



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Wirkung eines neuen Resveratrolderivats (JB26) an isolierten
Präparaten von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Agnieszka Ewa Strallhofer
Matrikel-Nummer:	9627163
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 449 Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof.Mag.Dr.Christian Studenik
Wien, im Februar 2008	

Inhaltsverzeichnis:

1.Einführung	3
1.1.Zielsetzung	3
1.2.Resveratrol	4
1.2.1.Geschichte	4
1.2.2.Vorkommen	4
1.2.3.Biosynthese	6
1.2.4.Eigenschaften und Wirkungen	8
1.2.5.Bioverfügbarkeit von Resveratrol	10
2.Material und Methodik	11
2.1.Testsubstanz	11
2.2.Versuchstiere	13
2.3.Präparation der Organe	14
2.3.1.Isolierung der Arteria pulmonalis	14
2.3.2.Isolierung des rechten Vorhofes	14
2.3.3.Isolierung des Papillarmuskels	15
2.3.4.Isolierung der Aorta	15
2.3.5.Isolierung des terminalen Ileums	16
2.3.6.Isolierung des Uterus	17
2.4.Physiologische Elektrolytlösungen (Tyroden)	18
2.4.1.Elektrolytlösung für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum	19
2.4.2.Elektrolytlösung für die Aorta	21
2.4.3.Elektrolytlösung für den Uterus	22
2.5.Versuchsanordnung	23
2.5.1.Versuchsapparatur I	23
2.5.2.Versuchsapparatur II	26
2.5.3.Kraftwandler	28
2.5.4.Gasversorgung	29
2.6.Versuchsablauf.....	30
2.6.1.Versuchsablauf beim rechten Vorhof	30
2.6.2.Versuchsablauf beim Papillarmuskel	31
2.6.3.Versuchsablauf bei der Aorta	32
2.6.4.Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis	33
2.6.5.Versuchsablauf beim terminalen Ileum	34
2.7.Untersuchungen der Testsubstanz in Kombination mit Agonisten	35

2.7.1. Verwendete Agonisten	35
2.7.1.1. Histamindihydrochlorid	35
2.7.1.2. Acetylcholinhydrochlorid	37
2.7.1.3. Phenylephrinhydrochlorid	39
2.7.2. Versuchsablauf am terminalen Ileum mit Agonisten	40
2.7.3. Versuchsablauf am Uterus mit Agonisten	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Testsubstanz JB26	42
3.1.1. Wirkung auf den rechten Vorhof	42
3.1.2. Wirkung auf Papillarmuskel	46
3.1.3. Wirkung auf isolierte Aorta	50
3.1.4. Wirkung auf die Arteria pulmonalis	54
3.1.5. Wirkung auf das terminale Ileum	58
3.2. Versuche der Testsubstanz JB26 mit Agonisten	62
3.2.1. Versuche in Kombination mit Histamin an terminalen Ileum	62
3.2.2. Versuche in Kombination mit Acetylcholinhydrochlorid am terminalen Ileum	70
3.2.3. Versuche in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid am terminalen Ileum	78
3.2.4. Versuche in Kombination mit Histamin am Uterus	86
3.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die isolierte Organe	92
3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs	92
3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	93
3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta	94
3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis	95
3.3.5. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums	96
4. Diskussion	97
4.1. Struktur-Wirkungsbeziehung	97
4.2. Versuche an den isolierten Organen	98
4.3. Versuche an den isolierten Organen in Kombination mit Agonisten	102
5. Zusammenfassung	104
6. Literaturverzeichnis	106
Curriculum vitae	110

1. Einführung

1.1. Zielsetzung

Die genaue Untersuchung und Feststellung einer Wirkung der Testsubstanz JB26 auf die isolierten Organe des Meerschweinchens war das Ziel dieser Diplomarbeit.

Als Ausgangssubstanz für die Synthese von JB26 diente bereits gut erforschter Naturstoff Resveratrol. Die gewonnen Ergebnisse wurden auch mit Resveratrol verglichen.

Um den Einfluss der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur zu erforschen, wurden Aorta-, Arteria pulmonalis- und terminales Ileum-Präparate verwendet. Für die mögliche positive oder negative chronotrope bzw. inotrope Wirkung wurden Papillarmuskel- und Vorhof-Präparate herangezogen.

Um ein mögliches identes Wirkungsspektrum mit Ausgangssubstanz Resveratrol herauszufinden, wurde die Testsubstanz JB26 auch in Kombination mit unterschiedlichen Agonisten (Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin) getestet.

Diese Versuche wurden am terminalen Ileum und am Uterus durchgeführt.

1.2. Resveratrol

1.2.1. Geschichte

Resveratrol wurde zum ersten Mal 1963 in Knötterich-Pflanzen (*Polygonum cuspidatum*) Isoliert und identifiziert. Diese Pflanzen haben lange Tradition in der japanischen und chinesischen Medizin und wurden angewendet um zum Beispiel Pilze, Hautentzündungen, sowie Krankheiten des Herzens und der Blutgefäße zu behandeln.

1976 wurde Resveratrol in Weintrauben nachgewiesen, aber erst seit 1992 erkannte man das große Potential dieses Stoffes.

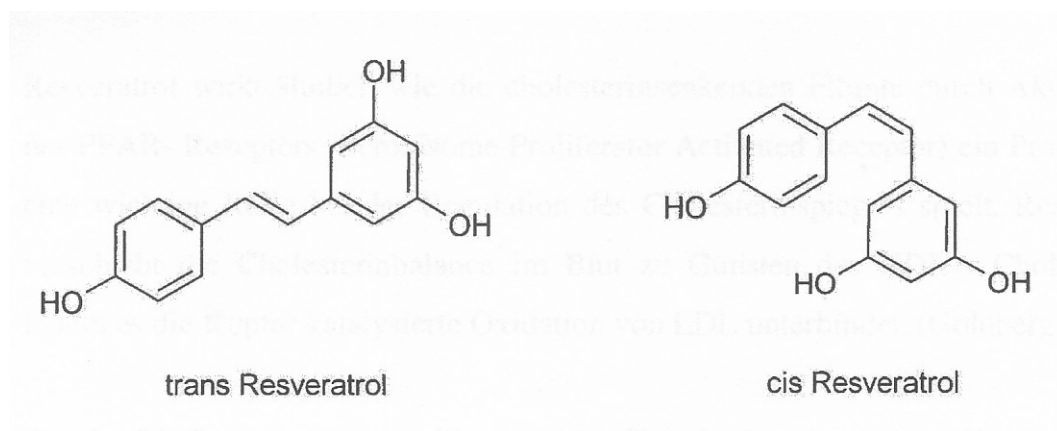
1.2.2. Vorkommen

Resveratrol kommt in vielen Spermatophyten vor und ist vor allem in Weintrauben (Langcake und Pryce 1976), Maulbeeren, Himbeeren und Erdnüssen (Schoepner und Kindl 1984) aber auch in Kiefern (Kindl,1985), Lein- und Sesamsaat (Hettwer 1997) zu finden. Am meisten konzentriert ist es aber in den Traubenschalen.

Was daraus resultiert ist auch eine hohe Konzentration von Resveratrol in Wein, vor allem im Rotwein. Weißwein enthält im Vergleich zum Rotwein nur wenig Resveratrol, da er einen anderen Fermentierungsprozess durchläuft.

Doch im Rotwein ist der Gehalt auch oft sehr unterschiedlich und beträgt 0,1 bis 15 mg pro Liter.

Abbildung 1: Strukturformel von Resveratrol



1.2.3. Biosynthese

Resveratrol (Trans-3,5,4'-trihydroxy-Stilben) gehört zu den Flavonoiden und wird der Klasse Phytoalexine zugeordnet. Phytoalexine sind eine Klasse von antibiotischen Polyphenol-Verbindungen, die das Abwehrsystem von Pflanzen stärken. (Gehm 1997)

Resveratrol ist ein Stoff, der als Stress-Metabolit bei erhöhter Belastung in der Pflanze selbst gebildet wird. Seine Synthese erfolgt zum Beispiel bei Infektionen, bei Insekten- oder Pilzbefall, durch Schadstoffe oder auch durch hohe Ozonbildung.

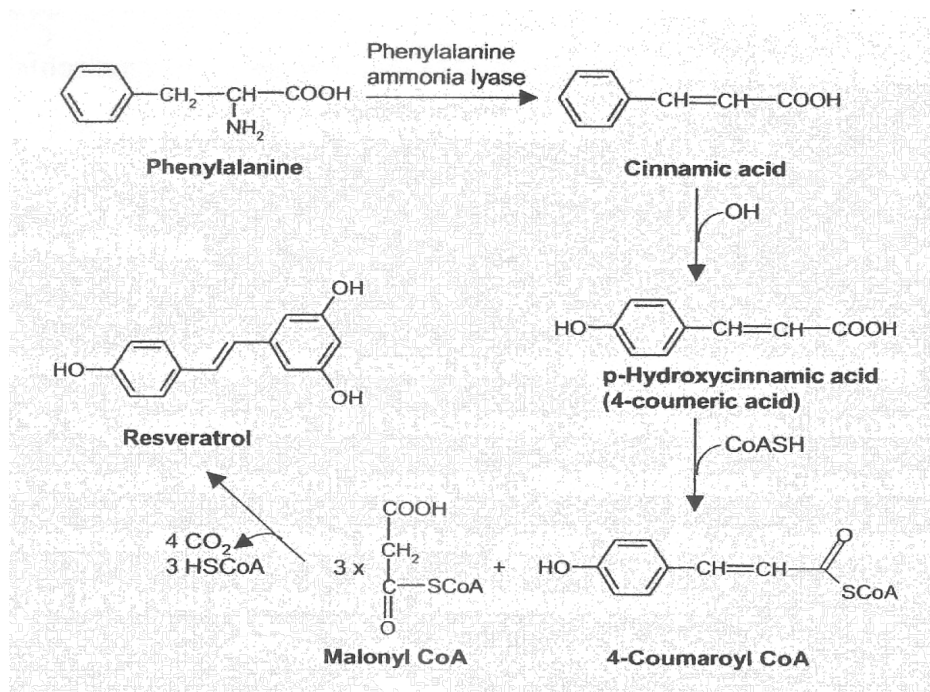
Bereits einige Stunden nach dem Stressauslösens wird die Stilben-Synthetase aktiviert. Diese Synthetase ist nötig für die Reaktion, bei der aus Phenylalanin über Zimtsäure die Cumarinsäure entsteht und mit Malonsäure weiter reagiert. Stilben-Synthetase ist nur bei wenigen Pflanzen vorhanden.

Manche Wissenschaftler spekulieren mit der Möglichkeit durch gezielte Genmanipulation auch andere Pflanzen zur Resveratrol-Synthese zu betätigen. (Austin 2004).

Für Biosynthese von Resveratrol fungiert als Ausgangssubstanz die Aminosäure: Phenylalanin. Diese wird durch Oxydation und Desaminierung zur Zimtsäure, die in weiterer Folge enzymatisch zur p-Cumarinsäure hydroxyliert wird. Durch eine spezifische CoA-Ligase wird die Cumarinsäure zum Ester umgesetzt. Danach findet mit drei Malonyl-CoA und der Resveratrol-Synthetase die Kondensation statt. (Wu 2001)

Resveratrol kommt in der Natur in der trans- und der cis-Form vor, sowie auch als Glucosid, jedoch die prozentuell häufigste Form ist trans-Resveratrol. (Hung 1997)

Abbildung 2: Biosynthese von Resveratrol



1.2.4. Eigenschaften und Wirkungen

Bis jetzt wurden die positiven Wirkungen von Resveratrol bei In-vitro-Versuchen und bei Untersuchungen an Tiermodellen untersucht, allerdings stehen genaue Studien am Menschen noch aus. In den letzten Jahren wurden viele Studien über den Naturstoff Resveratrol veröffentlicht und Resveratrol als Wundermittel angepriesen.

Antioxidative Wirkung

Resveratrol ist vor allem Fänger von Peroxyl-Radikalen. Seine antioxidative Wirkung wurde bereits durch mehrere Studien belegt. Es hemmt auch die Thrombozytenaggregation und ist den anderen bereits bekannten Thrombozytenaggregationshemmern, wie α -Tocopherol, Vitamin C oder Hydrochinon, überlegen. (Kirk 2000; Hung 2000)

Es stärkt auch die Herz-Kreislauffunktionen, hat eine gewisse kardioprotektive Wirkung und bietet Schutz vor koronaren Herzkrankheiten oder Arteriosklerose.

Außerdem greift Resveratrol in den Fettstoffwechsel ein, indem es die Lipidperoxidation von Lipoproteinen low density lipoproteins (LDL) senkt und gleichzeitig die Oxidation von high density lipoproteins (HDL) forciert.

So schützt Resveratrol vor den schädlichen Folgen von oxidiertem LDL, senkt die Cholesterin-Werte und einen damit verbundenen Risikofaktor für Herzerkrankungen oder Arteriosklerose.

Östrogene Wirkung

Da Resveratrol ähnliche Struktur wie Östrogene aufweist, wird auch eine östrogen-ähnliche Aktivität vermutet. Es wurde bereits die schützende Wirkung bei Mammakarzinom- Kulturen von Mäusen experimentell nachgewiesen. Bei menschlichen Mammatumoren konnte aber bislang noch keine anticarcinogene Wirkung bewiesen werden. (Gehm 1997)

Resveratrol wirkt also ähnlich wie Phytoöstrogene und hat auch eine strukturelle Ähnlichkeit mit synthetischen Östrogenen, wie Diethylstilbestrol. Deswegen wird die Resveratrol-Wirkung von Östrogenrezeptorenblocker (wie zum Beispiel Tamoxifen) inhibiert.

Chemoprotektive und antiinflammatorische Wirkung

Resveratrol stärkt das Immunsystem und hat eine gewisse antiphlogistische Wirkung, hemmt einige Pilze sowie Herpes-Viren. Es ist imstande die Cyclooxygenase (COX) und die Aktivität von Hydroperoxidase von COX-1 zu hemmen.

Am meisten diskutiert ist jedoch die mögliche antimutagene bzw. anticancerogene Wirkung. Resveratrol kann auf Prozesse einwirken, welche die Bindung von Krebszellen, sowie deren weitere Entwicklung hemmen können. (verringerte Nitrooxidsynthase, verminderte Bildung von Prostaglandinen)

Man geht davon aus, dass Resveratrol einen gewissen Schutz vor Brustkrebs, Darmkrebs, Leukämie, Haut-, Lungen- sowie Prostatakrebs bietet. Es wurde ja auch in vielen Studien belegt, die Fähigkeit von Resveratrol in Krebszellen eine Apoptose zu induzieren. Die

Apoptose kommt nämlich durch Hemmung der zwei wichtigsten Transkriptionsfaktoren activating protein 1 (AP-1) und nuclear faktor κ B (NF- κ B) zustande. (Yeung 2004)

Es konnte auch bewiesen werden, dass Resveratrol die DANN-Polymerase, die Ribonukleotidreduktase und Ornithindecaboxylase hemmt. Die Ornithindecaboxylase ist ein Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese, die beim Tumorwachstum charakteristisch erhöht ist. (Fontecave 1998)

1.2.5. Bioverfügbarkeit von Resveratrol

Der Grossteil an Resveratrol wird als Glucuronid-konjugat aufgenommen (Kuhnle 2000). Resveratrol wird stark in der Leber metabolisiert und als trans-Resveratrol-3-O-glucuronid und trans-Resveratrol- β -sulfat über den Urin ausgeschieden. Die Bioverfügbarkeit von Resveratrol beträgt etwa 90% (Goldberg 2003), aber aufgrund der raschen Clearance ist Verweildauer im Blutkreislauf kurz (Soleas 2001).

Die bisherige Forschung mit Resveratrol war jedoch ausschließlich auf Kurzzeitstudien und in vitro- und Tiermodelle beschränkt. Daher ist es vor zu großer Euphorie bezüglich der vielfältigen Wirkungen von Resveratrol abzuraten.

Die Untersuchungen hinsichtlich Bioverfügbarkeit und Metabolismus sind noch nicht ausreichend, um genaue Angaben zu Dosierung und Pharmakokinetik beim Menschen zu machen.

Es bleibt Ergebnisse weiterer Studien abzuwarten, da Resveratrol eine hochinteressante Substanz mit ungeahnter Potenz ist.

2. Material und Methodik

2.1. Testsubstanz

In dieser Arbeit beschriebene Versuche wurden an isolierten Organen des Meerschweinchens mit der Substanz JB26 durchgeführt. Diese Substanz wurde am Institut für Organische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und von Herrn Professor Erker zur Verfügung gestellt.

Jeden Tag wurde für die Versuche eine frische Stammlösung der Testsubstanz bereitet. DMSO diente als Lösungsmittel dazu.

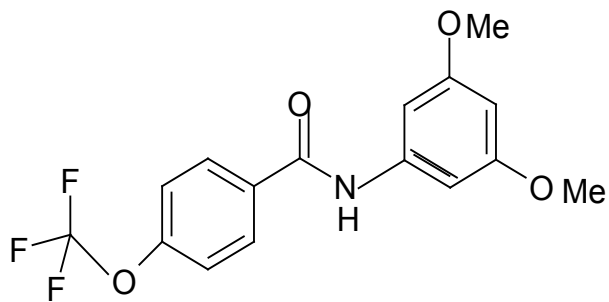
Das Kammervolumen des Organbades war unterschiedlich groß (7 ml, 14 ml, 25 ml bzw. 27 ml).

Deswegen musste die Einwaage so berechnet werden, dass eine maximale Badkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 300 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

Die Badkonzentrationen wurden berechnet für 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,3 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$.

Jeweils alle 45 Minuten wurde die Substanz mit einer Finnpiquette injiziert (außer bei Versuchen mit Agonisten, siehe 3.2). Dadurch wurde bei jeder Konzentration ein Plateau erreicht (=“steady state Bedingungen“).

Abbildung 3: Strukturformel der Testsubstanz JB26



Nomenklatur: N-(3,5-Dimethoxyphenyl)-4'-trifluormethoxybenzamid

Molekulargewicht: 341 g/l

2.2. Versuchstiere

Da eine vollständige Gesundheit der Tiere gewährleistet sein musste, stammten alle Versuchstiere aus einer Versuchstierzucht in Himberg (Niederösterreich).

Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Versuchstiere, die alle ein durchschnittliches Körpergewicht von 300-800 g hatten und erst wenige Wochen alt waren.

Um ein zu große Darmmotilität zu verhindern, wurde am Tag vor der Versuchsdurchführung das für Versuche verwendete Tier nüchtern gestellt. Die anderen Tiere verblieben in ihren Käfigen in den Räumen des Instituts für Pharmakologie der Universität Wien.

Das für Versuche bestimmte Tier wurde dann durch einen gezielten Genickschlag getötet. Um einen Sauerstoffmangel zu verhindern, musste das Herz so rasch , wie möglich entnommen werden und wurde sofort in eine vorher zubereitete Elektrolytlösung übergeführt und mit Oxymix (95% O₂ und 5% CO₂) , zur Sauerstoffzufuhr, begast. Um eine Blutgerinnselbildung zu vermeiden, wurde das noch im Herzen enthaltene Blut rasch ausgedrückt. Nun wurde in einer Petrischale weiterpräpariert. Petrischale wurde mit Kork und einem Gummiring ausgelegt, um das Herz mit feinen Stecknadeln befestigen zu können. Die Schale war ebenfalls mit physiologischer Nährlösung gefüllt und wurde während des gesamten Präparationsvorgangs mit Oxymix durchspült.

2.3. Präparation der Organe

2.3.1. Isolierung der Arteria pulmonalis

Nach der Entnahme des Herzens wurde die Präparation unter dem Mikroskop weiter fortgesetzt. Anhaftende Lungenteile und Perikard wurden mittels einer Federschere entfernt und die Arteria pulmonalis wurde so nahe wie möglich am Herzen abgeschnitten. Verwendet wurde nur der Teil, der direkt vom Herzen weg führt, bis zur Aufteilung in rechte und linke Arteria. Dieser Teil wurde nun behutsam vom Fett- und Muskelgeweberesten befreit und anschließend in ringförmige Stücke von circa 3 Millimetern Länge geschnitten.

Danach wurde ein Stück in die Versuchsanordnung eingespannt und der Rest (zur Aufbewahrung) in ein mit physiologischer Nährlösung gefülltes Becherglas gegeben und wiederum mit Oxymix begast.

2.3.2. Isolierung des rechten Vorhofes

Nach der Entnahme wurde das Herz in eine Petrischale mit Nährlösung übergeführt. Es ist besonders wichtig bei diesem Organ, immer für eine ausreichende Begasung mit Oxymix zu achten. Hierfür wurden zuerst das anhaftende Fettgewebe, das Perikard und Lungenteile entfernt.

Nachher wurde der rechte Vorhof abgetrennt und mit Präpariernadeln am Korkboden der Petrischale befestigt. Es war erforderlich bei diesem Schritt darauf zu achten, dass man den Sinusknoten nicht verletzte und das Präparat nicht zu sehr dehnte, da durch Verletzungen beim Entfernen von Fettresten oder durch Überdehnung würde der Vorhof aufhören zu schlagen und somit unbrauchbar werden.

Es wurden weiter unter dem Binokular mittels Pinzette zwei Fäden um das Herzohr und der Spitze des Sinusknoten geknotet. An diesen Knoten wurden kleine Silberhäkchen eingehängt mit denen das Präparat später im Organbad befestigt wurde.

Trotz niedriger Temperatur schlug der Vorhof in der Petrischale , während des gesamten Vorgangs , weiter.

Bis zum Einspannen in der Versuchsanordnung wurde der Vorhof in einer geeigneten Elektrolytlösung aufbewahrt und mit Oxymin durchperlt.

2.3.3. Isolierung des Papillarmuskels

Nachdem überflüssige Fettreste und Perikard entfernt wurden, wurden Vorhöfe von den Kammern getrennt. Die rechte Kammer wurde über die Arteria pulmonalis entlang des Septums zur Herzspitze hin aufgeschnitten, aufgeklappt und mit Präpariernadeln fixiert, damit man die Papillarmuskeln erreichen könnte.

Um die Gefahr einer störenden Aktivierung der Schrittmachertätigkeit von Purkinje-Fasern, mussten diese von den Papillarmuskeln entfernt werden. Der ganze Vorgang fand unter dem Binokular in einer mit Oxymin durchperlten Nährlösung statt.

Danach wurde an jener Sehne, an der der Muskel an die Herzklappe angewachsen war, ein s-förmiges Silberhäkchen mit einem Stück Faden befestigt. Daraufhin wurde mit einer Federschere die Sehne durchtrennt und der Muskel aus der Herzwand vorsichtig herauspräpariert. Auch die präparierten Papillarmuskeln kamen zur Aufbewahrung in eine mit Oxymin begaste, physiologische Nährlösung.

2.3.4. Isolierung der Aorta

Für die Versuche wurde die weiter vom Herzen liegende Aorta und nicht der Aortabogen verwendet. Nach der Herzentnahme wurde ein Teil des Brustbeins entfernt um eine bessere Sicht auf die Aorta zu haben. Ebenso war es notwendig Lungenteile zu beseitigen und das Zwerchfell einzuschneiden. Nun wurde die Wirbelsäule nach vorne gedrückt und mit

physiologischer Nährlösung gespült, um das noch eventuell vorhandene und bereits geronnene Blut zu beseitigen. Daraufhin wurde die Aorta vorsichtig entlang des Rückgrades herausgeschnitten und sofort in eine Aorta-Elektrolytlösung (siehe Kapitel 2.4.) überführt.

Die weitere Präparation fand unter dem Mikroskop statt. Die Behandlung erfolgte in einer mit Korkboden und physiologischer Nährlösung gefüllten Petrischale. Die Aorta wurde mit zwei Präpariernadeln am oberen und unteren Ende befestigt. Muskel- und Fettgewebe konnten so leichter entfernt werden. Gleichzeitig konnten auch Stücke der Aorta, die beschädigt waren, abgetrennt werden. In weiterer Folge wurden circa zwei Millimeter lange Gefäßringe abgeschnitten und diese dann in Versuchsanordnung eingespannt. Die Arteria pulmonalis und die Aorta sind jene zwei Organe, die nicht mit Faden und Haken versehen wurden, weil sie aufgrund ihrer Ringform gut in Versuchsanordnung fixiert werden konnten.

2.3.5. Isolierung des terminalen Ileums

Nach der Entnahme des Herzens wurde die Bauchdecke des Meerschweinchens mit einer Präparierschere der Länge nach aufgeschnitten. Der Dickdarm wurde zur Seite gelegt, um das Anschlussstück des Dünndarms an den Dickdarm zu finden. Nach Bestimmung des caecalen Endes wurde der Teil, der vor dem Caecum liegt, entnommen. Es war darauf zu achten, dass der Darm nicht zu sehr gedehnt wurde. Um bei der späteren Präparation die Lage im Bauchraum rekonstruieren zu können, wurde das dem Jejunum zugewandte Ende mit einem schwarzen Faden abgebunden. Etwa 30 bis 40 cm langes Stück wurde abgetrennt und sofort in ein Becherglas mit Elektrolytlösung gegeben.

Nun erfolgte die weitere Präparation wieder unter dem Mikroskop in einer Petrischale, die mit einem Korkboden und physiologischer Nährlösung ausgestattet war. Ca. 1 cm langer Teil des caecal gelegenen Darms wurde abgetrennt und die beiden Enden schräg angeschnitten.

Die beiden Enden wurden mit Präpariernadeln von innen nach außen fixiert und es war darauf zu achten, das jejunale und caecale Ende nicht zu verwechseln.

Mit Pinzette und Federschere wurde das Stück anschließend von Fettgewebe und Gefäßen befreit und falls der Darm noch gefüllt war, musste er mit physiologischer Nährlösung vom

jejunalen zum caecalen Ende durchgespült werden, wobei wieder darauf zu achten war, den Darm nicht zu dehnen oder ihn verletzen.

Für das einspannen in die Versuchsanordnung war es erforderlich, an beiden Enden Silberhäkchen anzubringen, da der Darm nicht wie Aorta oder Arteria pulmonalis selbst in die Versuchsanordnung eingespannt werden konnte. Dazu wurde zuerst der schwarze Faden an das obere Ende des Darms befestigt, aber noch nicht ganz fest zugezogen. Es wurde dann das Häkchen gesteckt, der Faden fest zugezogen und durch einen weiteren Knoten fixiert. Der Darm durfte dabei nicht mit dem Haken durchgestochen oder die Oberfläche allzu stark perforiert werden.

Beim unteren Ende des Darms wurde gleich verfahren, nur, um beim Einspannen in die Versuchsanordnung eine Verwechslung der Enden auszuschließen, wurde hier ein roter Faden verwendet.

Die beiden Fäden wurden so geknotet, dass das Lumen nicht vollständig verschlossen wurde, um in späterer Folge ein Durchströmen der Substanz zu ermöglichen. Die präparierten Darmstücke wurden sofort eingespannt oder in ein mit physiologischer Nährlösung gefülltes Becherglas gegeben.

2.3.6. Isolierung des Uterus

Nun erfolgte die Entnahme des Uterus. Der konnte erst nach der Entfernung des Ileums entnommen werden, aufgrund seiner Lage. Meerschweinchen weisen einen Uterus duplex auf, der aus zwei getrennten Uterushörnern besteht. Nahezu gesamte Y-förmige Uterus wurde herauspräpariert und in eine De-Jalon's Nährlösung übergeführt.

Es erfolgte die weitere Präparation unter dem Mikroskop. Anhaftendes Bindegewebe und Fettgewebe wurden mit einer Federschere entfernt, ohne das Präparat zu verletzen. Eine genaue Angabe der Länge war durch die starke Kontraktion nicht möglich, es war nur daran zu denken, dass die Uterusmuskulatur sehr fest ist und sich im Verlauf des Versuchs sehr stark dehnt.

Die beiden Enden wurden schräg abgeschnitten und Silberhäkchen befestigt. Wichtig war, die Silberhäkchen direkt durch die Organwand zu stechen, um ein Ausreißen dieser Häkchen während der Durchführung der Versuche zu verhindern. Die Silberhäkchen wurden anschließend mit einem Faden versehen und mit drei Knoten fixiert.

Die fertigen Uteruspräparate wurden in einer mit Oxymix durchperlten Nährlösung aufbewahrt.

2.4. Physiologische Elektrolytlösungen (Tyroden)

Weil viele Versuche oft mehrere Stunden andauerten, war es notwendig die Organpräparate mit Hilfe von Nährlösungen und einer ausreichenden Sauerstoffversorgung mit Oxymix (95% O₂ und 5% CO₂) am Leben zu erhalten. Weiters dienten diese auch als Transportmedien für die zu testenden Substanzen und als Aufbewahrungsmedium für bereits präparierte isolierte Organe.

Für die Reproduzierbarkeit und das Gelingen der Versuche war die richtige Bereitung der Elektrolytlösungen Voraussetzung. Die physiologischen Elektrolytlösungen wurden jeden Tag frisch zubereitet.

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

Diese physiologische Elektrolytlösung entspricht einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung und wurde nach Vorschrift von Reiter (1967) zubereitet.

Tabelle1: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum

	mmol/l
NaCl	114,90
KCl	4,73
NaHCO₃	24,90
CaCl₂	3,20
MgSO₄	1,18
KH₂PO₄	1,18
Glucose	10,00

Es war erforderlich die Nährlösungen an jedem Versuchstag frisch zu bereiten. Dazu wurden alle in der Tabelle angegebenen Stocklösungen, mit Ausnahme des CaCl_2 -Lösung, in einen Kolben gefüllt und mit Aqua bidestilata auf ein ca. $\frac{3}{4}$ der Füllmenge aufgefüllt. Hierauf wurde der Inhalt für 10 Minuten mit Oxymix begast. Um ein Ausfällen schwerlöslicher Calciumsalze und in weiterer Folge eine Trübung zu vermeiden, wurde das fehlende CaCl_2 tropfenweise zugesetzt.

Zum Schluss wurde der Kolben mit Aqua bidestilata bis zur Markierung aufgefüllt und einige Male kurz umgeschwenkt, um eine gute Durchmischung zu erreichen.

Die Nährlösung wurde während der gesamten Versuchsdauer mit Oxymix begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe zu garantieren und den pH-Wert im physiologischen Bereich zwischen 7,2-7,4 konstant zu halten.

2.4.2. Elektrolytlösung für die Aorta

Für die Versuche an der Aorta wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Die Bereitung dieser Nährlösung erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben wurde.

Tabelle 2: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung für die Aorta

	mmol/l
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO₃	11,90
CaCl₂	3,20
MgSO₄	5,80
KH₂PO₄	1,40
Glucose	10,00

2.4.3. Elektrolytlösung für den Uterus

Um Versuche am Uterus durchführen zu können, wurde die De Jalon's Lösung verwendet. Auch bei dieser Lösung war es erforderlich, sie jeden Tag frisch zu bereiten. Die Bereitung erfolgte, wie unter Kapitel 2.4.1. angeführt, jedoch mit der Ausnahme, dass hier das CaCl_2 aufgrund der geringen Menge gleich zugefügt werden konnte ohne eine zehnminütige Begasung abzuwarten.

Anschließend wurde mit Aqua bidestilata aufgefüllt und für ca. 10 Minuten mit Oxymix begast.

Tabelle 3: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung für den Uterus

	mmol/l
NaCl	154,00
KCl	5,60
NaHCO₃	5,95
CaCl₂	0,40

Glucose	10,00
----------------	--------------

2.5. Versuchsanordnung

Um die Reproduzierbarkeit und das Gelingen der Versuche zu gewährleisten war es notwendig die Schaffung möglichst stabiler physiologischer Bedingungen, hinsichtlich Temperatur, Sauerstoffversorgung und pH-Wert .

Für die Versuche standen zwei verschiedene Versuchsaapparaturen zur Verfügung, wobei Versuche mit dem Papillarmuskel nur mit Apparatur I durchgeführt werden konnten. Bei allen anderen untersuchten Organen war die Verwendung von beiden Apparaturen möglich.

Das Funktionsprinzip beider Anordnungen war identisch.

2.5.1. Versuchsaapparatur I

Die Versuchsaapparatur I bestand aus einem Wasserbad aus Acrylglas, dessen Temperatur mittels Thermostat möglichst konstant gehalten wurde. Bei Versuchen mit dem Papillarmuskel war eine Temperatur von $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erforderlich, bei allen übrigen Untersuchungen betrug die Temperatur $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Um eine optimale Sauerstoffversorgung und damit einen physiologischen pH-Wert zu gewährleisten, wurde die Nährlösung des Organbades von unten mit Oxymix durchperlt. Zur Spülung und zum Wechsel der Elektrolytlösung wurde eine Kunststoffspritze, an die ein Gummischlauch befestigt worden war, verwendet.

Das isolierte Organ musste, je nach Präparat, mit einem zuvor befestigten Silberdrahthaken eingehängt (bei Versuchen mit dem Vorhof, dem terminalen Ileum und dem Uterus), direkt zwischen zwei Häkchen (bei Versuchen mit der Arteria pulmonalis oder der Aorta) oder zwischen ein Plexiglasplättchen und einer Platin-Kathode (bei Versuchen mit dem Papillarmuskel) eingespannt werden. Der Silberdraht fungierte als Verbindung zum Kraftwandler.

Ein problemloses Absenken bzw. Herausnehmen der Organhalterung in die bzw. aus der Muskelkammer, zum Beispiel um die eingespannte Organe zu entfernen, ermöglichte ein Stativschlitten.

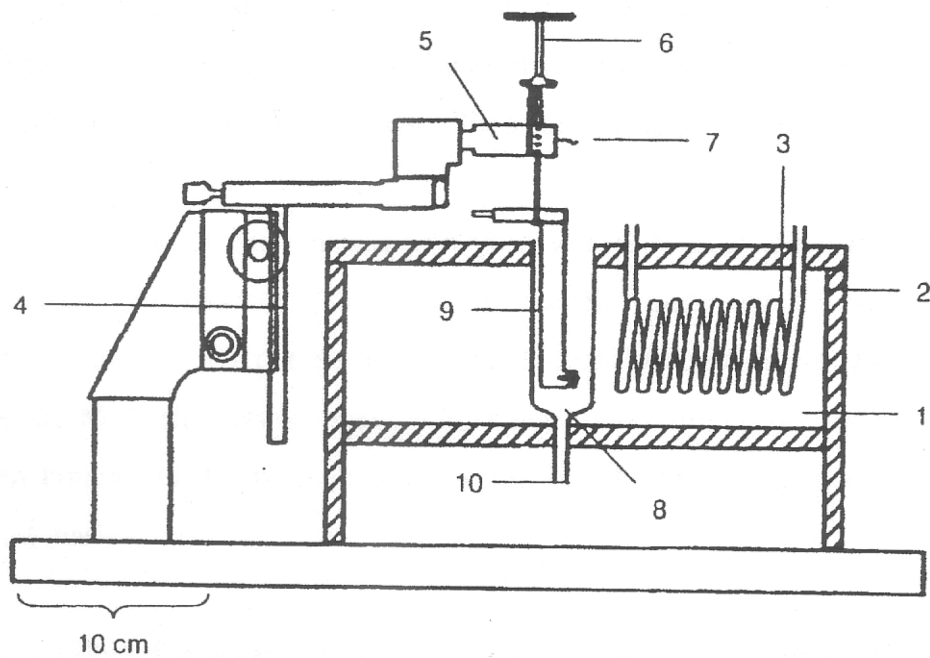
Danach wurde mittels Feintrieb die nötige Vorspannung eingestellt und so die maximale Kontraktionskraft erreicht, die je nach Organ unterschiedlich einzustellen ist.

Der Vorgang des Einspannens der Präparate musste rasch erfolgen, um eine Mindestversorgung des Organs zu verhindern. Weiters musste darauf geachtet werden das Organpräparat nicht zu stark zu dehnen.

Ein Kraftwandler, der das eigentliche Messinstrument darstellte, befand sich weiter oben am Stativ und transformierte die Kontraktionen in Stromimpulse.

Der Kraftwandler und ein Verstärker Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) dienten zur Messung der Kraft unter isometrischen Bedingungen. Diese übertrug die Ergebnisse als Linien bzw. Ausschläge auf einen Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

Abbildung 4: Versuchsassparatur I



Legende zu Abbildung 4:

- | | |
|--------------------|--------------------------------------|
| 1. Wasserbad | 6. Feintrieb |
| 2. Acrylglas | 7. Aufhängevorrichtung für das Organ |
| 3. Heizspirale | 8. Organbad |
| 4. Stativschlitten | 9. Organhalterung |
| 5. Kraftwandler | 10. Gaszufuhr mit Fritte |

2.5.2. Versuchsaapparatur II

Die Unterschiede zur bereits besprochenen Versuchsaapparatur I bestanden in der Ausführung des Organbads und der Fixierungsmöglichkeit der Organe an der Organhalterung.

Dieses Organbad bestand aus einer Kammer mit doppelwandigem Glas, zwischen dessen Wänden das temperierte Wasser zirkulierte, um die physiologischen Bedingungen in der Kammer aufrecht zu erhalten. Die Gaszufuhr sowie Wasserzufuhr erfolgten über Schlauchanschlüsse.

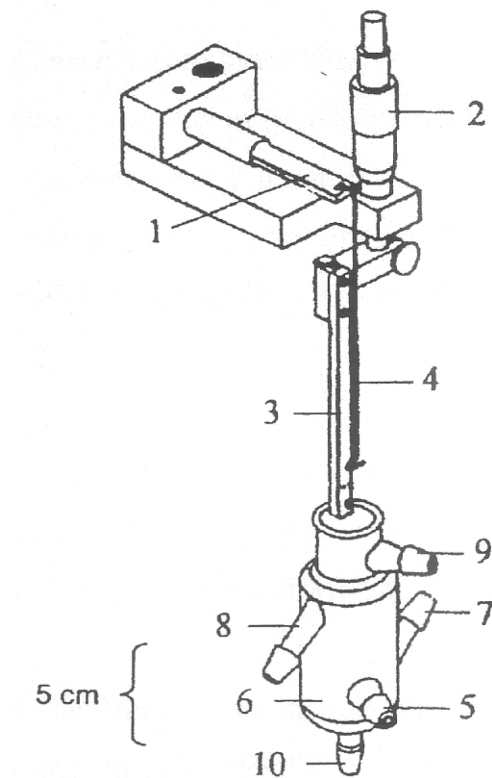
Am Boden des Organbades befand sich ein Abflussschlauch, der durch eine Quetschklemme verschlossen war. Der Abflussschlauch diente zum Wechseln bzw. Entfernen der Nährlösung. Die Nährlösung konnte separat über einen Schlauch in die Kammer zugeführt werden, was für alle Versuche mit Agonisten von Vorteil war.

Zur Organbefestigung dienten ein Silberdraht am Steg sowie ein zweiter Silberdraht, der an der Aufhängervorrichtung des Kraftwandlers eingehängt werden konnte.

Sobald das isolierte Organ eingehängt und in die Nährlösung eingetaucht worden war, wurde über das Mikrometer die Vorspannung eingestellt, um so wieder die maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Die Übertragung der Ergebnisse erfolgte wie bei Apparatur I über den Kraftwandler und einen Verstärker zum Schreiber.

Abbildung 5: Versuchsanordnung II



Legende zu Abbildung 5 :

- 1. Kraftwandler
- 2. Feintrieb

- 6. Organbad
- 7. Zulauf Wasserbad

3. Organhalterung

4. Aufhängervorrichtung

5. Gaszufuhr

8. Ablauf Wasserbad

9. Zulauf Nährlösung

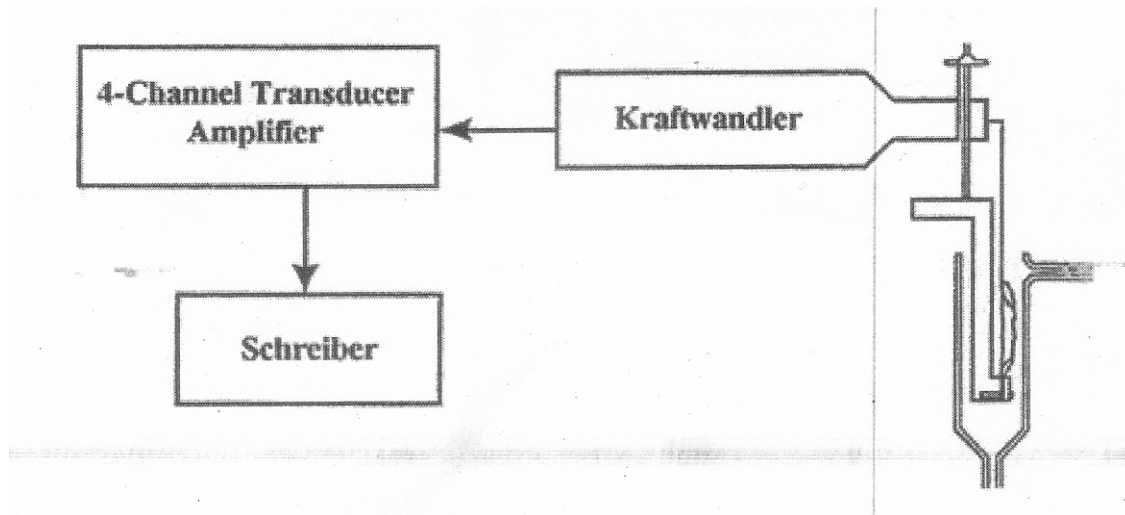
10. Ablauf Nährlösung

2.5.3. Kraftwandler

Die Aufgabe des Kraftwandlers war die Messung der isometrischen Kontraktionen. Dies geschah dadurch, indem er die mechanische Kraft, mit der sich das Organ kontrahierte, in ein elektrisches Signal transformierte, das wiederum durch einen Verstärker („4-Channel Transducer Amplifier“ von World Precision Instruments, FL, USA) entsprechend verstärkt wurde. Zur Dokumentation dieses Signals diente ein Schreiber mit automatischem Papiervorschub, der es mit Filzschreiber auf Millimeterpapier aufzeichnete.

Die nachfolgende Zeichnung dient zum besseren Verständnis der Signalgewinnungskaskade.

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



2.5.4. Gasversorgung

Die Gasversorgung erfolgte mit Hilfe einer zentralen Gasflasche. Von den vielen einzelnen Ventilen in Versuchsräumen führten Plastikschläuche zu den Versuchsaapparaturen, die am Ende mit einer Fritte zur feinen Zerstäubung des Gasstromes versehen waren.

Um die Regulierung der ausströmenden Gasmenge zu ermöglichen, wurden Schraubklemmen an den flexiblen Kunststoffschläuchen angebracht.

Es wurde ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ mit der Bezeichnung Oxymix verwendet. Die Gasversorgung musste vom Beginn bis zum Ende der Versuche konstant erhalten werden, da sie viele Parameter des Versuches beeinflusste, wie die ausreichende Sauerstoffversorgung der isolierten Organe, Gewährleistung einer optimalen und homogenen Verteilung der Testsubstanzen, sowie Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes zwischen 7,2-7,4 im Organbad.

2.6. Versuchsablauf

Um korrekte und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten war es nötig zu Beginn und am Ende jedes Arbeitstages, sowie nach jedem Organwechsel die Organbäder sorgfältig zu reinigen.

Dieses erfolgte mittels einer 2%-igen Salzsäure, um auskristallisierte Salze der Nährlösungen am Organbad wieder zu entfernen. Anschließend wurde das Bad mit Aqua bidestillata gründlich ausgespült.

Es war nötig die gleichen Prozedere jeden Tag zu vollziehen, vor allem aber auf die richtige Füllmenge, die korrekte Präparation und Einhängeweise der Organe sowie optimale Gasversorgung war zu achten.

2.6.1. Versuchsablauf beim rechten Vorhof

Nach Vorbereitung der Apparatur wurde der Vorhof in die Organhalterung mit Häkchen eingespannt und sofort in das temperierte und mit Oxymix begaste Organbad abgelassen, bis das Präparat vollständig in die Tyrode eintauchte.

Hierauf wurde der Schreiber und der Verstärker eingeschaltet und eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt, um die maximale Kontraktion zu erzielen. Während des gesamten Versuchs war es nötig die Vorspannung mittels Feintrieb gefühlvoll nachzukorrigieren, da das Organ aufgrund seiner Plastizität ständig etwas nachgab.

Danach wurde eine Anpassungszeit von ca. 60 Minuten abgewartet. Dann erfolgte eine Kontrollphase, in der alle 5 Minuten die Schläge aufgezeichnet wurden. Bei konstant bleibender Schlagfrequenz hat man mit Substanzzugabe beginnen können.

Alle 5 Minuten wurde eine Messung durchgeführt, wobei jeweils nach 45 Minuten die Zugabe der nächst höheren Konzentrationsstufe erfolgte.

Die Messung der Schlagfrequenz erfolgte, indem man alle 5 Minuten die Ausschläge über eine Länge von 6 cm des Millimeterpapiers, mit 5 mm/s Papiervorschub des Schreibers aufzeichnete.

2.6.2. Versuchsablauf beim Papillarmuskel

Der Papillarmuskel wurde nach der Präparation in die Apparatur eingespannt, wobei das eine Ende mit einem Silberhaken und das andere Ende mittels einer kleinen Kunststoffplatte über einen Schraubmechanismus festgeklemmt wurde, sodass ein Kontakt mit der Silberkathode hergestellt wurde.

Das Präparat wurde dann sofort in die auf 35 C° temperierte Elektrolytlösung eingetaucht und eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt. Auch hier war ein Nachjustieren während des gesamten Versuchablaufes , aufgrund der Plastizität des Gewebes notwendig. Dadurch wurde

eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine Verringerung der Ausgangsspannung verhindert. (Reiter 1967)

Die Vorhofpräparate wiesen eine Spontanaktivität auf, die durch den Sinusknoten bedingt war. Der Papillarmuskel musste durch elektrische Reizung zur Kontraktion angeregt werden. Diese Reizung geschah mit Hilfe des Reizgerätes Accupulser A310 (World Precision Instruments, Hamden, FL, USA).

Das Präparat wurde, nach ca. 10 minütigen Anpassungszeit in der Nährlösung, mit Rechteckimpulsen von 3 ms Dauer bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Stromstärke , die 10% über der minimalen Reizschwelle lag, angeregt. Die Stromstärke wurde so gering als möglich gewählt, um eine regelmäßige Kontraktion zu gewährleisten und die Ergebnisse durch die vollständige Entleerung der Catecholaminspeicher nicht zu verfälschen.

Nach einer Anpassungszeit wurde auch hier eine Kontrolle durchgeführt. Es wurden alle 10 Minuten jeweils 3-4 Kontraktionsamplituden aufgezeichnet. Waren die Amplituden konstant, konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden. Wie bei Vorhofversuchen wurden alle 5 Minuten die Amplituden aufgezeichnet und nach 45 Minuten wieder die nächst höhere Konzentration zugegeben.

2.6.3. Versuchsablauf bei der Aorta

Um eine Beschädigung des Organpräparats zu verhindern, wurden die präparierten Gefäßringe der Aorta mit L-förmigen , dem Präparat angepassten, Silberdrahtstücken quer in die Versuchsanordnung eingespannt. Das Organpräparat durfte nicht zu stark gedehnt werden. Anschließend wurde die Organhalterung mit dem Präparat in das vortemperierte und mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung gefüllte Organbad abgesenkt.

Nun erfolgte der Vorgang des Vorspannens. Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und mittels Positionswahlschalter die Nulllinie definiert. Danach wurde mit dem

Feintrieb der Organhalterung die Vorspannung von 19,6 mN oder 2g eingestellt. Die Vorspannung diente zur Erreichung der maximalen Kontraktionskraft des Organs.

Hierauf wurde wieder auf die Nulllinie zurückgesetzt und eine Anpassungszeit von etwa 45 Minuten abgewartet. Etwaige Abweichungen von der Nulllinie wurden über den Feintrieb ausgeglichen.

Danach musste die Elektrolytlösung im Organbad durch eine 90 mmol/l KCl-Lösung ersetzt werden, damit eine Vorkontraktion erreicht werden konnte und so danach die Abweichungen der Kontraktionskraft gemessen werden konnten.

Die 90 mmol/ l KCl-Lösung wurde durch eine Einwaage von 0,67g KCl in einem 100 ml Kolben und Auffüllung mit Nährlösung erreicht.

Nun erfolgte die Kontraktion und nach 90-120 Minuten wurde eine Plateaubildung beobachtet. Die Höhe dieses „steady state“ auf dem Papier entsprach einer 100%-igen Kontraktion des glatten Muskels.

Wenn dieser Zustand erreicht wurde, konnte mit der Zugabe der niedrigsten Konzentrationsstufe der Testsubstanz begonnen werden. Die Zugabe erfolgte mittels Finnpietten (Fa. Labsystems, Finnland). Die einzelnen Konzentrationsstufen der zu untersuchenden Substanz wurden kumulativ jeweils nach 45 Minuten zugefügt.

Die Veränderungen der Kontraktionskraft wurden vom Schreiber aufgezeichnet und konnten nachher ausgewertet werden. Die Zeitpunkte der Substanzzugabe wurden manuell am Millimeterpapier vermerkt.

Es musste darauf geachtet werden sorgfältig zu pipettieren , um die Organhalterung nicht zu berühren, da sonst die Messung beeinträchtigt werden konnte.

2.6.4. Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis

Die Vorgehensweise entsprach jener, die bereits im Kapitel 2.6.3. beschrieben wurde. Unterschiede ergaben sich lediglich in der Verwendung einer anderen Elektrolytlösung, sowie beim Anlegen der Vorspannung und Länge der Anpassungszeit, die etwa 30 Minuten betrug. Die Vorspannung bei Pulmonalarterien lag bei 9,81 mN oder 1g.

2.6.5. Versuchsablauf beim terminalen Ileum

Die präparierten Stücke des terminalen Ileums wurden in die vorbereitete Apparatur eingehängt. Es war dabei zu achten, dass das jejunale Ende nach oben und das caecale Ende nach unten zeigte. Es sollte auch kontrolliert werden, ob beide Enden nach der Präparation noch offen waren.

Hernach wurde die Organhalterung ins auf 37 C° temperierte Organbad abgesenkt. Schreiber und Verstärker wurden aktiviert und mittels Feintrieb eine Vorspannung von 4,9 mN oder 0,5 g angelegt.

Nun folgte eine 20 minütige Anpassungsphase, während dieser immer wieder über den Feintrieb die Spannung nachjustiert wurde.

Weil auch hier eine Abnahme der Kontraktionskraft gemessen werden sollte, wurde das Präparat mit 60 mM KCl-Lösung vorkontrahiert. Diese Lösung wurde durch lösen von 0,45 g KCl in 100 ml Elektrolytlösung hergestellt. Nach dem Austausch der Nährlösung kam es sofort zur Kontraktion des Organpräparats, was vom Schreiber aufgezeichnet wurde.

War dann die Kontraktionskraft über einen längeren Zeitraum konstant, hatte sich also ein Plateau gebildet, das einer 100%-igen Kontraktion entsprach, konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden.

Die Zugabe der nächst höheren Konzentration erfolge nach jeweils 45 Minuten. Die Zeitpunkte der Zugabe von der Testsubstanz wurden manuell auf dem Millimeterpapier vermerkt.

2.7. Untersuchungen der Testsubstanz in Kombination mit Agonisten

Dieser Versuche stellten Kombinationsversuche dar, bei denen die Wirkung der Testsubstanzen mit bereits bekannter Wirkung bestimmter anderer Substanzen verglichen wurde. Als Vergleichssubstanzen wurden Agonisten verwendet, um herauszufinden, an welche Rezeptoren in den untersuchten Organen die Testsubstanzen binden.

2.7.1. Verwendete Agonisten

Verwendet wurden Histamin für Versuche am terminalen Ileum und Uterus, sowie Acetylcholin und Phenylephrin für Versuche am terminalen Ileum.

2.7.1.1. Histamindihydrochlorid

Histamin ist ein monocyclisches Amin (chemisch: 4-(2'-Aminoethyl)-Imidazol), das aus der Aminosäure Histidin durch Decarboxylierung entstanden ist.

Histamin ist ein Gewebshormon, das in allen Organen in menschlichen Körper vorkommt, vor allem aber in Magen-Darm-Trakt, Lunge, Haut und Nervensystem. Gehört zu den Neurotransmitter im Zentralnervensystem und wird in basophilen Granulozyten, Mastzellen oder gebunden an Heparin oder basischen Proteinen gespeichert.

Histamin wird bei Überempfindlichkeitsreaktionen, durch Komplementfaktoren, wie zum Beispiel Endotoxine oder bei Entzündungen bzw. Verbrennungen aus den Speichern ausgeschüttet. (Thews et al. 1999)

Angriffspunkte im Zentralnervensystem sind die H₁-, H₂- und die präsynaptischen H₃-Rezeptoren.

Wirkungen an den H₁-Rezeptoren:

- Hautrötung und Quaddelbildung,
- Juckreiz und Schmerz,
- Muskelkontraktion in Bronchien und Gefäßen,
- Vermehrte Adrenalinausschüttung.

Wirkungen an den H₂-Rezeptoren:

- Erweiterung kleinerer Gefäße,
- Tachykardie,
- Steigerung der Magensaftabsonderung.

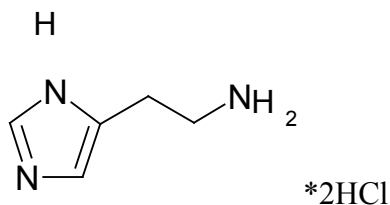
Wirkungen an den präsynaptischen H₃-Rezeptoren:

- durch negative Rückkoppelung Drosselung der der weiteren Histamin-Ausschüttung.

Charakteristisch sind diese Wirkungen für eine allergische Reaktion des Typ 1. Es ist zu beachten, dass ein anaphylaktischer Schock ausgelöst werden kann, bzw. durch Vermehrung der mastzellen im Blut oder Gewebe ein Flush, Urticaria oder in schweren Fällen sogar Ödeme auftreten können. (Lang et Silbernagl 1998)

Der Abbau von Histamin erfolgt durch oxidative Desaminierung über die Histaminase oder durch methylierung der NH-Gruppe im Imidazolring und durch Oxidation der gebildeten Metaboliten durch das Enzym Monoaminoxidase zu Imidazoyl- und Methylimidazolylessigsäure. (Mutschler 2001)

Abbildung 7 : Strukturformel von Histamindichlorid



2.7.1.2. Acetylcholinhydrochlorid

Acetylcholin zählt zu den wichtigsten Transmittern im menschlichen Körper und ist ein Ester der Essigsäure und des Aminoalkohols Cholin.

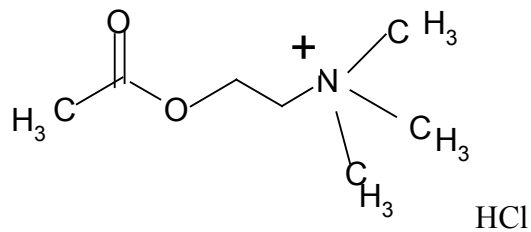
Es greift an den cholinergen Synapsen an, vor allem im zentralen und im vegetativen Nervensystem und wirkt durch Bindung an verschiedene Rezeptortypen. Zu nennen sind vor allem die nikotinischen bzw. muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Physiologische Wirkungen von Acetylcholin :

- Abnahme der Herzfrequenz,
- Pupillenverengung (Thews 1999)
- Steigerung der Speichel-, Magensaft-, und Schweißsekretion,
- Steigerung des Tonus der glatten Muskulatur, vor allem des Magen-Darm-Traktes und der Bronchien.

Der Transmitter kann wieder in Cholin und Essigsäure bzw. Acetat durch das Enzym Acetylcholinesterase gespalten werden.

Abbildung 8: Strukturformel von Acetylcholinhydrochlorid



2.7.1.3. Phenylephrinhydrochlorid

Phenylephrin gehört zur Gruppe der α -Sympathomimetika, die gleiche Wirkung hervorrufen wie Adrenalin oder Noradrenalin.

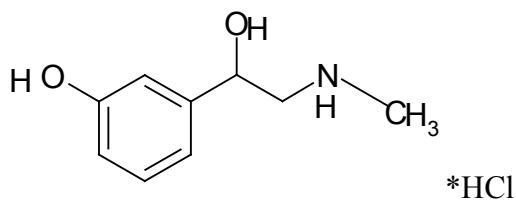
Phenylephrin wird indiziert bei:

- der Behandlung von spezifischer und allergischer Sinusitis, Konjunktivitis und Nasopharyngitis zur Schleimhautabschwellung,
- der Behandlung hypotoner Blutdruckstörungen, bei normalen oder erhöhtem Herzeitvolumen,
- Mydriasis (Burger et Wachter 1998)

Unerwünschte Nebenwirkungen :

- Pektanginöse Beschwerden,
- Ventrikuläre Rhythmusstörungen,
- Herzklopfen,
- Miktionsstörungen (Mutschler 2001)

Abbildung 9: Strukturformel von Phenylephrinhydrochlorid



2.7.2. Versuchsablauf am terminalen Ileum mit Agonisten

Um den Versuchsablauf nicht zu unterbrechen, wurden vor Beginn der Versuche Verdünnungsreihen des verwendeten Agonisten hergestellt. Beim Histamin und beim Acetylcholin wurden die Konzentrationen 0,01 $\mu\text{mol/l}$; 0,03 $\mu\text{mol/l}$; 0,1 $\mu\text{mol/l}$; 0,3 $\mu\text{mol/l}$; 1 $\mu\text{mol/l}$; 3 $\mu\text{mol/l}$ und beim Phenylephrin die Verdünnungsstufen 0,1 mmol/l; 0,3 $\mu\text{mol/l}$; 1 mmol/l; 3 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Danach wurden die präparierten Darmstücke in die Versuchsanordnung eingehängt, ins Organbad abgesenkt und vorgespannt mit Kraft von 4,9 mN.

Nach einer Anpassungszeit von ca. 30 Minuten, konnte mit der Kontrollphase begonnen werden. Es wurde in einem Abstand von 10 Minuten die Verdünnung von Agonisten injiziert. Dieses geschah mit einer mit 0,5 ml gefüllten Injektionsspritze, die Einwirkzeit betrug 30 Sekunden. Auch der Schreiber wurde jeweils für die 30 Sekunden der Einwirkzeit des Agonisten aktiviert.

Hierauf wurde die im Organbad befindliche Tyrode abgelassen, zwei Mal nachgespült und mit neuer Nährlösung aufgefüllt. Die nächst höhere Konzentration wurde nach 9,5 Minuten zugegeben. Dieser 10 Minuten langer Zyklus wurde mit einer Stoppuhr genau eingehalten.

Wenn alle Verdünnungsstufen des Agonisten auf diese Weise verwendet wurden, wurde statt der reinen Nährlösung eine Nährlösung mit gelösten Testsubstanz verwendet. Diese Lösung ließ man 45 Minuten auf das Organ einwirken und begann von neuem mit der Agonistenzugabe.

Damit die richtigen und quantitativen Ergebnisse garantiert werden konnten, wurden bei allen Versuchen auch verschiedene Konzentrationen von Testsubstanzen verwendet.

2.7.3. Versuchsablauf am Uterus mit Agonisten

Bei Versuchen mit Agonisten am Uterus entsprach die Vorgehensweise jener, die unter Kapitel 2.7.2. beschrieben wurde. Es gab allerdings einen Unterschied und zwar in der Durchführung einer Vorkontraktion mit einer 30 mmol/l KCl-Lösung. Dies erfolgte nach einer 15 minütigen Anpassungszeit und wurde nach weiteren 30 Minuten aus dem Organbad entfernt und durch Uterus-Tyrode ersetzt.

Danach wurden die Verdünnungsstufen des Agonisten injiziert: 1 $\mu\text{mol/l}$; 3 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$. Der Zyklus dauerte wieder 10 Minuten. Die Konzentrationen wurden dreimal

hintereinander zugesetzt und eine Einwirkzeit von ca. 3-4 Minuten abgewartet. Die zweite Phase mit der gelösten Testsubstanz wurde auf die gleiche Weise durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Testsubstanz JB26

3.1.1. Wirkung auf den rechten Vorhof

Bei Versuchen mit 5 unterschiedlichen rechten Vorhöfen wurde die Schlagfrequenz getestet. Die Vorhof-Präparate wurden, wie bereits im Kapitel 2.6.1. erwähnt, mit 10,4 mN vorgespannt und nach Erreichen einer konstanten Schlagfrequenz hat man mit Zugabe der Testsubstanz JB26 begonnen.

Die Aufzeichnungsstrecke betrug 6 cm und die Ausschläge wurden händisch abgezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert. Dadurch wurden die Schläge pro Minute erhalten.

Als Kontrollwert wurde jener Wert vor Zugabe der ersten Konzentrationsstufe herangezogen und als 100% definiert. Es wurde Kontrollwert mit $200,96 \pm 11,20$ ermittelt.

Bei den Versuchen wurde eine negativ chronotrope Wirkung beobachtet.

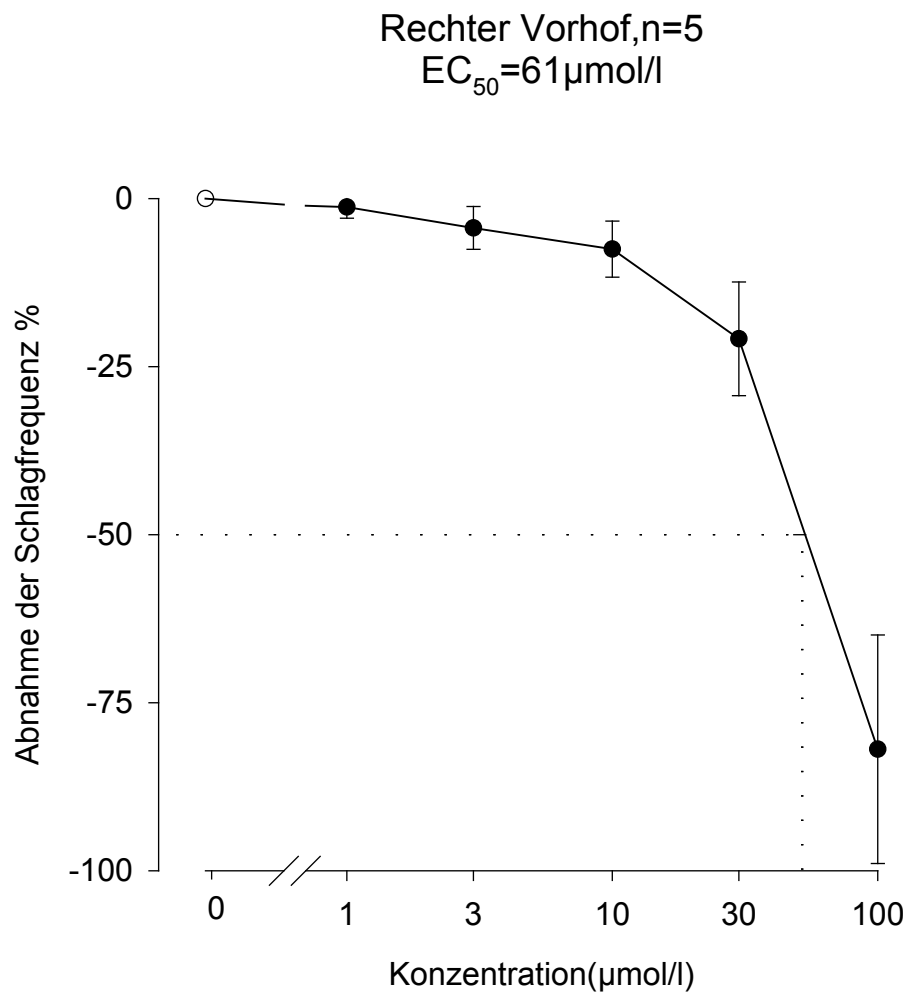
Die Verminderung der Schlagfrequenz war ab der ersten Konzentrationsstufe der Testsubstanz JB26 erkennbar. Der Versuch war bei der 100µmol/l Konzentration zu Ende und es wurde ein EC₅₀-Wert von 61µmol/l ermittelt.

Tabelle 4: Wirkung von JB26 auf die Schlagfrequenz rechter Vorhöfe

JB26 (µmol/l)	f_c±SEM (mN)	f_c±SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	200,96±11,20	100±0	5	----
1	198,46±11,49	-1,28±1,64	5	n.s.
3	192,06±11,73	-4,38±3,20	5	n.s.
10	185,88±13,16	-7,51±4,17	5	n.s.
30	159,45±19,77	- 20,87±8,45	5	0,05
100	39,78±39,78	- 81,92±18,08	5	0,05

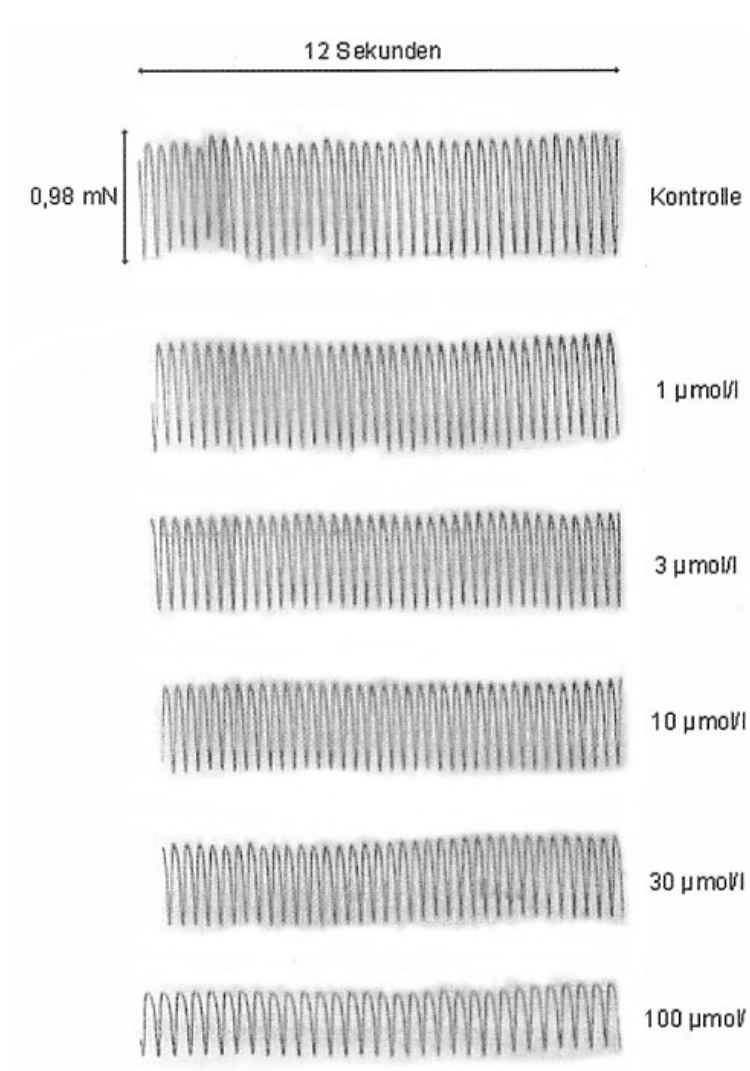
Die Tabelle 4 enthält die Konzentrationsangaben, die Irrtumswahrscheinlichkeit, die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenzabnahme und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf den rechten Vorhof



Die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozentzahlen wurde senkrecht, die Konzentrationsstufen der Substanz JB26 wurden waagrecht aufgetragen. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardfehler in Form von Balken angezeigt werden.

Abbildung 11: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB26 auf die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe



In der Aufzeichnung sieht man die Abnahme der Schlagfrequenz eines isolierten rechten Vorhofs. JB26 wurde in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l zugesetzt.

3.1.2. Wirkung auf Papillarmuskel

Die Papillarmuskelpräparate wurden in Versuchsanordnung I eingespannt und mit Hilfe eines Reizgerätes zur Kontraktion gebracht, was schon im Kapitel 2.6.2. erwähnt wurde. Auch hier wurde die Reaktion mittels eines Schreibers aufgezeichnet und ausgewertet.

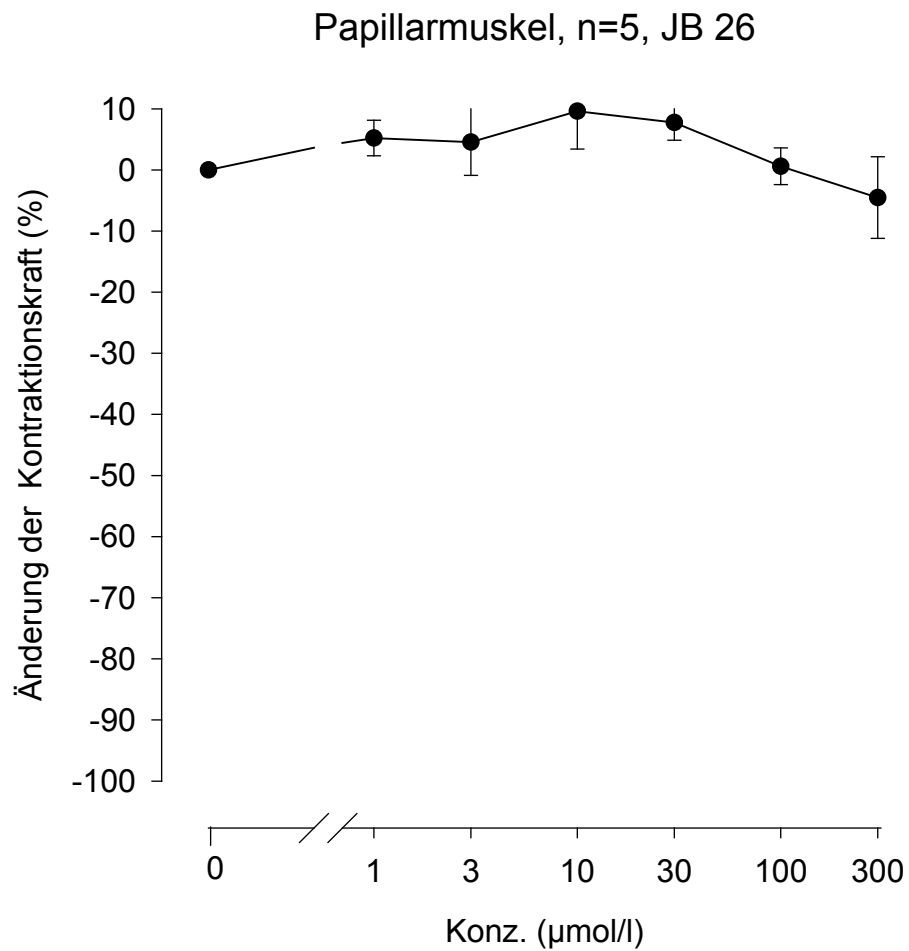
Ähnlich, wie bei Präparaten der rechten Vorhöfe wurde zuerst der Kontrollwert ermittelt, der $0,93 \pm \text{ mN}$ betrug und den 100%- Wert definierte. Es wurden insgesamt 5 Versuche durchgeführt. Leichte Zunahme der Kontraktionskraft war ab der ersten Konzentrationsstufe der Substanz JB26 erkennbar. Erst ab Konzentrationsstufe von $100 \text{ } \mu\text{mol/l}$ war eine Abnahme der Kontraktionskraft feststellbar.

Bei der letzten Konzentrationsstufe ($300 \text{ } \mu\text{mol/l}$) wurde ein Wert von $0,47 \pm 0,22 \text{ mN}$ erreicht, was einem Prozentsatz von $95,48 \pm 6,68$ entspricht und es konnte daher kein EC_{50} -Wert berechnet werden.

Tabelle 5: Wirkung von JB26 auf Kontraktionskraft der Papillarmuskel-Präparate

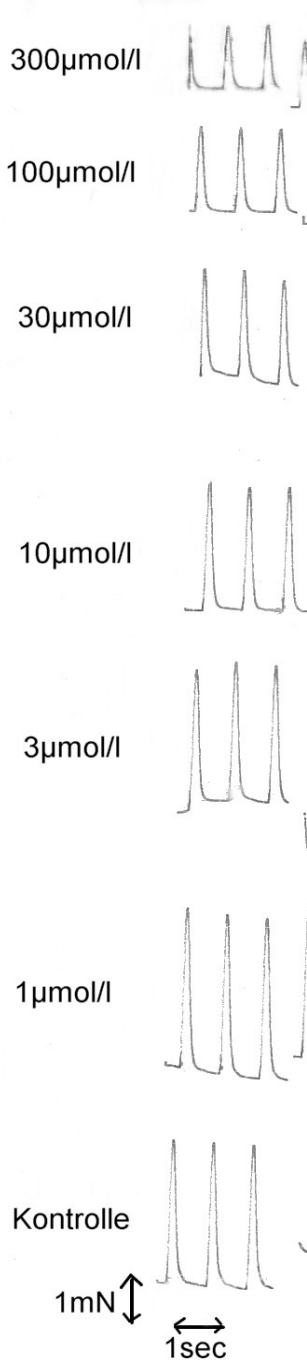
JB26 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	0,93 $\pm$	100 $\pm$ 0	5	
1	0,93 $\pm$ 0,28	5,22 $\pm$ 2,9	5	
3	0,86 $\pm$ 0,25	4,56 $\pm$ 5,46	5	
10	0,77 $\pm$ 0,22	9,62 $\pm$ 6,21	5	
30	0,64 $\pm$ 0,19	7,76 $\pm$ 2,90	5	
100	0,50 $\pm$ 0,15	0,6 $\pm$ 3,01	5	
300	0,47 $\pm$ 0,22	-4,52 $\pm$ 6,68	5	

**Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von JB26 auf
Papillarmuskel-Präparate**



Die Konzentrationsstufen der Testsubstanz JB26 wurden auf der Abszisse aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler werden in Form von Balken angezeigt.

Abbildung 13: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln.



In der Aufzeichnung sieht man die Abnahme der Kontraktionskraft eines isolierten Papillarmuskel.

3.1.3. Wirkung auf isolierte Aorta

Die Aorta , wie bereits im Kapitel 2.6.3 erwähnt, wurde mit einer 90 mmol/l Kaliumchloridlösung vorkontrahiert und anschließend die Testsubstanz JB26 in den Konzentrationen 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l und 300 µmol/l zugesetzt. Die Zugabe von Testsubstanz erfolgte kumulativ nach einer jeweils 45-minütigen Anpassungszeit.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Kontraktionskraft der Aorta gemessen und danach ausgewertet.

An der isolierten Aorta wurden 7 Versuche durchgeführt und ein daraus resultierender Mittelwert der Kontraktionskraft von $8,57 \pm 0,95$ berechnet.

Die Auswertung zeigte eine nahezu lineare Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta. Nach der Zugabe von 100 µmol/l Substanzlösung wurde die Kontraktionskraft bereits auf $54,21 \pm 4,94\%$ bezogen auf den Kontrollwert, reduziert. Es wurde ein EC_{50} -Wert von 175 µmol/l ermittelt.

Tabelle 6: Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft isolierter Aortapräparate.

JB26 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$8,57 \pm 0,95$	100 ± 0	7	- - -
1	$8,47 \pm 0,99$	$-2,71 \pm 2,77$	7	n.s.
3	$8,06 \pm 0,92$	$-7,87 \pm 2,01$	7	n.s.
10	$7,07 \pm 0,80$	$-18,88 \pm 2,88$	7	n.s.
30	$6,00 \pm 0,73$	$-30,86 \pm 4,16$	7	0,05
100	$4,79 \pm 0,75$	$-45,79 \pm 4,94$	7	0,05
300	$3,08 \pm 0,84$	$-56,01 \pm 3,85$	2	0,05

Die Tabelle (6) enthält neben den Konzentrationsangaben und der Irrtumswahrscheinlichkeit auch die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionsänderung sowohl in mN als auch in Prozent und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von JB26 auf isolierte Aortapräparate

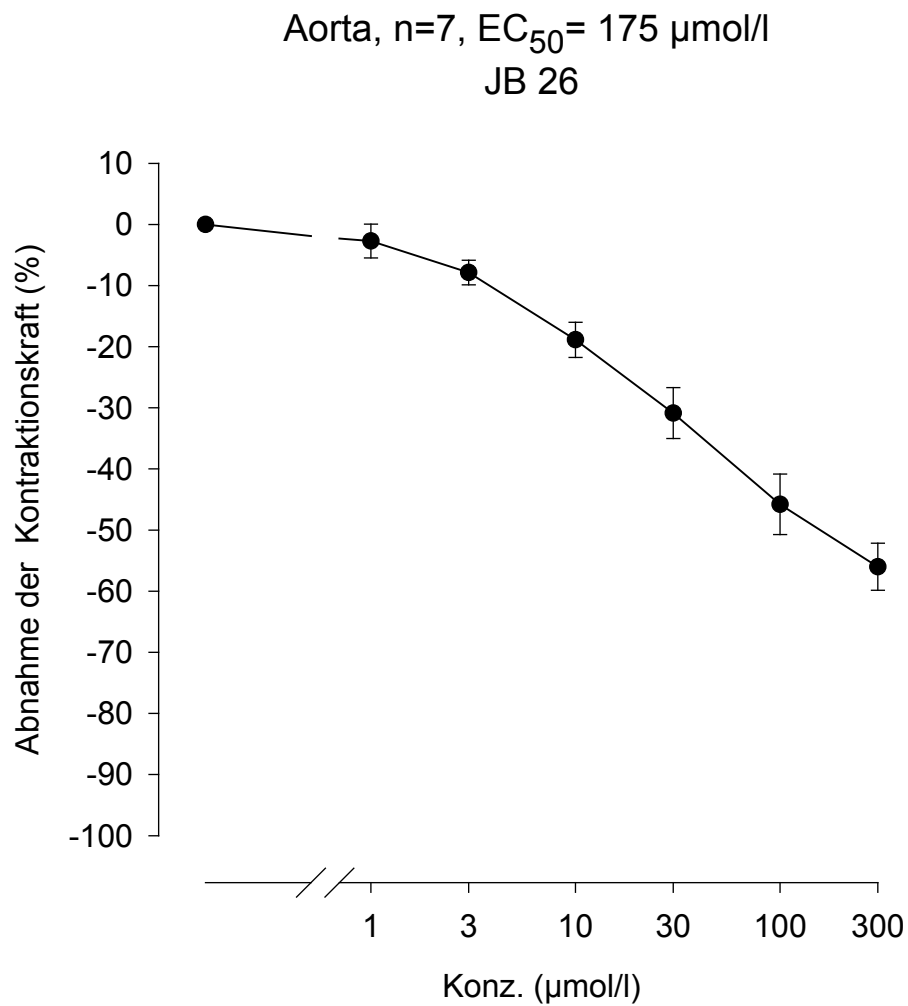
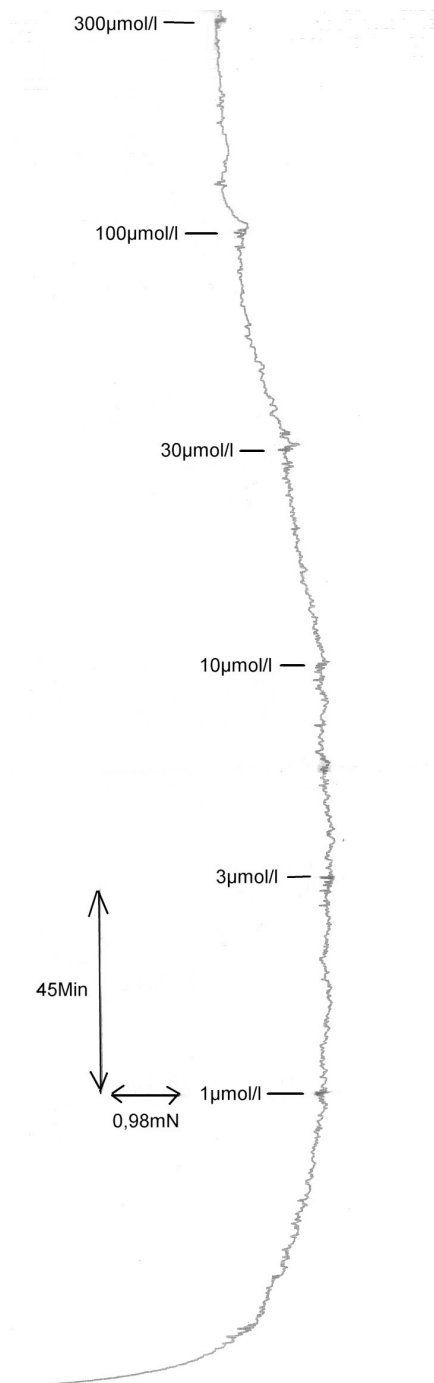


Abbildung 14 zeigt die graphische Darstellung der Abnahme der Kontraktionskraft der isolierten Aorta nach der kumulativen Zugabe von Testsubstanz JB26. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen der Substanz JB26 in $\mu\text{mol/l}$ und auf der Ordinate wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen.

Als Punkte wurden die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM) als Balken dargestellt.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft isolierter Aortapräparate



Die Abbildung 15 gibt zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur der Aorta nach Erhöhung der Konzentration von JB26. Die Zugabe erfolgte jeweils nach 45 Minuten.

3.1.4. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Wie bereits in Kapitel 2.6.4 beschrieben, wurden die Präparate der Arteria pulmonalis mit einer 90 mmol/l Kaliumchloridlösung vorkontrahiert und danach die Testsubstanz JB26 wiederum kumulativ nach einer Anpassungszeit zugegeben.

Die Abnahme der Kontraktionskraft wurde an 5 verschiedenen Präparaten untersucht. Wie auch bei den anderen Versuchen wurde ein Mittelwert der Kontrollenwerte von $14,91 \pm 3,26$ berechnet, die 100% der Kontraktionskraft festlegten.

Es ergab sich aus den Aufzeichnungen keine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis und es konnte in der Folge kein EC_{50} -Wert ermittelt werden.

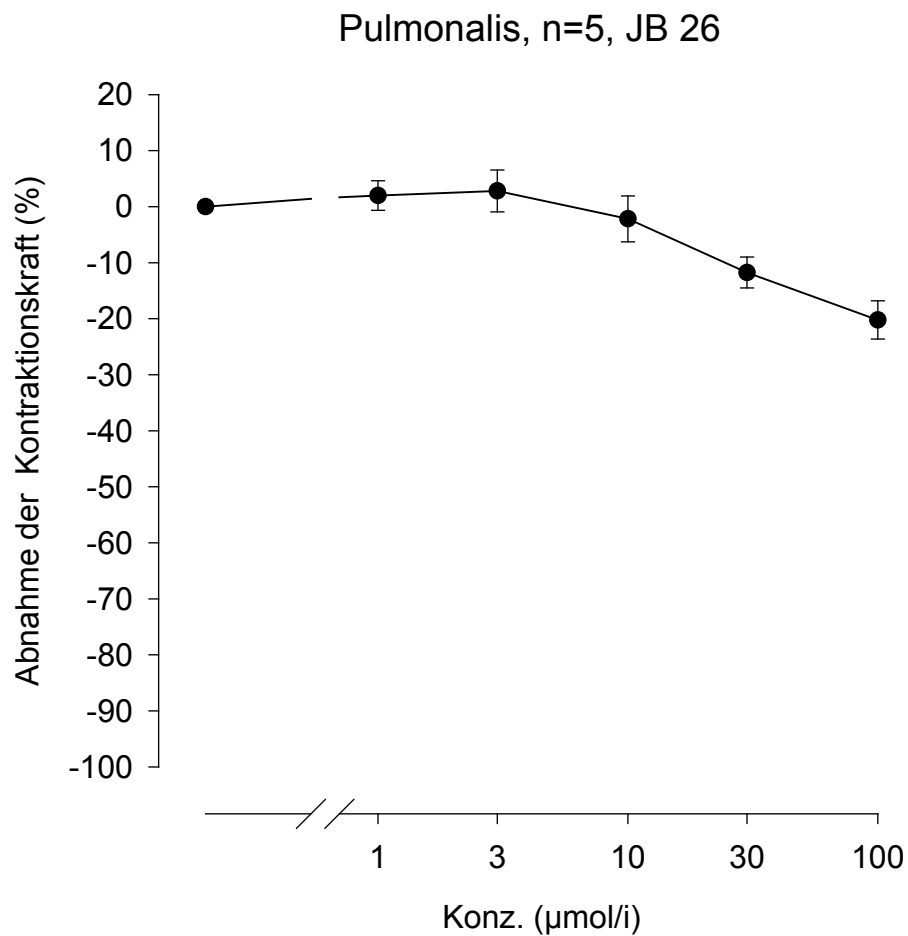
Die letzte Stufe endete bei $77,76 \pm 12,93\%$.

Tabelle 7: Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft isolierter Arteria pulmonalis-Präparate

JB26 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$14,91 \pm 3,26$	100 ± 0	5	- - -
1	$15,22 \pm 3,11$	$1,99 \pm 2,64$	5	n.s.
3	$15,33 \pm 3,02$	$2,81 \pm 3,73$	5	n.s.
10	$14,53 \pm 2,94$	$-2,18 \pm 4,09$	5	n.s.
30	$13,48 \pm 2,87$	$-11,75 \pm 2,76$	5	n.s.
100	$12,18 \pm 2,64$	$-20,22 \pm 3,40$	5	n.s.
300	$6,63 \pm 1,63$	$-22,24 \pm 12,93$	2	n.s.

Die Tabelle 7 enthält neben den Konzentrationsangaben und der Irrtumswahrscheinlichkeit auch die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionsänderung sowohl in mN als auch in Prozent und die Anzahl der durchgeführten Versuche.

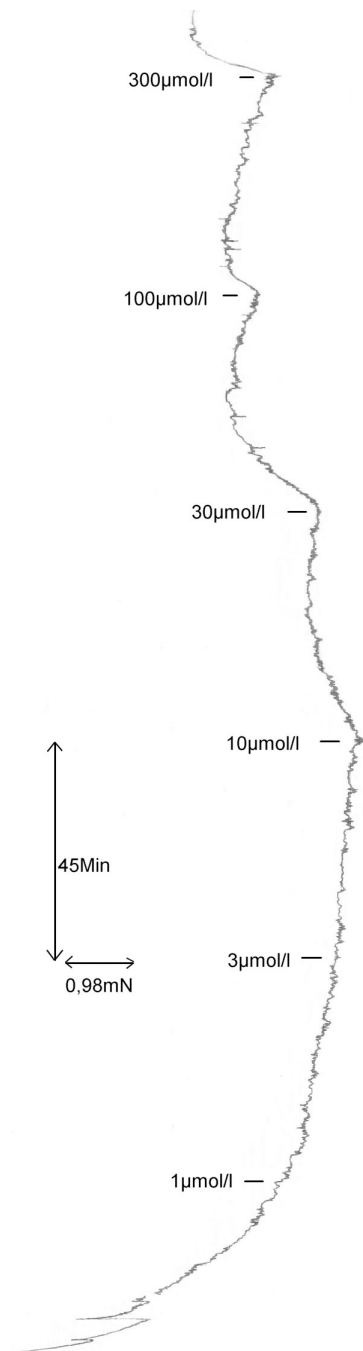
Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von JB26 auf isolierte Arteria pulmonalis-Präparate.



Auf der Abszisse dieser Abbildung (16) wurden die Konzentrationsstufen der Testsubstanz JB26 aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Mittelwerte wurden als Punkte und ihre Standardfehler (SEM) als Balken graphisch dargestellt.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft isolierter Arteria pulmonalis- Präparate



Originalaufzeichnung des Schreibers zeigt die Kontraktionsänderung der Arteria pulmonalis-Präparate nach Erhöhung der Konzentration von Testsubstanz JB26. Die Zugabe erfolgte jeweils nach 45 Minuten.

3.1.5. Wirkung auf das terminale Ileum.

Die Wirkung von JB26 auf das terminale Ileum wurde an 5 Präparaten getestet. Auch hier erfolgte eine Vorkontraktion mit einer 60 mmol/l Kaliumchloridlösung.

Als Kontrollwert wurde ein Wert von $17,25 \pm 2,45$ mN berechnet, der die 100% der Kontraktionskraft definiert.

Nach einer jeweils 45-minütigen Anpassungszeit wurden fünf Konzentrationsstufen der Testsubstanz JB26 zugegeben.

Die Testsubstanz JB26 zeigte eine stark relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums. Die Erschlaffung der Muskulatur nahm relativ stark zu ab der Konzentrationsstufe 3 $\mu\text{mol/l}$.

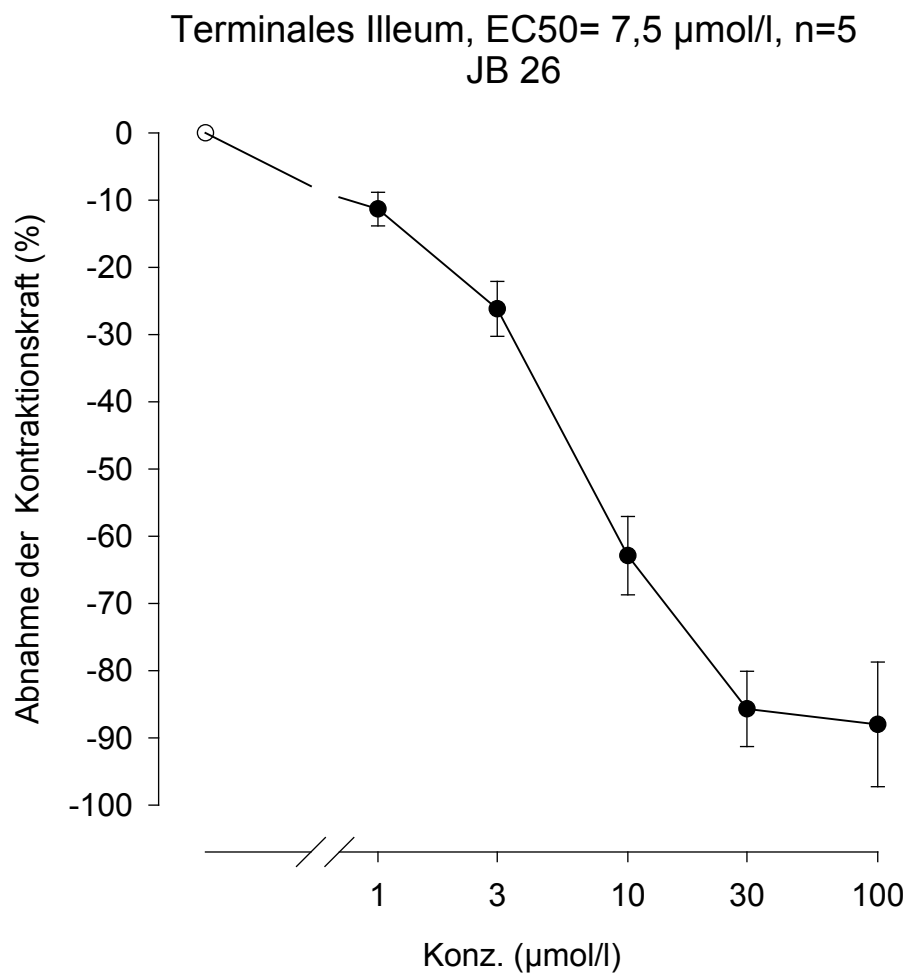
Es konnte ein EC_{50} -Wert ermittelt werden. Er lag bei 7,5 $\mu\text{mol/l}$.

Tabelle 8: Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft der isolierten terminalen Ilea

JB26 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$17,25 \pm 2,45$	100 ± 0	5	----
1	$15,09 \pm 2,22$	$-11,34 \pm 2,51$	5	n.s.
3	$12,21 \pm 2,04$	$-26,18 \pm 4,09$	5	n.s.
10	$5,28 \pm 1,27$	$-62,90 \pm 5,83$	5	0,01
30	$0,84 \pm 1,18$	$-85,70 \pm 5,59$	5	0,01
100	$-1,10 \pm 1,89$	$-88,01 \pm 9,27$	4	0,01

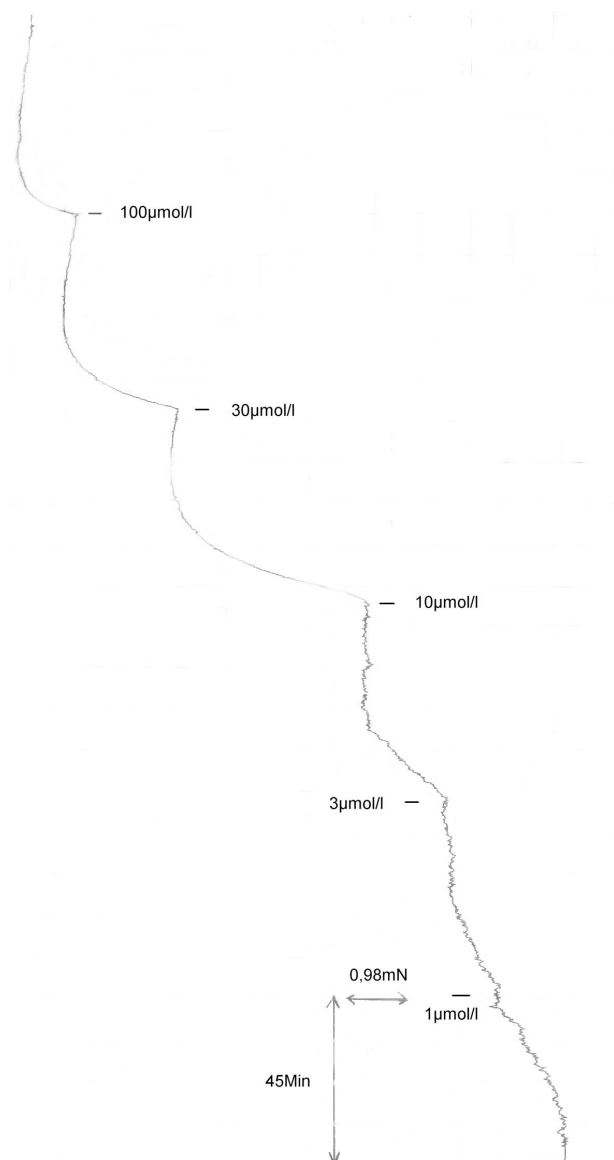
Die Tabelle 8 gibt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft sowie deren Standardfehler (SEM) aus den 5 Versuchen wieder. Alle werte wurden auf die Kontrolle bezogen und in mN und in % angegeben.

**Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von JB26 auf terminale
Ilea**



Auf der x-Achse wurden die Konzentrationsstufen der Testsubstanz JB26 in µmol/l und auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozentzahlen aufgetragen. Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardfehler werden in Form von Balken angezeigt.

Abbildung 19: Die Originalaufzeichnung der Wirkung von JB26 auf die Kontraktionskraft der isolierten terminalen Ilea



Die Kurve zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft nach der Erhöhung der Konzentration von JB26. Die Einwirkzeit zwischen den Zugaben betrug jeweils 45 Minuten.

3.2. Versuche der Testsubstanz JB26 mit Agonisten

3.2.1. Versuche in Kombination mit Histamin am terminalen Ileum.

Die Testsubstanz JB26 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$) getestet. Als Agonist für diese Versuche wurde Histamindihydrochlorid zugesetzt. Es wurde eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,03 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,3 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Um eine höhere Richtigkeit zu erzielen, wurden je drei Wiederholungen durchgeführt.

Bei der Auswertung wurde eine Zunahme der Kontraktionskraft beobachtet. Für die Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich, ausgehend vom Kontrollwert $9,20 \pm 3,27 \text{ mN}$, eine Erhöhung der Kontraktionskraft auf $9,47 \pm 3,39 \text{ mN}$. In der nächst höheren Konzentrationsstufe (10 $\mu\text{mol/l}$) wurde auch eine Erhöhung berechnet, nämlich von $11,14 \pm 0,64 \text{ mN}$ der Kontrollwert auf $11,50 \pm 0,75 \text{ mN}$. Für die Konzentration 30 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich eine noch größere Zunahme der Kontraktionskraft und zwar von $10,65 \pm 1,35 \text{ mN}$ auf $12,97 \pm 2,21 \text{ mN}$.

Tabelle 9: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea ohne Testsubstanz JB26 (Kontrolle)

Histamindihydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	$0,69 \pm 0,26$	3
0,03	$1,21 \pm 0,45$	3
0,1	$2,93 \pm 1,00$	3
0,3	$5,18 \pm 1,87$	3
1	$8,20 \pm 2,92$	3
3	$9,20 \pm 3,27$	3

Tabelle 10: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit $1 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26

Histamindihydrochlorid +1 $\mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	$0,75 \pm 1,61$	3	n.s.
0,03	$1,44 \pm 0,61$	3	n.s.
0,1	$3,09 \pm 1,09$	3	n.s.
0,3	$5,32 \pm 1,92$	3	n.s.
1	$8,40 \pm 3,00$	3	n.s.
3	$9,47 \pm 3,39$	3	n.s.

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit $1 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Tabelle 11: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea ohne die Testsubstanz JB26 (Kontrolle)

Histamindihydrochlorid Kontrolle (μmol/l)	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	0,62 ± 0,09	3
0,03	1,15 ± 0,03	3
0,1	2,74 ± 0,17	3
0,3	5,78 ± 3,30	3
1	8,85 ± 0,28	3
3	11,14 ± 0,64	3

Tabelle 12: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä mit 10 μmol/l der Testsubstanz JB26

Histamindihydrochlorid +10 μmol/l JB26	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	0,77 ± 0,11	3	n.s.
0,03	1,37 ± 0,11	3	n.s.
0,1	3,30 ± 0,21	3	n.s.
0,3	5,98 ± 0,34	3	n.s.
1	9,70 ± 0,66	3	n.s.
3	11,50 ± 0,75	3	n.s.

Die Tabellen 11 und 12 geben die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit 10 μmol/l JB26.

Tabelle13: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä ohne die Testsubstanz JB26 (Kontrolle)

Histamindihydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	$0,62 \pm 0,09$	3
0,03	$1,24 \pm 0,09$	3
0,1	$2,61 \pm 0,17$	3
0,3	$5,29 \pm 1,49$	3
1	$9,57 \pm 1,92$	3
3	$10,65 \pm 1,35$	3

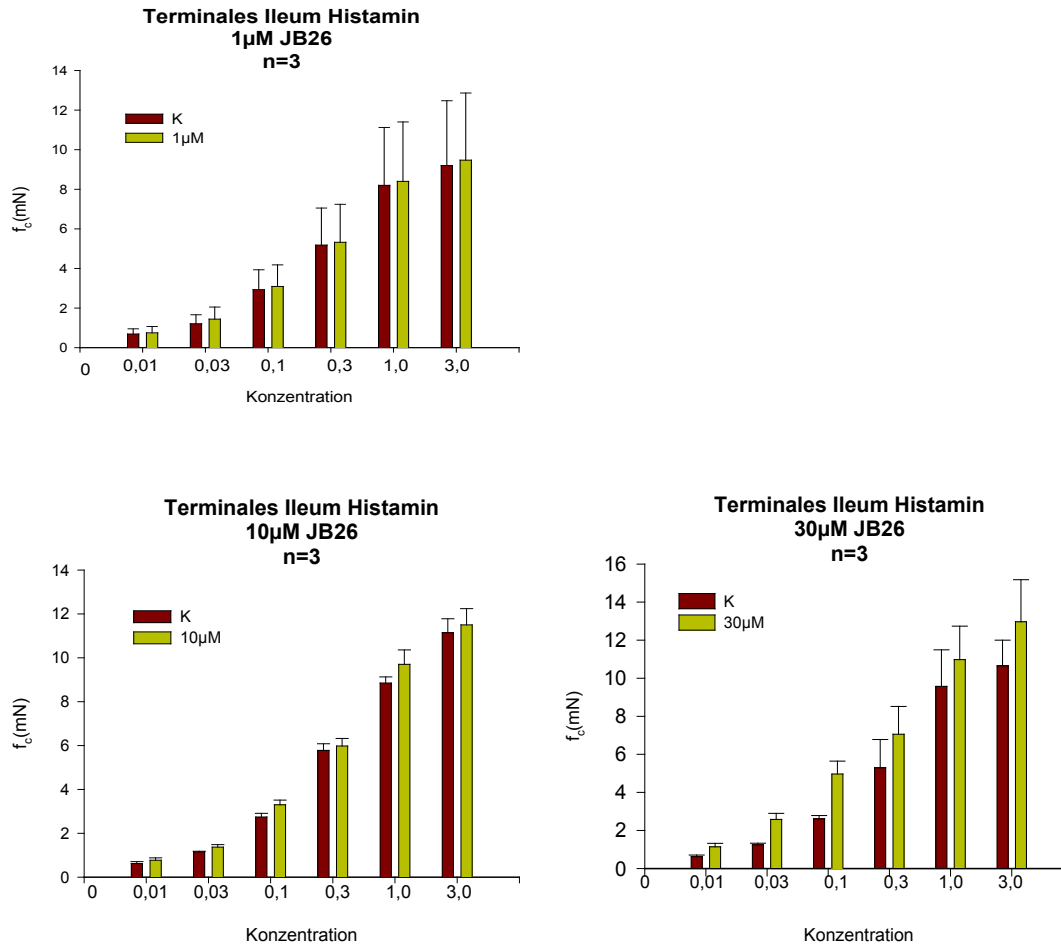
Tabelle 14: Wirkung von Histamindihydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit 30 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26

Histamindihydrochlorid +30 $\mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	$1,14 \pm 0,18$	3	n.s.
0,03	$2,58 \pm 0,32$	3	n.s.
0,1	$4,97 \pm 0,67$	3	n.s.
0,3	$7,06 \pm 1,46$	3	n.s.
1	$10,98 \pm 1,76$	3	n.s.
3	$12,97 \pm 2,21$	3	n.s.

Die Tabellen 13 und 14 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB26.

Abbildungen 20, 21, 22: Graphische Darstellung der Wirkung von

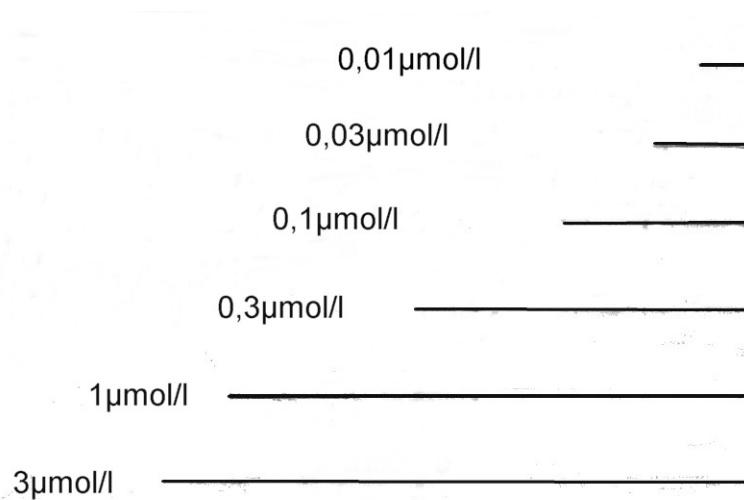
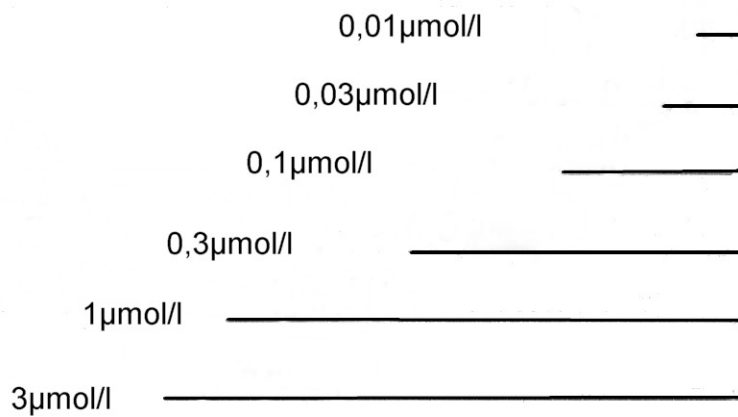
Histamindihydrochlorid allein und unter Exposition von JB26 (in den Konzentrationen 1, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



Die Kontraktionskraft der terminalen Ilea wurde in mN auf die Ordinate, die Konzentration von Histamindihydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$ auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen wurden in der Graphik als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen dargestellt.

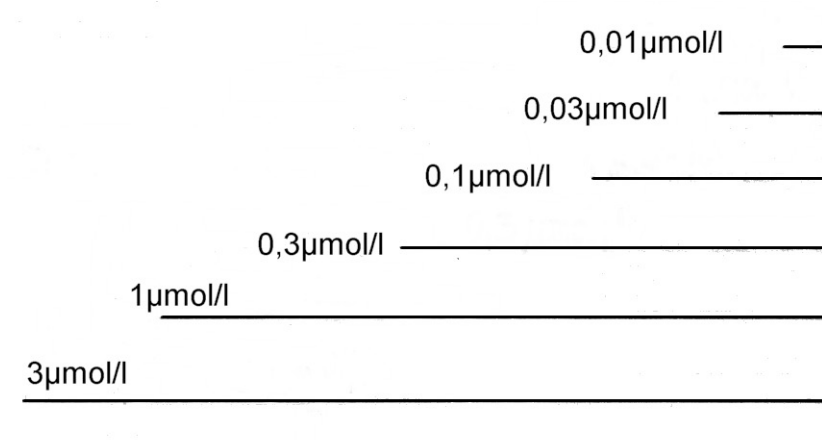
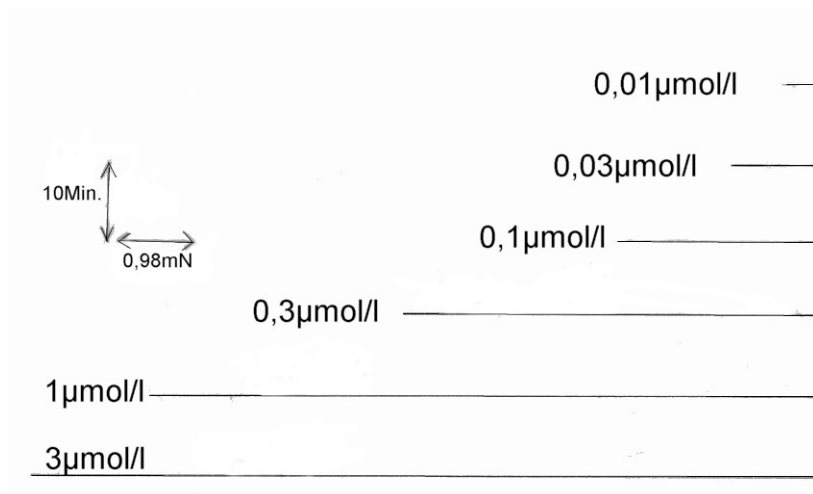
Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit 1 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

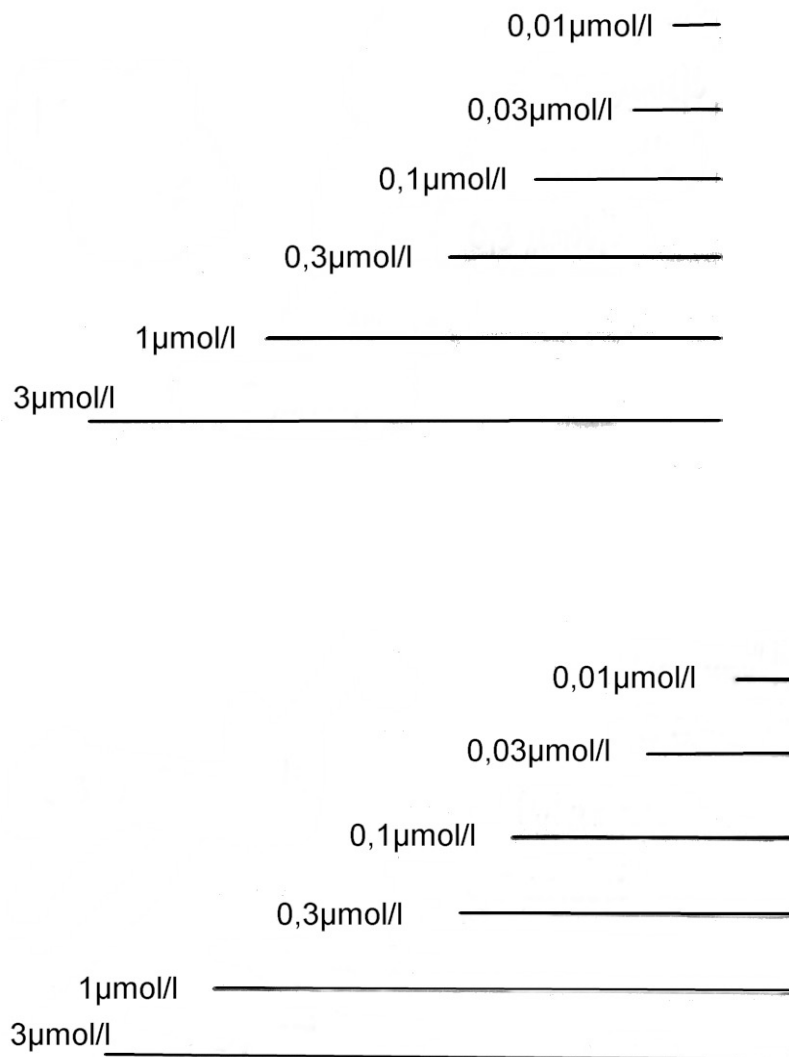
Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit 10 µmol/l JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histamindihydrochlorid allein und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

3.2.2. Versuche in Kombination mit Acetylcholinhydrochlorid am terminalen

Ileum

Die Testsubstanz JB26 wurde für die Versuche in drei unterschiedlichen Konzentrationen, nämlich 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, verwendet. Es wurden je drei Untersuchungen durchgeführt.

Als Agonist wurde bei diesen Versuchen Acetylcholinhydrochlorid zugesetzt mit folgender Verdünnungsreihe: 0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,03 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,3 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$.

Die Kontrollwerte der 3 $\mu\text{mol/l}$ wurden berechnet und als 100% definiert. Alle folgenden Werte wurden auf diesen Wert bezogen.

Es war eine geringe Abnahme der Kontraktionskraft (von $7,68 \text{ mN} \pm 1,88$ auf $7,09 \pm 1,78 \text{ N}$) schon nach der Zugabe der 1 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26 zu beobachten. Nach Zugabe der nächsten Konzentrationen der Testsubstanz JB26, nämlich 10 $\mu\text{mol/l}$ und 30 $\mu\text{mol/l}$, ist die Kontraktionskraft weiter gesunken. Allerdings war der Effekt der Testsubstanz JB26 auf den Einfluss von Acetylcholinhydrochlorid nicht prägnant genug und somit nicht signifikant.

Tabelle 15: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

Acetylcholinhydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	$1,01 \pm 0,23$	3
0,03	$1,92 \pm 0,33$	3
0,1	$3,59 \pm 0,72$	3
0,3	$4,41 \pm 0,85$	3
1	$6,57 \pm 1,50$	3
3	$7,68 \pm 1,88$	3

Tabelle 16: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä mit $1 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26.

Acetylcholinhydrochlorid +1 $\mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	$0,75 \pm 0,14$	3	n.s.
0,03	$1,67 \pm 0,30$	3	n.s.
0,1	$3,20 \pm 0,64$	3	n.s.
0,3	$4,15 \pm 0,76$	3	n.s.
1	$6,11 \pm 1,47$	3	n.s.
3	$7,09 \pm 1,78$	3	n.s.

Die Tabellen 15 und 16 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit $1 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Tabelle 17: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

Acetylcholinhydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	$1,36 \pm 0,36$	3
0,03	$2,50 \pm 0,52$	3
0,1	$4,57 \pm 0,26$	3
0,3	$7,04 \pm 1,18$	3
1	$8,33 \pm 1,54$	3
3	$9,73 \pm 1,09$	3

Tabelle 18: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä mit $10 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26.

Acetylcholinhydrochlorid + $10 \mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,01	$0,75 \pm 0,23$	3	n.s.
0,03	$1,76 \pm 0,23$	3	n.s.
0,1	$3,85 \pm 0,23$	3	n.s.
0,3	$6,21 \pm 0,91$	3	n.s.
1	$7,69 \pm 1,16$	3	n.s.
3	$8,59 \pm 0,88$	3	n.s.

Die Tabellen 17 und 18 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit $10 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Tabelle 19: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

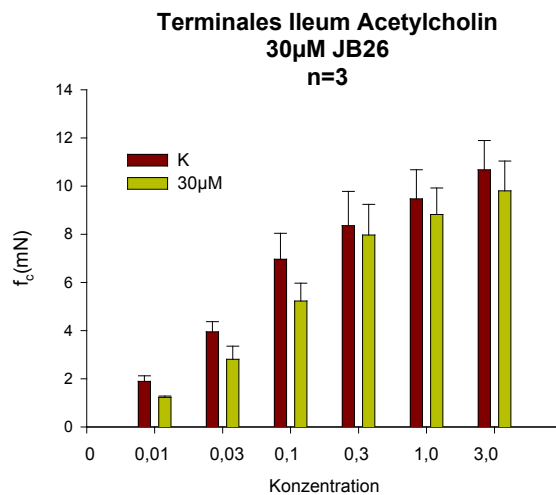
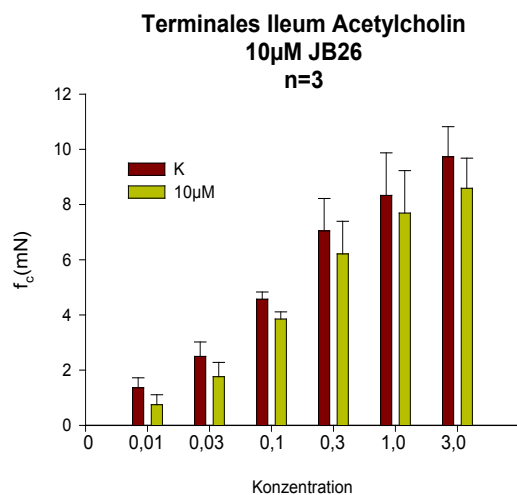
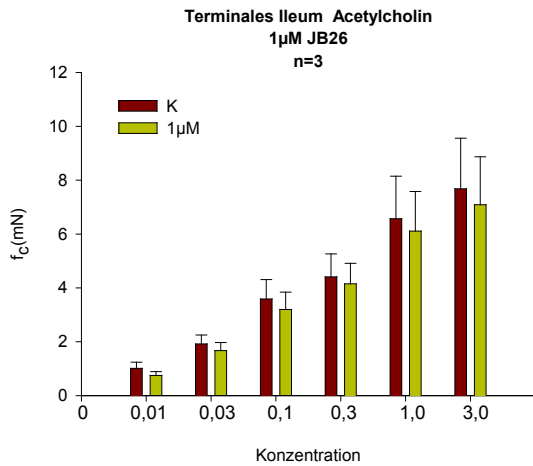
Acetylcholinhydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,01	$1,89 \pm 0,23$	3
0,03	$3,95 \pm 0,42$	3
0,1	$6,96 \pm 1,08$	3
0,3	$8,36 \pm 1,42$	3
1	$9,47 \pm 1,21$	3
3	$10,68 \pm 1,21$	3

Tabelle 20: Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit $30 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26.

Acetylcholinhydrochlorid + $30 \mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- Scheinlichkeit P
0,01	$1,23 \pm 0,05$	3	n.s.
0,03	$2,81 \pm 0,54$	3	n.s.
0,1	$5,23 \pm 0,74$	3	n.s.
0,3	$7,97 \pm 1,27$	3	n.s.
1	$8,82 \pm 1,10$	3	n.s.
3	$9,80 \pm 1,24$	3	n.s.

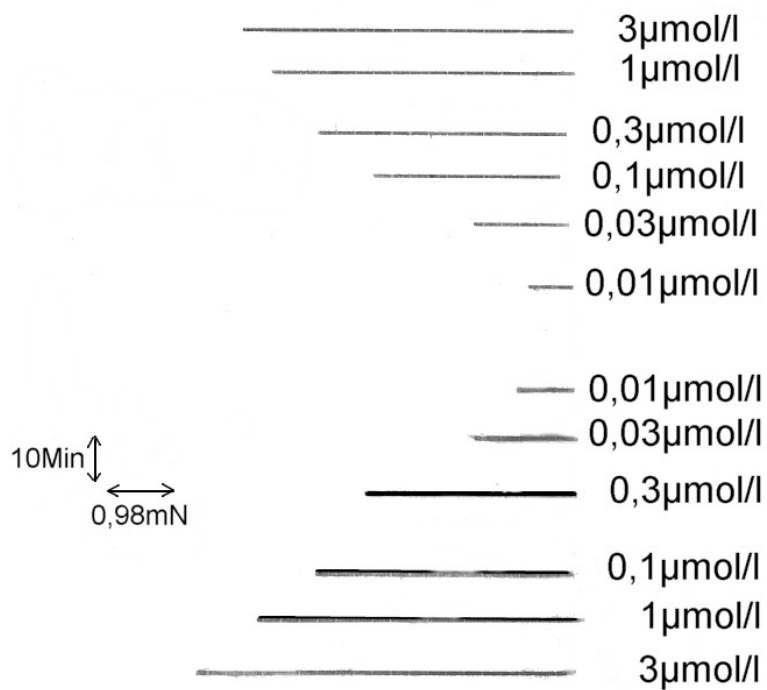
Die Tabellen 19 und 20 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit $30 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Abbildungen 26, 27, 28: Graphische Darstellung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid allein und unter Exposition von JB26 (in den Konzentrationen 1, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



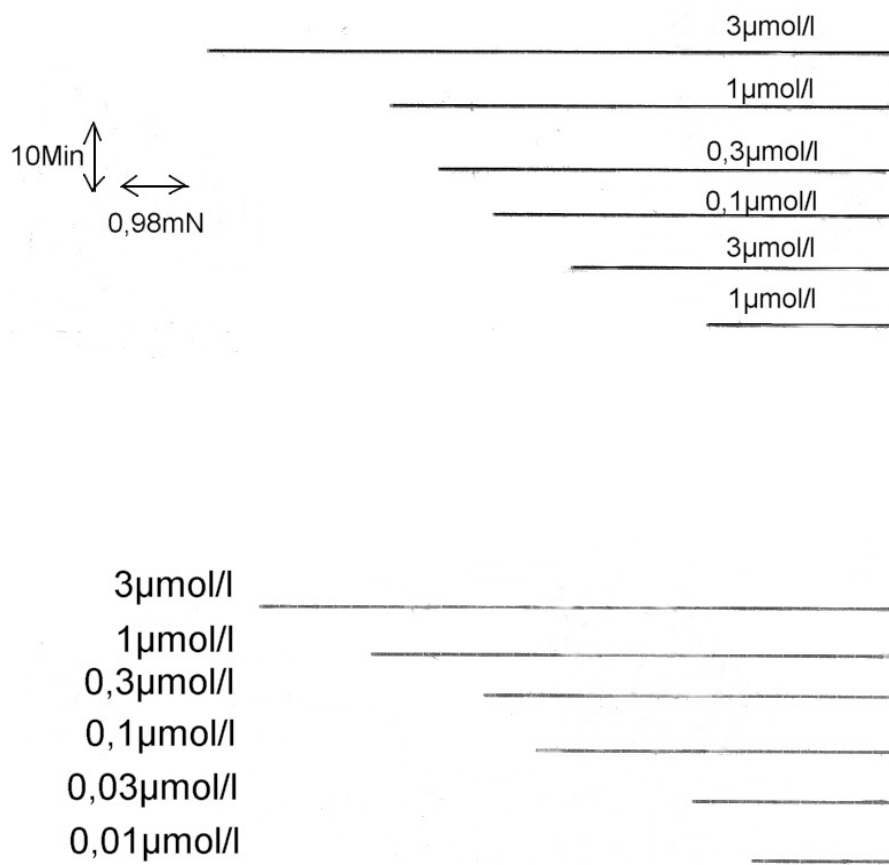
Die Kontraktionskraft der terminalen Ilea wurde in mN auf die Ordinate, die Konzentration von Acetylcholinhydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$ auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen wurden in der Graphik als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen dargestellt.

Abbildung 29: Originalaufzeichnung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit 1 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



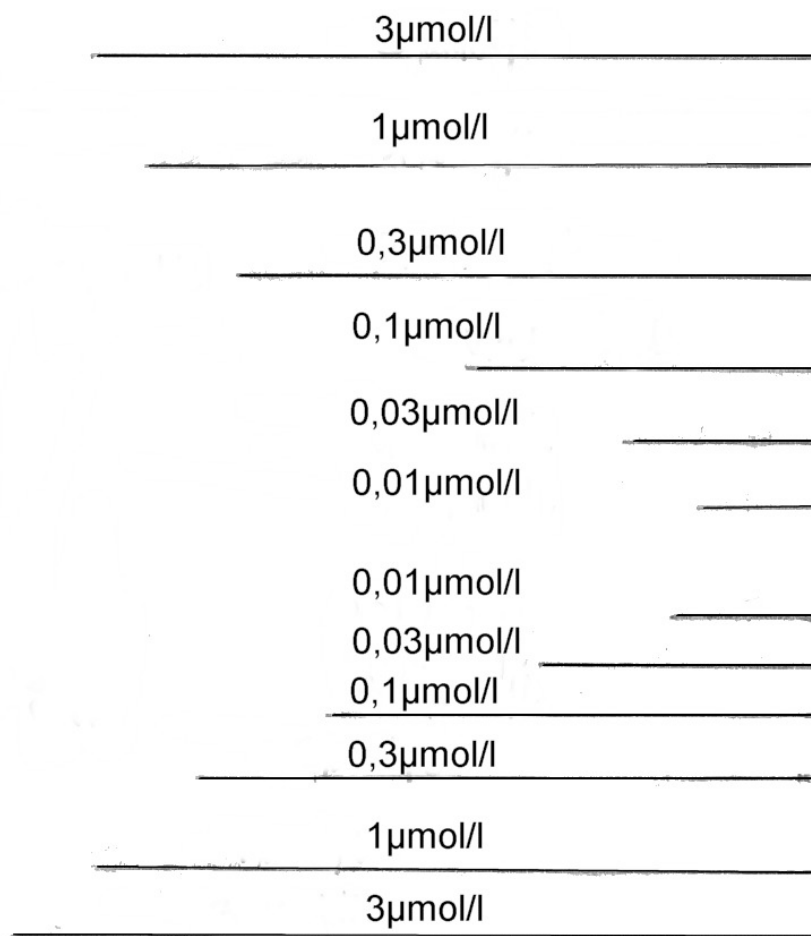
Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 30: Originalaufzeichnung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von Acetylcholinhydrochlorid allein und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

3.2.3. Versuche in Kombination mit Phenylephrinhydrochlorid am terminalen Ileum.

Für die Versuche wurde die Testsubstanz JB26 in drei verschiedenen Konzentrationsstufen verwendet (1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$). Phenylephrinhydrochlorid in den fünf Verdünnungsstufen (0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,3 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 mmol/l , 10 $\mu\text{mol/l}$) fungierte bei den Versuchen als Agonist.

Wie bei den anderen Versuchen mit Agonisten, wurden auch hier jeweils drei Versuche mit den verschiedenen Konzentrationsstufen der Testsubstanz JB26 durchgeführt.

Mit steigender Konzentration wurde die Abnahme der Kontraktilität des Organs beobachtet. Jedoch die Wirkung von JB26 auf den Einfluss von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea war nicht signifikant.

Tabelle 21: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

Phenylephrinhydrochlorid Kontrolle (μmol/l)	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	0,95 ± 0,21	3
0,3	1,50 ± 0,29	3
1	2,45 ± 0,25	3
3	3,79 ± 0,17	3
10	5,49 ± 0,34	3

Tabelle 22: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit 1 μmol/l der Testsubstanz JB26.

Phenylephrinhydrochlorid +1 μmol/l JB26	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,1	0,64 ± 0,05	3	n.s.
0,3	1,34 ± 0,28	3	n.s.
1	2,15 ± 0,20	3	n.s.
3	3,36 ± 0,20	3	n.s.
10	5,03 ± 0,41	3	n.s.

Die Tabellen 21 und 22 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 1 μmol/l JB26.

Tabelle 23: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

Phenylephrinhydrochlorid Kontrolle (μmol/l)	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	1,15 ± 0,03	3
0,3	1,67 ± 0,15	3
1	2,58 ± 0,14	3
3	4,02 ± 0,44	3
10	5,72 ± 0,29	3

Tabelle 24: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit 10 μmol/l der Testsubstanz JB26.

Phenylephrinhydrochlorid +10 μmol/l JB26	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- Scheinlichkeit P
0,1	0,98 ± 0,00	3	n.s.
0,3	1,37 ± 0,15	3	n.s.
1	2,25 ± 0,11	3	n.s.
3	3,50 ± 0,31	3	n.s.
10	5,16 ± 0,28	3	n.s.

Die Tabellen 23 und 24 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 10 μmol/l JB26.

Tabelle 25: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler

Ilea ohne die Testsubstanz (Kontrolle).

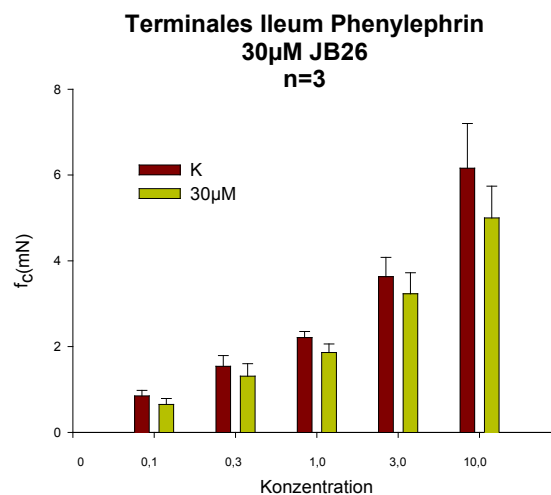
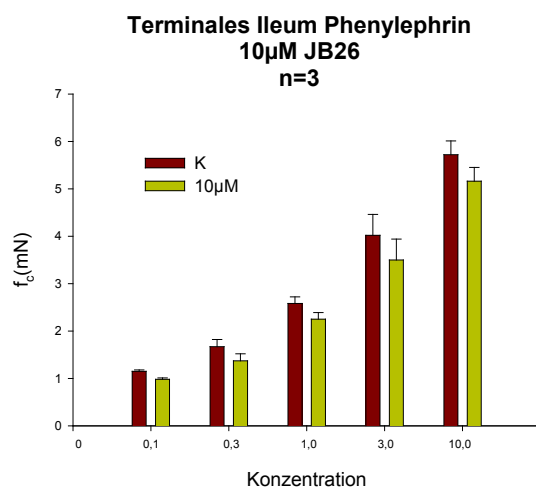
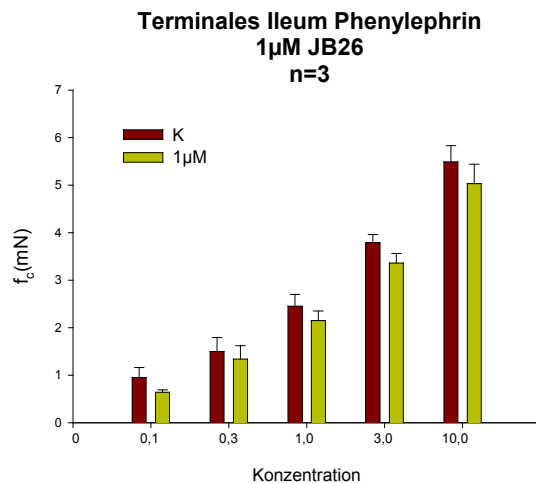
Phenylephrinhydrochlorid Kontrolle (μmol/l)	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	0,85 ± 0,13	3
0,3	1,54 ± 0,25	3
1	2,21 ± 0,14	3
3	3,63 ± 0,45	3
10	6,16 ± 1,04	3

Tabelle 26: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea mit 30 μmol/l der Testsubstanz JB26.

Phenylephrinhydrochlorid +30 μmol/l JB26	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
0,1	0,65 ± 0,14	3	n.s.
0,3	1,31 ± 0,29	3	n.s.
1	1,86 ± 0,20	3	n.s.
3	3,23 ± 0,49	3	n.s.
10	5,00 ± 0,74	3	n.s.

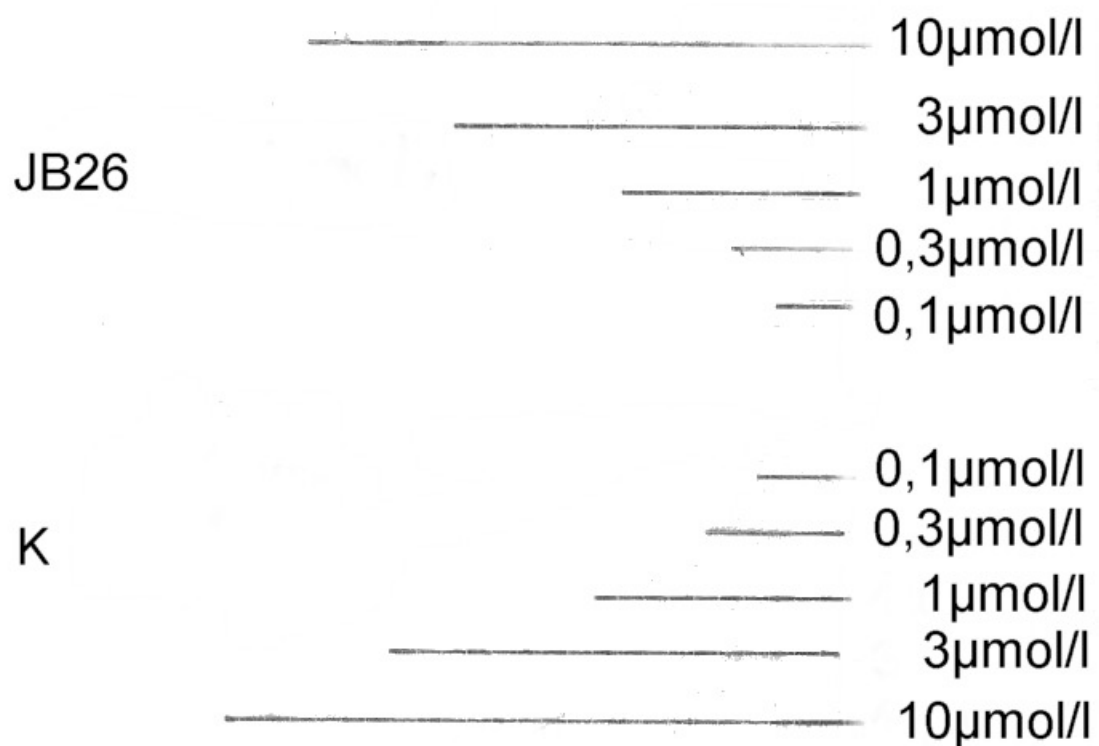
Die Tabellen 25 und 26 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 30 μmol/l JB26.

Abbildungen 32,33,34: Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid allein und unter Exposition von JB26 (in den Konzentrationen 1, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



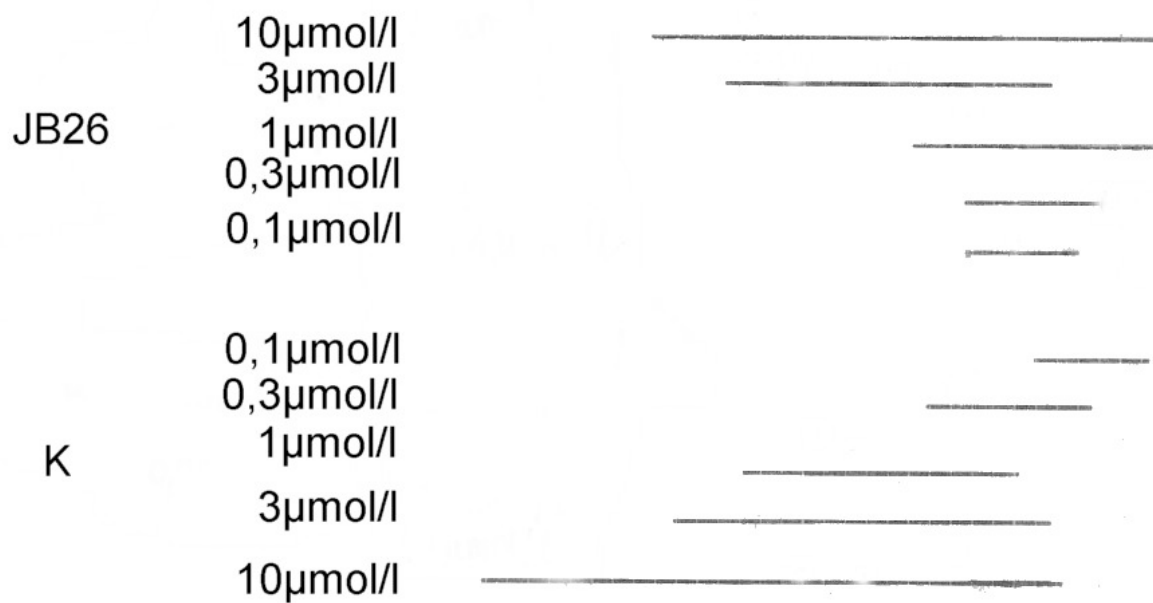
Die Kontraktionskraft der terminalen Ilea wurde in mN auf die Ordinate, die Konzentration von Phenylephrinhydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$ auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen wurden in der Graphik als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen dargestellt.

Abbildung 35: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 1 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ilea.



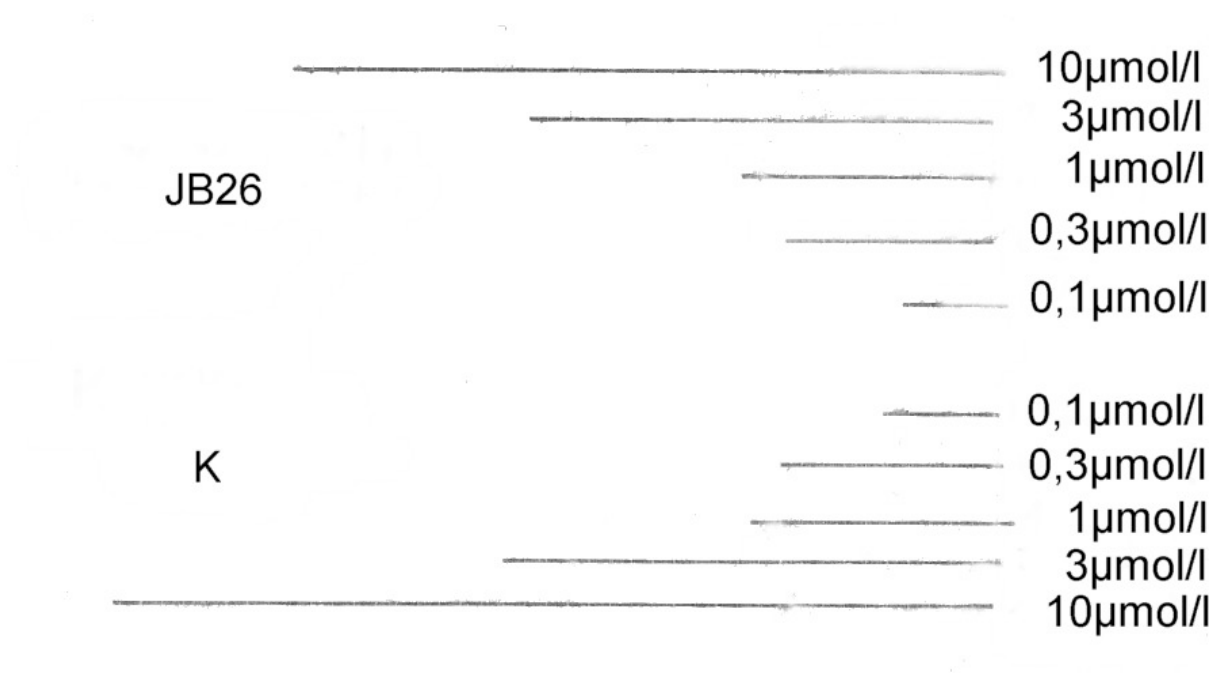
Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 36: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 37: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid allein und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft terminaler Ileä.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

3.2.4. Versuche in Kombination mit Histamin am Uterus

Bei diesen Versuchen wurde der Einfluss der Testsubstanz JB26 auf die Kontraktionskraft des Uterus in den Konzentrationen 10 $\mu\text{mol/l}$ und 30 $\mu\text{mol/l}$ untersucht.

Als Agonist wurde hier Histaminhydrochlorid verwendet und in den Verdünnungsstufen 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ in das Organbad injiziert. Bei jeder Konzentration wurden jeweils drei Versuche durchgeführt.

Die Kontraktionskraft des Uterus sank bei jeder Zugabe der nächst höheren Konzentration der Testsubstanz JB26.

Tabelle 27: Wirkung von Histaminhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des Uterus ohne die Testsubstanz JB26 (Kontrolle).

Histaminhydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
1	$2,73 \pm 0,37$	3
3	$10,74 \pm 1,49$	3
10	$19,42 \pm 2,75$	3

Tabelle 28: Wirkung von Histaminhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des Uterus mit $10 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26.

Histaminhydrochlorid +$10 \mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
1	$1,95 \pm 0,17$	3	n.s.
3	$9,57 \pm 0,83$	3	n.s.
10	$14,98 \pm 1,46$	3	n.s.

Die Tabellen 27 und 28 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Histaminhydrochlorid allein und in Kombination mit $10 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Tabelle 29: Wirkung von Histaminhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des Uterus ohne die Testsubstanz JB26 (Kontrolle).

Histaminhydrochlorid Kontrolle ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
1	$5,54 \pm 2,11$	3
3	$12,87 \pm 1,55$	3
10	$22,82 \pm 2,56$	3

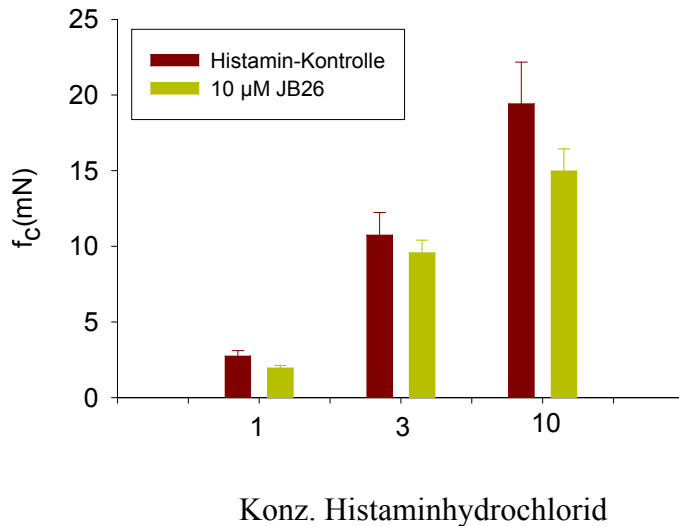
Tabelle 30: Wirkung von Histaminhydrochlorid auf die Kontraktionskraft des Uterus mit $30 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz JB26.

Histaminhydrochlorid +30 $\mu\text{mol/l}$ JB26	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtumswahr- Scheinlichkeit P
1	$2,88 \pm 1,12$	4	n.s.
3	$8,88 \pm 1,41$	4	n.s.
10	$17,67 \pm 2,54$	4	n.s.

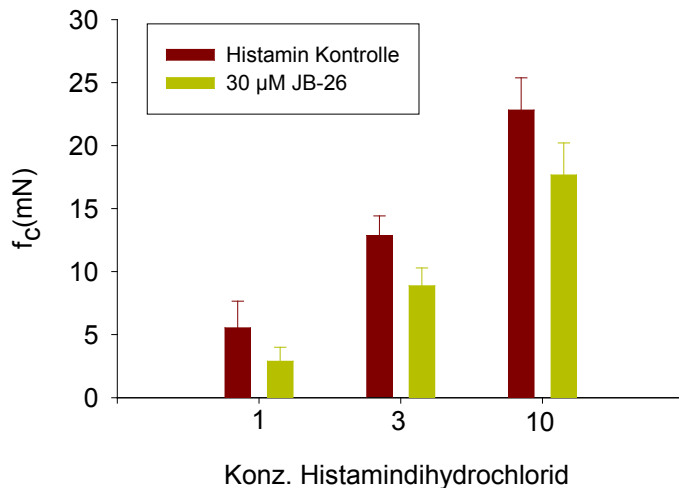
Die Tabellen 29 und 30 zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler aus den Kontrollversuchen mit Histaminhydrochlorid allein und in Kombination mit $30 \mu\text{mol/l}$ JB26.

Abbildungen 38,39: Graphische Darstellung der Wirkung von Histaminhydrochlorid allein und unter Exposition von JB26 (in den Konzentrationen 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) auf die Kontraktionskraft des Uterus.

Uterus, n=3, JB-26

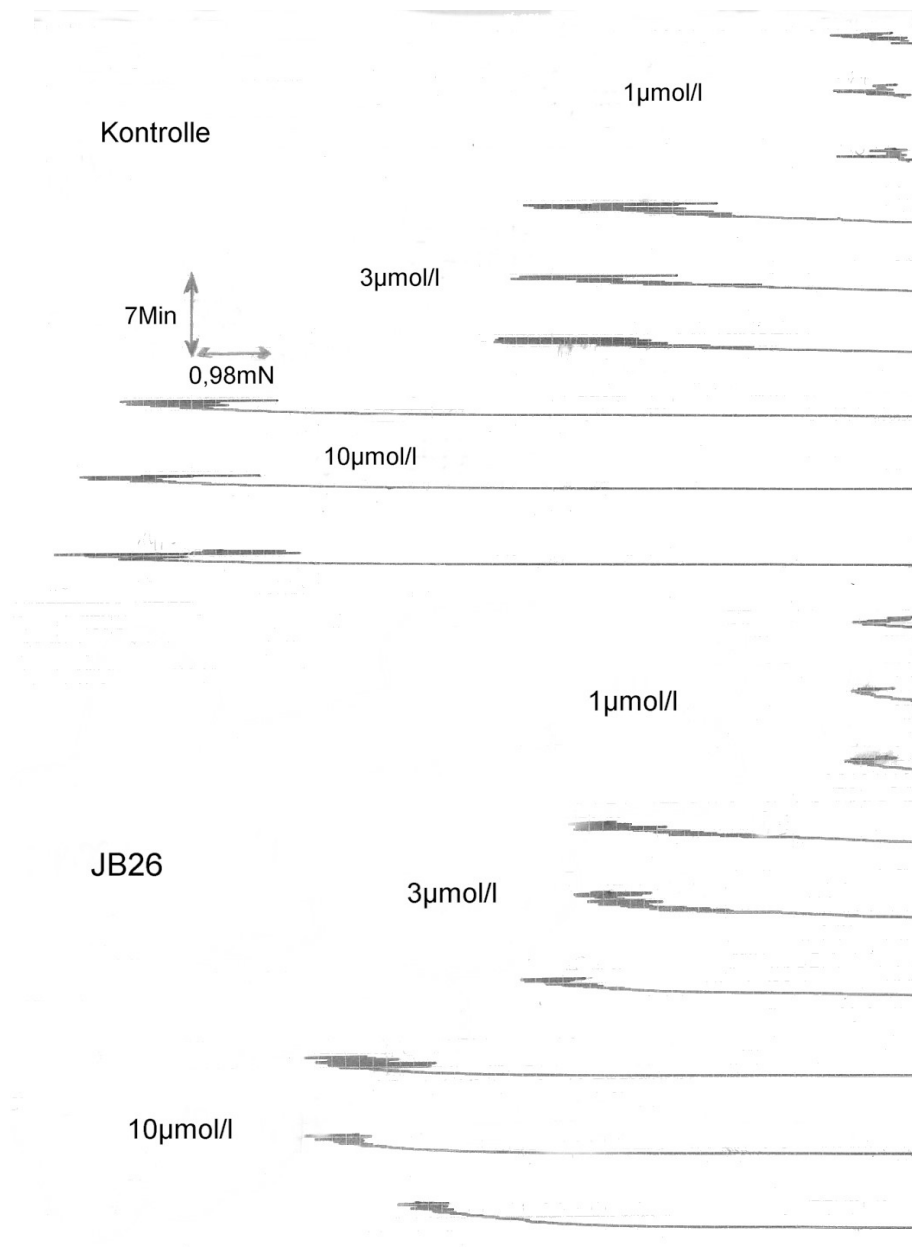


Uterus, n=4, JB-26



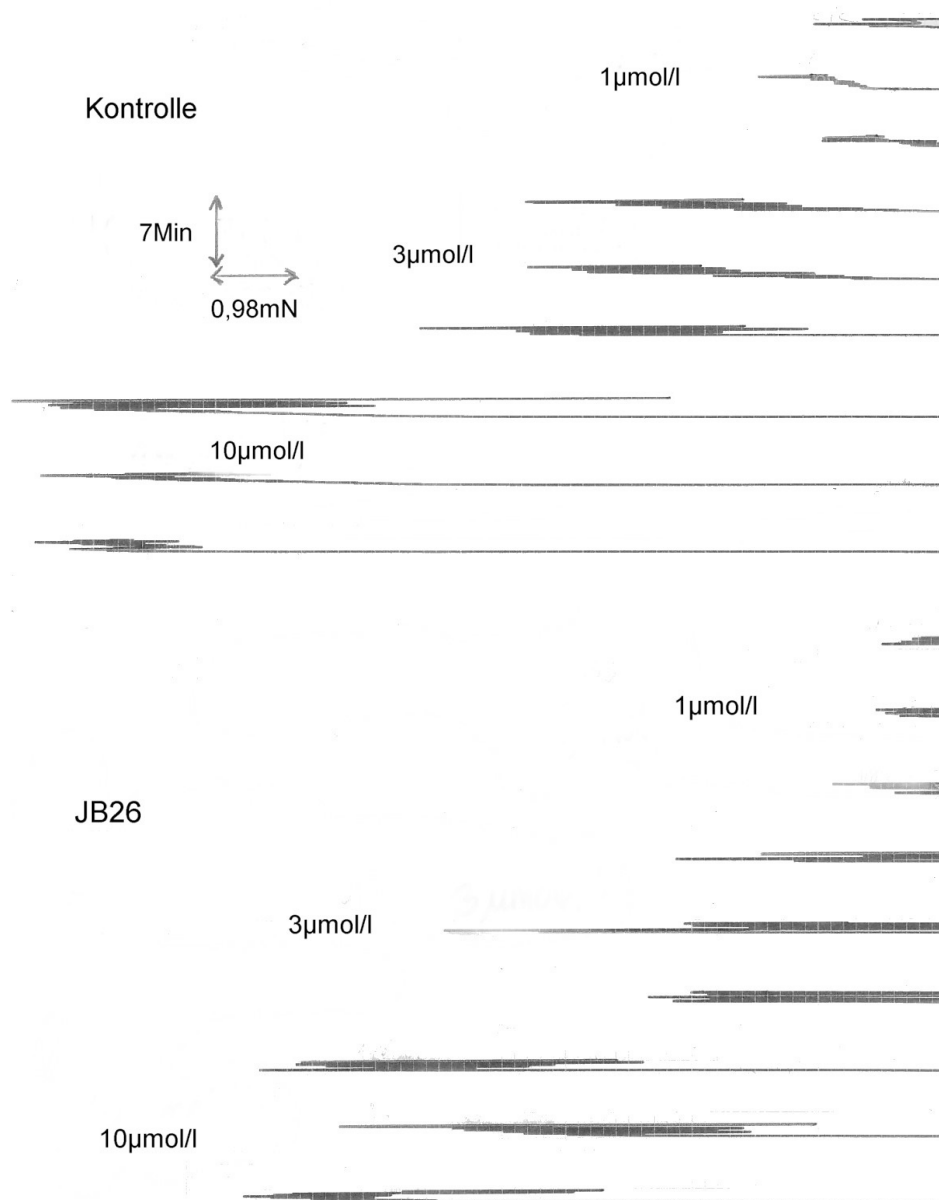
Die Kontraktionskraft des Uterus wurde in mN auf die Ordinate, die Konzentration von Histaminhydrochlorid in $\mu\text{mol/l}$ auf der Abszisse aufgetragen. Die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen wurden in der Graphik als Balken, deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen dargestellt.

Abbildung 40: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histaminhydrochlorid allein und in Kombination mit 10 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft des Uterus.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

Abbildung 41: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histaminhydrochlorid allein und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ JB26 auf die Kontraktionskraft des Uterus.



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Schreibers. 1 cm der Peaklänge entspricht 0,98 mN.

3.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die isolierten Organe

DMSO (Dimethylsulfoxid) fungierte bei den Versuchen mit der Testsubstanz JB26 als Lösungsmittel und übte eine Eigenwirkung auf die isolierten Organe aus. Dieser Effekt musste bei den Messdaten berücksichtigt werden. Deswegen wurden jeweils drei reproduzierbare Lösungsmittelversuche durchgeführt.

3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Bei Zugabe von 300 $\mu\text{mol/l}$ DMSO wurde eine Zunahme der Schlagfrequenz auf $100,9 \pm 0,89$ % beobachtet.

Tabelle 31: Wirkung von DMSO auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$237,5 \pm 42,50$	100 ± 0	- - -
0,3	240 ± 45	$100,9 \pm 0,89$	n.s.
1	245 ± 40	$103,45 \pm 1,66$	n.s.
3	245 ± 45	$103,04 \pm 0,53$	n.s.
10	245 ± 45	$103,04 \pm 0,53$	n.s.
30	240 ± 40	$101,25 \pm 1,25$	n.s.
100	$242,5 \pm 45$	$102,15 \pm 0,35$	n.s.
300	240 ± 45	$100,9 \pm 0,89$	n.s.

Diese Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardabweichungen in mN und % an.

3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels.

300 $\mu\text{mol/l}$ DMSO bewirkten eine Relaxation der Muskulatur. Es wurde ein Wert von $60,41 \pm 2,09 \%$ erreicht.

Tabelle 32: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels.

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$1,0 \pm 0,20$	100 ± 0	- - -
0,3	$0,9 \pm 0,1$	$91,66 \pm 8,34$	n.s.
1	$0,75 \pm 0,05$	$77,08 \pm 10,42$	$< 0,05$
3	$0,6 \pm 0,1$	$60,41 \pm 2,09$	$< 0,01$
10	$0,6 \pm 0,1$	$60,41 \pm 2,09$	$< 0,01$
30	$0,55 \pm 0,05$	$56,25 \pm 6,25$	$< 0,01$
100	$0,6 \pm 0,1$	$60,41 \pm 2,09$	$< 0,01$
300	$0,6 \pm 0,1$	$60,41 \pm 2,09$	$< 0,01$

Die Tabelle stellt die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz und deren Standardfehler dar.

3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

Bei Zugabe von 300 $\mu\text{mol/l}$ DMSO sank die Kontraktion auf $6,64 \pm 1,85$ mN bezogen auf den Kontrollwert ($8,79 \pm 2,92$ mN).

Tabelle 33: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$8,79 \pm 2,92$	100 ± 0	- - -
0,3	$8,79 \pm 2,92$	100 ± 0	n.s.
1	$8,79 \pm 2,92$	100 ± 0	n.s.
3	$8,66 \pm 2,79$	$99,09 \pm 0,91$	n.s.
10	$8,34 \pm 2,52$	$97,08 \pm 3,84$	n.s.
30	$8,21 \pm 2,56$	$95,37 \pm 4,62$	n.s.
100	$7,42 \pm 2,29$	$86,02 \pm 2,68$	n.s.
300	$6,64 \pm 1,85$	$78,20 \pm 4,09$	$< 0,05$

Diese Tabelle beinhaltet die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler.

3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ verursacht das Lösungsmittel DMSO eine Abnahme des Tonus der Muskulatur auf $84,79 \pm 4,43 \%$.

Tabelle 34: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$9,82 \pm 0,39$	100 ± 0	- - -
0,3	$9,86 \pm 0,37$	$100,36 \pm 0,36$	n.s.
1	$9,92 \pm 0,35$	$101,06 \pm 0,61$	n.s.
3	$9,71 \pm 0,37$	$98,84 \pm 0,86$	n.s.
10	$9,40 \pm 0,40$	$95,69 \pm 0,41$	n.s.
30	$9,07 \pm 0,58$	$92,23 \pm 2,87$	n.s.
100	$8,80 \pm 0,53$	$89,46 \pm 2,63$	$< 0,05$
300	$\pm 0,63$	$84,79 \pm 4,43$	$< 0,05$

Diese Tabelle beinhaltet die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler.

3.3.5. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums.

300 $\mu\text{mol/l}$ DMSO bewirkten eine Relaxation der Muskulatur auf $55,37 \pm 14,10 \%$.

Tabelle 35: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahr- scheinlichkeit P
Kontrolle	$7,16 \pm 1,56$	100 ± 0	- - -
0,3	$7,16 \pm 1,56$	100 ± 0	n.s.
1	$7,16 \pm 1,56$	100 ± 0	n.s.
3	$6,83 \pm 1,59$	$95,03 \pm 2,38$	n.s.
10	$6,64 \pm 1,59$	$92,21 \pm 3,64$	n.s.
30	$6,31 \pm 1,78$	$85,40 \pm 6,38$	$< 0,05$
100	$5,53 \pm 1,67$	$80,73 \pm 11,34$	$< 0,05$
300	$4,38 \pm 1,70$	$55,37 \pm 14,10$	$< 0,01$

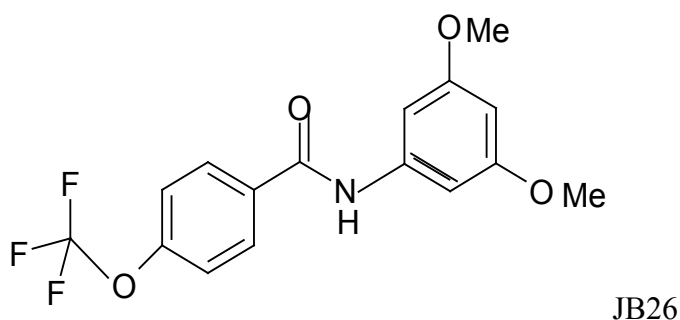
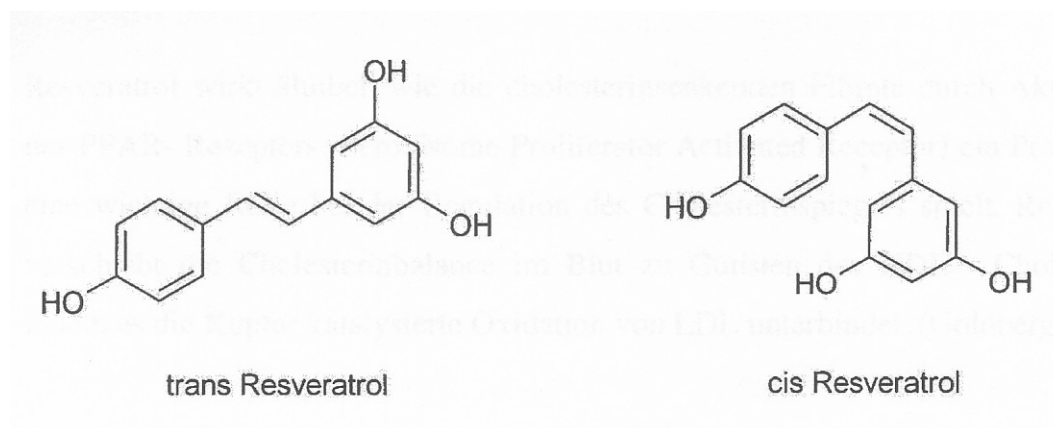
Diese Tabelle beinhaltet die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung des Resveratrol-Derivates, JB26, an sechs verschiedenen, isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht und zwar: am rechten Vorhof, am Papillarmuskel, an der Arteria pulmonalis, an der Aorta, am terminalen Ileum und am Uterus.

Es wurde zunächst die Eigenwirkung von der Substanz JB26 an den unterschiedlichen Präparaten getestet. In weiterer Folge wurde der Einfluss von JB26 auf die Wirkung von den Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin an terminalen Ilea bzw. von Histamin am Uterus diagnostiziert.

4.1. Struktur-Wirkungsbeziehung



Resveratrol (Trans-3,5,4'-trihydroxystilben) besitzt ein Stilbengrundgerüst, das an den Positionen 3,5 und 4' mit je mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist. Die Grundstruktur selbst besteht aus zwei Phenylringen, die durch eine trans-ständige Doppelbindung, als Komponente der Ethylenbrücke, verknüpft sind.

Die Substanz JB26, N-(3,5-Dimethoxyphenyl)-4'-trifluormethoxybenzamid, stellt ein Resveratrol-Derivat dar.

An dem Aromaten wurden die drei Hydroxygruppen durch zwei Methoxygruppen und eine Trifluormethoxygruppe und die Ethylenbrücke durch Amidgruppe ersetzt.

Der Strukturvergleich legt die Vermutung nahe, dass die Lipophilie der Substanz erhöht wurde. Daraus würde resultieren, dass JB26 schneller und besser in die Zellen resorbiert würde als das hydrophilere Resveratrol.

4.2. Versuche an den isolierten Organen

Die Wirkung von der Substanz JB26 wurde an sechs verschiedenen Präparaten in den Konzentrationen 1 µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l und 300 µmol/l getestet.

Bei der Untersuchung der Wirkung von JB26 am rechten Vorhof in den Konzentrationen 1,3, 10, 30 und 100 µmol/l zeigte sich bis Konzentration 10 µmol/l keine Wirkung, erst ab 30 µmol/l wurde eine negativ chronotrope Wirkung beobachtet. Es wurde ein EC₅₀-Wert ermittelt und zwar bei 61 µmol/l.

Im Vergleich begann bei Resveratrol bei einer Konzentration von 10 µmol/l die Schlagfrequenz kontinuierlich zu sinken und erst bei einer Konzentration von 100 µmol/l erreichte die Abnahme statistische Signifikanz (Lötsch 2004).

Ähnlich wie Resveratrol, der weder eine positiv noch eine negativ inotrope Wirkung am Papillarmuskel besitzt (Lötsch 2004), verhielt sich bei den Versuchen am Papillarmuskel die Substanz JB26. Es konnte auch kein EC₅₀-Wert ermittelt werden.

Tabelle 36: Vergleichende Darstellung der Wirkung von Resveratrol und JB26 auf die Herzmuskulatur

Präparat	Resveratrol f_c ± SEM (%) bei 30/100 µmol/l bezogen auf den Kontrollwert	EC₅₀ (µmol/l)	JB26 f_c ± SEM (%) bei 30/100 µmol/l bezogen auf den Kontrollwert	EC₅₀ (µmol/l)
Vorhof	96,23 ± 3,01 81,55 ± 7,52	-----	79,13 ± 8,45 18,08 ± 18,08	61
Papillarmuskel	109,81 ± 3,54 103,45 ± 5,35	-----	107,76 ± 2,90 100,60 ± 3,01	-----

Bei der Untersuchung der Wirkung von JB26 auf die Aortapräparate zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur der Aorta. Nach Zugabe von 100 µmol/l Substanzlösung wurde die Kontraktionskraft bereits auf 54,21 ± 4,94 % des Kontrollwertes reduziert. Es wurde ein EC₅₀-Wert von 175 µmol/l erreicht.

Auch Resveratrol bewirkt eine konzentrationsabhängige Relaxation der glatten Muskulatur der Aorta, die sich erst ab einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ als statistisch signifikant erwies. Die EC_{50} lag bei 145 $\mu\text{mol/l}$ (Lötsch 2004).

Bei der Versuchsreihe an Arteria pulmonalis konnte keine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet werden. Es konnte auch kein EC_{50} -Wert ermittelt werden.

Im Gegensatz dazu zeigte Resveratrol eine ausgeprägte Relaxation der glatten Muskulatur der Arteria pulmonalis, die bei 100 $\mu\text{mol/l}$ statistisch signifikant wurde. EC_{50} -Wert wurde bei 126 $\mu\text{mol/l}$ erreicht (Lötsch 2004).

Die Testsubstanz JB26 zeigte eine stark relaxierende Wirkung am terminalen Ileum. JB26 erzielte sogar eine stärkere Abnahme der Kontraktionskraft als Vergleichssubstanz Resveratrol. Die Reduktion der Kontraktion wurde bereits ab Konzentration 3 $\mu\text{mol/l}$ bedeutend und bei 7,5 $\mu\text{mol/l}$ lag der EC_{50} -Wert. Die Relaxation der glatten Muskulatur war ab der Konzentrationsstufe 10 $\mu\text{mol/l}$ statistisch hochsignifikant.

Bei Resveratrol war eine statistische Signifikanz der Wirkung bei der Konzentrationsstufe von 30 $\mu\text{mol/l}$ gegeben. EC_{50} lag bei 46 $\mu\text{mol/l}$ (Lötsch 2004).

Tabelle 37: Wirkung von Resveratrol und JB26 auf die glatte Muskulatur

Präparat	Resveratrol $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 30/100/300 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	JB26 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 30/100/300 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Kontrollwert	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	91,84 $\pm$ 4,60 64,85 $\pm$ 6,96 24,28 $\pm$ 17,66	145	69,14 $\pm$ 4,16 54,21 $\pm$ 4,94 43,99 $\pm$ 3,85	175
Arteria pulmonalis	91,59 $\pm$ 4,22 56,44 $\pm$ 7,10 18,94 $\pm$ 3,69	126	88,25 $\pm$ 2,76 79,78 $\pm$ 3,40 77,76 $\pm$ 12,93	-----
terminales Ileum	53,40 $\pm$ 8,33 30,23 $\pm$ 2,62 -----	46,4	14,30 $\pm$ 5,59 11,99 $\pm$ 9,27 -----	7,5

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man feststellen, dass JB26, obwohl es ein Derivat von Resveratrol ist, Unterschiede in der Wirkung zeigt. Die Wirkung der Testsubstanz JB26 ist ausgeprägter als die von Resveratrol an Präparaten vom Vorhof und an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums.

Die Testsubstanz JB26 zeigte, im Vergleich zu Resveratrol, eine stärker relaxierende Wirkung an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums.

Während Resveratrol keine Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels zeigte, war die negativ chronotrope Wirkung durch JB26 bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ statistisch signifikant.

Papillarmuskel und die Aorta waren die einzigen Präparate, an welchen nahezu eine idente Wirkung gezeigt werden konnte.

Bei Stilbenderivaten scheint der Einfluss auf die glatte Muskulatur zu überwiegen.

4.3. Versuche an den isolierten Organen in Kombination mit Agonisten

Die Kombinationsversuche von JB26 mit den unterschiedlichen Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin wurden in den Konzentrationsstufen 1, 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ von JB26 durchgeführt.

Bei der Versuchsreihe an Uterus-Präparaten, bei gleichzeitiger Exposition von Histamin, wurde mit 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz JB26 gearbeitet.

JB26 zeigte bei der Versuchsreihe an terminalen Ilea unter gleichzeitiger Exposition von Phenylephrin keinen erwähnenswerten Einfluss auf den Agonisten. Die Testsubstanz bewirkte leichte Abnahme der kontrahierenden Wirkung von Phenylephrin am terminalen Ileum, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Testsubstanz JB26 übte bei den Versuchen an terminalen Ilea unter gleichzeitiger Exposition von Acetylcholin keine wesentliche Beeinflussung des Effekts von Agonisten auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums. Der Tonus der glatten Muskulatur ist leicht gesunken, was auf eine eventuell vorhandene anticholinerge Wirkung schließen lässt.

An der Muskulatur des Darms und des Uterus wurde ein eventuell vorliegender histaminerger bzw. antihistaminerger Einfluss von JB26 ausgetestet.

Im Zuge der Versuche an terminalen Ilea konnte eine Zunahme der kontrahierenden Wirkung von Histamin festgestellt werden, vor allem in den höheren Konzentrationsstufen. Es wurde also ein histaminerger Einfluss von JB26 festgestellt.

Bei den Versuchen an Uteruspräparaten unter gleichzeitiger Einwirkung von Histamin zeigte sich ein antihistaminischer Effekt. Die Substanz bewirkte eine starke Abnahme der Kontraktionskraft des Uterus, aber ohne statistische Signifikanz.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war die Eigenwirkung eines neu synthetisierten Resveratrol-Derivates, JB26, an isolierten Organen von Meerschweinchen zu untersuchen und weiters den abschwächenden bzw. verstärkenden Einfluss auf die Agonisten Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin festzustellen.

Die Versuche wurden an zwei Herzmuskelpräparaten (rechter Vorhof und Papillarmuskel) und an vier Organen mit glatter Muskulatur (Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Uterus) durchgeführt, wobei die Substanz JB26 bzw. die Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen in das Organbad injiziert wurden.

Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem bereits gut erforschten Naturstoff Resveratrol verglichen.

Es wurde also der Einfluss von JB26 auf die Kontraktionskraft der isolierten Organe, sowie der Einfluss von JB26 unter gleichzeitiger Exposition von Agonisten auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums und des Uterus festgestellt.

Die Untersuchungen zeigten, vor allem bei den Versuchen am rechten Vorhof eine sehr starke negativ chronotrope Wirkung, die viel ausgeprägter war als die von Resveratrol. Bei den Versuchen an terminalen Ilea konnte man auch einen stärker relaxierenden Effekt als bei Resveratrol feststellen.

Zu den Kombinationsversuchen mit den Agonisten kann abschließend gesagt werden, dass eine eventuell vorhandene histaminerge und anticholinerge Wirkung von JB26 nicht ausgeschlossen werden konnte.

Durch die Derivatisierung des Naturstoffes Resveratrol ist eine Substanz entstanden, die eine ähnliche Wirkung wie Resveratrol zeigt, lediglich die Wirkungsintensität am rechten Vorhof und am terminalen Ileum ist herausragend.

6. Literaturverzeichnis

Zoe J, Huang Y, Cao K, Ynag G, Yin H, Len J, Hsieh TC, Wu KM (2000) Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. Life Sci 1; 68: 153-163.

Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huan YZ (2001) Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review), Int J Mol Med 8: 3-17.

Lötsch V (2004) Wirkung von Resveratrol und eines neu synthetisierten Derivates (STPAR29A) auf verschiedene isolierte Präparate von Meerschweinchen.
Diplomarbeit Universität Wien

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

Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E (1998) Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Lett 421: 277-279.

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ (2003) Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. Clin Biochem 36: 79-87.

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

Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, Hahn U (2000) Resveratrol is Absorbed in the Small Intestine as Resveratrol Glucuronid. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 212-217.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? *Clin Biochem* 30: 91-113.

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 97, 99, 356, 526, 658.

Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1991) Resveratrol a polyphenolic compound found in grapes and wine is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl Acad Sci USA* 94: 14138.

Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, Schröder J, Noel JP (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type 3 polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 11: 1179-1197.

Yeung Fan, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye DR, Mayo MW (2004) Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT 1 deacetylase. *EMBO J* 23: 2369-2380.

Hung IM, Chen JK, Hung SS (1997) Cardioprotective effect of Resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Science* 275: 218-220.

Burger A, Wachter H (1998) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch Walter de Gruyter Berlin New York : 1064.

Silbernagl S, Lang F (1998) Taschenatlas der Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 294.

Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM (2000) Resveratrol decreases early signalling events in washed platelets but has little effect on platelet aggregation in whole blood. Blood Cells Mol Dis 26: 144-150.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kingshorn AD, Metha RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemoprotective activity of resveratrol a natural product derived from grapes. Science 275: 218-220.

Urena G (2003) Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. J of Agricultural and Food Chemistry 51: 82-89.

Chen CK, Pace-Asciak CR (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Gen Pharmacol 27: 363-366.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg Dm (1995) The red wine Phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis-implication of protection against coronary heart disease. Clin Chem Acta 235: 207-219.

Metz G (2000) Rotwein und mediterrane Küche sind ein potentes Duo. Deutsche pharmazeutische Zeitung 34: 19-23.

Adhami VM, Afaq F, Ahmad N (2001) Involvement of the retinoblastoma(PRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 579-585.

Soleas GJ, Diamandis EP and Goldberg Dm (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? *Clin Biochem* 30:91-113.

Curriculum vitae

Agnieszka Ewa Strallhofer

Persönliche Daten: geboren am 16. Jänner 1974 in Mielec, Polen.

Wohnort Wien.

Ausbildung:

1981-1989 Volksschule in Mielec, Polen

1989-1993 Allgemein bildende höhere Lehranstalt erfolgreich mit Matura abgeschlossen

1994-1996 Fachschule zur Ausbildung zum medizinisch technischen Assistenten
(medizinischer Laborant)

1997-1998 2 Semester am Vorstudienlehrgang für Deutsch (mit Sehr Gut abgeschlossen)

seit Oktober.1998 Studium der Pharmazie

8 Mai 2003 1. Diplomprüfung

Berufstätigkeit:

2001-2004 Teilzeitbeschäftigung in der Maria Schutz-Apotheke in Wien

01.03.2005-31.07.2005 beschäftigt als Tutorin (Institut für Pharmazeutische Technologie)

April.2005 – dato Teilzeitbeschäftigung in der Schutzengel-Apotheke in Wien