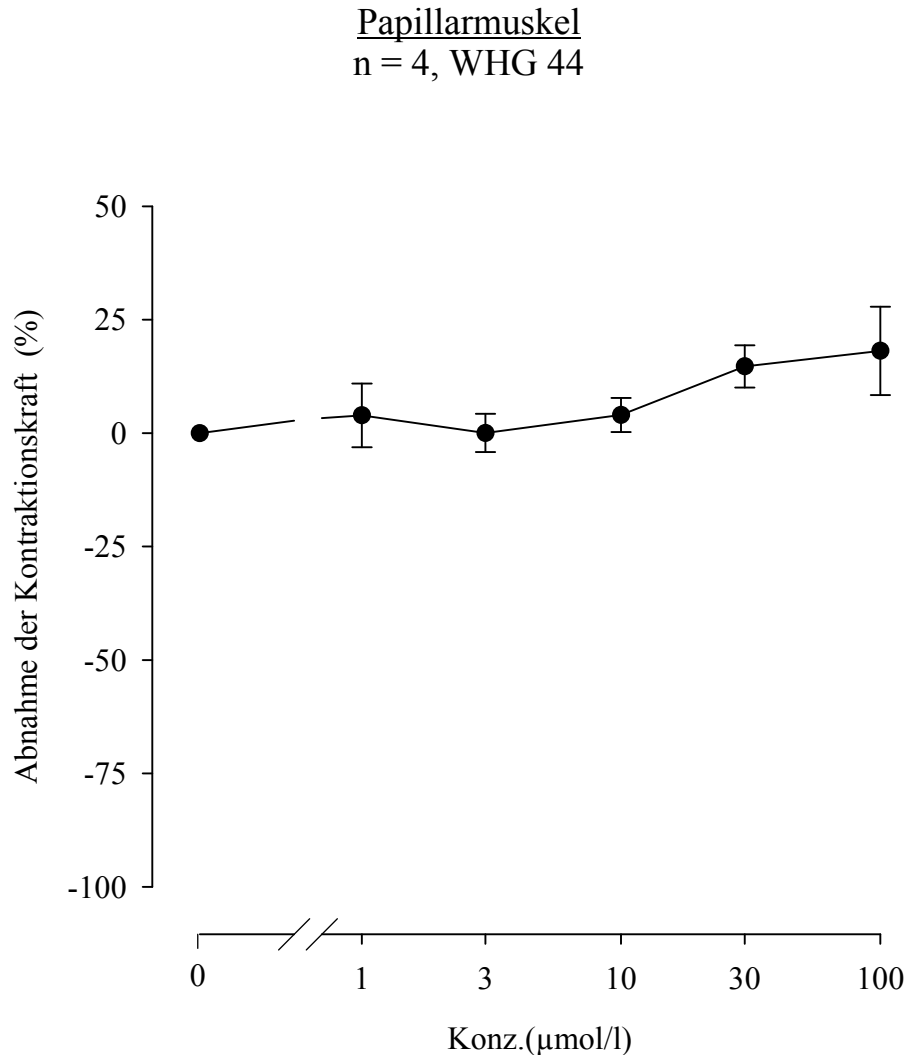
Tabelle 10: Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels

WHG 44 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$1,67 \pm 0,50$	$0,0 \pm 0$	4	/
1	$1,74 \pm 0,53$	$3,92 \pm 7,04$	4	n.s.
3	$1,64 \pm 0,46$	$0,04 \pm 4,23$	4	n.s.
10	$1,73 \pm 0,53$	$4,00 \pm 3,75$	4	n.s.
30	$1,90 \pm 0,59$	$14,70 \pm 4,65$	4	n.s.
100	$1,96 \pm 0,64$	$18,13 \pm 8,29$	4	0,05

Legende zu Tabelle 10:

In Tabelle 10 sind Konzentrationsangaben, Irrtumswahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung in mN und in Prozent dargestellt. Weiters ersichtlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.

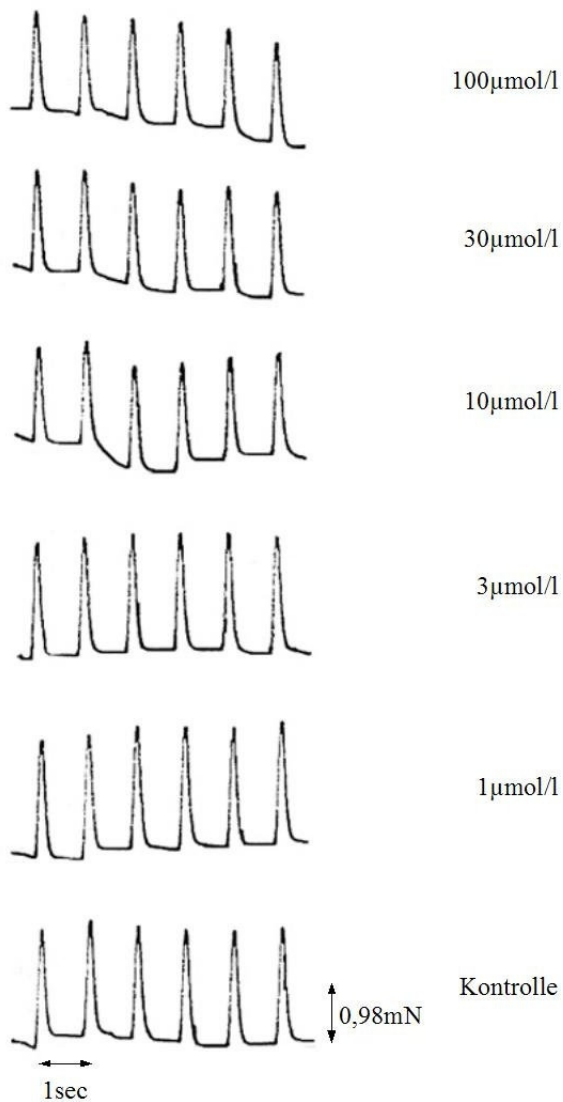
Abbildung 21: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG 44 bezüglich der isolierten und elektrisch stimulierten Papillarmuskeln



Legende zu Abbildung 21:

Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 44 in $\mu\text{mol/l}$ dargestellt. Die Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte geben die arithmetischen Mittelwerte wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 22: Originalabbildung der Wirkung von WHG 44 auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels



Legende zu Abbildung 22:

Durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 44 auf den Papillarmuskel in unterschiedlichen Konzentrationen nahm die Kontraktionskraft im Vergleich zum Kontrollwert zu. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten in unterschiedlichen Konzentrationen.

3.2.5. Wirkung von WHG 44 auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs

Bei den Versuchen am spontan schlagenden rechten Vorhof wurde der chronotrope Effekt der Testsubstanz WHG 44 untersucht. Bevor mit den Versuchen begonnen werden konnte, musste die Schlagfrequenz des Vorhofs annähernd konstant sein. Daraufhin konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Die Testsubstanzkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden im Abstand von 45 Minuten in das Organbad injiziert. Im Abstand von fünf Minuten wurde die Schlagfrequenz während der gesamten Versuchsdauer aufgezeichnet. Bei der Auswertung der Testsubstanzversuche mussten die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche nicht berücksichtigt werden.

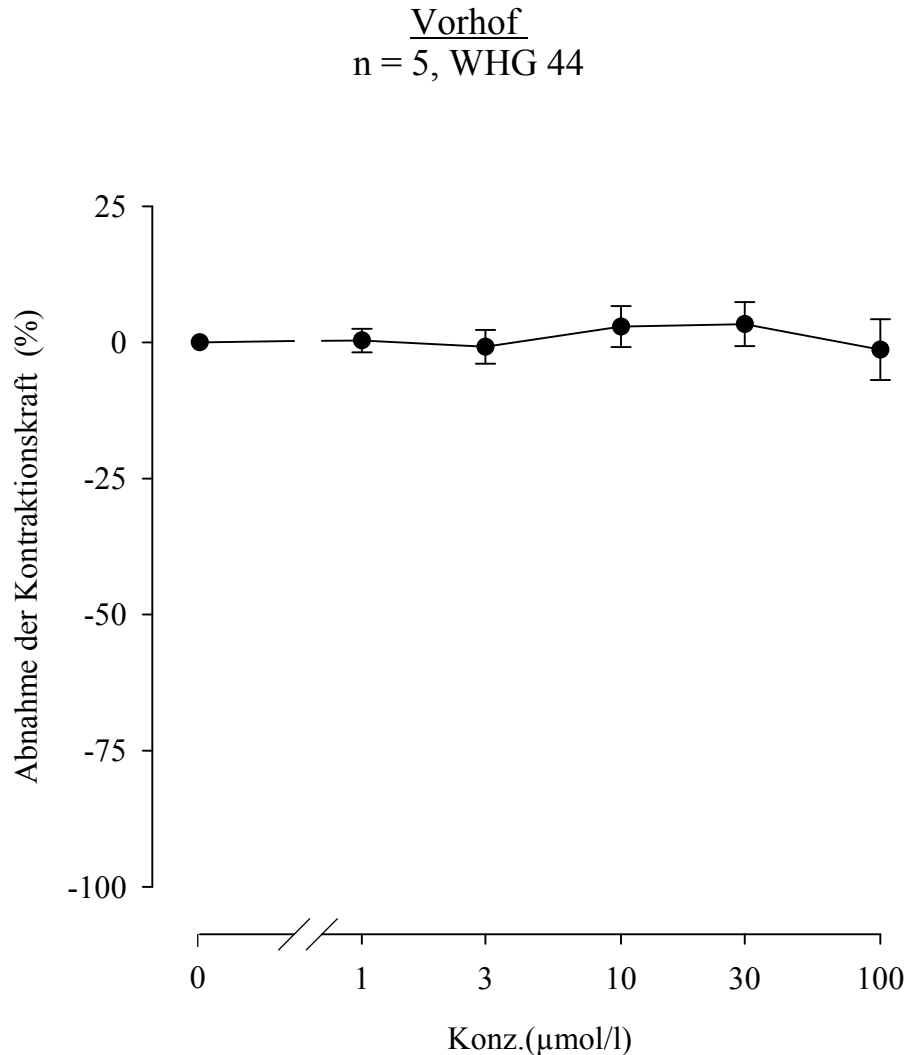
Tabelle 11: Wirkung der Testsubstanz WHG 44 auf die Schlagfrequenz des isolierten Vorhofs

WHG 44 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	214,00 $\pm$ 16,00	0,00 $\pm$ 0	5	/
1	215,00 $\pm$ 17,39	0,34 $\pm$ 2,17	5	n.s.
3	214,00 $\pm$ 22,43	-0,81 $\pm$ 3,12	5	n.s.
10	222,00 $\pm$ 23,48	2,91 $\pm$ 3,75	5	n.s.
30	223,00 $\pm$ 23,91	3,37 $\pm$ 4,04	5	n.s.
100	213,00 $\pm$ 24,37	-1,33 $\pm$ 5,59	5	n.s.

Legende zu Tabelle 11:

Tabelle 11 gibt die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) mit ihren Standardfehlern (SEM) bei verschiedenen Testkonzentrationen aus insgesamt 5 Versuchen wieder. Weiters ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) dargestellt.

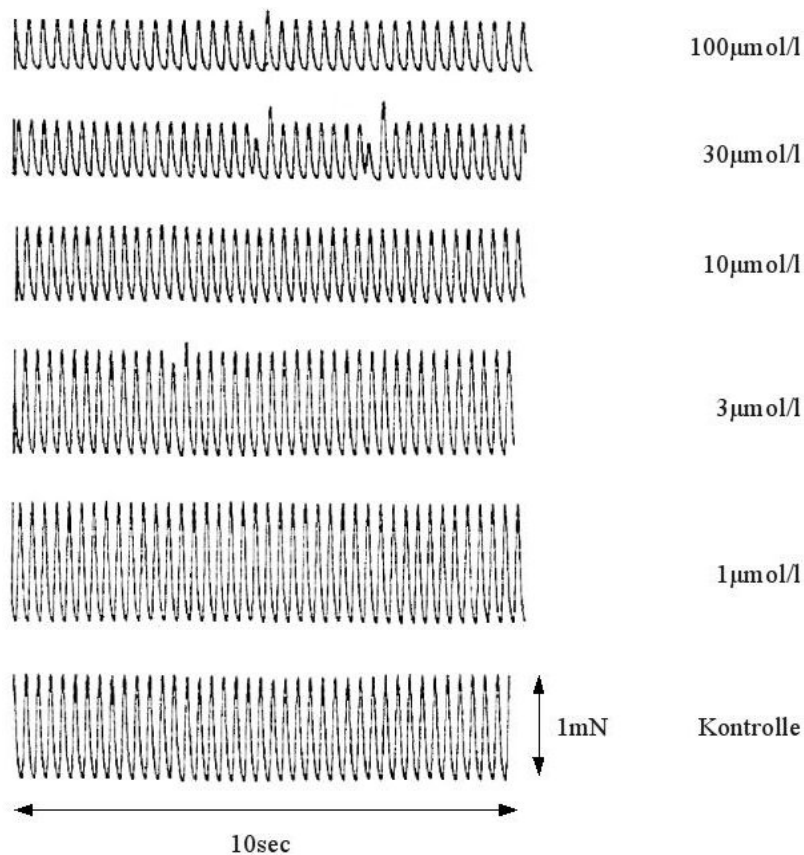
Abbildung 23: Konzentrations- Wirkungskurve des chronotropen Effekts von WHG 44 auf den isolierten, rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 23:

Der Kurvenverlauf zeigt die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz des Vorhofs durch das Einwirken der Testsubstanz WHG 44 in unterschiedlichen Konzentrationen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Konzentrationsstufen der Testsubstanz WHG 44 in µmol/l dargestellt. Die Änderungen der Schlagfrequenz in Prozent sind auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte auf dem Graphen geben die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz wieder, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 24: Originalabbildung der Wirkung von WHG 44 auf die Schlagfrequenz des isolierten, rechten Vorhofs



Legende zu Abbildung 24:

Die Abbildung verdeutlicht die konzentrationsabhängige Abnahme der Schlagfrequenz eines isolierten, rechten Vorhofs. Die Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz erfolgte im Abstand von 45 Minuten.

3.3. EINFLUSS DES LÖSUNGSMITTELS DIMETHYLSULFOXID (DMSO) AUF DIE ISOLIERTEN ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN

Die beiden Testsubstanzen WHG 40 und WHG 44 wurden vor den Versuchen in dem Lösungsmittel DMSO gelöst, welches jedoch selbst eine Wirkung auf die isolierten Organe hatte. Um die Wirkung des Lösungsmittels festzustellen, wurden Lösungsmittelversuche durchgeführt. Somit konnte man die Wirkungen der Testsubstanzen von der Wirkung des Lösungsmittels differenzieren.

Die Testsubstanzen WHG 40 und WHG 44 lösten sich vollständig in 200 µl DMSO, so dass auch die reinen Lösungsmittelversuche mit dieser Konzentration durchgeführt wurden.

Bei der Durchführung der Lösungsmittelversuche wurde DMSO zu den im jeweiligen Versuch verwendeten Konzentrationen im Abstand von 45 Minuten zugesetzt. Die ausgewerteten Messdaten der Lösungsmittelversuche mussten bei der Auswertung der Testsubstanzergebnisse berücksichtigt werden.

3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

200 $\mu\text{mol/l}$ DMSO bewirkten eine Relaxation der Muskulatur von 100 % auf $84,03 \pm 3,74$ %.

Tabelle 12: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO - Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)
Kontrolle	$5,96 \pm 1,22$	$0,00 \pm 0$
1	$5,79 \pm 1,23$	$-3,12 \pm 0,98$
3	$5,74 \pm 1,15$	$-3,39 \pm 1,62$
10	$5,56 \pm 1,16$	$-6,86 \pm 2,57$
30	$5,37 \pm 1,14$	$-10,16 \pm 2,77$
100	$5,07 \pm 1,14$	$-15,97 \pm 3,74$

Legende zu Tabelle 12:

In Tabelle 12 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) der Aorta und deren Standardfehler (SEM) bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Der ermittelte Kontrollwert $5,96 \pm 1,22$ mN ist ausschlaggebend für die prozentuale Änderung der Kontraktionskraft.

3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ verursachte das Lösungsmittel DMSO eine Abnahme des Muskeltonus von 100 % auf $92,16 \pm 1,82$ %.

Tabelle 13: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

DMSO - Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)
Kontrolle	$10,90 \pm 2,77$	$0,00 \pm 0$
1	$10,87 \pm 2,66$	$-0,06 \pm 1,04$
3	$10,95 \pm 2,72$	$0,62 \pm 0,62$
10	$10,56 \pm 2,33$	$-2,24 \pm 3,47$
30	$10,29 \pm 2,35$	$-4,93 \pm 2,60$
100	$10,00 \pm 2,36$	$-7,84 \pm 1,82$

Legende zu Tabelle 13:

In Tabelle 13 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) der Arteria pulmonalis und deren Standardfehler (SEM) bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Der ermittelte Kontrollwert $10,90 \pm 2,77$ mN ist ausschlaggebend für die prozentuale Änderung der Kontraktionskraft.

3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

Bei einem Gehalt von 200 $\mu\text{mol/l}$ DMSO sank die Kontraktionskraft von 100 % auf $54,49 \pm 3,53$ %.

Tabelle 14: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

DMSO - Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)
Kontrolle	$13,94 \pm 3,22$	$0,00 \pm 0$
1	$13,49 \pm 3,34$	$-4,83 \pm 1,91$
3	$12,64 \pm 3,21$	$-11,41 \pm 2,84$
10	$12,06 \pm 3,22$	$-16,72 \pm 4,00$
30	$10,36 \pm 2,66$	$-28,11 \pm 3,32$
100	$8,00 \pm 2,15$	$-45,51 \pm 3,53$

Legende zu Tabelle 14:

In Tabelle 14 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) des terminalen Ileums und deren Standardfehler (SEM) bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Der ermittelte Kontrollwert $13,94 \pm 3,22$ mN ist ausschlaggebend für die prozentuale Änderung der Kontraktionskraft.

3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ DMSO nahm die Kontraktionskraft des Papillarmuskels von 100 % auf $72,32 \pm 14,62$ % ab.

Tabelle 15: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

DMSO - Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)
Kontrolle	$0,66 \pm 0,12$	$0,00 \pm 0$
1	$0,60 \pm 0,08$	$-6,22 \pm 4,25$
3	$0,53 \pm 0,04$	$-13,12 \pm 8,39$
10	$0,52 \pm 0,05$	$-14,47 \pm 9,58$
30	$0,48 \pm 0,06$	$-20,55 \pm 12,11$
100	$0,43 \pm 0,08$	$-27,68 \pm 14,62$

Legende zu Tabelle 15:

In Tabelle 15 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) des Papillarmuskels und deren Standardfehler (SEM) bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Der ermittelte Kontrollwert $0,66 \pm 0,12$ mN ist ausschlaggebend für die prozentuale Änderung der Kontraktionskraft.

3.3.5. Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ DMSO nahm die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs von 100 % auf $99,94 \pm 9,37$ % ab.

Tabelle 16: Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

DMSO - Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)
Kontrolle	$240,00 \pm 25,00$	$0,00 \pm 0$
1	$247,50 \pm 22,50$	$3,27 \pm 1,38$
3	$247,50 \pm 22,50$	$3,27 \pm 1,38$
10	$245,00 \pm 15,00$	$2,55 \pm 4,44$
30	$242,50 \pm 12,50$	$1,61 \pm 5,38$
100	$237,50 \pm 2,50$	$-0,06 \pm 9,37$

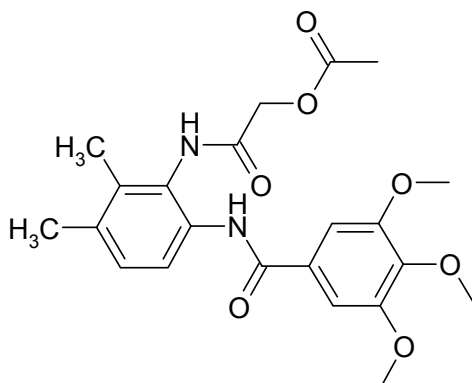
Legende zu Tabelle 16:

In Tabelle 16 sind die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des rechten Vorhofs und deren Standardfehler (SEM) bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Der ermittelte Kontrollwert $240,00 \pm 25,00$ mN ist ausschlaggebend für die prozentuale Änderung der Schlagfrequenz.

4. DISKUSSION

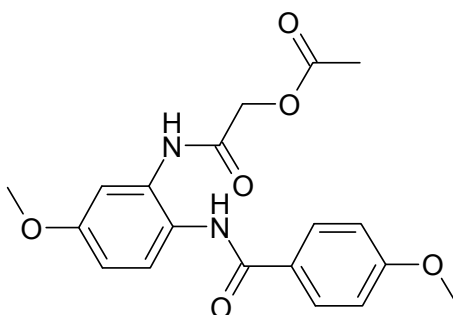
4.1. STRUKTURVERGLEICH

Strukturformel von WHG 40:



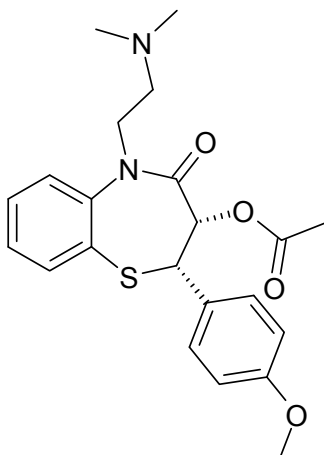
3-{2,3-dimethyl-6-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

Strukturformel von WHG 44:



3-{5-methoxy-2-[(4-methoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

Strukturformel von Diltiazem :



(2S,3S)-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2-(4-methoxyphenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzothiazepin-3-yl acetat

Das Diltiazem ist ein Benzothiazepin Derivat, das an Position 5 einen 2-(dimethylamino)ethylrest trägt, an Position 2 ein p-Methoxyphenyl und an Position 3 einen Acetylrest. Es weist 2 Chiralitätszentren an den Positionen 2 und 3 auf, wodurch 4 Stereomere möglich sind.

Bei den beiden Testsubstanzen WHG 40 und WHG 44 wurde im Vergleich zum Diltiazem der Thiazepinring geöffnet. Zur Fixierung der Stereochemie wurde der Schwefel an Position 1 durch eine Amidfunktion ersetzt, wodurch für das dadurch entstandene Benzanilid eine transoide Struktur wahrscheinlicher wurde. Der 2-(dimethylamino)ethylrest am Stickstoff an Position 5 ist bei den beiden Testsubstanzen nicht mehr vorhanden. Die 2-oxoethylacetat Seitenkette, die beim Diltiazem - eingebaut im Thiazepinring - bereits vorlag, blieb bei beiden Testsubstanzen erhalten.

Weiteres unterschieden sich die beiden Testsubstanzen vom Diltiazem durch zusätzliche Substituenten an den Benzolringen. WHG 40 hat an der aromatischen Struktur im Anilinteil an den Positionen 2 und 3 jeweils eine Methylgruppe und am Benzoylrest an den Positionen 3 und 5 zwei zusätzliche Methoxygruppierungen. Die Substanz WHG 44 hat an der aromatischen Struktur im Anilinteil an Position 5 eine zusätzliche Methoxygruppe.

4.2. VERSUCHE AN DEN ISOLIERTEN ORGANEN

Tabelle 17: Vergleich von WHG 40 und WHG 44 bezüglich ihrer Wirkung auf die glatte Muskulatur

Organ- präparat	WHG 40 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	WHG 44 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	$105,75 \pm 3,39$	/	$88,70 \pm 5,50$	/
Arteria pulmonalis	$91,86 \pm 4,84$	/	$82,75 \pm 2,80$	/
Terminales Ileum	$47,2 \pm 3,69$	87,5	$59,92 \pm 6,27$	/

Bei den Versuchen der Testsubstanz WHG 40 an der Aorta nahm die Kontraktionskraft bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ unerwarteterweise um $5,75 \pm 3,39 \%$ zu, wodurch auch keine EC_{50} erreicht werden konnte. Bei der Testsubstanz WHG 44 konnte ebenfalls keine EC_{50} ermittelt werden, jedoch kam es hier bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Abnahme der Kontraktionskraft auf $88,70 \pm 5,50 \%$. Die Aorta betreffend lässt sich somit sagen, dass bezüglich der Kontraktionskraftabnahme die Substanz WHG 44 stärker wirksam war als WHG 40.

Sowohl mit der Testsubstanz WHG 40 als auch mit WHG 44 konnte eine geringe Abnahme der Kontraktionskraft an der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis erzielt werden. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug diese bei WHG 40 $91,86 \pm 4,84 \%$, bei WHG 44 $82,75 \pm 2,80 \%$. Somit bewirkte WHG 44 eine etwas stärkere Abnahme der Kontraktilität. Bei keiner der beiden Substanzen wurde eine EC_{50} erreicht.

Die Untersuchungen am terminalen Ileum zeigten, dass beide Testsubstanzen bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ einen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur hervorrufen. WHG 40 bewirkte eine Relaxierung auf $47,2 \pm 3,69 \%$. Eine EC_{50} wurde bei 87,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft konnte bei Konzentrationen

von 30 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ beobachtet werden. Auch bei WHG 44 nahm die Kontraktionskraft auf $59,92 \pm 6,27 \%$ ab, jedoch wurde im Gegensatz zu WHG 40 keine EC_{50} erreicht.

Tabelle 18: Vergleich von WHG 40 und WHG 44 bezüglich ihrer Wirkung auf die Herzmuskulatur

Organ- präparat	WHG 40 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	WHG 44 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Papillarmuskel	$98,50 \pm 9,73$	/	$118,13 \pm 8,29$	/
Rechter Vorhof	$22,44 \pm 12,45$	54	$98,67 \pm 5,59$	/

Die Testsubstanz WHG 40 wies einen geringen negativ inotropen Effekt auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter Papillarmuskeln auf. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Abnahme der Kontraktilität nur $1,50 \pm 9,73 \%$. Hingegen nahm die Kontraktionskraft unter Einwirkung von WHG 44 bei gleicher Konzentration auf $118,13 \pm 8,29 \%$ zu, und erwirkte somit eine positiv inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel. Eine EC_{50} wurde weder bei WHG 40 noch bei WHG 44 erreicht.

Auf den rechten Vorhof erzielten beide Substanzen bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ einen negativ chronotropen Effekt, der jedoch bei WHG 40 weitaus stärker ausgeprägt war. Die Abnahme der Schlagfrequenz auf $22,44 \pm 12,45 \%$ bei WHG 40 war wesentlich höher als bei WHG 44, wo die Schlagfrequenz nur um 1,33 % auf $98,67 \pm 5,59 \%$ abnahm. Bei WHG 40 wurde eine EC_{50} bei 54 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Bei Konzentrationen von 30 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ nahm die Schlagfrequenz besonders stark ab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass WHG 44 eine stärkere Abnahme der Kontraktilität an der Aorta und an der Arteria pulmonalis als WHG 40 bewirkte. Am terminalen Ileum war die Abnahme nur unwesentlich geringer als bei WHG 40. In Bezug auf die abnehmende Kontraktionskraft an der glatten Muskulatur war die Testsubstanz WHG 44 somit wirksamer als WHG 40. An der Herzmuskulatur zeigte jedoch die Substanz WHG 40 einen wesentlich deutlicheren negativ inotropen und negativ chronotropen Effekt als WHG 44.

Tabelle 19: Zusammenfassung der EC₅₀ Werte für negativ chronotrope und negativ inotrope Effekte an Präparaten des Meerschweinchens aus der Literatur

Substanz	Negativ chronotroper Effekt EC ₅₀	Negativ inotroper Effekt EC ₅₀	Literatur
Diltiazem	≤ 0,8 µmol/l	≥ 5,0 µmol/l	Erker et al. 1996
Verapamil	8,0 µmol/l	0,27 µmol/l	Buljubasic et al. 1991
KT-362	20,0 µmol/l	7,0 µmol/l	Buljubasic et al. 1991
Compound 7	23,0 µmol/l	2,7 µmol/l	Erker et al. 1996

Im Vergleich der beiden Testsubstanzen bezüglich ihrer negativ inotropen Wirkung mit Diltiazem, konnte ein deutlich geringerer Effekt festgestellt werden, da weder bei WHG 40 noch bei WHG 44 eine EC₅₀ erreicht wurde. Auch im Vergleich mit der negativ chronotropen Wirkung von Diltiazem erwiesen sich beide Substanzen als wesentlich schwächer wirksam. Bei WHG 44 konnte keine EC₅₀ ermittelt werden. Bei WHG 40 betrug die EC₅₀ 54 µmol/l, und somit das 67fache der EC₅₀ von Diltiazem. Auch der Vergleich mit weiteren Calciumantagonisten und ihren Nachfolgesubstanzen zeigte, dass beide untersuchte Substanzen wesentlich schwächere Wirkungen auf die Herzmuskelpräparate aufwiesen. Der EC₅₀ Wert von WHG 40 bezüglich des negativ chronotropen Effekts war um das 6,75fache höher als der des Verapamils (8,0 µmol/l) beziehungsweise 2,7mal höher als der von KT-362 (20 µmol/l), und 3,4fach höher als der von Compound 7 (23,0 µmol/l).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Diplomarbeit war es, zwei am Department für Medizinische Chemie an der Universität Wien neu synthetisierte Testsubstanzen bezüglich ihrer pharmakologischen Wirkung zu testen. Die beiden Substanzen hatten die Bezeichnung WHG 40 und WHG 44 und wiesen strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Calciumkanalblocker Diltiazem auf. Die Versuche wurden an den isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Die Resultate aus den Versuchsreihen wurden ausgewertet und graphisch dargestellt. Um eventuelle Unterschiede bezüglich pharmakologischer Wirkung feststellen zu können, wurden die beiden Testsubstanzen miteinander verglichen. Bezüglich unterschiedlicher Wirkung an den Herzmuskelpräparaten auch mit den Calciumantagonisten Diltiazem und Verapamil.

Hauptsächlich galt es herauszufinden, ob die beiden Testsubstanzen Effekte an der glatten Muskulatur der Aorta, der Arteria pulmonalis und an dem terminalen Ileum hervorrufen. Weiters wurden WHG 40 und WHG 44 auf eventuelle inotrope und chronotrope Wirkungen getestet. Diese Versuche erfolgten an den Herzmuskelpräparaten Papillarmuskel und rechter Vorhof.

Die beiden Testsubstanzen wurden jeweils in dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in die entsprechenden Organbäder in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert, wobei die Konzentrationsstufe alle 45 Minuten erhöht wurde.

An der glatten Muskulatur wies die Testsubstanz WHG 44 eine stärkere Wirkung als WHG 40 auf. An den Herzmuskelpräparaten erwies sich WHG 40 als die wirksamere Verbindung. In Bezug auf negativ inotropen und negativ chronotropen Effekt zeigte sich, dass beide Substanzen wesentlich schwächer wirksam waren als die beiden Calciumantagonisten Diltiazem und Verapamil.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Buljubasic N, Marijic J, Stowe DF, Gross GJ, Kampine JP, Bosnjak ZJ (1991) Comparative cardiac effects of KT-362 and verapamil in isolated heart-correlation to calcium channel current depression. J Cardiovasc Pharmacol 18(4):594-604

Erker T, Laimer I, Huck S, Boehm S, Studenik C, Heistracher P (1996) Synthesis and calcium antagonistic activity of 8-[N-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)ethyl]-beta-alanyl]-5,6,7,8-tetrahydrothieno[3,2-b][1,4]thiazepine fumarate. Arch Pharm 329:347-351

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

Hille B (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Mass. Sinauer Associates, Inc. 1992

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

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart:66, 137-139

Nayler WG (1992) Calciumantagonisten der zweiten Generation. Springer Verlag: 26-27

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2001) Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage, Springer Verlag: 288-290

Reuter H (1986) Voltage-dependent mechanisms for raising intracellular free calcium concentration: calcium channels. Ciba Found Symp 122: 5-22

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

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 86-87, 172-175, 589

7. CURRICULUM VITAE

Name	Andreas Gökler
Geburtsdatum	19.September 1979
Geburtsort	Steyr
Wohnort	Bad Hall
Staatsbürgerschaft	Österreich
Vater	Günter Gökler geb. 11.06.1954 Apotheker
Mutter	Heidi Gökler geb. 04.12.1951 PKA
Geschwister	Johannes Gökler geb. 03.07.1988 Student

Ausbildung:

1986 – 1990	Volksschule Bad Hall
1990 – 1998	Bundesgymnasium Steyr
1999 – 2000	Wehrdienst
2000 – 2008	Studium der Pharmazie Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien im SS 2007