

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Biologische Aktivität zweier neu synthetisierter
Hemmstoffe der Butyrylcholinesterase (BLV10ox und
CMC44ox) an isolierten Organen von Meerschweinchen“

verfasst von

Patrizia Elisabeth Windisch

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Weiters möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für seine Hilfsbereitschaft, sein Entgegenkommen und die fachliche Beratung bedanken.

Natürlich danke ich auch all meinen Freunden, mit denen ich im Laufe des Studiums Zeit verbringen durfte, speziell auch jenen, die ich im Rahmen meiner Diplomarbeit kennengelernt habe.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund, der während meiner gesamten Studienzeit immer für mich da war.

1. Einleitung.....	1
1.1. Morbus Alzheimer	1
1.1.1. Therapie von Morbus Alzheimer:.....	3
1.1.1.1. Substanzen, die die cholinerge Neurotransmission beeinflussen	3
1.1.1.2. Nichtkompetitive NMDA-Antagonisten	4
1.1.1.3. Nootropika	4
1.1.1.4. Ginkgo biloba.....	5
1.1.1.5. Radikalfänger.....	5
1.2. Acetylcholin	6
1.2.1. Acetylcholinrezeptoren	6
1.2.1.1. Nicotinrezeptoren	6
1.2.1.2. Muscarinrezeptoren	6
1.2.2. Acetylcholinwirkungen	7
1.2.3. Acetylcholinfreisetzung, -speicherung und -abbau.....	8
2. Zielsetzung.....	9
3. Material und Methoden	10
3.1. Verwendete Feststoffe	10
3.1.1. Testsubstanz BLV10ox	10
3.1.1.1. Strukturformel.....	10
3.1.1.2. Summenformel und Molmasse	10
3.1.1.3. Physiologische Wirkung.....	11
3.1.2. Testsubstanz CMC44ox	11
3.1.2.1. Strukturformel.....	11
3.1.2.2. Summenformel und Molmasse	12
3.1.2.3. Physiologische Wirkung.....	12
3.2. Verwendete Lösungen.....	12
3.2.1. Tyrode (Physiologische Nährlösung)	12
3.2.2. KCl-Lösungen	14
3.2.3. Dimethylsulfoxid (DMSO)	14
3.3. Die Versuchstiere	15
3.4. Entnahme, Isolierung und Präparation der Versuchsorgane	16
3.4.1. Entnahme der Versuchsorgane	16
3.4.2. Isolierung und Präparation der Versuchsorgane.....	17
3.4.2.1. Aorta (Aorta descendens)	17
3.4.2.2. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	18
3.4.2.3. Hüft- bzw. Krummdarm (Terminales Ileum)	18

3.4.2.4. Rechter Vorhof (Atrium cordis dexter).....	19
3.4.2.5. Papillarmuskel (Musculus papillaris)	20
3.5. Versuchsanordnung	21
3.5.1. Aufbau der Versuchsaapparaturen	22
3.5.1.1. Apparatur 1	23
3.5.1.2. Apparatur 2	26
3.6. Versuchsablauf	28
3.6.1. Allgemeiner Versuchsablauf.....	28
3.6.2. Versuchspräparate	28
3.6.2.1. Versuchsablauf an der Aorta descendens.....	28
3.6.2.2. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis.....	29
3.6.2.3. Versuchsablauf am terminalen Ileum	29
3.6.2.4. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum.....	30
3.6.2.5. Versuchsablauf am Musculus papillaris	31
3.7. Datenauswertung.....	32
3.7.1. Datenauswertung der glattmuskulären Präparate	32
3.7.1.1. Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum.....	32
3.7.2. Auswertung der Herzpräparate.....	33
3.7.2.1. Musculus papillaris	33
3.7.2.2. Atrium cordis dexter.....	34
3.8. Statistik	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz BLV10ox	36
4.1.1. Wirkung von BLV10ox auf die Aorta descendens	36
4.1.2. Wirkung von BLV10ox auf die Arteria pulmonalis.....	40
4.1.3. Wirkung von BLV10ox auf das terminale Ileum	43
4.1.4. Wirkung von BLV10ox auf den Musculus papillaris	47
4.1.5. Wirkung von BLV10ox auf das Atrium cordis dextrum	51
4.2. Ergebnisse der Testsubstanz CMC44ox.....	55
4.2.1. Wirkung von CMC44ox auf die Aorta descendens.....	55
4.2.2. Wirkung von CMC44ox auf die Arteria pulmonalis	59
4.2.3. Wirkung von CMC44ox auf das terminale Ileum.....	63
4.2.4. Wirkung von CMC44ox auf den Musculus papillaris.....	67
4.2.5. Wirkung von CMC44ox auf den rechten Vorhof	72
5. Diskussion.....	77
5.1. Wirkung auf die Organe	77

5.1.1. Wirkung auf die Organe der glatten Muskulatur	77
5.1.1.1. Wirkung auf die Aorta descendens	78
5.1.1.2. Wirkung auf die Arteria pulmonalis	78
5.1.1.3. Wirkung auf das terminale Ileum	78
5.1.2. Wirkung auf die Organe der Herzmuskulatur	79
5.1.2.1. Wirkung auf den Musculus papillaris	79
5.1.2.2. Wirkung auf das Atrium cordis dextrum	80
5.2. Schlussfolgerung.....	80
6. Zusammenfassung.....	81
7. Literaturverzeichnis.....	83
8. Curriculum Vitae.....	85

1. Einleitung

1.1. Morbus Alzheimer

Die Alzheimer-Erkrankung zählt neben Morbus Parkinson, Chorea Huntington und anderen zu den neurodegenerativen Erkrankungen und stellt die häufigste Ursache einer Demenz dar; sie bedingt mehr als 50 % aller dementiellen Syndrome. Unter dementiellen Syndromen versteht man Krankheitsbilder, die zu einer qualitativen und quantitativen Abnahme der Hirnleistung sowie Beeinträchtigung des Sozialverhaltens führen. In den meisten Fällen kommt es zunächst zu einer geringen Gedächtnisstörung, die sich dann im Laufe der Jahre zum Verlust des Gedächtnisses, zur Reduktion der Sprache, des Auffassungs- und Konzentrationsvermögens, zu räumlicher und zeitlicher Desorientiertheit, Koordinationsstörungen, Antriebslosigkeit, Harn- und Stuhlinkontinenz sowie Persönlichkeitsveränderungen bzw. -verlust entwickelt. Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium ist eine selbstständige Lebensführung oft nicht mehr möglich. In den meisten Fällen treten Demenzen erst im höheren Lebensalter auf, denn es sind nur etwa 2 % der Fünfundsechzigjährigen und mehr als 30 % der Neunzigjährigen davon betroffen. Somit nimmt die Häufigkeit dementieller Syndrome mit steigendem Lebensalter stark zu (Aktories et al. 2009, Mutschler et al. 2013).

Nach ätiopathogenetischen Gesichtspunkten werden Demenzen folgendermaßen unterteilt:

- Demenz bei Alzheimer-Erkrankung,
- vaskulär bedingte Demenzen,
- Mischformen beider Typen,
- Demenzen bei anderen neurodegenerativen Krankheiten (z.B. bei Chorea Huntington oder Morbus Parkinson) und
- (sekundäre) Demenzen nach bzw. bei Infektionen (z.B. mit HIV), Hirntraumen, Hirntumoren oder Intoxikationen (z.B. mit Alkohol) (Mutschler et al. 2013).

Ein Morbus Alzheimer lässt sich heute durch die verfügbaren diagnostischen Verfahren mit hoher Wahrscheinlichkeit erkennen, wobei eine absolut sichere Diagnose erst post mortem möglich ist. Bei der Obduktion lässt sich eine generalisierte Hirnatrophie feststellen. Weiters liegen intrazelluläre Faserbündel, die Tau-Proteine enthalten, sowie extrazelluläre Plaques und Fibrillen, die aus β -Amyloid-Proteinen, die aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Präkursor-Protein (APP) gebildet werden, aufgebaut sind, vor. Eine wichtige Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung spielen die sogenannten Sekretasen, die APP in kleinere Polypeptide spalten. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die α -Sekretase das lösliche APP bildet, welches neuroprotektiven Einfluss ausübt, während die β - und γ -Sekretasen verantwortlich für die Bildung von zelluntergangsfördernden β -Amyloiden sind. Familiäre Formen der Alzheimer-Demenz sind häufig durch Mutationen von APP sowie von Presenilin-Genen gekennzeichnet, die u.a. die Bildung von β -Amyloiden begünstigen (Mutschler et al. 2013).

Zusätzlich zu den β -Amyloiden tragen auch „oxidativer Stress“, lokale Entzündungen und eine überschießende NMDA-Rezeptor-Aktivierung zur Neurodegeneration bei (Aktories et al. 2009).

Vom Nervenzelluntergang sind vor allem cholinerge Neuronen betroffen, wodurch die Lern- und Gedächtnisleistung maßgeblich beeinträchtigt werden. Im Vordergrund stehen hier besonders die cholinergen Neuronen im Nucleus basalis Meynert, von dem etwa 90 % der cholinergen Bahnen zum Neocortex ausgehen (Mutschler et al. 2013).

Weiters sind auch noch andere Regionen im Gehirn von einer Neuronen- und Nervenzellfortsatz-Degeneration betroffen wie z.B. der medialen Temporalappen. Allerdings machen sich klinische Symptome erst dann bemerkbar, wenn ca. 70 % der betreffenden Neuronen zerstört sind (Mutschler et al. 2013).

1.1.1. Therapie von Morbus Alzheimer:

Grundsätzlich ist hier zu erwähnen, dass die medikamentöse Therapie dementieller Syndrome nur eingeschränkt möglich ist. Dies beruht insbesondere auf der Tatsache, dass sich eine Demenz erst dann symptomatisch bemerkbar macht, wenn bereits ein Großteil der betroffenen Neuronen zerstört ist. Außerdem liegt die Schwierigkeit der medikamentösen Behandlung auch darin, dass bei einer Demenz mehrere neuronale Systeme mit unterschiedlichen Neurotransmittern betroffen sind, welche sich nur sehr schwierig durch einen oder mehrere Arzneistoff/e gleichzeitig positiv beeinflussen lassen (Mutschler et al. 2013).

Deshalb wäre es in der Zukunft von großer Bedeutung, Möglichkeiten zur Frühdiagnose von Demenzen zu entwickeln bzw. zu optimieren (Mutschler et al. 2013).

1.1.1.1. Substanzen, die die cholinerge Neurotransmission beeinflussen

Hintergedanke beim Einsatz dieser Substanzen ist es, die cholinerge Erregungsübertragung, die bei der Alzheimer-Erkrankung beeinträchtigt wird, zu verbessern. Dies wäre prinzipiell möglich durch Acetylcholinpräkursoren, cholinerge Agonisten und Acetylcholinesterasehemmstoffen, wobei sich nur die letzteren als therapeutisch einsetzbar erwiesen haben (Mutschler et al. 2013).

Folgende zentral wirksame Substanzen dieser Arzneistoffgruppe sind zur Behandlung der leichten bis mittelschweren Alzheimer-Demenz zugelassen:

- Donepezil
- Galantamin
- Rivastigmin

Allerdings ist zu erwähnen, dass die klinische Effektivität der Acetylcholinesterasehemmer limitiert ist; nichtsdestotrotz ermöglicht diese Substanzklasse im Vergleich zu Placebo eine Stabilisierung der kognitiven Leistung über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten (Mutschler et al. 2013).

1.1.1.2.Nichtkompetitive NMDA-Antagonisten

Ein wesentlicher pathogenetischer Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen ist die sogenannte Exzitotoxizität. Darunter versteht man die Überstimulierung von NMDA-Rezeptoren und die dadurch bedingte Überladung der Nervenzellen mit Calciumionen. Daher macht der Einsatz von NMDA-Antagonisten als Antidementiva Sinn, vorausgesetzt die Substanz interagiert nicht mit der eigentlichen Glutamat-Bindungsstelle, sondern greift nichtkompetitiv im Inneren des NMDA-gesteuerten Ionenkanals in der Region der Magnesium-Bindungsstelle an, damit die normale glutamaterge Neurotransmission nicht übermäßig beeinflusst wird. Zusätzlich darf die Blockade des Kanals nicht zu lange andauern, da dies einen anhaltenden Funktionsausfall bedingen würde, demzufolge der Antagonist rasch von der Bindungsstelle abdissoziieren muss (Mutschler et al. 2013).

Diese Voraussetzungen werden vom nichtkompetitiven NMDA-Antagonist Memantin erfüllt. Durch zahlreiche Studien konnte der positive Einfluss dieser Substanz in Bezug auf kognitive Fähigkeiten, Antrieb, soziale Kompetenz und Funktionen des täglichen Lebens belegt werden. Memantin stellt die bislang einzige Substanz dar, die für die Therapie von mittelschwerem bis schwerem Morbus Alzheimer zugelassen ist (Mutschler et al. 2013).

1.1.1.3.Nootropika

Hierbei handelt es sich um eine in Bezug auf chemische Aspekte sehr unterschiedliche Stoffklasse, deren Wirkung darauf beruhen soll, dass sie den Gehirnstoffwechsel beeinflussen und dadurch verschiedene Hirnleistungen, vor allem Gedächtnis, Konzentrationsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Orientierung und Urteilsvermögen, verbessern sollen. Das heißt also, ihre Wirkung basiert nicht bzw. nur sehr geringfügig auf zentral stimulierenden Effekten (Mutschler et al. 2013).

Anzumerken ist, dass deren Wirksamkeit bei Hirnleistungsstörungen als stark umstritten gilt, da zwar in Studien Effekte mit statistischer Signifikanz nachgewiesen wurden, diese aber klinisch gesehen nur wenig relevant sind

(Mutschler et al. 2013).

Zu dieser Arzneistoffklasse zählen:

- Nicergolin
- Piracetam
- Pyritinol

1.1.1.4.Ginkgo biloba

Vor allem in der Selbstmedikation finden Präparate aus dem Trockenextrakt der Ginkgobaumblätter zur Demenzbehandlung Anwendung. Wesentliche Inhaltsstoffe stellen dabei Flavonglykoside und Terpenlactone dar (Mutschler et al. 2013).

Trotz der Hinweise, dass insbesondere Patienten, die zusätzlich zu den kognitiven Einbußen auch an psychiatrischen Erkrankungen leiden, von Ginkgo biloba profitieren, werden diese Ergebnisse in Bezug auf ihre klinische Relevanz, ähnlich wie bei den Nootropika, kontrovers diskutiert (Mutschler et al. 2013).

1.1.1.5.Radikalfänger

Basierend auf der Annahme, dass die Entstehung freier Radikale eine potentielle Ursache für die Hirnzellschädigung ist, wurde vermutet, dass Substanzen, die entweder die Bildung von Radikalen verhindern oder diese unschädlich machen, neuroprotektive Wirkung haben. Allerdings konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, dass Radikalfänger wie Vitamin A, C oder E einen klinischen Nutzen erbringen (Mutschler et al. 2013).

1.2. Acetylcholin

Acetylcholin ist ein biogenes Amin mit einer hohen biologischen Aktivität. Es fungiert als Neurotransmitter an allen Nervenendigungen des parasympathischen und an den präganglionären Synapsen des sympathischen Nervensystems, an den neuromuskulären Synapsen und im Zentralnervensystem (Hunnius 2004).

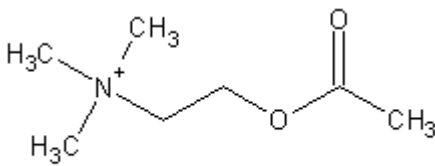


Abbildung 1: Acetylcholin

1.2.1. Acetylcholinrezeptoren

1.2.1.1. Nicotinrezeptoren

Nicotinrezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die nicht nur durch Acetylcholin sondern auch durch Nicotin stimuliert werden können. Man findet sie in zentralen und ganglionären Neuronen sowie an der neuromuskulären Endplatte (Mutschler et al. 2013).

1.2.1.2. Muscarinrezeptoren

Bei den Muscarinrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch Acetylcholin sowie Muscarin aktiviert werden können. Man unterscheidet zwischen 5 Subtypen:

- M₁-Rezeptoren findet man hauptsächlich in neuronalen Strukturen wie ZNS und Ganglien. Diese spielen bei Gedächtnis- und Lernvorgängen bei der ganglionären Übertragung eine wichtige Rolle.

- M₂-Rezeptoren liegen vor allem am Herzen vor; bei Stimulation kommt es zu einer Erniedrigung der Herzfrequenz.
- M₃-Rezeptoren sind an der glatten Muskulatur und den exokrinen Drüsen funktionell bedeutsam; deren Interaktion mit einem Agonisten bewirkt eine Kontraktion bzw. Sekretion.
- M₄-Rezeptoren findet man u.a. im Vorderhirn, Hippocampus und Striatum, jedoch ist ihre physiologische Funktion noch nicht ausreichend untersucht. Sie sind nachweislich am Schmerzgeschehen beteiligt.
- M₅-Rezeptoren sind insbesondere im Zentralnervensystem vorhanden und eventuell für die Vasodilatation zerebraler Arteriolen und die Dopaminfreisetzung im Striatum von Bedeutung (Mutschler et al. 2013).

Muscarinrezeptoren kommen sowohl postsynaptisch als auch präsynaptisch vor, wobei die Erregung präsynaptischer Rezeptoren die Acetylcholinfreisetzung hemmt (Mutschler et al. 2013).

1.2.2. Acetylcholinwirkungen

Wird Acetylcholin intravenös verabreicht, so treten folgende, sehr kurz andauernde Wirkungen auf:

- Abnahme der Herzfrequenz, d.h., eine negativ chronotrope Wirkung,
- Abnahme der Kontraktionskraft der Vorhofmuskulatur, d.h., eine negativ inotrope Wirkung,
- Verzögerung der atrioventrikulären Erregungsüberleitung, d.h., eine negativ dromotrope Wirkung,
- Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes,
- Steigerung der Speichel-, Magensaft-, Bronchial- und Schweißsekretion,
- Zunahme des Tonus der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, der ableitenden Harnwege und der Bronchialmuskulatur,
- Verengung der Pupille und

- Akkommodation des Auges auf den Nahpunkt (Mutschler et al. 2013, Thews et al. 1999).

Diese Wirkungen treten auf, da es nach der Bindung von Acetylcholin an seinen Rezeptor zur Veränderung der Membranpermeabilität für Natrium-, Kalium- und Calciumionen kommt. An der motorischen Endplatte und den Ganglienzellen wird die Permeabilität für Natriumionen wesentlich stärker erhöht als die für Kaliumionen, woraus eine Depolarisation resultiert. An den Schrittmacherzellen des Herzens kommt es, bedingt durch die gesteigerte Kaliumpermeabilität, zu einer Hyperpolarisation, woraufhin die Herzfrequenz abnimmt. Bei Drüsenzellen und verschiedenen Geweben der glatten Muskulatur führt Acetylcholin zu einem verstärkten Calciumeinstrom mit der Folge der Aktivierung der Sekretion bzw. Ermöglichung der Kontraktion. Ist das Gefäßendothel intakt, so bewirkt Acetylcholin eine NO-Freisetzung und somit eine Gefäßerschaffung. Außerdem reduziert Acetylcholin durch Stimulierung von präsynaptischen Heterorezeptoren die Freisetzung von Noradrenalin (Mutschler et al. 2013).

1.2.3. Acetylcholinfreisetzung, -speicherung und -abbau

Die Freisetzung von Acetylcholin erfolgt durch die Erregung parasympathischer Nervenfasern. Danach wird es sehr rasch von der spezifischen Acetylcholinesterase, welche sowohl in der prä- als auch postsynaptischen Membran lokalisiert ist, in Cholin und Essigsäure gespalten. Cholin wird wieder ins Axon aufgenommen, und mittels Cholinesterase entsteht aus Cholin und Acetyl-CoA wieder Acetylcholin; die Essigsäure hingegen wird mit dem Blut abtransportiert (Mutschler et al. 2013).

Neben der membrangebundenen, spezifischen Acetylcholinesterase findet man in Blut und Leber auch eine unspezifische Cholinesterase, die sogenannte Butyrylcholinesterase bzw. Pseudocholinesterase. Diese hydrolysiert nicht nur Acetylcholin sondern auch andere Cholinester und verhindert eine vom Freisetzungsort entfernte Acetylcholinwirkung (Mutschler et al. 2013).

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten zwei am Department für Pharmazeutische Chemie von Frau DI (FH) Claudia Mayer synthetisierte Substanzen mit den Bezeichnungen BLV10ox und CMC44ox auf ihr Nebenwirkungsprofil untersucht werden. Bei den beiden Substanzen handelt es sich um selektive Hemmstoffe der Butyrylcholinesterase, die somit zu einer Arzneistoffklasse zählen, die Einsatz bei der Therapie von Morbus Alzheimer findet.

Zur Ermittlung des pharmakologischen Profils der beiden Substanzen wurden folgende isolierte und anschließend präparierte Meerschweinchenorgane herangezogen:

- Organe der glatten Muskulatur: Aorta (Aorta descendens), Lungenarterie (Arteria pulmonalis) und Krumm- bzw. Hüft darm (terminales Ileum), sowie
- Organe der quergestreiften Muskulatur: rechter Vorhof (Atrium cordis dextrum) und Papillarmuskel (Musculus papillaris).

Da Acetylcholin mehrfach Einfluss auf das Herz ausübt, lag besonders dieses Organ im Fokus der Untersuchungen in Bezug auf die Nebenwirkungen.

Aufgrund der Acetylcholinwirkungen wären hier eine negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung beider Testsubstanzen zu erwarten.

An den glattmuskulären Organen, sprich den Präparaten von Aorta, Lungenarterie und Krumm- bzw. Hüft darm, wurde die in Hinblick auf eine vermutete Abnahme der Kontraktionskraft vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Feststoffe

3.1.1. Testsubstanz BLV10ox

3.1.1.1. Strukturformel

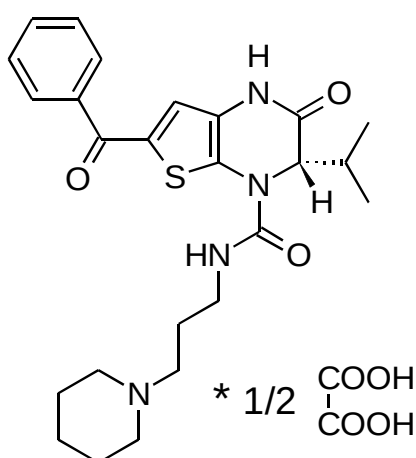


Abbildung 2: BLV10ox

Vom chemischen Standpunkt betrachtet, handelt es sich bei der Testsubstanz BLV10ox um ein Salz der Oxalsäure, welches in Form eines Thienodiazin-Derivates vorliegt. Der vollständige nomenklatorische Name lautet *N*4-(3-piperidinopropyl)-(3*S*)-6-benzoyl-3-isopropyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*b*]pyrazin-4-carboxamid Oxalat.

Die Verbindung liegt als ein intensiv gelbes und feinkörniges Pulver vor.

3.1.1.2. Summenformel und Molmasse

Die Summenformel von BLV10ox lautet $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$.

Die Molmasse der Testsubstanz beträgt 513,63 g/mol.

3.1.1.3. Physiologische Wirkung

Wie schon im Kapitel 2 erwähnt, handelt es sich bei der Testverbindung BLV10ox um eine von Frau DI(FH) Claudia Mayer im Zuge ihrer noch nicht publizierten Dissertation am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisierte Substanz, die als Inhibitor der Butyrylcholinesterase fungiert.

3.1.2. Testsubstanz CMC44ox

3.1.2.1. Strukturformel

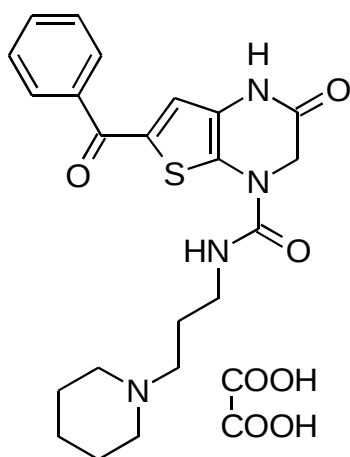


Abbildung 3: CMC44ox

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei der Testsubstanz CMC44ox ebenfalls um ein Salz der Oxalsäure, welches in Form eines Thienodiazin-Derivates vorliegt. Die vollständige nomenklatorische Bezeichnung lautet *N*4-(3-piperidinopropyl)-6-benzoyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*b*]pyrazin-4-carboxamid Oxalat.

CMC44ox unterscheidet sich chemisch gesehen im Vergleich zur Testsubstanz BLV10ox lediglich durch das Fehlen der Isopropylgruppe in Position 3, wodurch

CMC44ox kein Chiralitätszentrum aufweist.

Auch diese Verbindung liegt in Form eines gelben Pulver vor.

3.1.2.2. Summenformel und Molmasse

Die Summenformel von CMC44ox lautet $C_{24}H_{28}N_4O_7S$.

Die Molmasse der Testsubstanz beträgt 516,57 g/mol.

3.1.2.3. Physiologische Wirkung

Siehe 3.1.1.3

3.2. Verwendete Lösungen

3.2.1. Tyrode (Physiologische Nährlösung)

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode (physiologischen Nährlösung)

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

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NaCl	67,2 ml
KCl	70,0 ml
NaHCO ₃	167,4 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ PO ₄	2,36 ml
CaCl ₂	6,4 ml
Glucose	3,96 g

Bei dieser Nährlösung handelt es sich um eine Modifikation der Krebs-Henseleit-Lösung, die entsprechend der Vorschrift nach Reiter (1967) hergestellt wird. Die Bestandteile dieser Lösung umfassen verschiedene Ionen sowie Glucose und sind notwendig, um die physiologische Funktion der isolierten Organe aufrecht zu erhalten.

Die Tyrode wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt, wobei folgendermaßen vorgegangen wurde: In einem 2 Liter- Messkolben wurden zunächst alle in der Tabelle 1 angegebenen Bestandteile, mit Ausnahme von Calciumchlorid, in der jeweils vorgeschriebenen Menge zusammengeführt. Anschließend wurde der Kolben auf ca. drei Viertel des Volumens mit Aqua bidestillata aufgefüllt und kräftig geschüttelt, damit eine gleichmäßige Durchmischung der Inhaltsstoffe gewährleistet war. Danach musste die Lösung für etwa 20 Minuten mit Oxymix (Carbogen), wobei es sich um ein Gasgemisch handelte, welches sich aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid zusammensetzte, begast werden. Dies führte einerseits zu einer Sättigung der Nährlösung mit Sauerstoff und andererseits zur Gewährleistung eines konstanten pH-Wertes von 7,2 – 7,4. Anschließend konnte das zuvor im Kühlschrank aufbewahrte Calciumchlorid tropfenweise mit einer Pipette zugesetzt werden. Zu beachten war, dass die Zugabe des Calciumchlorids langsam erfolgen musste, da sonst die Gefahr bestand, dass es zur Bildung schwerlöslicher Calciumsalze kam, die in weiterer Folge eine Trübung der Tyrode bedingt und diese damit unbrauchbar gemacht hätten. Als letzter Schritt wurde der Kolben noch bis zur 2 Liter-Markierung mit Aqua bidestillata

aufgefüllt.

Die fertige Tyrode wurde dann am jeweiligen Versuchstag sowohl während der Präparation und der Lagerung als auch während der Versuchsabläufe zur Aufrechterhaltung der Funktion der Organe verwendet.

3.2.2. KCl-Lösungen

Für die Versuche an der glatten Muskulatur, sprich Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum, mussten die Organbäder mit Kaliumchloridlösung befüllt werden, wodurch es zu einer maximalen Kontraktion der glatten Muskelzellen kam. Dies war notwendig, damit im Anschluss auf eine vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz geschlossen werden konnte.

Auch die Kaliumchloridlösung wurde jeden Tag frisch bereitet, wobei die Herstellung folgendermaßen durchgeführt wurde: Je nach Versuchsorgan wurde die notwendige Menge an Kaliumchlorid (siehe Tabelle 3) auf einem Kartenblatt eingewogen. Anschließend wurde das gewogene Kaliumchlorid in einen 100 ml Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit der an diesem Tag bereiteten Tyrode aufgefüllt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Kaliumchlorid-Lösungen

<i>Präparat</i>	<i>g KCl / 100 ml Tyrode</i>	<i>Konzentration (mmol/l)</i>
Aorta descendens Arteria pulmonalis	0,67	90
Terminales Ileum	0,45	60

3.2.3. Dimethylsulfoxid (DMSO)

Da beide Testsubstanzen nicht ausreichend in Wasser löslich waren, wurde

Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel zur Herstellung der Versuchslösung herangezogen.

Bei DMSO handelt es sich um eine hygroskopische, farb- und geruchlose Flüssigkeit, die - verglichen mit anderen organischen Lösungsmitteln - nur eine schwache und in niedriger Konzentration vernachlässigbare zytotoxische Wirkung aufweist (Douglas. 1946, Sexton. 1979, Da Violante et al. 2002).

Da auch DMSO zumindest geringfügig eine Auswirkung auf Chronotropie, Inotropie und Gefäß- und Eingeweidemuskeltonus aufweist, mussten die Messwerte bei deren Auswertung diesbezüglich angeglichen werden, was mit Hilfe eines Korrekturfaktors erfolgte, der bereits in vorangegangenen Versuchen ermittelt worden war.

3.3. Die Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche wurden ausschließlich Organe männlicher und weiblicher Meerschweinchen des „TRIK“-Stammes herangezogen. Dabei handelt es sich um Auszucht-Meerschweinchen, die aus einem Grazer Reptilienzoo bezogen wurden. Die Tiere wiesen eine durchschnittliche Masse von 250 – 600 Gramm auf.

Der Grund, warum diese Versuche ausgerechnet an Meerschweinchen-Organen durchgeführt wurden, ist jener, dass die Ionenströme dieser Tiere - nebenbei bemerkt auch jene von Schweinen - denen des menschlichen Herzens ähnlich sind.



Abbildung 4: Versuchstiere

3.4. Entnahme, Isolierung und Präparation der Versuchsorgane

3.4.1. Entnahme der Versuchsorgane

An jedem Versuchstag wurde zunächst ein Meerschweinchen mittels präzisen Genickschlags getötet, wodurch der Tod rasch und schmerzfrei eintrat. Direkt im Anschluss wurde der Thorax mit Hilfe einer Schere geöffnet und das noch schlagende Herz entnommen. In weiterer Folge wurde ein Teil des terminalen Ileums herausgeschnitten, ebenso wie die thorakale Aorta.

Diese Organe wurden unmittelbar nach Entnahme separat in ein Becherglas mit der frisch bereiteten Tyrode gegeben und möglichst rasch mit Oxy mix (Carbogen) begast, um ein Absterben der Organe zu verhindern.

3.4.2. Isolierung und Präparation der Versuchsorgane

Unmittelbar nach der Organentnahme erfolgte unter einem Lichtmikroskop die Präparation. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Organ mit Hilfe von zwei Präpariernadeln auf einer am Boden mit einer dünnen Korkschicht bedeckten und mit physiologischer Nährlösung befüllten Petrischale fixiert. Um den Auftrieb des Korkrings zu vermeiden, wurde dieser mit einem Gummischlauch beschwert. Bei der Präparation kamen weiters Spitzscheren, Federscheren, Pinzetten und Pasteurpipetten zum Einsatz.

Anschließend wurden die Präparate bis zur Durchführung der Versuche in einem mit Tyrode, welche mit Oxygymix (Carbogen) begast wurde, befüllten Becherglas aufbewahrt.



Abbildung 5: Arbeitsplatz mit Lichtmikroskop und Präparierbesteck

3.4.2.1. Aorta (Aorta descendens)

Von der entnommenen Aorta wurden jegliche Muskel- und Gewebereste mit Hilfe einer Federschere entfernt. Dabei war mit größter Vorsicht vorzugehen, da

die Aorta bei diesem Vorgang nicht zu stark gedehnt werden durfte und auch keine Einschnitte des Gefäßes entstehen durften. Danach wurde das Organ in ringförmige Stücke mit einer Länge von 2-3 mm geschnitten.



Abbildung 6: isolierte und von Muskel- und Geweberesten befreite Aorta

3.4.2.2. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Unter dem Mikroskop musste die Arteria pulmonalis von Überresten an Lungen- und Fettgewebe sowie von Perikardresten befreit werden. Danach konnte sie abgeschnitten werden, wobei es von Bedeutung war, dass man sie möglichst herznah abtrennte, da nur das kurze Stück bis zur Trennung in linke und rechte Arterie verwendet werden konnte. Anschließend wurde sie analog zur Aorta descendens aufarbeitet und letztendlich in ca. 3 mm lange Ringe geschnitten.

3.4.2.3. Hüft- bzw. Krummdarm (Terminales Ileum)

Die Präparation des Darms erfolgte erst unmittelbar vor dem Versuchsbeginn. Zuerst wurde ein ca. 0,5 cm großes Stück vom entnommenen Darm abgeschnitten, wobei es wichtig war, dass man die Enden gegengleich

abschrägte. Jedes Ende wurde dann mit jeweils einer Präpariernadel in einer mit einem Korkring ausgelegten und mit Tyrode befüllten Petrischale fixiert, wobei die Präpariernadeln so angebracht wurden, dass das Darmlumen offen blieb. Mit einer Pipette wurde der Darm zunächst vorsichtig durchgespült, um Chymus-Reste zu entfernen. Anschließend wurde dann an den beiden Enden mit Hilfe eines Fadens jeweils ein Häkchen angebracht, welches notwendig war, um das Präparat in die Apparatur einzubringen. Beim Anbringen der Häkchen war es wichtig, dass der Faden so gebunden wurde, dass das Darmlumen offen blieb; dies war auch der Grund für die Abschrägung der beiden Enden.



Abbildung 7: ein Stück des entnommenen terminalen Ileums

3.4.2.4. Rechter Vorhof (Atrium cordis dexter)

Direkt nach der Entnahme des Herzens wurde dieses in die Nährlösung eingebracht, um eine Hypoxie sowie eine Koagulation des Blutes im Organ zu verhindern. Durch die Kontraktion des Herzens wurde dieses sowohl innen als auch außen vom Blut befreit.

Die Präparation erfolgte aufgrund der geringen Größe unter dem Mikroskop, wobei zunächst umgebenes Binde- und Fettgewebe sowie anhaftende

Lungenteile mit einer Federschere entfernt werden mussten. Dann wurde das Herz an Basis und Spitze mittels Präpariernadeln in einer mit Kork ausgelegten Petrischale fixiert. Entlang des Sulcus Coronarius wurde der rechte Vorhof vom Ventrikel abgetrennt. Im rechten Vorhof befindet sich der Sinusknoten, welcher den primären Schrittmacher des Herzens darstellt und somit maßgeblich für die Schlagfrequenz des Herzens ist. Genauer gesagt, befindet er sich in der rechten Vorhofwand in der Nähe der Einmündung der Vena cava superior.

Auch hier musste wieder am oberen und unteren Ende des rechten Vorhofs jeweils ein Häkchen angebracht werden, um das Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen. Dies erfolgt im Wesentlichen analog zum terminalen Ileum.

Nach Befestigung der Häkchen wurde das fertige Präparat bis zum Versuchsbeginn wieder in eine mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung eingebracht.



Abbildung 8: präparierter rechter Vorhof

3.4.2.5. Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Nach Entfernung des rechten Vorhofs wurde das rechte Ventrikel entlang des

Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten, aufgeklappt und mit Präpariernadeln am Kork fixiert. Dadurch waren die Papillarmuskeln erst einmal freigelegt; insgesamt liegen in der rechten Herzkammer drei und in der linken Herzkammer zwei kegelförmige Papillarmuskeln vor. Anschließend mussten die Purkinjefasern vorsichtig entfernt werden, damit nicht deren Spontanaktivität den Versuch ungünstig beeinflussen konnte.

Danach wurde am Ansatz der Papillarmuskelsehne mittels Faden ein Silberhäkchen angebracht, und durch vorsichtiges Durchschneiden der Sehne konnte das gewünschte Muskelpräparat gewonnen werden.



Abbildung 9: präparierter Papillarmuskel

3.5. Versuchsanordnung

Die Messung der Kontraktionskraft der Organe stellte die Basis der Versuchsordnung dar. Um dies zu ermöglichen, wurde das untere Ende des jeweiligen Organs unbeweglich befestigt und das obere Ende mittels Silberdraht mit einem Kraftwandler, welcher das ausschlaggebende Element darstellte, um die mechanische Bewegung der Organe in elektrische Signale umzuwandeln, verbunden. Trat nun eine Dehnung auf, so traf der stetige Stromfluss durch den enthaltenen Dehnungsmessstreifen auf größeren Widerstand. Bei

gleichbleibender Spannung änderte sich gemäß des Ohm'schen Gesetzes die Stromstärke direkt proportional zur Widerstandsänderung. Durch einen Verstärker (Transbridge TM, 4-Channel Transduce Amplifier, World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) wurde dieses elektrische Signal amplifiziert und schließlich vom angeschlossenen Schreiber (Recorder BD-112, Dual Channel, Kipp & Zonen, Niederlande) auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

3.5.1. Aufbau der Versuchsaapparaturen

Für die Durchführung der Versuche kamen zwei verschiedene Apparaturen zum Einsatz, welche sich im Prinzip lediglich durch den Aufbau und das Fixierungsschema unterschieden.

Apparatur 1 wurde ausschließlich für die Testung der Substanzen am Papillarmuskel herangezogen, wohingegen die Apparatur 2 für die Untersuchungen an den restlichen Organen, sprich Aorta, Lungenarterie, rechtem Vorhof und auch dem Darm verwendet wurde.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, war es von größter Bedeutung, dass die Versuche unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt wurden. Diese Rahmenbedingungen umfassten eine konstante Gaszufuhr und Temperatur sowie einen physiologischen und einheitlichen pH-Wert und eine kontinuierliche Handhabung.

3.5.1.1. Apparatur 1

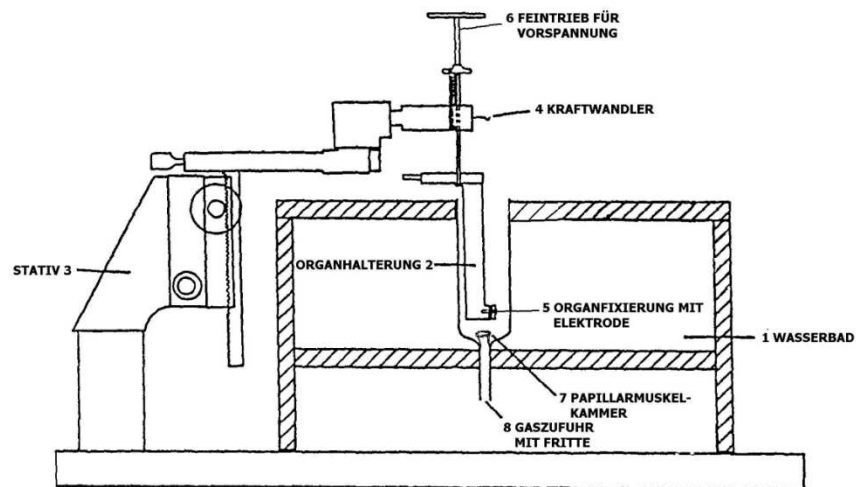


Abbildung 10: Skizze der Apparatur 1

Wie schon im Kapitel 3.5.1 erwähnt, fand diese Apparatur Anwendung für die Untersuchungen am Papillarmuskel. Der Einsatz dieser Apparatur war notwendig, weil der Papillarmuskel keine spontanen Erregungen aufweist. Durch den unmittelbaren Kontakt mit der Elektrode wurde der Muskel mittels Anapulse Stimulators (Model Isostim 301T, World Precision Instruments (WPI), Hamden (CT, USA)) elektrisch stimuliert.

Die beiden Hauptkomponenten dieser Apparatur stellten einerseits ein mit Aqua bidestillata befülltes Wasserbad, in dessen Abdeckung ein Organbad, welches ein Fassungsvermögen von 27 ml aufwies, eingelassen war, und andererseits ein Stativ mit entsprechender Vorrichtung zum Einbringen des präparierten Organs, dar. Dieses Stativ konnte mittels Stativschlitten abgesenkt bzw. angehoben werden, wodurch es möglich war, das Präparat während des Versuchs vollständig in das mit Tyrode befüllte Organbad einzutauchen.

Um physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurde einerseits das Wasserbad mittels Thermostat und Heizspirale auf eine weitgehend konstante Temperatur von $35 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt und andererseits das Organbad über eine Glasfritte ständig mit Oxymix (Carbogen) begast, was - wie schon unter 3.2.1. erwähnt - sowohl für eine ausreichende Sauerstoffversorgung als auch für einen physiologischen pH-Wert von 7,2 – 7,4 sorgte.

Wurde die Versuchsanordnung entsprechend vorbereitet, sprich nach Erreichen der entsprechenden Temperatur des Wasserbades, Spülung des Organbades mit Aqua bidestillata und Tyrode sowie anschließender Befüllung des Organbades mit 25 ml Tyrode und Aufdrehen des Gashahnes, konnte das zuvor präparierte Organ (siehe 3.4.2.5.) in die Apparatur eingebracht werden. Dafür wurde das Präparat an einem Steg aus Plexiglas durch Einhängen des vorher angebrachten Silberhäkchens am Silberdraht der Apparatur mit einem Kraftwandler verbunden. Daraufhin wurden wenige Millimeter des frei hängenden Muskels zwischen einer Platinelektrode, welche als Kathode fungierte, und einer Plexiglasscheibe mittels Feststellschraube fixiert. Anschließend wurde das Organ durch Senken des Stativschlittens in das mit Tyrode befüllte Organbad eingebracht.

Damit gleichbleibende Versuchsbedingungen und somit die Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet war, musste vor dem eigentlichen Versuchsbeginn eine entsprechende Vorspannung mittels Feintreib angelegt werden, die zusätzlich auch dazu diente, um eine maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Um die Kontraktionskraft messen zu können, kam ein Kraftwandler (siehe 3.5.) zum Einsatz, welcher die Muskelkontraktion in elektrische Impulse überführte, die dann mittels Verstärker amplifiziert und dann durch einen Schreiber dokumentiert wurden.



Abbildung 11: Originalabbildung der Apparatur 1

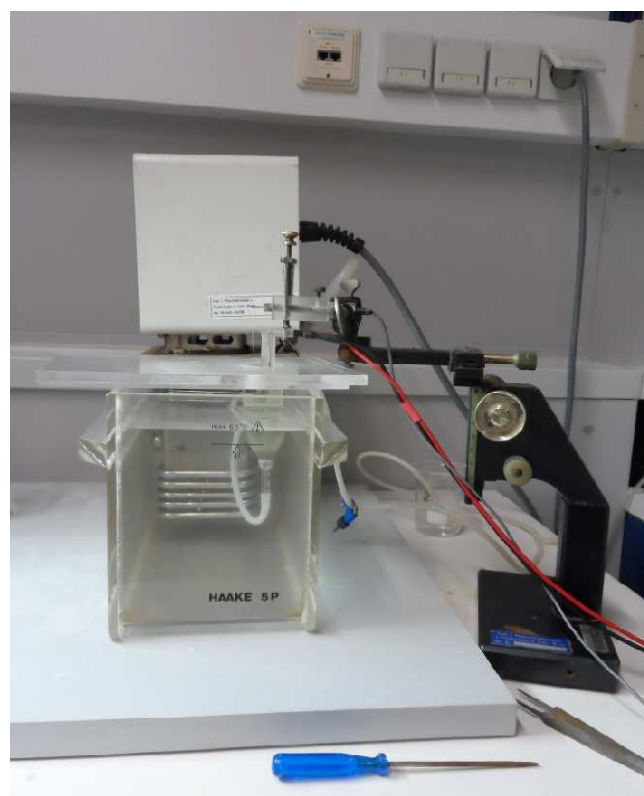


Abbildung 12: Originalabbildung der Apparatur 1

3.5.1.2. Apparatur 2

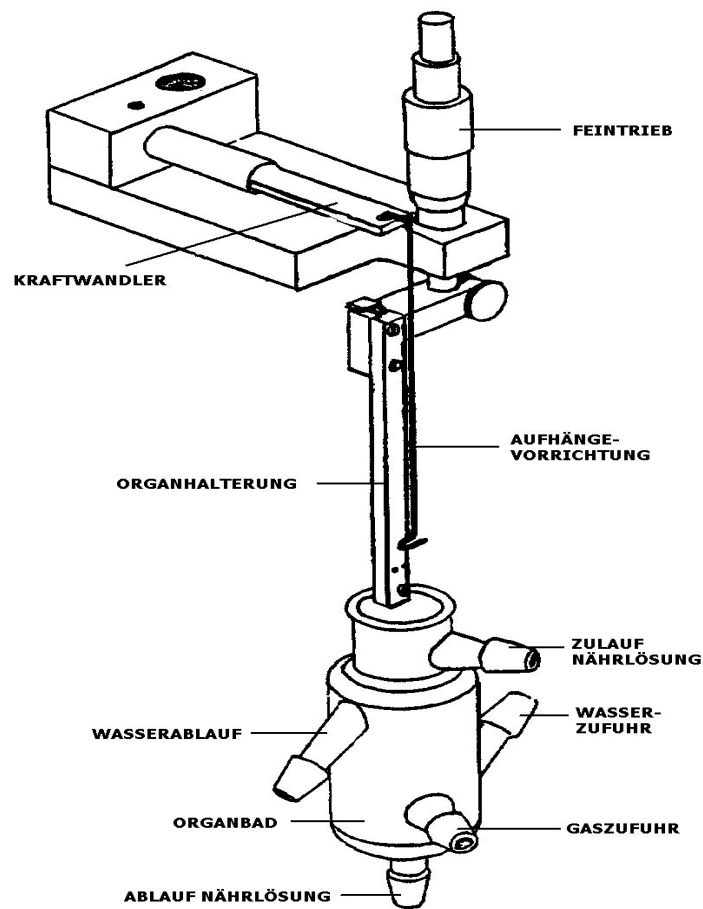


Abbildung 13: Skizze der Apparatur 2

Diese Apparatur kam für die Durchführung der Versuche von Aorta, Lungenarterie, rechtem Vorhof und auch des Darmes zum Einsatz. Auch diese Apparatur bestand aus einem Organbad, welches je nach Fassungsvermögen entweder mit 8 ml oder 25 ml frisch bereiteter Tyrode befüllt wurde, und einem Stativ mit Halterung für das Präparat sowie einem Kraftwandler und Feintrieb.

Im Unterschied zur Apparatur 1 wies Apparatur 2 ein Organbad auf, bei dem es sich um ein doppelwandiges Glasgefäß handelte, wodurch es hier nicht nötig war, dass das Organbad direkt ins Wasserbad eintauchte, sondern das temperierte Wasser zwischen der Doppelwand hindurch floss. Bei den Versuchen an glattmuskulären Organen wurde die Temperatur des Wassers weitgehend konstant auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$, beim rechten Vorhof auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ gehalten.

Bei dieser Apparatur wurde die sich im Organbad befindliche physiologische Nährlösung ebenso wie bei Apparatur 1 ununterbrochen mit Oxymix (Carbogen) begast.

Das Einbringen der Präparate in die Apparatur war abhängig vom jeweiligen Organ. So konnten die fertig präparierten Aorta- und Lungenarterienstücke direkt zwischen der Aufhängevorrichtung und dem Drahtstück am unteren Ende des Stegs eingespannt werden.

Im Gegensatz dazu wurden der rechte Vorhof und das terminale Ileum mittels Silberhäkchen, die zuvor angebunden wurden, in die Einhängevorrichtung der Apparatur eingebracht.

Ebenso wie bei Apparatur I wurde auch hier vor Versuchsstart eine Vorspannung angelegt, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten.

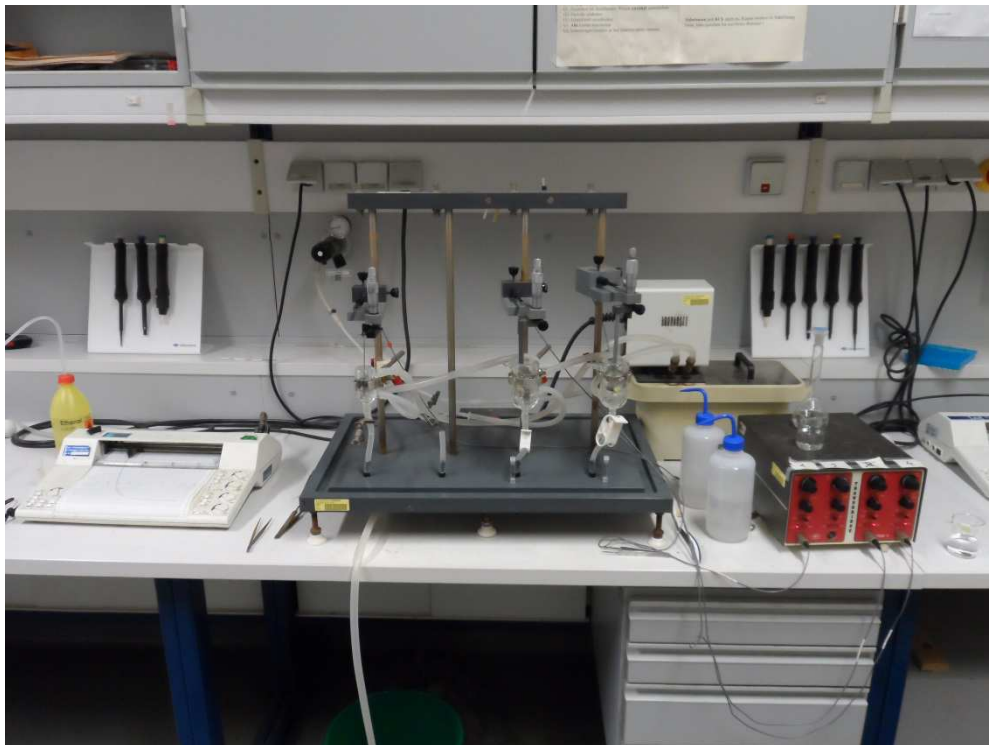


Abbildung 14: Originalabbildung der Apparatur 2

3.6. Versuchsablauf

3.6.1. Allgemeiner Versuchsablauf

Der prinzipielle Versuchsablauf bei den verschiedenen Organpräparaten basierte auf einem einheitlichen Schema. Nach Erreichen der eingestellten Temperatur des Wasserbades, Spülung des Organbades mit Aqua bidestillata und Tyrode sowie Befüllung dieser Kammer mit dem entsprechenden Volumen an Tyrode konnte das entsprechende Organ - wie unter 3.5.1.1. bzw. 3.5.1.2. beschrieben - in die Apparatur eingebracht werden. Nach Anlegen der Vorspannung und einer kurzen Zeitspanne von 20 Minuten, in der sich das Präparat an die umgebenden Bedingungen gewöhnen konnte, wurde dann die Kontraktionskraft des Organs ohne und anschließend mit der entsprechenden Testsubstanz gemessen. Die Messung ohne die zu untersuchende Substanz erfolgte während der Kontrollzeit, welche abhängig davon war, wie schnell eine Konstanz der Muskelfunktion eintrat, jedoch mindestens 45 Minuten beanspruchte. Anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanz. Dabei handelte es sich um eine kumulative Wirkstoffzugabe, wobei jeweils eine Zeitspanne von 45 Minuten abgewartet wurde, ehe es zu einer Steigerung der Konzentration kam. Das heißt, am Ende der Kontrollzeit wurden zunächst 3 µl der Testsubstanz eingespritzt und dann nach jeweils 45 Minuten 7 µl, 20 µl und 70 µl, wodurch die Messung bei Konzentrationen von 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l erfolgte.

3.6.2. Versuchspräparate

3.6.2.1. Versuchsablauf an der Aorta descendens

Der Versuch wurde wie unter 3.5.1. erwähnt in der Apparatur 2 durchgeführt. Das ringförmige Aortenstück wurde direkt zwischen zwei Silberdrähte in die Apparatur eingespannt. Dabei war es wichtig zu beachten, dass sich das Präparat nicht allzu lange außerhalb der begasten physiologischen Nährlösung befand und außerdem beim Einspannen nicht übermäßig mechanisch

beansprucht, spricht einer zu starken Dehnung ausgesetzt oder gar beschädigt, wurde. Dies hätte nämlich zur Unbrauchbarkeit des Präparates geführt.

Anschließend konnte der Steg mit eingespanntem Präparat in die Nährlösung eingetaucht werden. Das Organbad war zuvor mit Tyrode gereinigt und befüllt sowie auf 37 ± 1 °C vorbeheizt worden.

Danach wurden Schreiber und Amplifier eingeschaltet und entsprechend eingestellt. Dann wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 19,6 mN bei 10 mV angelegt. Nachdem man dem Organ 20 Minuten Zeit gegeben hatte um sich an die Umgebungsbedingungen anzupassen, wurde die Spannung auf 5 mV umgestellt und, falls es zu einer Abweichung des Nullpunktes gekommen war, dieser mittels Feintrieb wieder eingestellt. Unmittelbar nach Beginn der Aufzeichnung wurde die Tyrode über einen Schlauchanschluss abgelassen und diese je nach Größe des Organbades mit 8 ml bzw. 25 ml 90 mmolarer KCl-Lösung, welche eine maximale Kontraktion des Aortenstücks bedingte, ersetzt.

Anschließend erfolgte die Kontrollzeit; dies bedeutete, man musste mindestens 45 Minuten abwarten bzw. so lange, bis die auftretende Kontraktionskraft konstant war. Anschließend erfolgte die Wirkstoffzugabe, allerdings nur dann, wenn bedingt durch den Kontraktionsreiz eine konstante Auslenkung des Schreibers von mindestens 5 cm erreicht wurde (siehe 3.6.1.).

Das Plateau, das bei konstanter Kontraktionskraft erreicht wurde, wurde mit 100 % definiert. Im Zuge der kontinuierlichen Aufzeichnung erhielt man schlussendlich eine Kurve.

3.6.2.2. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Der Versuchsablauf an der Lungenarterie erfolgte analog zur Aorta descendens, mit dem einzigen Unterschied, dass man hier bereits anfänglich eine Spannung von 5 mV einstellte und somit eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5 mV anlegte.

3.6.2.3. Versuchsablauf am terminalen Ileum

Auch der Versuchsablauf des Darms erfolgte ähnlich wie bei der Aorta

descendens. Durchgeführt wurde der Versuch ebenso mit Apparatur 2. Im Unterschied zur Aorta wurde das Darmpräparat mit Hilfe von 2 Silberhäkchen zwischen den beiden Silberdrähten entlang des Stegs befestigt. Nach Absenken des Stegs in das mit Tyrode befüllte und begaste Organbad wurde wie bei der Aorta das Einschalten und Einstellen des Schreibers und Amplifiers vorgenommen. Im Gegensatz zum Versuchsablauf an der Aorta wurde hier eine Vorspannung von 4,9 mN bei 5mV angelegt. Hier war es besonders wichtig, dass man die Vorspannung nicht zu rasch anlegte, da sonst das Darmpräparat überdehnt werden bzw. sogar reißen hätte können.

Auch hier gab man dem Präparat wieder 20 Minuten Zeit, um sich an die Umgebung anzupassen, ehe man, wenn notwendig, mittels Feintrieb den Schreiber auf den Nullpunkt nachjustierte und anschließend mit den Aufzeichnungen begann. Ebenso wie bei Aorta und Lungenarterie wurde hier die Tyrode ausgelassen und mit dem entsprechenden Volumen an KCl-Lösung ersetzt, allerdings mit dem Unterschied, dass hier nur eine 60 mmolare KCl-Lösung zum Einsatz kam. Analog wie im Kapitel 3.6.2.1 beschrieben, wartet man auch hier die Kontrollzeit ab und startete nur dann mit dem eigentlichen Versuch, wenn der Schreiber bei konstanter Kontraktion mindestens 5 cm ausschlug.

3.6.2.4. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum

Nach der Präparation des rechten Vorhofs (siehe 3.4.2.4.) wurde dieser mit Hilfe der beiden zuvor angebrachten Silberhäkchen in die Apparatur 2 eingespannt. Wie bei allen Versuchsabläufen wurde auch hier vor Beginn der Durchführung das Organbad gereinigt und mit - in diesem Fall - 25 ml Tyrode befüllt und mit Oxymix (Carbogen) begast. Das eingespannte Präparat wurde vollständig in die Nährlösung eingetaucht. Hier galt es zu beachten, dass die Sauerstoffversorgung zwar ausreichend, aber dennoch die Begasung nicht zu stark war, da ansonsten der Silberdraht durch den Gaseinstrom bewegt und somit die Ergebnisse verfälscht worden wären.

Nach Einschalten und Einstellen von Schreiber und Amplifier wurde zunächst auf den Nullpunkt eingestellt und anschließend bei 5 mV eine Vorspannung von

10,4 mN induziert. Nach der 20-minütigen Anpassungszeit wurde dann begonnen die Kontrolle aufzunehmen. Dies erfolgte, indem man alle 5 Minuten für jeweils 12 Sekunden (entspricht 6 cm bzw. 6 Kästchen am Papier) die Schläge aufzeichnete. Hierbei war allerdings nicht die Amplitude der Peaks, sondern die Anzahl der Schläge und somit die Schlagfrequenz von Bedeutung. Auch hier dauerte die Kontrollzeit so lange, bis eine konstante Schlagfrequenz erreicht wurde, mindestens aber 45 Minuten.

Nach Einbringen der Testsubstanz erfolgte die Aufzeichnung analog zur Kontrollmessung. Auch hier wurde alle 45 Minuten die Konzentration - wie im Kapitel 3.6.1 beschrieben - erhöht.

3.6.2.5. Versuchsablauf am Musculus papillaris

Der isolierte und präparierte Papillarmuskel (siehe 3.4.2.5.) wurde - wie im Kapitel 3.5.5.1 geschildert - in Apparatur 1 eingespannt und in das mit 25 ml Tyrode befüllte Organbad abgesenkt. Bei 5 mV wurde eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt.

Für den Versuchsablauf am Papillarmuskel war ein Reizgerät (Accupulser A310-Akkumulator Stimulus Asolator A360, World Precision Instruments (WPI), Hamden, USA), welches mittels elektrischer Reize eine Stimulation dieses Muskels bewirkt, notwendig, da dieser über keine Spontanaktivität verfügte. Die Reizung erfolgte mit Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms.

Die Stromstärke, welche nicht zu hoch sein durfte, da sonst eine vollständige Entleerung der Katecholaminspeicher ausgelöst hätte werden können, was eine Verfälschung der Resultate zur Folge hätte, lag ca. 10 % über der muskelabhängigen Reizschwelle.

Nach einer 20-minütigen Akklimatisierung wurde im Fünfminutentakt über mindestens 45 Minuten lang eine Kontrollmessung durchgeführt, indem 6 Schläge aufgezeichnet wurden. Im Gegensatz zum rechten Vorhof wurde hier nicht die Schlagfrequenz, sondern die Kontraktionskraft bestimmt, weshalb hier die Amplitude vermessen wurde. War diese nicht mindestens 2 cm groß, so

konnte im Laufe der Kontrollmessung die Einstellung auf 2 mV bzw. 1mV geändert werden. Entsprach die Amplitude selbst bei 1 mV nicht dieser Anforderung, so musste das Präparat verworfen werden.

Nach Ablauf der Kontrollzeit, sprich nach Erreichen der Konstanz, wurde die erste Konzentration der Testsubstanz eingespritzt und analog zur Kontrollmessung die Kontraktionskraft bestimmt. Jeweils nach 45 Minuten wurde dann nach dem unter 3.6.1. erwähnten Schema die Konzentration erhöht.

3.7. Datenauswertung

Hierbei galt es zu beachten, dass das verwendete Lösungsmittel, DMSO, wie schon unter 3.2.3. erwähnt, selber auch eine Auswirkung auf Chronotropie, Inotropie und Gefäß- und Eingeweidemuskeltonus aufweist. Dementsprechend mussten in die ermittelten Werte ein Korrekturfaktor einberechnet werden.

3.7.1. Datenauswertung der glattemuskulären Präparate

Bei den Organen der glatten Muskulatur wurde untersucht, ob die beiden Testsubstanzen BLV10ox und CMC44ox zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, sprich zu einer Gefäßrelaxation bzw. Spasmolyse führten.

Die Aufzeichnung erfolgte hierbei während der gesamten Versuchsdauer, wodurch man schlussendlich eine Kontraktionskurve erhielt.

3.7.1.1. Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

Zunächst kam es durch den Einsatz der entsprechenden Kaliumchlorid-Lösung zu einer maximalen Kontraktion des jeweiligen Präparates, woraufhin dann stufenweise die Konzentration der Testsubstanz erhöht wurde. Die dadurch bedingte Änderung der Kontraktionskraft wurde mit Hilfe eines Schreibers

aufgezeichnet und somit eine Kontraktionskurve erstellt. Damit man bei der Auswertung den exakten Zeitpunkt der Wirkstoffkonzentration kannte, wurden während der Aufzeichnung die Stellen am Millimeterpapier entsprechend markiert, an denen die Testsubstanz mit der jeweiligen Konzentration eingespritzt wurde.

Im Anschluss an den Versuch wurde der Abstand vom Nullpunkt zur Plateauphase, die am Ende der Kontrollzeit entstanden war, mittels Lineal vermessen. Der dabei ermittelte Wert wurde dann mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert. Dieser ergibt sich dadurch, dass 1 cm am Papier bei 5 mV 0,98 mN entsprach. Der dadurch erhaltene Referenzwert wurde dann als 100 %ige Kontraktionskraft definiert.

Ebenso wurde auch die Entfernung vom Nullpunkt bis zu jenen Punkten der Kontraktionskurve vermessen, die nach jeweils 45-minütiger Einwirkung der entsprechenden Wirkstoffkonzentration auf das Präparat zustande gekommen waren. Bezogen auf den Referenzwert konnte so die prozentuelle Kontraktionsabnahme bei der jeweiligen Wirkstoffkonzentration ermittelt werden.

3.7.2. Auswertung der Herzpräparate

Bei den Organpräparaten der quergestreiften Muskulatur wurde untersucht, ob die beiden Testsubstanzen eine negativ chronotrope und/oder inotrope Wirkung ausübten.

Bei diesen Versuchen erfolgten die Aufzeichnungen in einem Abstand von 5 Minuten, also nicht kontinuierlich. Für die Auswertung wurden dann die jeweiligen Messungen nach 45-minütiger Einwirkung der Substanzkonzentration auf das Präparat herangezogen.

3.7.2.1. Musculus papillaris

Ebenso wie bei den glattemuskulären Organen wurde auch beim Papillarmuskel die Änderung der Kontraktionskraft, sprich die Inotropie, ermittelt. Die

Bezeichnung inotrop bedeutet die Schlagstärke oder Kontraktionskraft des Herzens beeinflussend. Positiv inotrop sind somit Pharmaka, die zu einer Steigerung der Schlagfrequenz des Herzens führen, dazu zählen z.B. herzwirksame Glykoside, Catecholamine und Methylxanthine. Im Gegensatz dazu führen negativ inotrope Pharmaka wie z.B. Betarezeptorenblocker, bestimmte Calciumantagonisten und Parasympathomimetika zu einer Herabsetzung der Kontraktionskraft des Herzens (Hunnius 2004).

Die Messwerte kamen dabei so zustande, dass die Länge der Amplitude mittels Lineal vermessen und dann mit dem Eichfaktor multipliziert wurde.

Als Referenzwert, das heißt als 100 %ige Kontraktion, wurde jener Wert herangezogen, der bei der letzten Kontrollmessung ermittelt wurde.

Die restlichen Werte wurden 45 Minuten nach Zusatz der entsprechenden Substanzkonzentration auf dieselbe Art und Weise wie der Referenzwert ermittelt.

Anschließend musste noch die DMSO-Eigenwirkung abgezogen werden, wodurch man dann auf die durch die Testsubstanz bedingte Änderung der Kontraktionskraft schließen konnte.

3.7.2.2. Atrium cordis dexter

Am rechten Vorhof wurde im Gegensatz zu allen anderen Organen nicht eine Änderung der Kontraktionskraft bestimmt, sondern der Einfluss der Testsubstanzen auf die Schlagfrequenz des Herzens, sprich die Chronotropie. Chronotrop bedeutet also die Schlagfrequenz des Herzens beeinflussend. Demzufolge führen positiv chronotrope Pharmaka wie z.B. Sympathomimetika zu einer Steigerung und negativ chronotrope wie z.B. herzwirksame Glykoside oder Parasympathomimetika zu einer Verminderung der Herzfrequenz (Hunnius 2004).

Wie schon im Kapitel 3.6.2.4 erwähnt, erfolgte die Aufzeichnung mittels Schreiber alle 5 Minuten über eine Zeitspanne von 12 Sekunden. Für die Auswertung wurden schließlich die letzte Aufnahme der Kontrollmessung und die jeweiligen Aufzeichnungen der verschiedenen Substanzkonzentration nach

45-minütiger Einwirkzeit herangezogen.

Bei den eben genannten Aufzeichnungen wurde schließlich die jeweilige Anzahl der Peaks bestimmt, die dann mit 5 multipliziert wurde, wodurch man die Herzschläge pro Minute erhielt. Auch hier musste noch der Eichfaktor miteinberechnet werden, ehe man dann die prozentuelle Änderung der Schlagfrequenz bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz bezogen auf den Referenzwert ermitteln konnte.

3.8. Statistik

Die Messwerte, die durch die Versuche ermittelt wurden, wurden herangezogen um die arithmetischen Mittelwerte (f_c) sowie deren Standardfehler (SEM) zu ermitteln. Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte anschließend unter Verwendung des Programms „Sigma Plot“. Dieses diente dazu, um die jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurven zu erstellen, wobei auf der Ordinate die Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz in % und auf der Abszisse die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen wurde. Diese graphische Darstellung ermöglichte es dann, die EC_{50} -Werte - falls die EC_{50} erreicht wurde - zu ermitteln. Unter der EC_{50} versteht man die effektive Konzentration bei der es zu einer 50 %igen Veränderung der Wirkung in Bezug auf den Kontrollwert kommt (Larsen 2011).

Für die Beurteilung, ob die Messergebnisse eine statistische Signifikanz erreichten, wurde ein Student-t-Test zu Rate gezogen. Dabei galten Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5 \%$ ($P < 0,05$) als signifikant, von $< 1 \%$ ($P < 0,01$) und von $< 0,1 \%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant.

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die durch die Versuche ermittelten Wirkungen der Testsubstanzen BLV10ox und CMC44ox aufgezeigt. Pro Organsystem und Wirkstoff findet man in den folgenden Unterkapiteln jeweils eine Tabelle mit den erhaltenen Messwerten, eine Konzentrations-Wirkungskurve sowie eine Originalaufzeichnung, die im Laufe des Versuchs vom angeschlossenen Schreiber erstellt wurde.

Bei den in den Tabellen angegebenen arithmetischen Mittelwerten sowie bei den Werten der errechneten Standardfehler wurde bereits die Eigenwirkung von DMSO berücksichtigt und abgezogen.

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz BLV10ox

4.1.1. Wirkung von BLV10ox auf die Aorta descendens

Insgesamt wurden 4 Versuche durchgeführt, um die Wirkung, die die Testsubstanz auf die Aorta ausübt, zu ermitteln.

Der genaue Versuchsablauf für die Untersuchung der Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Aorta wurde bereits im Kapitel 3.6.2.1 beschrieben.

Die vollständige Kontraktion der Aorta, die durch den Austausch von der physiologischen Nährlösung durch eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung ausgelöst wurde, und sich allmählich auf eine konstante Kontraktion einpendelte, lieferte einen Referenzwert von $7,96 \pm 1,07$ mN. Dieser Wert entsprach einer 100 %igen Kontraktion und wurde somit als Basis für die Beurteilung einer vasodilatierenden Wirkung herangezogen.

BLV10ox verursachte eine geringfügige Abnahme der Kontraktionskraft an der Aorta. Die höchste getestete Konzentration der Versuchssubstanz, nämlich 100 $\mu\text{mol/l}$, bewirkte eine Kontraktionskraft von $5,15 \pm 0,76$ mN.

In Tabelle 4 sind die Daten der vier an der Aorta descendens durchgeführten

Versuche ersichtlich. Aus der Tabelle kann man das arithmetische Mittel (f_c) der gemessenen Kontraktionskraft in mN und die Kontraktionskraftänderung in % inklusive Standardfehler (SEM) ablesen, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), die Auskunft über die Signifikanz der ermittelten Werte liefert.

Tabelle 4: Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Aorta descendens

BLV10ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$7,96 \pm 1,07$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$7,48 \pm 1,01$	$-6,15 \pm 1,61$	4	n.s.
10	$7,00 \pm 0,94$	$-12,17 \pm 3,05$	4	0,05
30	$6,49 \pm 0,83$	$-18,23 \pm 3,42$	4	0,05
100	$5,15 \pm 0,76$	$-35,20 \pm 5,76$	4	0,01

Durch Eintragen der Messergebnisse in das Programm „Sigma Plot 9.0“ wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

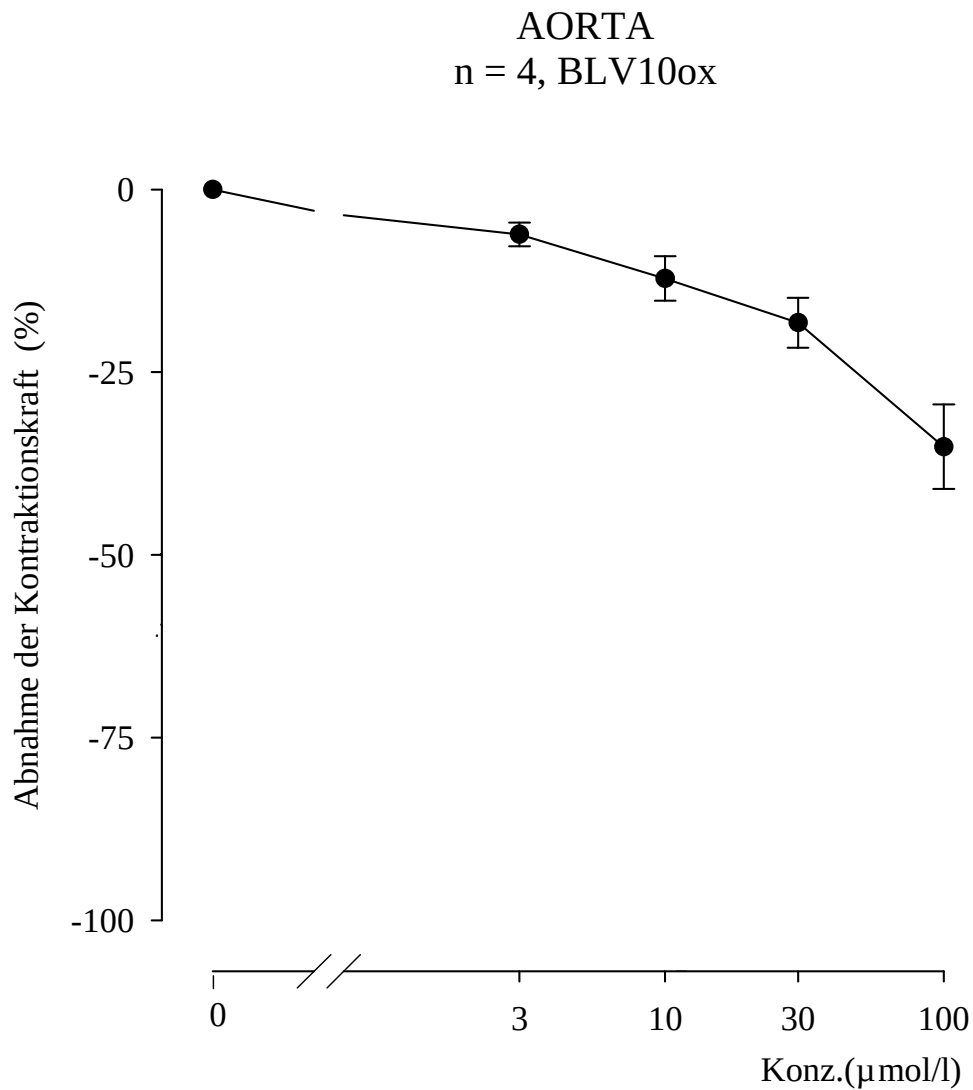


Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von BLV10ox auf die Aorta descendens

In Diagramm 1 sind auf der Abszisse die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz in µmol/l in semilogarithmischer Form und auf der Ordinate die Kontraktionskraft in % aufgetragen.

Die schwarzen Punkte in der Graphik stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) dar, die davon ausgehenden senkrechten Balken deren Standardfehler (SEM).

Im Diagramm ist die Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Aorta descendens ersichtlich. Dieses zeigt, dass selbst bei der höchsten getesteten Substanzkonzentration die EC₅₀ nicht erreicht wurde.

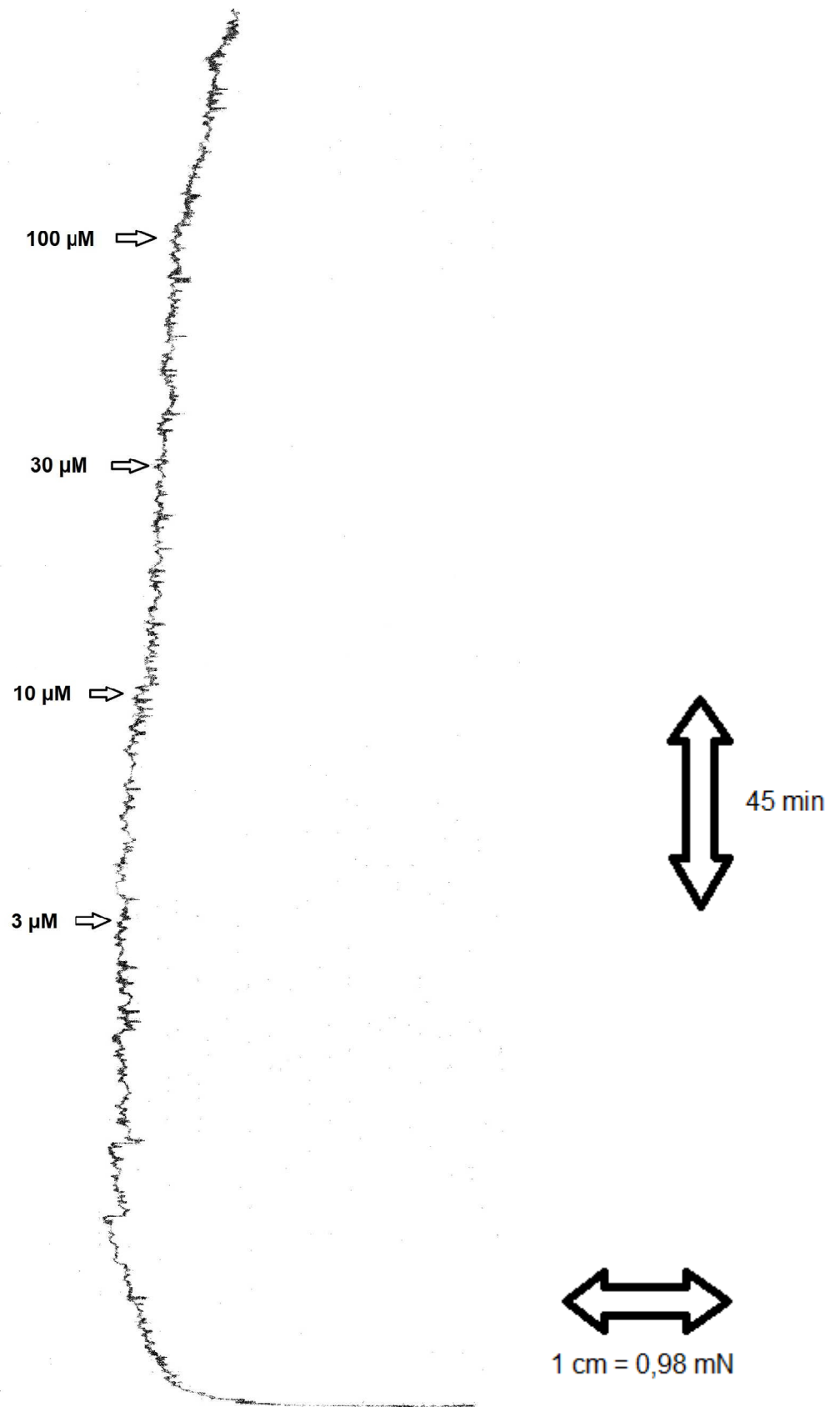


Abbildung 15: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta descendens unter Einfluss von BLV10ox

4.1.2. Wirkung von BLV10ox auf die Arteria pulmonalis

Zur Ermittlung der Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie wurden 5 Versuche durchgeführt.

Der genaue Versuchsablauf für die Untersuchung der Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie ist im Kapitel 3.6.2.2 ersichtlich.

Durch Austausch der Tyrode gegen eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung wurde die vollständige Kontraktion der Lungenarterie bewirkt. Nachdem eine konstante Kontraktion erreicht wurde, konnte der Kontrollwert ermittelt werden. Dieser betrug $12,04 \pm 1,70$ mN und wurde als 100 %ige Kontraktion definiert. Anhand des Kontrollwertes konnte nun die Beurteilung einer vasodilatierenden Wirkung erfolgen.

BLV10ox bedingte lediglich eine geringfügige Abnahme der Kontraktionskraft an der Lungenarterie. Die höchste getestete Konzentration von BLV10ox, nämlich 100 $\mu\text{mol/l}$, führte zu einer Kontraktionskraft von $8,55 \pm 2,15$ mN. Somit ist die Abnahme der Kontraktionskraft der Lungenarterie vergleichbar mit der der Aorta.

Tabelle 5 präsentiert ebenso wie Tabelle 4 die errechneten Mittelwerte (f_c) inklusive Standardfehler (SEM), die Anzahl der Versuch (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 5: Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

BLV10ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)
0	$12,04 \pm 1,70$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$11,54 \pm 1,65$	$-4,25 \pm 0,59$	5	n.s.
10	$11,32 \pm 1,73$	$-6,50 \pm 1,57$	5	0,05
30	$10,68 \pm 1,85$	$-12,39 \pm 4,02$	5	0,05
100	$8,55 \pm 2,15$	$-31,76 \pm 8,98$	5	0,01

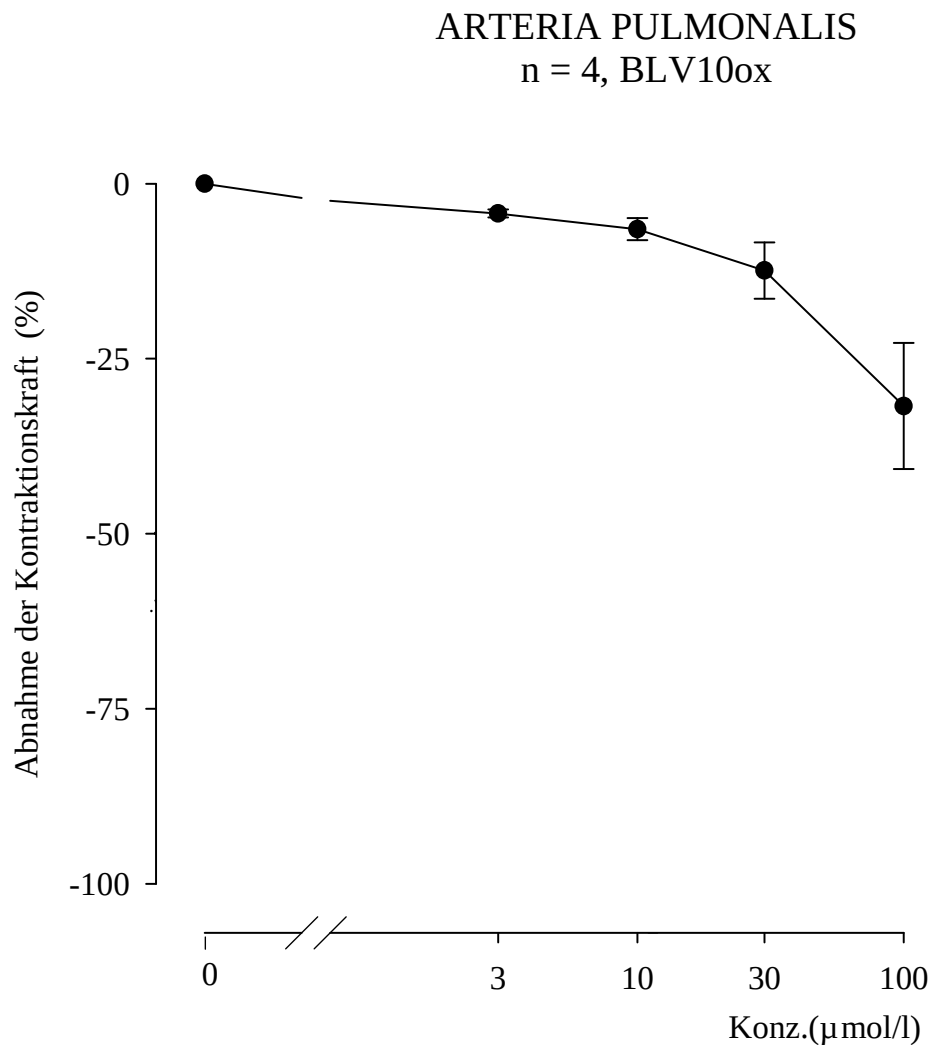


Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von BLV10ox an der Arteria pulmonalis

Diagramm 2 zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie. Erstellt wurde diese Grafik mit Hilfe des Programms "Sigma Plot 9.0".

Die Substanzkonzentrationen in µmol/l in semilogarithmischer Form sind auf der Abszisse eingetragen und die Änderung der Kontraktionskraft in % auf der Ordinate.

In der Graphik sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) in Form von schwarzen Punkten dargestellt und deren Standardfehler (SEM) als senkrechte Balken.

Wie auch bei der Aorta konnte durch die eingesetzten Konzentrationen der Substanz BLV10ox die EC_{50} nicht erreicht werden.

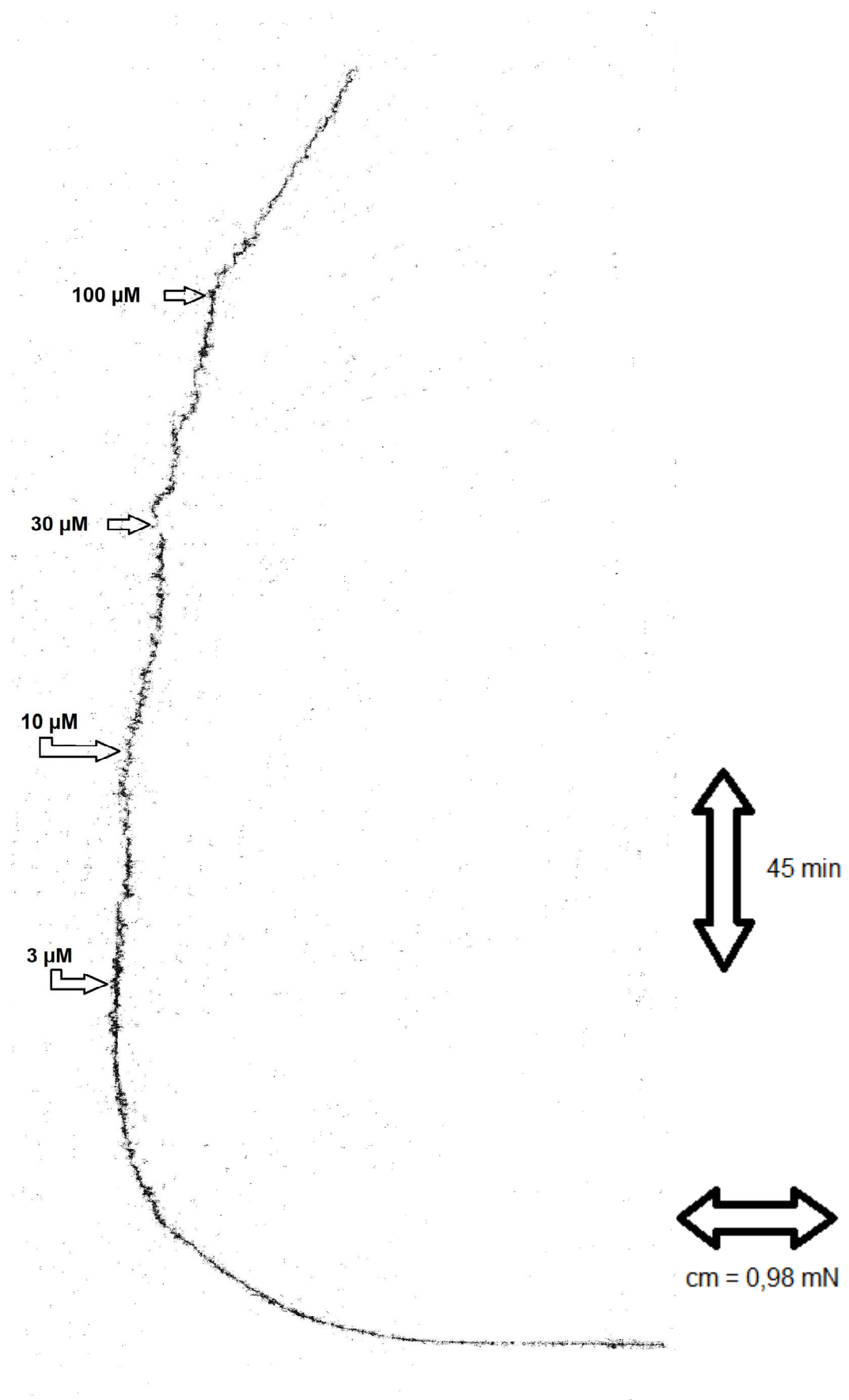


Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Arteria pulmonalis unter Einfluss von BLV10ox

4.1.3. Wirkung von BLV10ox auf das terminale Ileum

Zur Wirkungsermittlung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms wurden 6 Versuche durchgeführt.

Der genaue Versuchsablauf für diese Untersuchung kann im Kapitel 3.6.2.3 nachgelesen werden.

Anders als bei der Aorta und Lungenarterie wurde hier nach der 20-minütigen Anpassungsphase die physiologische Nährlösung gegen eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung ausgetauscht. Die dadurch erreichte maximale Kontraktion des Hüftdarms von $6,67 \pm 0,72$ mN wurde als Kontrollwert verwendet und als 100 %ige Kontraktionskraft angesehen.

Bereits durch Zugabe der niedrigsten Konzentration von BLV10ox, nämlich von $3 \mu\text{mol/l}$, war eine spasmolytische Wirkung bemerkbar. Die Kontraktionskraft sank bereits hier auf $5,77 \pm 0,62$ mN ab. Durch die Erhöhung der BLV10ox-Konzentration kam es zu einer stetigen Abnahme der Kontraktionskraft des Hüftdarms. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft nur mehr $1,47 \pm 0,25$ mN.

Tabelle 6 zeigt die Versuchsergebnisse, die durch den Einfluss von BLV10ox am Darm ermittelt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und ebenso die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft. Weiters sind auch die zugehörigen Standardfehler (SEM) aufgelistet, sowie die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 6: Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

BLV10ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	6,67 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	5,77 $\pm$ 0,62	-13,39 $\pm$ 1,35	6	0,05
10	4,78 $\pm$ 0,45	-27,28 $\pm$ 3,63	6	0,05
30	3,22 $\pm$ 0,35	-49,57 $\pm$ 5,91	6	0,01
100	1,47 $\pm$ 0,25	-78,22 $\pm$ 2,43	6	0,001

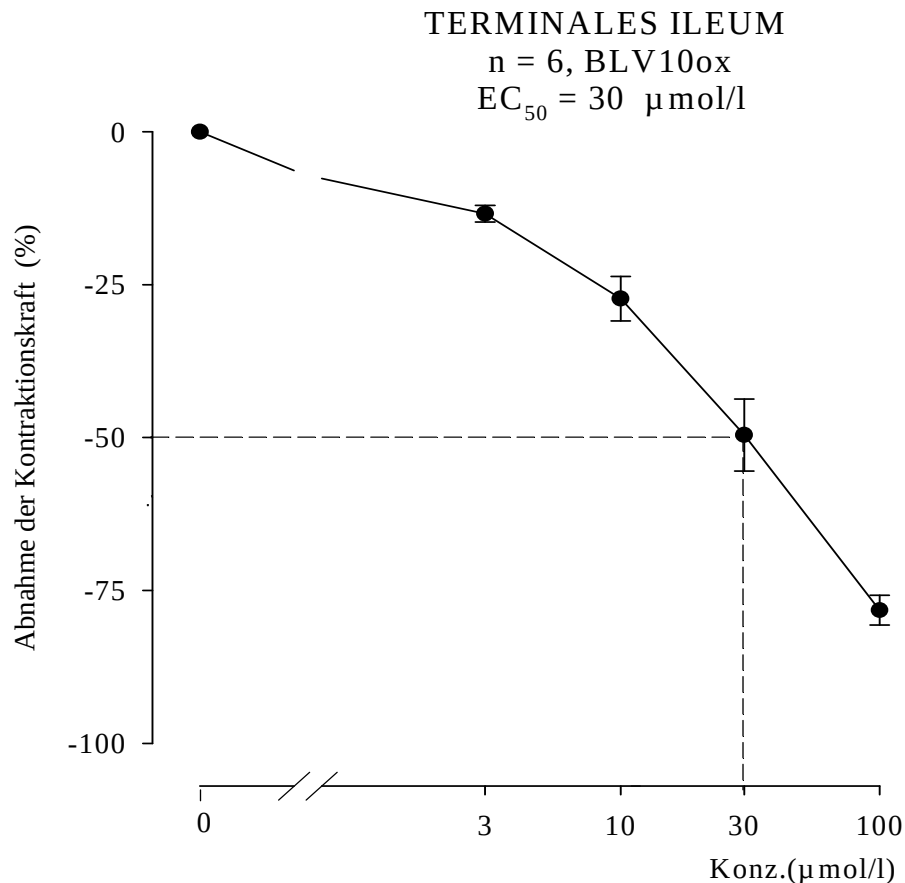


Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von BLV10ox am terminalen Ileum

Diagramm 3 veranschaulicht die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms. Der Graph wurde, anhand der in den Versuchen ermittelten Daten, mit dem Programm "Sigma Plot 9.0" erstellt.

Auf der x-Achse sind semilogarithmisch die Substanzkonzentrationen in µmol/l eingetragen und auf der y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %.

In der Graphik sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) als schwarze Punkte und die zugehörigen Standardfehler (SEM) in Form von senkrechten Balken dargestellt.

Die EC₅₀ konnte durch Anlegen der strichlierten Linien ermittelt werden; diese betrug 30 µmol/l.

Anhand dieses Diagramms lässt sich die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf den Darm deutlich erkennen.

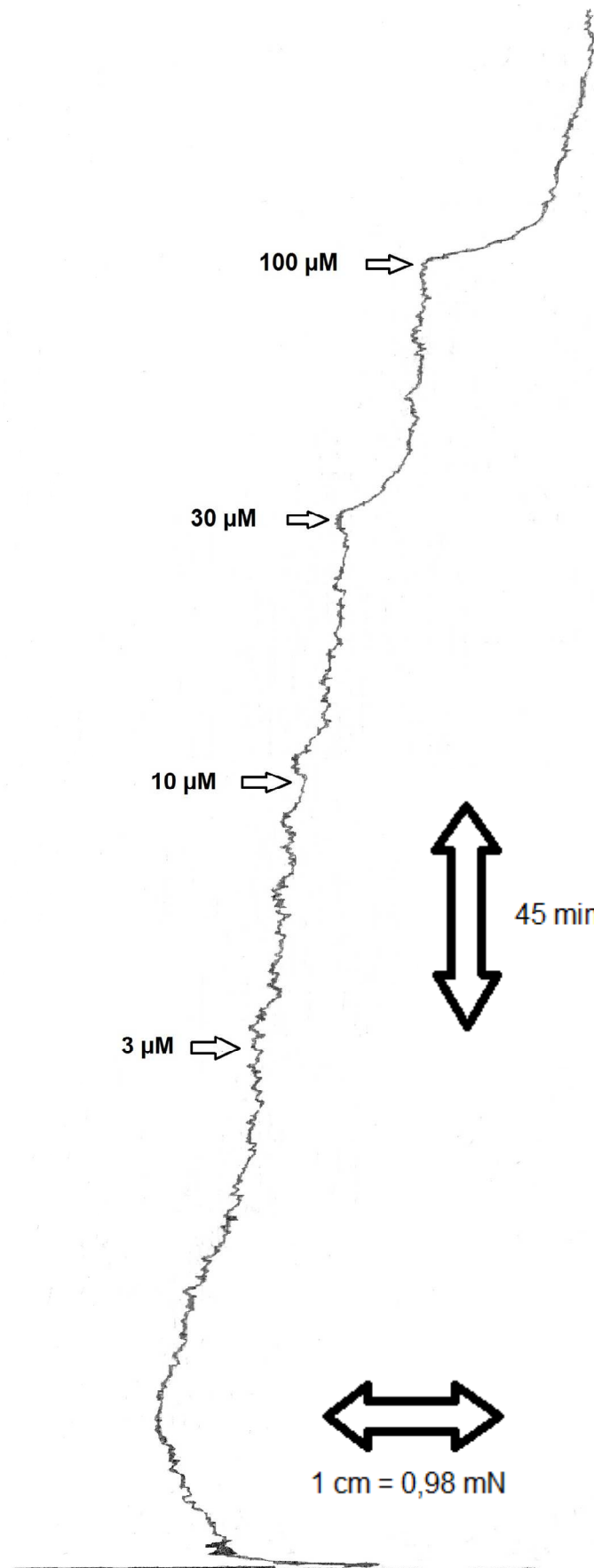


Abbildung 17: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileums unter Einfluss von BLV10ox

4.1.4. Wirkung von BLV10ox auf den Musculus papillaris

Insgesamt wurden 4 Versuche durchgeführt, um die Wirkung, die die Testsubstanz auf den Papillarmuskel ausübt, zu ermitteln.

Damit die Auswirkung von BLV10ox auf die Inotropie des Papillarmuskels bestimmt werden konnte, wurde dieser zunächst - wie in den Kapiteln 3.4.2.5 und 3.5.1.1 beschrieben - präpariert und in die Apparatur 1 eingespannt. Bei dieser Versuchsreihe wurde die physiologische Nährlösung nicht durch eine Kaliumchloridlösung ersetzt, da hier ein Reizgerät Anwendung fand, welches den Muskel mittels elektrischen Reizen stimulierte.

Der ermittelte durchschnittliche Referenzwert, welcher als maximale Kontraktionskraft angesehen wurde, betrug $2,02 \pm 0,47$ mN.

Durch die darauffolgende Zugabe und schrittweise Konzentrationssteigerung der Testsubstanz BLV10ox konnte nun deren inotrope Wirkung bestimmt werden. Allerdings war diese nur sehr schwach ausgeprägt, denn bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz wurde eine Kontraktionskraft von $2,13 \pm 0,37$ mN ermittelt. Dies bedeutet, es kam zu einer sehr geringfügigen positiv inotropen Wirkung. Allerdings kam es durch die Konzentrationssteigerung nicht durchgehend zu einer erhöhten Kontraktionskraft, sondern teilweise auch zu einer Abnahme. Doch all diese Veränderungen waren nur sehr schwach ausgeprägt.

In Tabelle 7 findet man die bei den vier Versuchsdurchgängen am Papillarmuskel ermittelten Werte der Kontraktionskraft angegeben in mN sowie die prozentuelle Veränderung der Kontraktionskraft inklusive der zugehörigen Standardfehler (SEM). Weiters kann man aus dieser Tabelle auch die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) herauslesen.

Tabelle 7: Wirkung von BLV10ox auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

BLV10ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$2,02 \pm 0,47$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$2,09 \pm 0,45$	$4,18 \pm 3,83$	4	n.s.
10	$1,87 \pm 0,28$	$-3,57 \pm 6,75$	4	n.s.
30	$1,98 \pm 0,30$	$2,47 \pm 7,51$	4	n.s.
100	$2,13 \pm 0,37$	$8,60 \pm 5,09$	4	n.s.

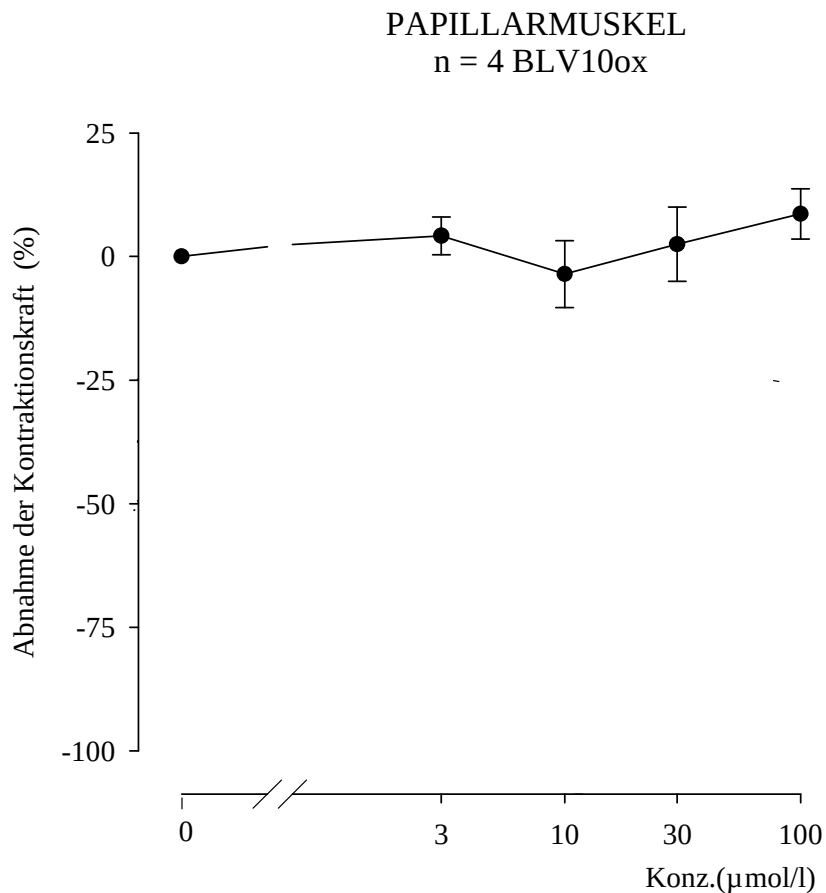


Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von BLV10ox auf den Musculus Papillaris

Diagramm 4 wurde mit dem Programm "Sigma Plot 9.0" erstellt und veranschaulicht die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Dabei wurden auf die Abszisse die Wirkstoffkonzentrationen in µmol/l semilogarithmisch und auf die Ordinate die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft aufgetragen.

Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) werden als schwarze Punkte und deren Standardfehler (SEM) als senkrechte Balken dargestellt.

Durch keine der eingesetzten Substanzkonzentrationen wurde die EC_{50} auch nur annähernd erreicht.

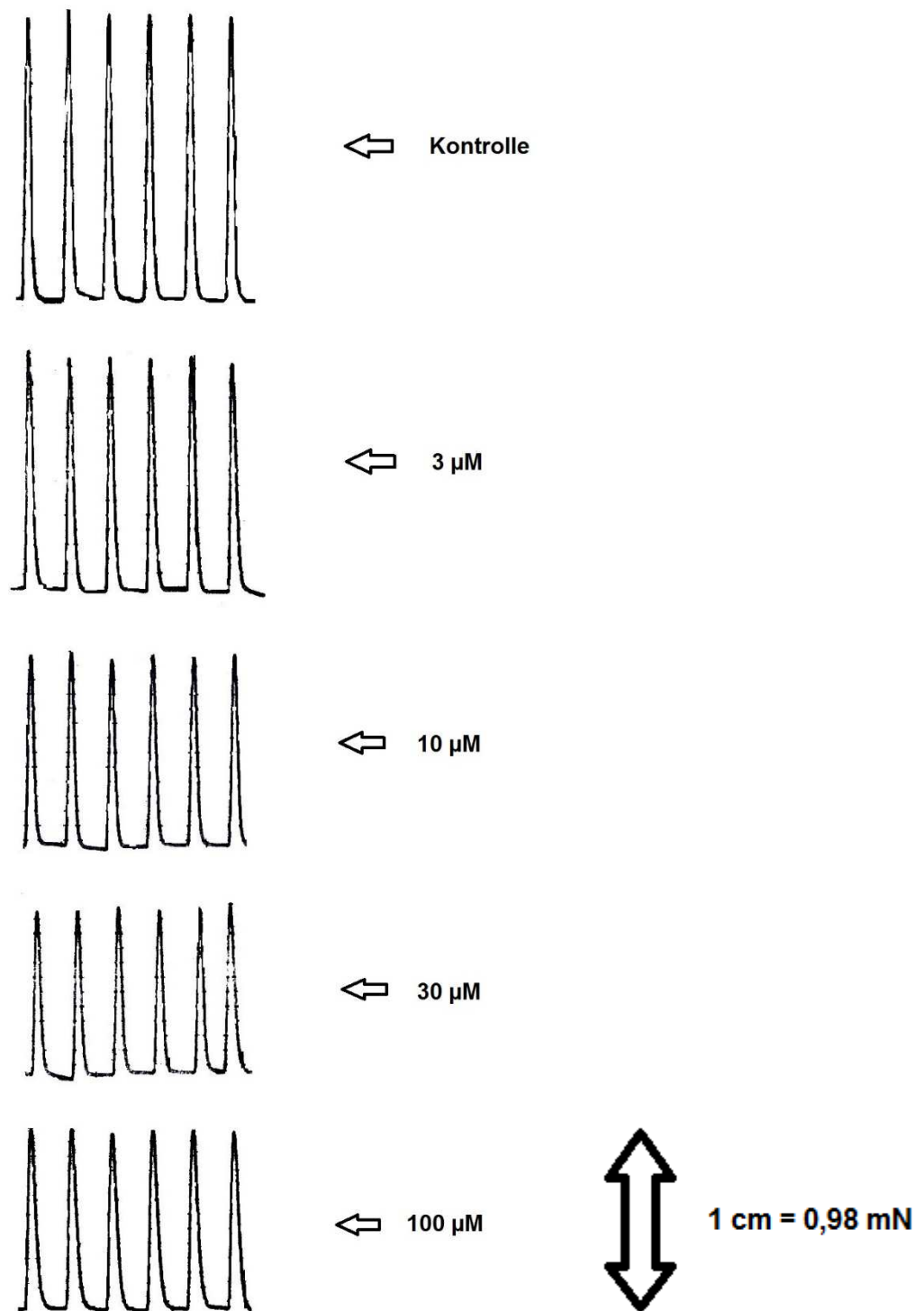


Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Peaks des Musculus papillaris unter Einfluss von BLV10ox

4.1.5. Wirkung von BLV10ox auf das Atrium cordis dextrum

Zur Ermittlung der Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurden 4 Versuche durchgeführt.

Der genaue Versuchsablauf für die Untersuchung der Wirkung, die BLV10ox auf den rechten Vorhof ausübt, ist im Kapitel 3.6.2.4 ersichtlich.

Ebenso wie bei der Versuchsdurchführung des Papillarmuskels kam hier keine Kaliumchloridlösung zum Einsatz.

Als Referenzwert wurde hier die letzte Messung der Kontrollzeit herangezogen und deren Anzahl an Schlägen gleich 100 % gesetzt. Die durchschnittliche maximale Schlagfrequenz betrug hier $187,50 \pm 25,37$ mN.

Durch die Zugabe der Testsubstanz kam es bei jeder Konzentrationssteigerung zu einer Abnahme der Schlagfrequenz. Bei einer BLV10ox-Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ trat schließlich der Herzstillstand ein, weshalb dann keine weitere Konzentrationssteigerung mehr erfolgte.

Tabelle 8 zeigt die Versuchsergebnisse, die durch den Einfluss von BLV10ox am rechten Vorhof ermittelt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und ebenso die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft. Weiters sind auch die zugehörigen Standardfehler (SEM) aufgelistet, sowie die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 8: Wirkung von BLV10ox auf die Schlagfrequenz von Atrium cordis dextrum

BLV10ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	187,50 $\pm$ 25,37	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
3	170,00 $\pm$ 11,73	-5,73 $\pm$ 9,23	4	n.s.
10	128,75 $\pm$ 15,33	-30,22 $\pm$ 4,09	4	0,01
30	0,00 $\pm$ 0,00	-100,00 $\pm$ 0,00	4	0,001

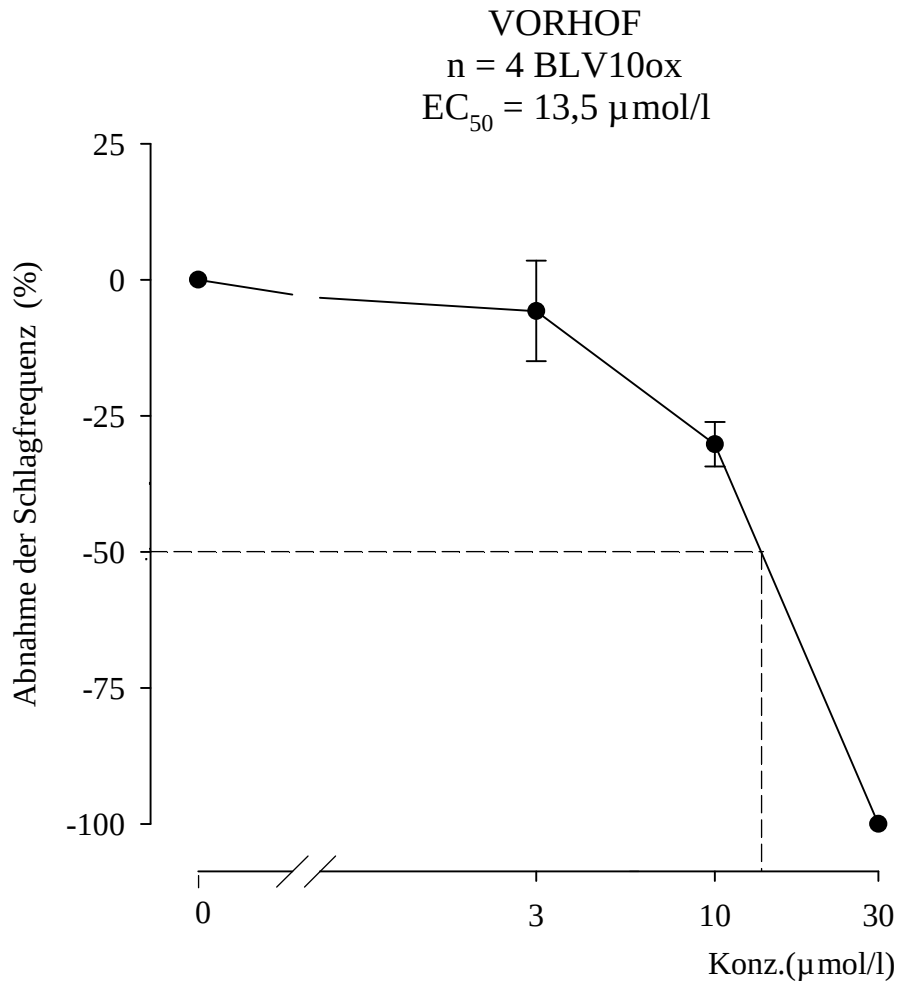


Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von BLV10ox am Atrium cordis dextrum

Diagramm 5 zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz BLV10ox auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs. Erstellt wurde diese Graphik mit Hilfe des Programms "Sigma Plot 9.0".

Die Substanzkonzentrationen in µmol/l in semilogarithmischer Form sind auf der Abszisse eingetragen und die Änderung der Kontraktionskraft in % auf der Ordinate.

In der Graphik sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) in Form von schwarzen Punkten dargestellt und deren Standardfehler (SEM) als senkrechten Balken.

Im Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass die Testsubstanz eine negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof ausübt. Die Ermittlung der EC₅₀ erfolgte durch Anlegen von strichlierten Linien; diese betrug 13,5 µmol/l.

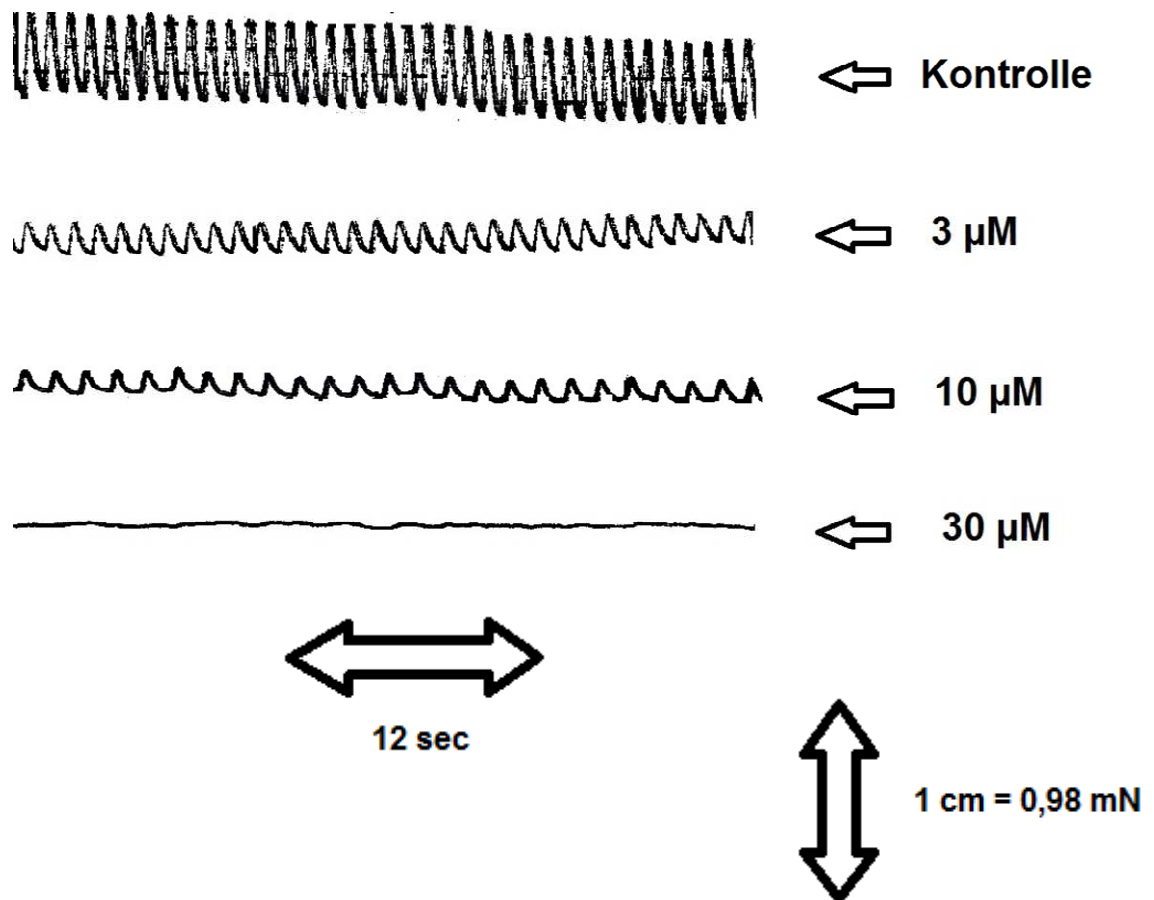


Abbildung 19: Originalaufzeichnung der Peaks des rechten Vorhofs unter Einfluss von BLV10ox

4.2. Ergebnisse der Testsubstanz CMC44ox

4.2.1. Wirkung von CMC44ox auf die Aorta descendens

Zur Ermittlung der Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Aorta wurden 4 Versuche durchgeführt.

Der genaue Versuchsablauf, um die Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Aorta zu ermitteln, kann im Kapitel 3.6.2.1 nachgelesen werden.

Die vollständige Kontraktion des Gefäßes ergab sich durch den Austausch der Tyrode gegen eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung. Nachdem die Kontraktion konstant blieb, konnte mit dem eigentlichen Versuch gestartet und zuvor ein Referenzwert, dieser betrug $9,26 \pm 3,08$ mN, ermittelt werden. Dieser Wert entsprach einer 100 %igen Kontraktion und wurde somit als Basis für die Beurteilung einer vasodilatierenden Wirkung herangezogen.

Im Vergleich zur Testsubstanz BLV10ox führte CMC44ox zu einer noch geringfügigeren, im Prinzip kaum bemerkbaren, Reduktion der Kontraktionskraft an der Aorta. Bei einer CMC44ox-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$, wurde eine Kontraktionskraft von $8,58 \pm 2,64$ mN bestimmt.

In Tabelle 9 kann Einsicht in die Daten, die anhand der vier an der Aorta descendens durchgeführten Versuche erhalten wurden, genommen werden. Angeführt sind das arithmetische Mittel (f_c) der gemessenen Kontraktionskraft in mN und die Kontraktionskraftänderung in % inklusive der Standardfehler (SEM). Dann auch noch die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), welche Auskunft über die Signifikanz der ermittelten Werte liefert, sowie die Anzahl der Versuche (n).

Tabelle 9: Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Aorta descendens

CMC44ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$9,26 \pm 3,08$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$9,18 \pm 2,97$	$0,24 \pm 1,30$	4	n.s.
10	$9,23 \pm 2,96$	$1,59 \pm 2,64$	4	n.s.
30	$9,14 \pm 2,91$	$0,80 \pm 3,00$	4	n.s.
100	$8,58 \pm 2,64$	$-4,39 \pm 3,71$	4	n.s.

AORTA
n = 4 CMC44ox

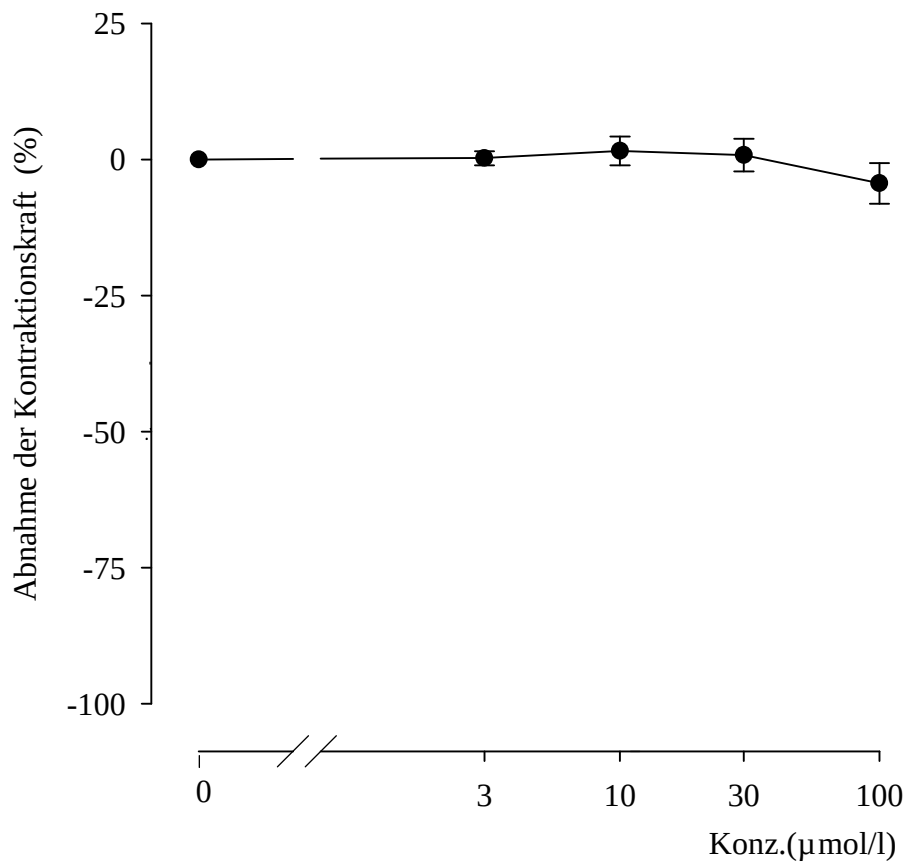


Diagramm 6: Konzentrations-Wirkungskurve von CMC44ox an der Aorta descendens

Diagramm 6 stellt eine Konzentrationswirkungskurve dar, die durch das Eintragen der Messergebnisse in das Programm "Sigma Plot 9.0" erstellt wurde. Diese Kurve ermöglicht eine Veranschaulichung der konzentrationsabhängigen Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Aorta. Dabei wurden auf die Abszisse die Wirkstoffkonzentrationen in µmol/l semilogarithmisch und auf die Ordinate die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft aufgetragen.

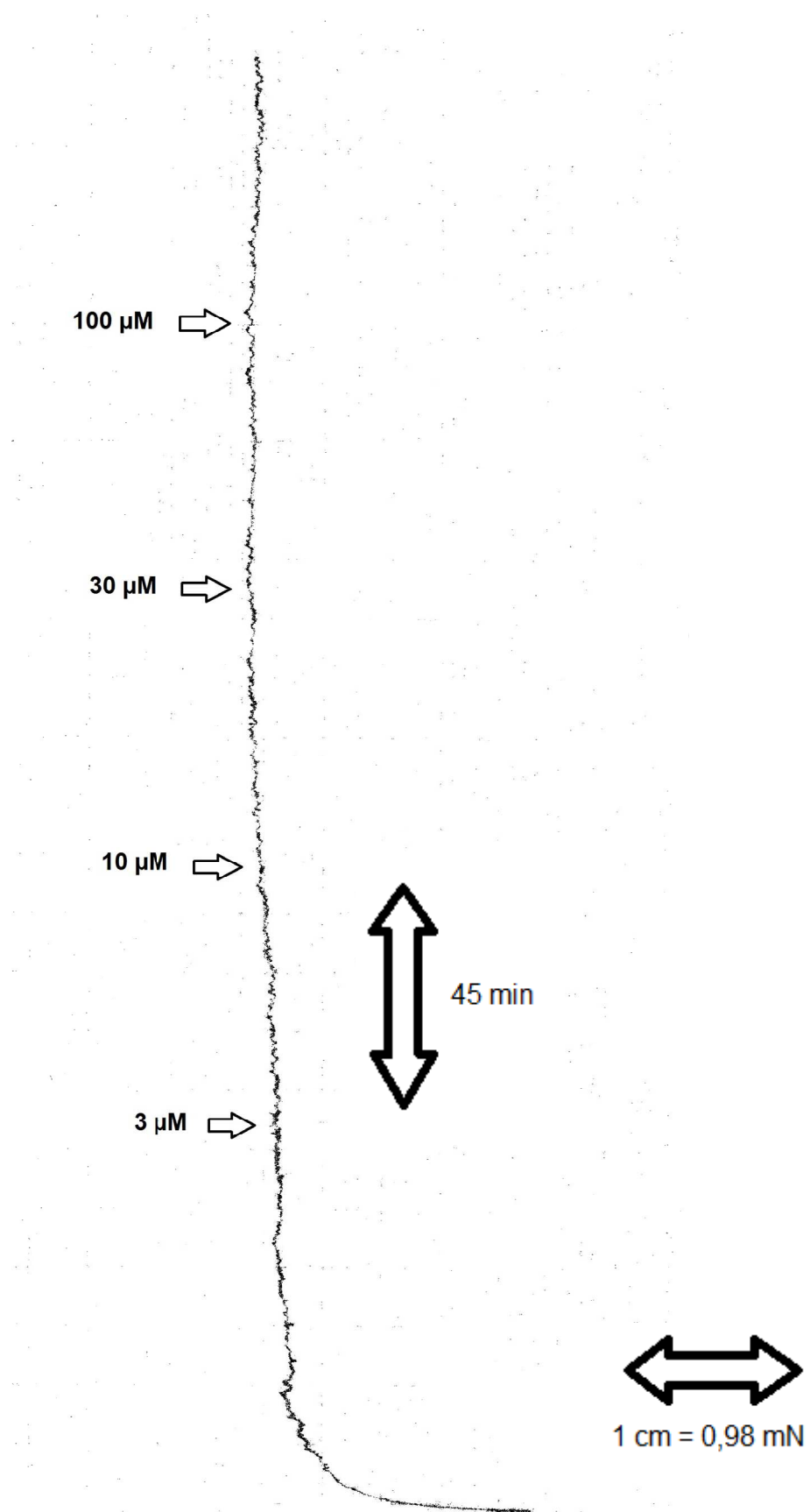


Abbildung 20: Originalabbildung der Kontraktionskurve der Aorta descendens unter Einfluss von CMC44ox

4.2.2. Wirkung von CMC44ox auf die Arteria pulmonalis

Zur Ermittlung der Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie erfolgte eine Durchführung von 4 Versuchen.

Der exakte Versuchsablauf für die Untersuchung der Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie wurde bereits im Kapitel 3.6.2.2 beschrieben.

Durch Austausch der Tyrode gegen eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung wurde die vollständige Kontraktion der Lungenarterie erreicht. Nach Beendigung der Kontrollzeit, sprich nach Erreichen einer konstanten Kontraktion, konnte der Referenzwert bestimmt werden. Dieser betrug $10,38 \pm 1,60$ mN und wurde nun als 100 %ige Kontraktion definiert. Anhand dieses Wertes konnte nun die Beurteilung einer vasodilatierenden Wirkung erfolgen.

Ebenso wie die Testsubstanz BLV10ox bedingte auch CMC44ox lediglich eine geringfügige Reduktion der Kontraktionskraft an der Lungenarterie. Die höchste getestete Konzentration von CMC44ox, sprich $100 \mu\text{mol/l}$, führte zu einer Kontraktionskraft von $7,81 \pm 1,41$ mN.

CMC44ox bewirkte also eine stärkere Vasodilatation an der Lungenarterie als an der Aorta.

Tabelle 10 zeigt wiederum die errechneten Mittelwerte (f_c) inklusive Standardfehler (SEM), die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 10: Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

CMC44ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$10,38 \pm 1,60$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$9,87 \pm 1,57$	$-5,11 \pm 0,93$	4	n.s.
10	$9,63 \pm 1,60$	$-7,62 \pm 1,63$	4	0,05
30	$9,00 \pm 1,55$	$-13,88 \pm 2,04$	4	0,05
100	$7,81 \pm 1,41$	$-25,51 \pm 2,30$	4	0,05

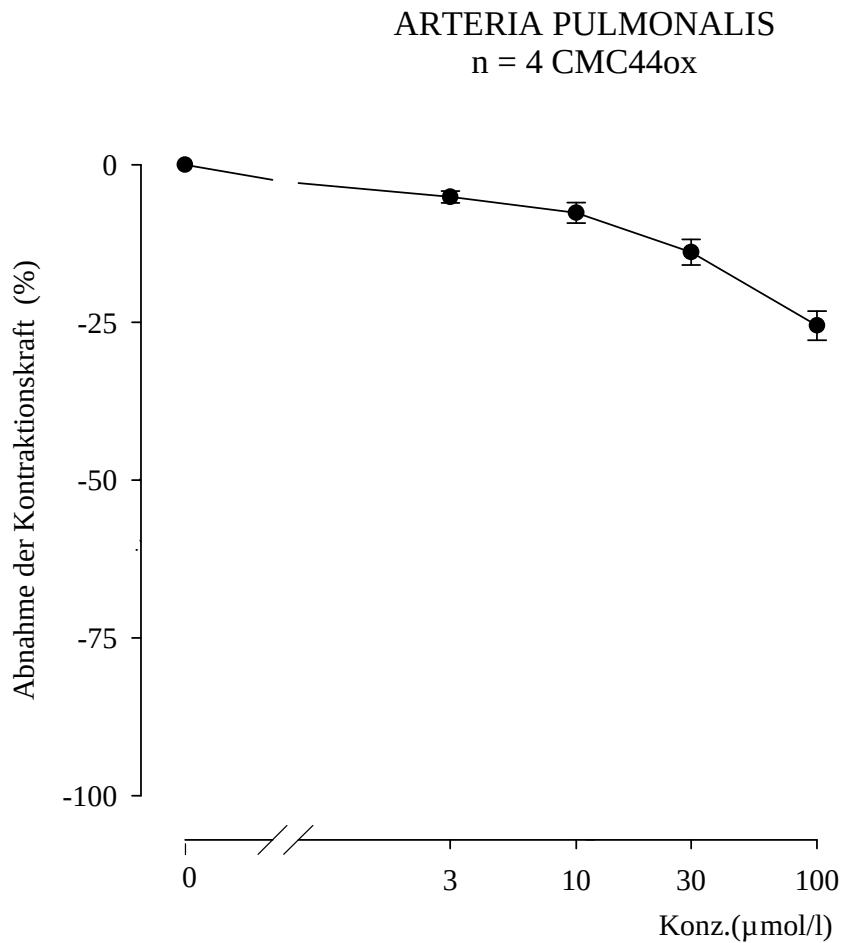


Diagramm 7: Konzentrations-Wirkungskurve von CMC44ox an der Arteria pulmonalis

Diagramm 7 präsentiert die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft der Lungenarterie. Erstellt wurde diese Graphik mit Hilfe des Programms "Sigma Plot 9.0".

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentrationen in µmol/l in semilogarithmischer Form eingetragen und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in %.

Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) sind in Form von schwarzen Punkten dargestellt und deren Standardfehler (SEM) als senkrechte Balken.

Wie bei BLV10ox konnte auch hier keine der eingesetzten CMC44ox-Konzentrationen eine EC_{50} erreichen.

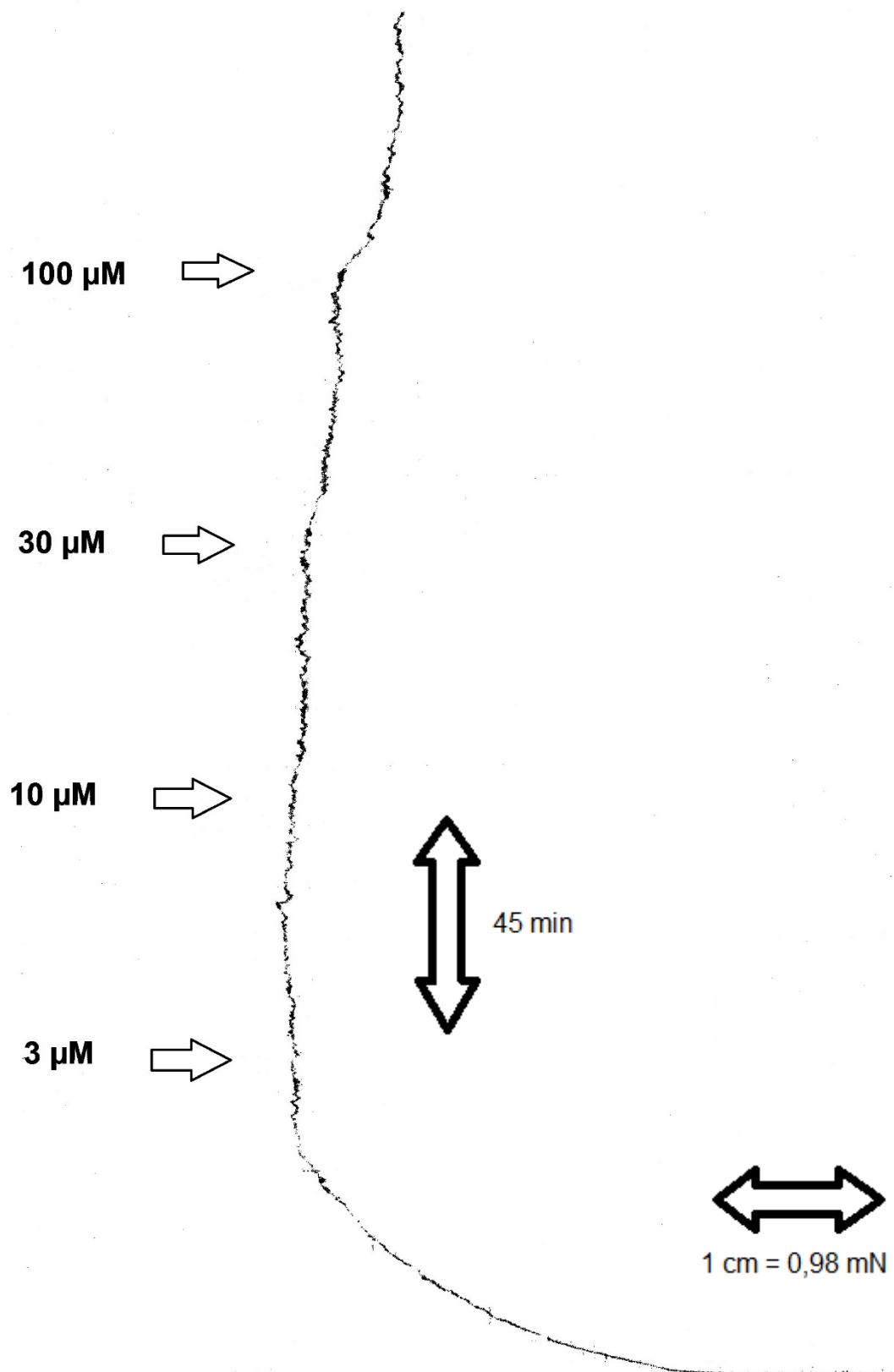


Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Arteria pulmonalis unter Einfluss von CMC44ox

4.2.3. Wirkung von CMC44ox auf das terminale Ileum

Mittels 5 Versuchen wurde die Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms ermittelt.

Im Kapitel 3.6.2.3 kann der Ablauf des Versuches, der dazu dient, die Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms zu untersuchen, nachgelesen werden.

Im Gegensatz zum Versuchsablauf an Aorta und Lungenarterie wurde hier nach der 20-minütigen Anpassungsphase die Nährlösung durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung ausgetauscht. Die dadurch erreichte maximale Kontraktion des Hüftdarms von $8,02 \pm 1,33$ mN wurde als Kontrollwert herangezogen und stellte die 100 %ige Kontraktionskraft dar.

Schon bei einer CMC44ox-Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ machte sich eine spasmolytische Wirkung bemerkbar. Die Kontraktionskraft reduzierte sich bereits hier auf $6,66 \pm 1,24$ mN. Durch die Erhöhung der Konzentration von CMC44ox kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Kontraktionskraft des Hüftdarms. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration, nämlich $100 \mu\text{mol/l}$, betrug die Kontraktionskraft nur mehr $1,69 \pm 0,32$ mN.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse, die im Laufe der Versuchsdurchführung durch den Einfluss von CMC44ox am Darm erhalten wurden. Angegeben sind die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und auch die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft. Es sind dann auch noch die zugehörigen Standardfehler (SEM) aufgelistet, sowie die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 11: Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms

CMC44ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$8,02 \pm 1,33$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$6,66 \pm 1,24$	$-17,75 \pm 2,66$	5	0,05
10	$5,84 \pm 1,27$	$-28,78 \pm 5,02$	5	0,05
30	$4,07 \pm 0,88$	$-50,27 \pm 4,28$	5	0,01
100	$1,69 \pm 0,32$	$-79,24 \pm 0,60$	5	0,01

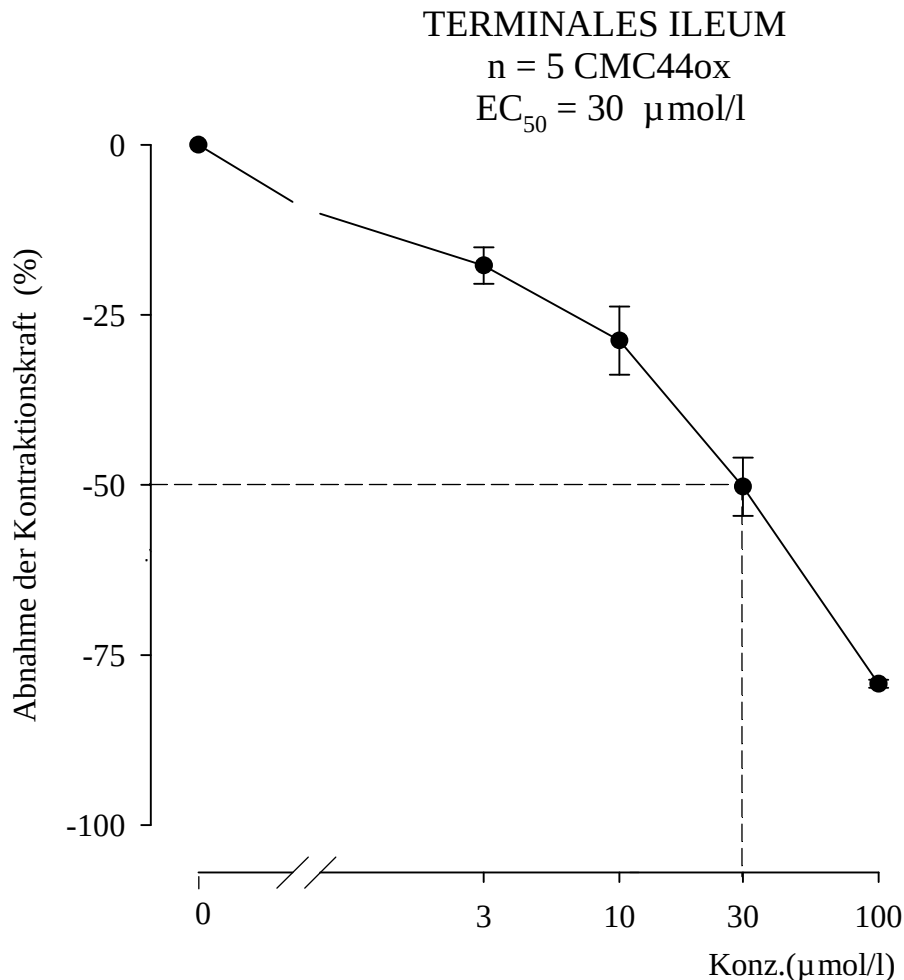


Diagramm 8: Konzentrations-Wirkungskurve von CMC44ox am terminalen Ileum

Diagramm 8 veranschaulicht die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Hüftdarms. Der Graph wurde durch das Eintragen der in den Versuchen ermittelten Daten mit dem Programm "Sigma Plot 9.0" erstellt.

Auf der x-Achse sind semilogarithmisch die Substanzkonzentrationen in µmol/l eingetragen und auf der y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %.

Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) sind in dem Diagramm als schwarze Punkte und die zugehörigen Standardfehler (SEM) in Form von senkrechten Balken dargestellt.

Durch Anlegen der strichlierten Linien konnte die EC₅₀ ermittelt werden; diese betrug 30 µmol/l. Somit ist die Intensität der durch CMC44ox bedingten Spasmolyse des Darms mit jener von BLV10ox vergleichbar.

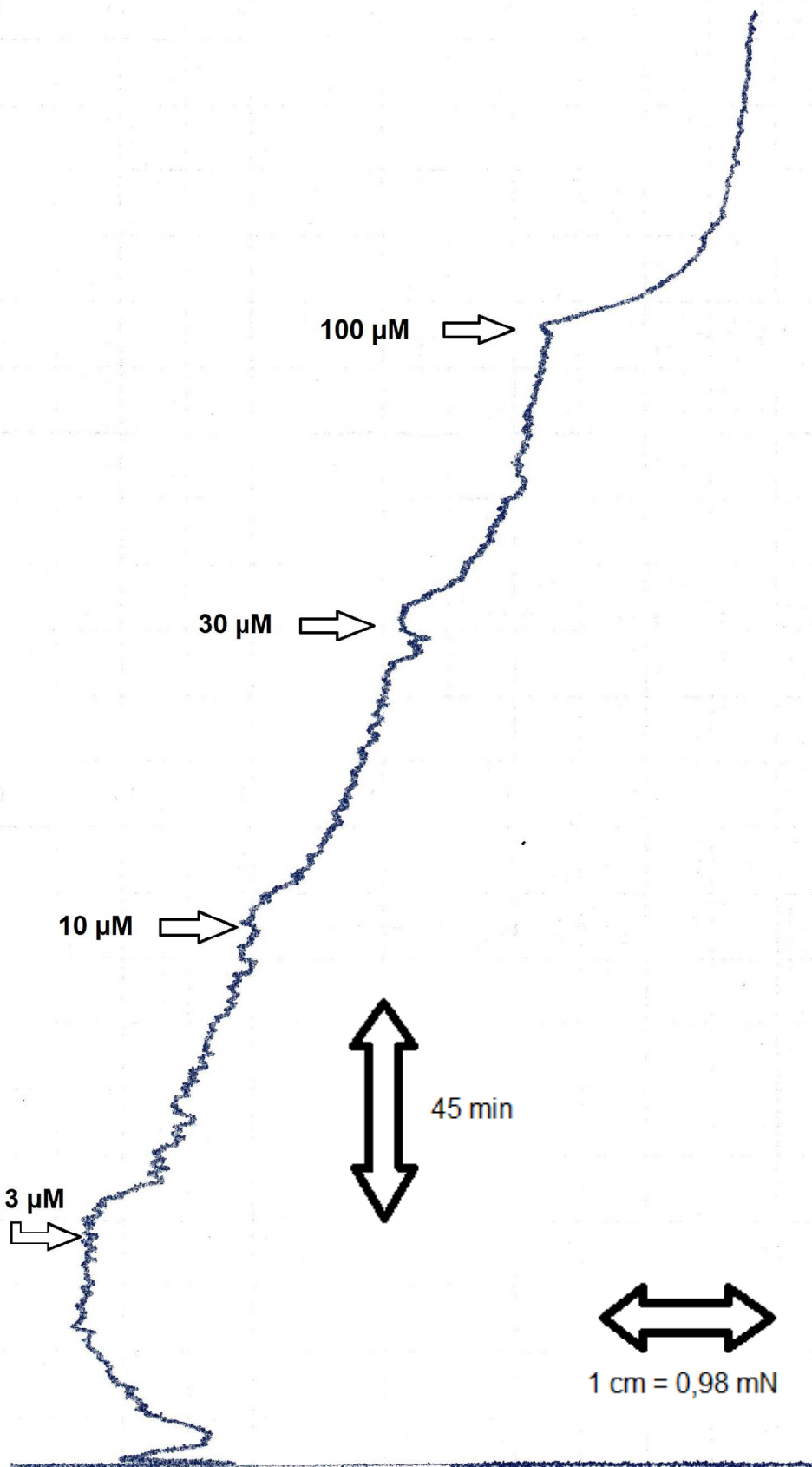


Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileums unter Einfluss von CMC44ox

4.2.4. Wirkung von CMC44ox auf den Musculus papillaris

Es erfolgte eine Durchführung von 4 Versuchen, um die Wirkung, die die Testsubstanz auf den Papillarmuskel ausübt, zu ermitteln.

Der genaue Versuchsablauf, um die Auswirkung von CMC44ox auf die Inotropie des Papillarmuskels zu ermitteln, kann im Kapitel 3.6.2.5 nachgelesen werden.

Da hier ein Reizgerät eingesetzt wurde, welches den Muskel durch elektrische Reize stimulierte, kam hier keine Kaliumchloridlösung zum Einsatz. Nach Erreichen einer konstanten maximalen Kontraktionskraft, konnte der Referenzwert ermittelt werden, welcher durchschnittlich $1,47 \pm 0,17$ mN betrug.

Bezogen auf diesen Kontrollwert konnte nun durch die darauffolgende Zugabe und schrittweise Konzentrationssteigerung der Testsubstanz CMC44ox deren inotrope Wirkung am Papillarmuskel bestimmt werden. Im Gegensatz zur Testsubstanz BLV10ox kam es hier zu einer Abnahme der Kontraktionskraft des Muskels, allerdings war auch diese nur sehr schwach ausgeprägt, denn bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz wurde eine Kontraktionskraft von $1,34 \pm 0,12$ mN ermittelt. Dies bedeutet, es kam zu einer sehr geringfügigen negativ inotropen Wirkung. Anzumerken ist, dass es durch die Konzentrationssteigerung nicht durchgehend zu einer Reduktion der Kontraktionskraft kam, sondern bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration zu einer Steigerung. All diese Abweichungen vom Kontrollwert waren aber nur von geringer Intensität.

In Tabelle 12 findet man die bei den vier Versuchsdurchgängen am Papillarmuskel ermittelten Werte der Kontraktionskraft angegeben in mN sowie die prozentuelle Veränderung der Kontraktionskraft inklusive der zugehörigen Standardfehler (SEM). Aus dieser Tabelle können dann auch noch die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) abgelesen werden.

Tabelle 12: Wirkung von CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

CMC44ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	$1,47 \pm 0,17$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$1,53 \pm 0,17$	$4,66 \pm 0,75$	4	n.s.
10	$1,36 \pm 0,20$	$-7,86 \pm 4,59$	4	n.s.
30	$1,27 \pm 0,15$	$-13,37 \pm 4,08$	4	n.s.
100	$1,34 \pm 0,12$	$-8,33 \pm 1,99$	4	n.s.

PAPILLARMUSKEL
n = 4 CMC44ox

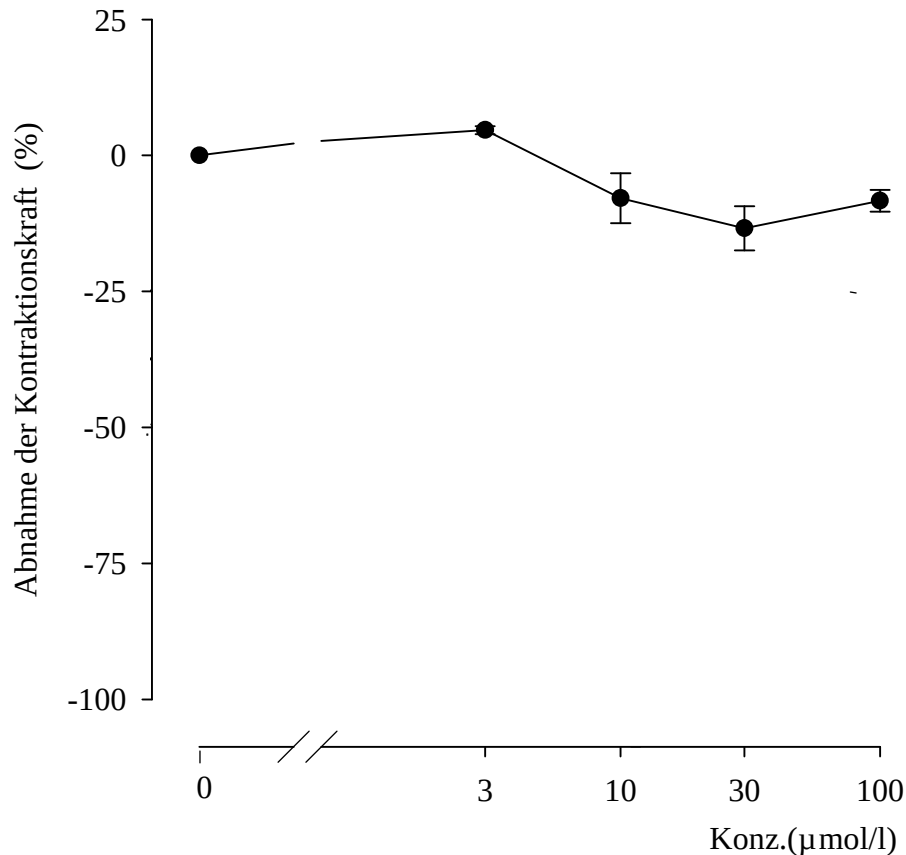


Diagramm 9: Konzentrations-Wirkungskurve von CMC44ox auf den Musculus papillaris

Diagramm 9 wurde mit dem Programm "Sigma Plot 9.0" erstellt und veranschaulicht die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Dabei wurden auf der x-Achse semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentrationen in µmol/l und auf die y-Achse die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft aufgetragen.

Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) werden als schwarze Punkte und deren Standardfehler (SEM) als senkrechte Balken dargestellt.

In diesem Diagramm ist nun deutlich sichtbar, dass es während der Versuche nicht zu einer durchgehenden Reduktion der Kontraktionskraft kam. Allgemein sind hier die Abweichungen der Kontraktionskraft vom Kontrollwert nur sehr

schwach ausgeprägt.

Die EC_{50} konnte somit durch keine der eingesetzten Substanzkonzentrationen erreicht werden.

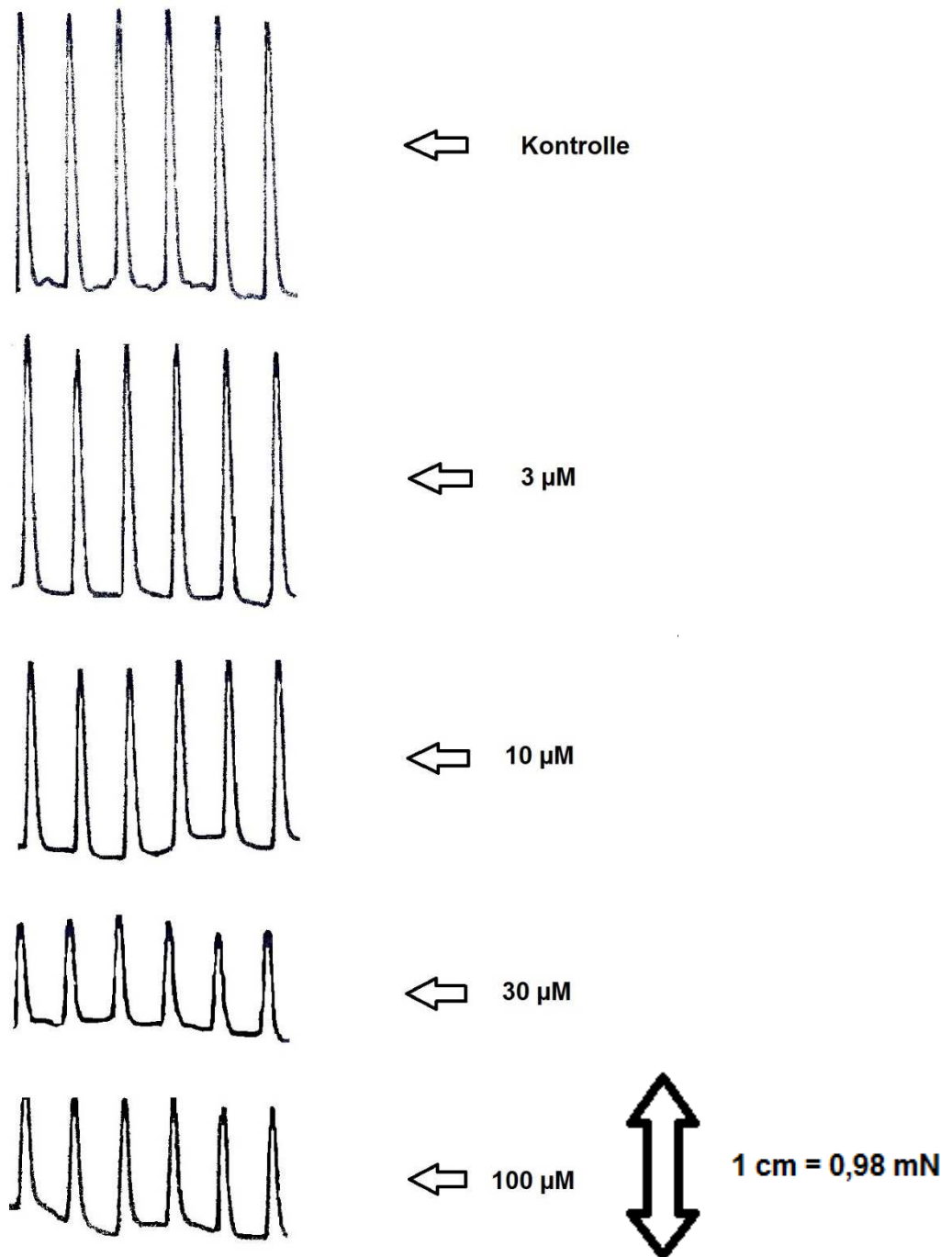


Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Peaks des Musculus papillaris unter Einfluss von CMC44ox

4.2.5. Wirkung von CMC44ox auf den rechten Vorhof

Zur Ermittlung der Auswirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurden 4 Versuche durchgeführt.

Im Kapitel 3.6.2.4 ist der genaue Versuchsaufbau für die Untersuchung der Wirkung, die CMC44ox auf den rechten Vorhof ausübt, ersichtlich.

Auch hier kam im Laufe des Versuchs keine Kaliumchloridlösung zum Einsatz.

Als Referenzwert wurde die konstante, maximale Schlagfrequenz herangezogen, die folglich 100 % entsprach. Der Durchschnittswert dieser maximalen Schlagfrequenz betrug hier $201,25 \pm 6,25$ mN.

Durch die Zugabe von CMC44ox kam es bei jeder Konzentrationssteigerung zu einer Reduktion der Schlagfrequenz. Bei einer CMC44ox-Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ wurde eine Frequenz von $101,25 \pm 4,27$ erreicht. Im Gegensatz zum Einfluss von BLV10ox auf den rechten Vorhof, führte keine der eingesetzten CMC44ox-Konzentrationen zum Herzstillstand, das heißt, die negativ chronotrope Wirkung von CMC44ox ist weniger stark ausgeprägt als jene von BLV10ox.

Tabelle 13 zeigt die Versuchsergebnisse, die durch den Einfluss von CMC44ox am rechten Vorhof ermittelt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und ebenso die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft verglichen mit dem Kontrollwert. Weiters sind auch die zugehörigen Standardfehler (SEM) aufgelistet, sowie die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Tabelle 13: Wirkung von CMC44ox auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

CMC44ox ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlich keit (P)
0	201,25 $\pm$ 6,25	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
3	181,25 $\pm$ 6,57	-9,94 $\pm$ 1,41	4	0,5
10	157,50 $\pm$ 7,22	-21,58 $\pm$ 3,84	4	0,5
30	133,75 $\pm$ 7,18	-33,42 $\pm$ 3,67	4	0,01
100	101,25 $\pm$ 4,27	-49,41 $\pm$ 3,46	4	0,01

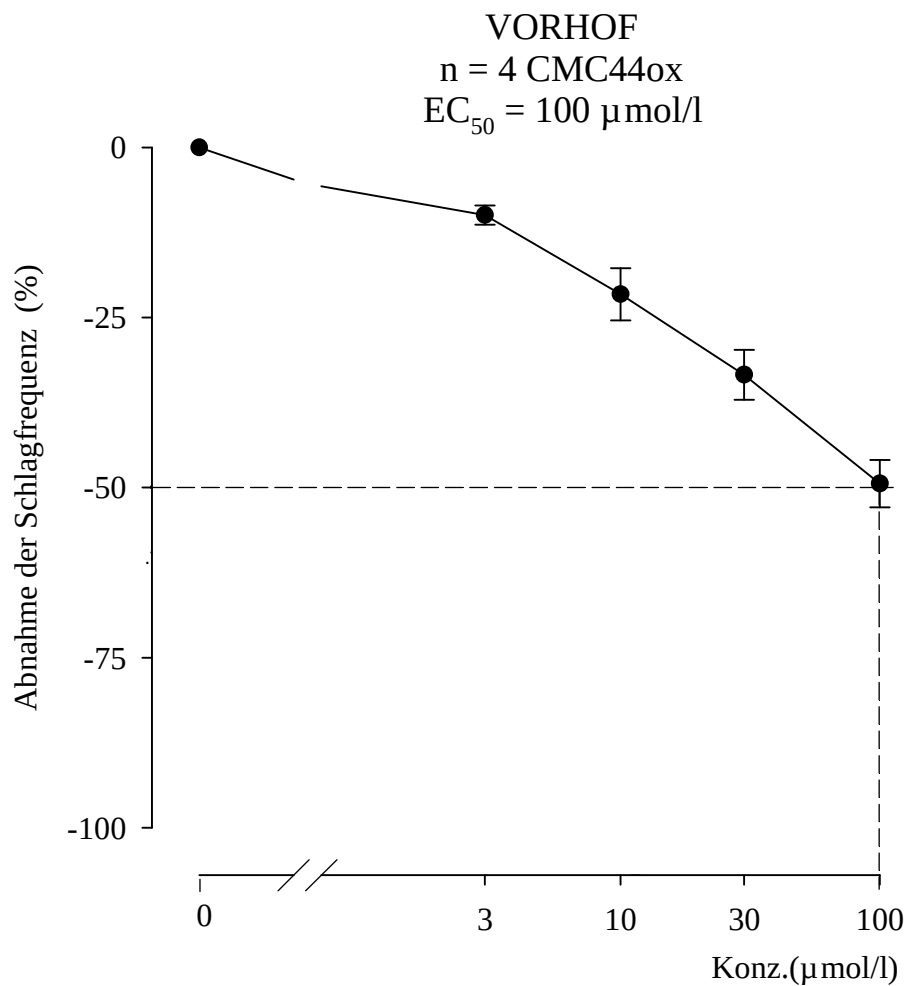


Diagramm 10: Konzentrations-Wirkungskurve von CMC44ox am Atrium cordis dextrum

In Diagramm 10 ist die konzentrationsabhängige Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs ersichtlich. Die Graphik wurde mit Hilfe des Programms "Sigma Plot 9.0" erstellt.

Die Substanzkonzentrationen in µmol/l wurden in semilogarithmischer Form auf der Abszisse aufgetragen und die Änderung der Kontraktionskraft in % auf der Ordinate.

In der graphischen Darstellung sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) in Form von schwarzen Punkten eingezeichnet und deren Standardfehler (SEM) als senkrechte Balken.

Im Diagramm kann die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz CMC44ox auf den rechten Vorhof erkannt werden. Die EC_{50} betrug $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ und wurde durch Anlegen strichlierter Linien ermittelt. Anhand der EC_{50} wird hier noch einmal verdeutlicht, dass in Bezug auf die Reduktion der Schlagfrequenz, BLV10ox potenter ist als CMC44ox.

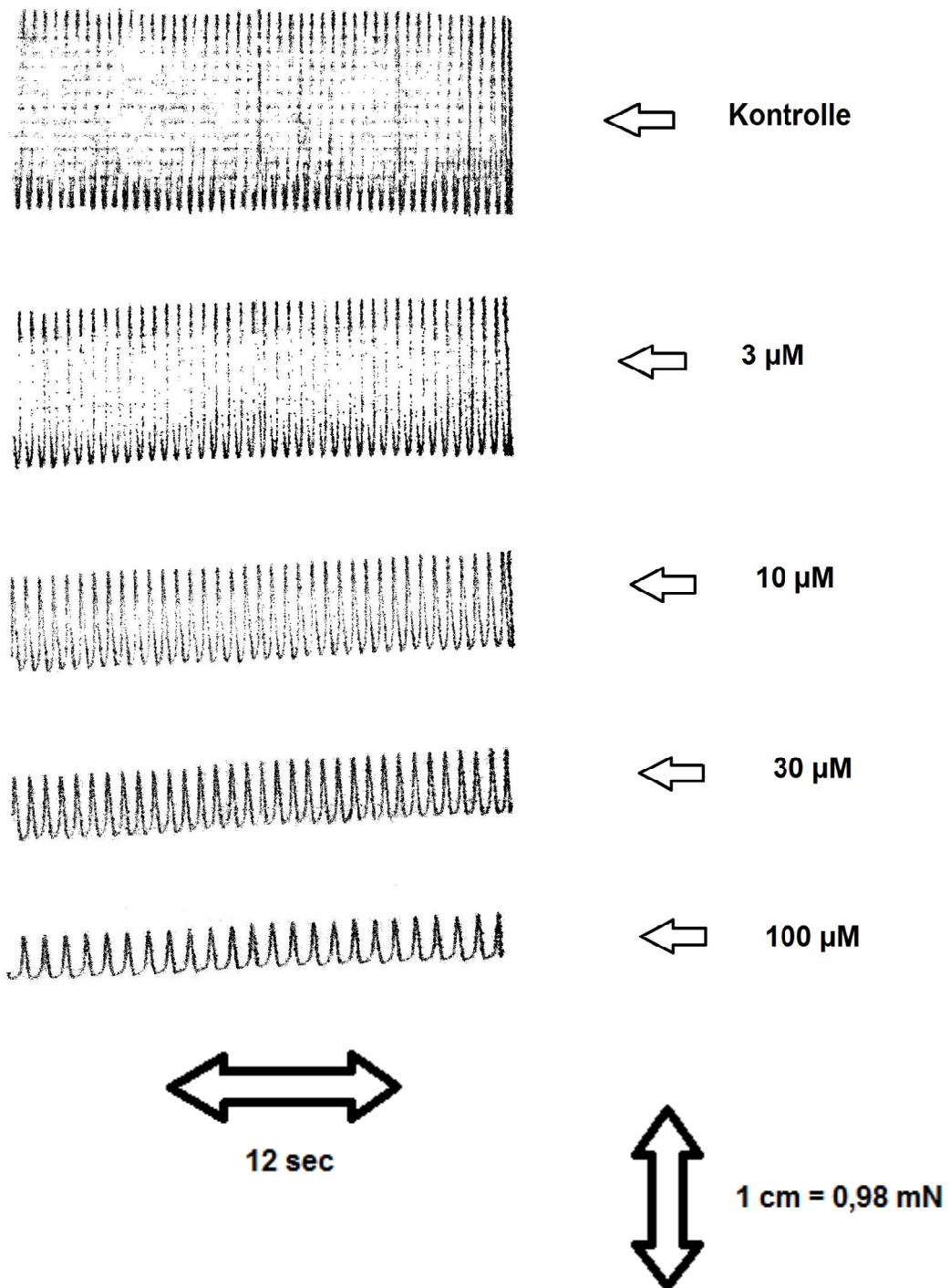


Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Peaks des rechten Vorhofs unter Einfluss von CMC44ox

5. Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Auswirkungen der beiden Testsubstanzen BLV10ox und CMC44ox auf isolierte Organe von Meerschweinchen zu untersuchen. Bei den verwendeten Organen handelte es sich einerseits um die glatte Muskulatur von Aorta, Lungenarterie und Hüft Darm und andererseits um die beiden Herzpräparate Papillarmuskel und rechter Vorhof. Getestet wurde dabei der Einfluss der beiden Verbindungen auf die Vasodilatation bzw. Spasmolyse an den glattemuskulären Präparaten, sowie eine Veränderung der Inotropie bzw. Chronotropie an der Herzmuskulatur.

Die dafür eingesetzten Methoden und die ermittelten Ergebnisse wurden bereits in den Kapiteln 3 und 4 näher ausgeführt.

5.1. Wirkung auf die Organe

5.1.1. Wirkung auf die Organe der glatten Muskulatur

Damit es überhaupt erst möglich war, eine Abnahme der Kontraktionskraft und somit eine vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung zu erkennen, kam es im Laufe der Versuche zum Einsatz einer Kaliumchloridlösung (siehe Kapitel 3.2.2), welche eine maximale Kontraktion der Muskulatur verursachte.

Tabelle 14: Einfluss von BLV10ox und CMC44ox auf die glatte Muskulatur

Präparat	BLV10ox f_c (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	CMC44ox f_c (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta descendens	$-35,20 \pm 5,76$	$>100 \mu\text{mol/l}$	$-4,39 \pm 3,71$	$>100 \mu\text{mol/l}$
Arteria pulmonalis	$-31,76 \pm 8,98$	$>100 \mu\text{mol/l}$	$-25,51 \pm 2,30$	$>100 \mu\text{mol/l}$
Terminales Ileum	$-78,22 \pm 2,43$	$30 \mu\text{mol/l}$	$-79,24 \pm 0,60$	$30 \mu\text{mol/l}$

Tabelle 14 ermöglicht den direkten Vergleich der beiden Testsubstanzen in Bezug auf deren Wirkung an der glatten Muskulatur, sowie die direkte Gegenüberstellung der Wirkung an der Aorta, der Lungenarterie und dem Hüft Darm innerhalb jeweils einer Substanz.

5.1.1.1. Wirkung auf die Aorta descendens

Beide Testsubstanzen führten zu einer Vasodilatation der Aorta, wobei wie Tabelle 14 zeigt, diese nur schwach ausgeprägt war. Vor allem bei CMC44ox machte sich diese kaum bemerkbar. Somit konnte durch die eingesetzten Konzentrationen der beiden Substanzen auch keine EC_{50} an diesem Gefäß ermittelt werden.

5.1.1.2. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Die gefäßerschlaffende Wirkung von BLV10ox erfolgte bei der Lungenarterie etwa im gleichen Ausmaß wie bei der Aorta. Im Gegensatz dazu verursachte CMC44ox eine stärkere Reduktion der Kontraktionskraft an der Lungenarterie als bei der Aorta. Dennoch war auch diese Wirkung weniger stark ausgeprägt als jene von BLV10ox. Auch an der Lungenarterie konnte im Laufe der Versuche durch keine der beiden Testsubstanzen eine EC_{50} ermittelt werden.

5.1.1.3. Wirkung auf das terminale Ileum

Im Laufe der Versuche konnte festgestellt werden, dass sowohl BLV10ox als auch CMC44ox über ein starkes spasmolytisches Potential verfügten. Dieses war bei beiden Substanzen in etwa vergleichbar, was dadurch verdeutlicht wurde, dass die EC_{50} jeweils bei 30 $\mu\text{mol/l}$ lag.

5.1.2. Wirkung auf die Organe der Herzmuskulatur

Tabelle 15: Einfluss von BLV10ox und CMC44ox auf die Herzmuskulatur

Präparat	BLV10ox f_c (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$ (Musculus papillaris) bzw. 30 $\mu\text{mol/l}$ (Atrium cordis dextrum)	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	CMC44ox f_c (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Musculus papillaris	$8,60 \pm 5,09$	$>100 \mu\text{mol/l}$	$-8,33 \pm 1,99$	$>100 \mu\text{mol/l}$
Atrium cordis dextrum	$-100,00 \pm 0,00$	$13,5 \mu\text{mol/l}$	$-49,41 \pm 3,46$	$100 \mu\text{mol/l}$

Tabelle 15 ermöglicht den direkten Vergleich der beiden Testsubstanzen in Bezug auf deren Wirkung auf die Herzmuskulatur, sowie die direkte Gegenüberstellung der Wirkung auf den Papillarmuskel und den rechten Vorhof innerhalb jeweils einer Substanz.

In der Zeile „Atrium cordis dextrum“ ist bei BLV10ox der arithmetische Mittelwert und Standardfehler bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ angegeben, da bereits bei dieser Konzentration der Herzstillstand eintrat.

5.1.2.1. Wirkung auf den Musculus papillaris

Wie in Tabelle 15 ersichtlich, hatte keine der beiden Testsubstanzen einen wesentlichen Einfluss auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Somit konnte auch durch keine der eingesetzten Substanzkonzentrationen die EC_{50} bestimmt werden.

Die Versuche zeigten bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine negativ inotrope Wirkung von CMC44ox und eine positiv inotrope Wirkung von BLV10ox. Allerdings kam es durch die Konzentrationssteigerung bei keiner der

beiden Testsubstanzen ausschließlich zu einer Reduktion bzw. Steigerung der Muskelkontraktionskraft, sondern zu Auf- und Abwärtsschwankungen im Bereich des Referenzwertes.

5.1.2.2. Wirkung auf das Atrium cordis dextrum

Beide Testsubstanzen wiesen eine starke negativ chronotrope Wirkung auf; belegt durch die Tatsache, dass sie bei jeder Konzentrationserhöhung eine weitere Abnahme der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs veranlassten. Dabei lag die EC_{50} bei BLV10ox bei nur 13,5 $\mu\text{mol/l}$, die von CMC44ox bei 100 $\mu\text{mol/l}$.

5.2. Schlussfolgerung

Die im Laufe der Durchführung der Versuche ermittelten Wirkungsprofile beider Testsubstanzen waren einander sehr ähnlich. So zeigten beide Substanzen eine negativ chronotrope Wirkung, die insbesondere bei BLV10ox sehr stark ausgeprägt war. Der Einfluss auf die Inotropie war von beiden Stoffen eher gering, wobei keiner bei steigender Konzentration eine durchgehende Ab- bzw. Zunahme der Kontraktionskraft bewirkte.

In Hinblick auf die glatte Muskulatur bedingten beide Wirkstoffe eine starke Spasmolyse des Darms. Die Auswirkung auf die Gefäßmuskulatur war hingegen weniger stark ausgeprägt, wobei BLV10ox stärker gefäßdilatierend wirkte als CMC44ox. Die erstgenannte Substanz verringerte die Kontraktionskraft der Aorta stärker als jene der Lungenarterie; die zweite Verbindung agierte genau umgekehrt.

6. Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit befasste sich mit der Untersuchung des Nebenwirkungsprofils zweier am Department für Pharmazeutische Chemie neu synthetisierte Substanzen mit den Bezeichnungen BLV10ox und CMC44ox. Die Durchführung der Versuche erfolgte hierfür an ausgewählten Organen von Meerschweinchen, die für diesen Zweck entsprechend isoliert und präpariert wurden. Genauer betrachtet handelte es sich dabei um die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum, welche glattmuskuläre Organe darstellen, sowie um zwei herzmuskuläre Organe, nämlich den Musculus papillaris und das Atrium cordis dextrum.

Da es sich bei den beiden Testsubstanzen um Butyrylcholinesterasehemmer handelt, wodurch der Abbau von Acetylcholin gehemmt und somit dessen Konzentration erhöht wird, war mit typischen Wirkungen von Acetylcholin zu rechnen. Wie schon unter Kapitel 2 erwähnt, lagen deshalb vor allem die Auswirkungen der beiden Wirkstoffe auf das Herz im Vordergrund der Untersuchungen.

Demzufolge wurde hier mit einer negativ chronotropen und negativ inotropen Wirkung gerechnet. In Hinblick auf die glattmuskulären Organe vermutete man eine Abnahme der Kontraktionskraft.

Die für die Testung verwendeten Meerschweinchenorgane wurden täglich frisch entnommen, anschließend präpariert und dann in die jeweils vorgesehene Apparatur eingebracht. Um den physiologischen Bedingungen möglichst getreu zu bleiben, befanden sich die Präparate durchgehend in einer physiologischen Nährlösung, die ebenfalls täglich frisch zubereitet wurde. Diese wurde mit einem Gasgemisch namens Oxymix (Carbogen) begast, was sowohl eine ausreichende Sauerstoffsättigung als auch einen konstanten physiologischen pH-Wert gewährleistete. Zusätzlich wurden auch die Organbäder beheizt und wiesen eine konstante körperähnliche Temperatur auf.

Die Substanz BLV10ox führte am rechten Vorhof, wie erwartet, zu einer negativ

chronotropen Wirkung. Diese war besonders stark ausgeprägt und verursachte bereits bei einer Konzentration von 30 µmol/l einen Herzstillstand.

Die ermittelte EC₅₀ lag bei nur 13,5 µmol/l; dies war somit die niedrigste EC₅₀, die im Rahmen dieser Diplomarbeit ermittelt wurde. Das bedeutet, dass in Hinblick auf die hier untersuchten Nebenwirkungen, die negative Chronotropie, die potenteste Wirkung von BLV10ox darstellt.

Im Gegensatz dazu konnte anhand der durchgeführten Versuche eine vermutete negativ inotrope Wirkung von BLV10ox nicht bestätigt werden.

An den Organen der glatten Muskulatur kam es wie vorausgesagt zu einer Reduktion der Kontraktionskraft, wobei die gefäßdilatierende Wirkung deutlich schwächer ausgeprägt war als die spasmolytische. Lediglich am Darm konnte die EC₅₀ von BLV10ox ermittelt werden, diese betrug 30 µmol/l.

Die Ergebnisse der Testsubstanz CMC44ox waren ähnlich jenen von BLV10ox. So wurde auch hier die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs herabgesetzt und somit die vermutete negativ chronotrope Wirkung bestätigt. Allerdings war diese nicht so stark ausgeprägt wie jene von BLV10ox, was durch die ermittelte EC₅₀ deutlich erkennbar war, denn diese war hier deutlich höher und betrug 100 µmol/l.

Auch hier kam es lediglich zu einer geringfügigen Änderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen resultierte diese Kontraktionskraftänderung bei der höchsten eingesetzten CMC44ox-Konzentration in einer schwachen, kaum bemerkbaren negativ inotropen Wirkung.

Die Resultate der Untersuchungen an den glattemuskulären Organen entsprachen weitgehend jenen von BLV10ox. Auch hier kam es zu der vermuteten Vasodilatation bzw. Spasmolyse. Ebenso war die gefäßerschlassende Wirkung nur von geringer und die spasmolytische Wirkung von starker Intensität. So konnte auch hier im Zuge der Versuche nur die EC₅₀ von CMC44ox am Darm bestimmt werden, welche 30 µmol/l betrug.

7. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. überarbeitete Auflage. Urban & Fischer-Verlag München 2009

Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P (2002): Evaluation oft he Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. Biological & Pharmaceutical Bulletin 25: 1600-1603

Douglas TB (1946): Heats of Formation of Liquid Methyl Sulfoxide and Crystalline Methyl Sulfone at 18 deg. Journal o American Chemical Society 68: 1072-1076

Hunnius – Pharmazeutisches Wörterbuch (2004) Walter de Gruyter, 9. Auflage

Larsen Reinhard (2011) Anästhesie. Elsevier, Urban & Fischer Verlag. 4

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P: Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2013

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

Sexton TJ (1979): Cytotoxicity of DMSO as related to components of turkey semen extender. Poultry Science 58: 1024-1030

Thews G, Mutschler E, Vaupel P: (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5., völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart

8. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Patrizia Elisabeth Windisch

Geburtsdatum: 24.12.1990

Geburtsort: Oberwart

Familienstand: ledig

Staatsbürgerschaft: Österreich

Religionsbekenntnis: römisch katholisch

Eltern:

- Mag. pharm. Norbert Windisch
- Mag. pharm. Andrea Anna Windisch

Geschwister:

- Mag. pharm. Norbert Klaus Windisch
- Mag. pharm. Andreas Martin Windisch
- Mag. pharm. Viktoria Andrea Singer
- Theresa Maria Windisch
- Julia Anna Schwarz
- Dominik Johannes Windisch

Ausbildung

1997 – 2001: Volksschule, Markt Allhau

2001 – 2009: Bundesgymnasium, Oberschützen

Seit Oktober 2009: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Seit Oktober 2013: Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie