



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

**WIRKUNG VON ZWEI NEU SYNTHETISIERTEN DIANILIDEN  
(WHG41 UND WHG47) AUF DIE GLATTE MUSKULATUR UND  
HERZMUSKELPRÄPARATE VON MEERSCHWEINCHEN**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Magister Pharmaciae (Mag.pharm.)  
an der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Universität Wien**

**Verfasser/in:** Wilhelm Wulz  
**Matrikelnummer:** 9906661  
**Studienrichtung:** Pharmazie (A449)  
**Begutachter:** ao. Univ. - Prof. Dr. Christian Studenik

**Wien, im Oktober 2008**

*In dankbarer Erinnerung an meine liebe Mutti  
Mag. pharm. Edith Wulz*

*Bedanken möchte ich mich bei Herrn Ass. Prof. Dr. Christian Studenik für die Betreuung meiner Diplomarbeit und den motivierenden Beistand bei den letzten Prüfungen.*

*Ebenso danke ich Herrn Peter Höflich für die tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor.*

*Danke sage ich allen meinen Freunden und lieben Studienkollegen, die meine Zeit in Wien unvergesslich gemacht haben und mit mir durch „Dick und Dünn“ gegangen sind. Besonders möchte ich mich bei meinem Studienkollegen Andi bedanken, der mich auf meinem gesamten Studienweg begleitet hat.*

*Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Birgit, die mich in meinem Studium unermüdlich unterstützt hat und Freud und Leid mit mir teilte.*

*Herzlich danke ich meinem Vater Mag. pharm. Wolfram Wulz, der mir mein Studium in vollem Umfang ermöglicht hat und mich auf meinem Ausbildungsweg immer begleitet und gefördert hat.*

*Danke meiner lieben Nina*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<i>1.1. Aufbau des Herzens</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Erregungsbildung und Erregungsleitung des Herzens</i>	<i>2</i>
<i>1.3. Ionenkanäle</i>	<i>3</i>
<i>1.4. Membran- und Aktionspotentiale des Herzmuskels</i>	<i>4</i>
<i>1.5. Spannungsabhängige Calciumkanäle</i>	<i>5</i>
<i>1.6. Calciumantagonisten</i>	<i>6</i>
<i>1.7. Ziel der Diplomarbeit</i>	<i>8</i>
<b>2. MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>9</b>
<i>2.1. Versuchstiere</i>	<i>9</i>
<i>2.2. Physiologische Elektrolytnährlösung und Begasung</i>	<i>10</i>
<i>2.3. Organentnahme und Präparation</i>	<i>12</i>
2.3.1. Isolierung der Arteria pulmonalis	12
2.3.2. Isolierung des Atrium dexter	12
2.3.3. Isolierung der Musculi papillares	13
2.3.4. Isolierung des Ileum terminalis	13
2.3.5. Isolierung der Aorta	14
<i>2.4. Versuchsanordnung und Apparaturen</i>	<i>16</i>
2.4.1. Apparatur 1	16
2.4.2. Apparatur 2	19

2.4.3. Kraftwandler	22
2.4.4. Gasversorgung	23
<b>2.5. Durchführung der Versuche</b>	<b>24</b>
2.5.1. Arteria pulmonalis	24
2.5.2. Aorta	25
2.5.3. Ileum terminalis	26
2.5.4. Atrium dexter	27
2.5.5. Musculi papillares	28
<b>2.6. Testsubstanzen</b>	<b>29</b>
<b>2.7. Strukturen der Testsubstanzen und Diltiazem</b>	<b>30</b>
<b>2.8. Auswertung</b>	<b>32</b>
2.8.1. Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis	32
2.8.2. Atrium dexter	32
2.8.3. Musculi papillares	33
2.8.4. EDV Erfassung	33
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Wirkung von WHG41 auf isolierte Organe von Meerschweinchen</b>	<b>34</b>
3.1.1. Auswertung Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis	34
3.1.2. Wirkung von WHG41 auf Arteria pulmonalis	34
3.1.3. Wirkung von WHG41 auf die Aorta	38
3.1.4. Wirkung von WHG41 auf Ileum terminalis	41
3.1.5. Auswertung der Musculi papillares	44
3.1.6. Wirkung von WHG41 auf Musculi papillares	44
3.1.7. Auswertung von Atrium dexter	48
3.1.8. Wirkung von WHG41 auf Atrium dexter	48
<b>3.2. Wirkung von WHG47 auf isolierte Organe von Meerschweinchen</b>	<b>52</b>
3.2.1. Wirkung von WHG47 auf Arteria pulmonalis	52
3.2.2. Wirkung von WHG47 auf die Aorta	55

3.2.3. Wirkung von WHG47 auf Ileum terminalis	58
3.2.4. Auswertung der Musculi papillares	61
3.2.5. Wirkung von WHG47 auf Musculi papillares	61
3.2.6. Auswertung von Atrium dexter	64
3.2.7. Wirkung von WHG47 auf Atrium dexter	64
<b>3.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf isolierte Organe</b>	<b>67</b>
3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis	68
3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta	69
3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft von Ileum terminalis	70
3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Musculi papillares	71
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>72</b>
<i>4.1. Strukturen WHG41, WHG47 und Diltiazem</i>	<i>72</i>
<i>4.2. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Arteria pulmonalis Präparaten</i>	<i>74</i>
<i>4.3. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Aorta Präparaten</i>	<i>74</i>
<i>4.4. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Ileum terminalis Präparaten</i>	<i>75</i>
<i>4.5. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Musculi papillares Präparaten</i>	<i>75</i>
<i>4.6. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Atrium dexter Präparaten</i>	<i>76</i>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>78</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>7. CURRICULUM VITAE</b>	<b>81</b>

# 1. EINLEITUNG

## *1.1. Aufbau des Herzens*

Funktionell betrachtet kann man das Herz in zwei Teile gliedern, zum einen in das rechte Herz, zum anderen in das linke Herz. Jeder Teil enthält einen kleinen Hohlraum, der dem Vorhof (Atrium) entspricht und einen weiteren Hohlraum, der als Kammer (Ventrikel) bezeichnet wird. Vorhöfe und Kammern unterscheiden sich in ihrer Größe und Muskelmasse, wodurch auch funktionelle Unterschiede begründet sind.

Die kleineren Vorhöfe sind durch ein Septum getrennt (Septum artorium). In den rechten Vorhof münden die beiden großen Hohlvenen (Vena cava superior und Vena cava inferior) während in den linken Vorhof die Lungenvenen ragen.

Die Vorhöfe sind von den Kammern durch den von außen sichtbaren sulcus coronarius getrennt, welcher als angelegte Ebene die Herzbasis markiert. Da an der Herzbasis sämtliche Herzklappen sitzen wird diese auch als Ventilebene bezeichnet. Die Kammern sind durch die Kammerscheidewand (Septum interventriculare) voneinander räumlich getrennt und ihre Innenwände sind mit Muskelbalken (Trabekel) überspannt, von welchen papillöse Muskelpartien in das Herzinnere ragen. Das sind die sogenannten Papillarmuskeln.

Das gesamte Herz ist vom Herzbeutel (Perikard) umgeben, der innenliegende Teil des Perikards wird Epikard genannt. Zwischen dem Perikard und dem Epikard ist ein mit Flüssigkeit (Liquor pericardii) gefüllter Spalt, welcher ein Gleiten zwischen den Herzbeutelsschichten möglich macht und Reibung verhindert.

Das Herz erfüllt die Pumpfunktion des Blutes durch rhythmische Kontraktionsphasen (Systole) und Erschlaffungsphasen (Diastole) (Mutschler et al. 2001).

## ***1.2. Erregungsbildung und Erregungsleitung des Herzens***

Das Herz ist zur immanenten Erregungsbildung und Erregungsleitung befähigt, welche als Autonomie (Autorhythmie) des Herzens bezeichnet wird und in weiterer Folge zu rhythmischen Kontraktionen führt (Herzaktion). Zwei Arten von Herzmuskelzellen (Muskelfasern) sind dafür verantwortlich, solche die einen Impuls erzeugen und weiterleiten sowie jene Zellen, die einen Impuls mit Kontraktion beantworten.

Die Erregungen werden in den Zellen des Sinusknotens (primärer Schrittmacher) gebildet, welcher an der Einmündung der Vena cava superior im rechten Vorhof lokalisiert ist.

Die Weiterleitung der Erregung geschieht über die Muskulatur des Vorhofes hin zum Atrio – Ventrikular-Knoten (AV-Knoten), der an der Grenze zwischen Vorhof und Kammer liegt und als sekundärer Schrittmacher fungieren kann. Von hier geht die Erregungsübertragung weiter über das His'sche Bündel und die Kammerchen (Tawara-Schenkel) und gelangt schließlich über ein verzweigtes Leitungssystem (Purkinje-Fasern) in die Kammermuskulatur.

Ebenso können die Purkinje- Fasern eine Schrittmacherfunktion übernehmen, sollten primärer und sekundärer Schrittmacher ausfallen (Silbernagel et al.1988).



### ***1.3. Ionenkanäle***

Ionenkanäle sind hochmolekulare Poren in Zellmembranen (Hille 1984).

Der Transport von Ionen bedeutet eine Verschiebung von Ladungen und damit die Entstehung einer elektrischen Potentialdifferenz. Wenn Ionen, wie zum Beispiel Kalium ( $K^+$ ) aus der Zelle diffundieren, entsteht dadurch ein Diffusionspotential, bei welchem das Äußere der Zelle positiv und das Innere der Zelle negativ geladen ist.

Das entstehende Potential ist von verschiedenen Ionen wie Natrium-, Calcium- und Kaliumionen abhängig, die auf beiden Seiten der Membran in verschiedenen Konzentrationen vorliegen und durch die Membranpermeabilität für jedes dieser Ionen variiert (Silbernagel et al. 1988).

Um Ionen gegen ein Konzentrationsgefälle bewegen zu können gibt es einen besonderen aktiven Transport, die Natrium-Kalium-Pumpe. Die Pumpe kann zwischen zwei Konformationszuständen wechseln und in einem Pumpzyklus jeweils drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen aus der Umgebung hinein pumpen. Somit wird insgesamt pro Pumpvorgang eine positive Ladung aus der Zelle geschafft. Dieser Vorgang führt zu einer Speicherung von Energie in Form des Membranpotentials.

Adeninriphosphat (ATP) greift phosphorylierend in die Konformationsänderung der Pumpe ein. Daher wird diese Ionenpumpe auch als Natrium-Kalium-ATPase bezeichnet (Campbell 2000).

Der Umfang des Ionenflusses ist abhängig davon, wie viele Kanäle geöffnet sind, wie lange sie offen sind und wie die Leitfähigkeit für ein Ion ist.

Der Mechanismus der Kanalöffnung beinhaltet zwei Typen. Jene, die durch Bindung an Liganden geöffnet oder geschlossen werden (Liganden gesteuerte Ionenkanäle) und Kanäle, die sich auf Grund von Ladungsverteilungen öffnen oder schließen lassen (spannungsabhängige Ionenkanäle) (Mutschler et al. 2001).

#### ***1.4. Membran- und Aktionspotentiale des Herzmuskels***

Ein Aktionspotential ist der Verlauf einer Änderung des Membranpotentials oder von Ionenpermeabilitäten. Dieses tritt auf nach Erreichung eines Schwellenpotentials an den Schrittmacherzellen, Purkinjefasern und Arbeitsmyokardfasern auf (Forth et al. 1992).

Das Ruhemembranpotential einer einzelnen Herzmuskelfaser des Säugers beträgt ungefähr -80 mV. Ein Reiz ist der Auslöser für ein Aktionspotential, welcher für den Beginn einer Kontraktion maßgeblich ist. Darauf folgt eine schnelle und überschießende Depolarisation, wie auch bei Nerven und Skelettmuskeln. Die folgende Repolarisation verläuft hingegen langsam. Im Herz eines Säugers dauert die Depolarisation etwa 2 ms an, die Repolarisation ca. 200 ms. Daraus folgt, dass die Repolarisation erst beendet ist, nachdem schon die Hälfte der Kontraktion abgelaufen ist.

Die Repolarisation kann in 3 Phasen eingeteilt werden. Sie beginnt nach dem Spitzenpotential mit hoher Geschwindigkeit, wird langsamer unter einer Plateaubildung in der zweiten Phase und stellt zum Schluss das Ruhemembranpotential wieder her.

Änderungen der extrazellulären Kalium-Konzentration beeinflussen das Ruhemembranpotential, während eine Änderung der extrazellulären Natrium-Konzentration die Größe eines Aktionspotentials beeinflussen kann.

Die Depolarisation und der erste schnelle Abschnitt der Repolarisation dürften durch eine Permeabilitätsänderung für Natrium Ionen verantwortlich sein. Die Plateauphase der Repolarisation ist durch eine langsam beginnende, schwächere und länger andauernde Erhöhung der Permeabilität für Calcium gekennzeichnet.

Ein Kalium Efflux am Ende der Repolarisation wird durch erhöhte Kaliumpermeabilität ermöglicht (Ganong 1979).

### *1.5. Spannungsabhängige Calciumkanäle*

Durch Änderung des Membranpotentials werden Ionenströme in Bewegung gesetzt. Eine Depolarisation stellt den Reiz für spannungsabhängige Calciumkanäle dar und veranlasst Calciumionen in die Zelle einzuströmen (Catterall 2000).

Calciumkanäle sind hochselektiv und dennoch im Stande, Ionen in schnellen Stößen durchzuschleusen (Hess et al. 1986).

Bei elektrophysiologischen Studien wurde beobachtet, dass es verschiedene Arten von Calciumströmen gibt. Diese werden in L-Typ, N-Typ, P-Typ, Q-Typ, R-Typ und T-Typ Kanäle eingeteilt (Catterall 2000).

Diese Unterscheidung ist von funktionaler Bedeutung. N – Typ Calciumkanäle sind nach Erreichung eines Aktionspotentials für den Calciumeinstrom verantwortlich, der zu einer Neurotransmitterfreisetzung führt, jedoch nicht Angriffspunkt für Calciumkanalblocker (Mutschler et al. 2001).

Calciumkanäle sind große heteromere Proteine mit Subtypen. Der spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal besteht aus den fünf Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (Dolphin 2006).

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist der zentrale Komplex und kommt in zwei Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht vor, 175 kDa und 212 kDa. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit besteht weiters aus vier sich wiederholenden Teilen, wovon jeder Teil nochmals in fünf hydrophobe Segmente S1, S2, S3, S5 und S6 sowie ein positiv geladenes Segment S4 unterteilt ist (Martonosi et al. 2003).

So sind die L-Typ Kanäle Ziel der therapeutisch eingesetzten Calciumkanalblocker. Calciumantagonisten hemmen mit Hilfe der L-Typ Kanäle den transmembranären Calciumeinstrom.

Alle Calciumkanalblocker binden an die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Kanals, jedoch in Abhängigkeit von der Struktur an den unterschiedlichen Stellen (Mutschler et al. 2001).

## ***1.6. Calciumantagonisten***

Die Entdeckung und das Prinzip des "Calciumantagonismus" für Substanzen die am Koronarsystem angreifen geht auf das Jahr 1964 zurück. A. Fleckenstein berichtete von zwei Verbindungen Verapamil und Prenylamin, die eine Wirkung zeigten, welche einem Calciumentzug entsprach. Verapamil hemmte die Calcium abhängige Kontraktilität der Herzmuskeln ohne gleichzeitige Beeinflussung der Natriumkanäle, was den Unterschied zu  $\beta$ -Sympatholytikern deutlich macht. 1969 wurde der Begriff „Calciumantagonisten“ als Gruppenname für solche Arzneimittel eingeführt. Auf der Suche nach Substanzen mit ähnlichem Wirkprofil wurden unter anderen D 600, Nifedipin, Niludipin, Nimodipin, Perhexilin, Fendilin sowie Terodilin entdeckt. 1975 steuerten Pharmakologen aus Japan die Verbindung Diltiazem den Calciumantagonisten bei (A. Fleckenstein 1983).

Calciumantagonisten (Calciumkanalblocker) stellen chemisch keine einheitliche Substanzgruppe dar. Bei den reinen Calciumantagonisten unterscheidet man auf Grund des unterschiedlichen Angriffs am Calciumkanal drei Verbindungstypen:

1. 1,4 – Dihydropyridin-Typ (Nifedipin-Typ)
2. Phenylalkylamin-Typ (Verapamil-Typ)
3. Benzo-1,5 thiazepin-Typ (Diltiazem-Typ)

Pharmakodynamisch gibt es jedoch Gemeinsamkeiten die daraus resultieren, dass die intrazelluläre Konzentration an freien Calciumionen abnimmt. Daraus ergeben sich zum einen eine Verringerung der Aktivität der Calcium abhängigen Myosin-ATPase am Herzen, wodurch der Phosphatumsatz und der Sauerstoffbedarf abnimmt, und zum anderen führt eine Erniedrigung des Gefäßmuskeltonus der glatten Muskulatur zu einer Vasodilatation. Somit führen Calciumantagonisten zu einer direkten Verringerung der Herzarbeit, da die elektromechanische Kopplung gehemmt und die Kontraktilität erniedrigt werden. Eine indirekte Entlastung des Herzens erfolgt durch Senkung der Vor- und Nachlast. Koronarspasmen an den größeren Arterien können aufgehoben werden.

Die Stoffgruppen unterscheiden zwischen der Beeinflussung der Erregungsbildung im Sinusknoten und der Erregungsleitung im AV-Knoten. Verapamil und Diltiazem wirken am

Sinusknoten negativ chronotrop und am AV-Knoten negativ dromotrop. Substanzen des Nifedipin-Typs wirken in therapeutischen Dosen vasodilatierend und durch Sympathikusaktivierung reflektorisch herzfrequenzsteigernd. Durch die Aktivierung des Sympathicus wird der negativ inotrope Effekt aufgehoben (Mutschler et al. 2001).

Die Indikation für Substanzen aller drei Typen sind koronare Herzkrankheit (Prophylaxe und Therapie) sowie spastische Angina-Formen inklusive Anfall und Hypertonie (Mutschler et al .2001).

### ***1.7. Ziel der Diplomarbeit***

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der inotropen und chronotropen Wirkung an Herzmuskelpräparaten beziehungsweise der relaxierenden Wirkung an der glatten Muskulatur. Da die Substanzen Teilstrukturen des Diltiazems aufwiesen, wurden die Wirkungen teilweise mit Diltiazem verglichen.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden die beiden Dianilide WHG41 und WHG47, welche am Institut für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert wurden, pharmakologisch erforscht.

Der Einfluss der Substanzen auf den Herzmuskel wurde an isolierten Vorhöfen und isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchen geprüft.

Der Einfluss der Substanzen auf glatte Muskulatur wurde mit Hilfe einer isolierter Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis geprüft.

Als Referenzsubstanz wurde Diltiazem herangezogen, da es strukturelle Ähnlichkeiten mit den Testsubstanzen besitzt.

## **2. MATERIAL UND METHODIK**

### ***2.1. Versuchstiere***

Die praktische Arbeit im Versuchslabor wurde an isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus dem Institut für Labortierkunde und Laborgenetik in Himberg (Himberg, Österreich, Stamm: DH) und aus dem Department für Toxikologie und Labortierzucht in Dobra Voda (Universität Bratislava, Slowakei, Stamm: TRIK).

Verwendet wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere, deren Körpergewicht im Durchschnitt 200-500g betrug und die ein Alter von nur wenigen Wochen aufwiesen.

Am Tag vor den Versuchen wurde jeweils ein Meerschwein von den anderen Versuchstieren räumlich isoliert und in Futterkarenz gestellt. Am Versuchstag wurde das Tier mit einem präzisen Schlag auf das Genick getötet, um anschließend sofort die benötigten Organe entnehmen zu können. Das Meerschweinchen wurde ventral median aufgeschnitten um als erstes das Herz, danach einen Teil des Dünndarms und abschließend einen Teil der Aorta zu entnehmen.

Alle Organe wurden in vorbereitete Elektrolytlösung unter Begasung (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> = Carbogen) zur Aufbewahrung gelegt.

## 2.2. Physiologische Elektrolytlösung und Begasung

Bei der für die Versuche verwendeten Elektrolytlösung handelt es sich um eine Tyrode-Lösung. Diese ist nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode benannt und wurde später zur Krebs Henseleit-Lösung modifiziert.

Zur Begasung der Lösung wurde Carbogen, bestehend aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>, verwendet. Die beiden Komponenten Elektrolytlösung und Carbogen wurden bei allen Versuchsanordnungen verwendet, wobei die Elektrolytlösung täglich frisch nach der in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung aufbereitet wurde.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Elektrolytlösung**

<i>Zusammensetzung der Elektrolytlösung</i>	<i>mmol/l</i>
<i>Natriumchlorid</i>	<i>114,90</i>
<i>Natriumhydrogencarbonat</i>	<i>24,90</i>
<i>Kaliumchlorid</i>	<i>4,7</i>
<i>Calciumchlorid</i>	<i>3,20</i>
<i>Magnesiumsulfat</i>	<i>1,18</i>
<i>Kaliumhydrogenphosphat</i>	<i>1,18</i>
<i>Natriumhydrogencarbonat</i>	<i>24,90</i>
<i>Glucose</i>	<i>10,00</i>

Nach Einwaage der einzelnen Stoffe in einen Rundkolben (mit Ausnahme des Calciumchlorids), wurde dieser fast zur Gänze mit Aqua purificata befüllt. Über ein Schlauchsystem wurde die Lösung im Kolben 20 min begast, um abschließend das Calciumchlorid als Lösung langsam bei zu tropfen. Es hat sich bewährt, während des zu Tropfens weiter zu begasen, um einem etwaigen Ausfall des Calciumsalzes entgegenzuwirken.



Nach der Begasung wurde der Kolben bis zur Volumsmarke mit Aqua purificata gefüllt und durch Schwenken homogenisiert. (Eine gut hergestellte Elektrolytlösung darf keinerlei Trübung zeigen.)

Die gefertigte Elektrolytlösung wurde sowohl zum Spülen der Organbäder, für die Durchführung der Versuche, als auch zur kurzzeitigen Aufbewahrung und für den Transport der einzelnen Organe verwendet.

## ***2.3. Organentnahme und Präparation***

### ***2.3.1. Isolierung der Arteria pulmonalis***

Das tote Versuchstier wurde am Rücken liegend ventral median mit einer Schere eröffnet, um zuerst im Thoraxbereich das Herz zu entnehmen. Das so entnommene Herz wurde sofort in Elektrolytlösung eingelegt, begast und unter leichtem Druck mit den Fingern massiert, um das sich darin befindliche Blut heraus zu spülen.

In direktem Anschluss wurde mit der Präparation des Organs in einer speziell vorbereiteten Petrischale, welche mit einem Korkboden und einem Plastikschauch als Randbegrenzung ausgekleidet war, begonnen. In einer Elektrolytlösung unter ständiger Begasung wurde das Herz unter einem Mikroskop präpariert. Zum den verwendeten Werkzeugen gehörten Pinzetten, Federgriff-Mikroscheren und Präpariernadeln zur Befestigung der Organe in der Petrischale.

Der zu entnehmende Teil der Arteria pulmonalis wurde so nah wie möglich am Truncus pulmonalis des Herzens abgetrennt und in mehreren Arbeitsschritten von Fett- und Muskelgewebe gesäubert. Die so erhaltenen Arterienstücke wurden zur weiteren Verwendung in Bechergläsern mit Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

### ***2.3.2 Isolierung des Atrium dexter***

Das entnommene Herz musste zuerst von Fett- und Muskelgewebe gesäubert werden, um anschließend den Atrium dexter zu isolieren. Das Perikard wurde vorsichtig geöffnet, um den Sinusknoten nicht zu beeinträchtigen und etwaige Überdehnungen des Herzgewebes zu vermeiden. Anschließend wurde das Atrium dexter entnommen.

In einer vorbereiteten Petrischale mit Elektrolytlösung wurde unter Begasung an der unteren Spitze des Atriums eine Schlinge mit Bindfaden geknüpft, ebenso am oberen Ende wo

Fettgewebe zur Befestigung nicht entfernt wurde. Weiters wurden an den Schlingen kleine Haken aus Silberdraht fixiert um das Organ später im Organbad befestigen zu können.

Der so präparierte Atrium wurde bis zum Versuchsbeginn in Elektrolytlösung unter Begasung gelagert.

### ***2.3.3. Isolierung der Musculi papillares***

Das entnommene Herz musste zuerst von Fett- und Muskelgewebe gesäubert werden um anschließend den Papillarmuskel isolieren zu können. Verwendet wurden nur Papillarmuskeln mit einem minimalen Durchmesser von 8,7 Millimetern (Koch-Weser1963).

Achtsam wurde mit einer Federgriff-Mikroschere vom rechten Ventrikel bei der Arteria pulmonalis, entlang des Septums bis hinunter zur Herzspitze ein Schnitt gemacht. Das Herz wurde vorsichtig mit Präpariernadeln auseinandergespreizt und unter dem Mikroskop nach Papillarmuskeln gesucht. An den Papillarmuskeln wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe von Pinzetten eine kleine Schlinge befestigt, um einen feinen Silberhaken anzuknüpfen. Danach konnte der, mit Hilfe einer Pinzette gehaltene Muskel, mit einer Federgriff-Mikroschere an den Sehnen heraustrennt werden. Das erhaltene Stück Papillarmuskel hatte an einer Seite einen Haken befestigt während die andere Seite frei stand.

Um einen guten Erfolg bei den anschließenden Versuchen zu erzielen, wurde ständig Gas zugeführt und in Elektrolytlösung gearbeitet.

### ***2.3.4. Isolierung des Ileum terminalis***

Das tote Versuchstier wurde am Rücken liegend ventral median mit einer Schere eröffnet um nacheinander das Herz, einen Teil des Ileums und ein Stück Aorta zu entnehmen.

Der Ileum terminalis wurde vorsichtig mit den Händen herausgezogen und teilweise mit einer Schere vom Mesenterium befreit, ohne diesen zu verletzen. Am oberen Ende des Darms wurde eine Schlinge mit rotem Bindfaden angeknüpft um später klar unterscheiden zu können, wo die obere und untere Seite des Organs ist. Am unteren Ende, nahe dem Caecum vor dem Bereich des Dickdarms, wurde der Darm am oberen Ende über der Schlinge mit einem Scherenschnitt abgetrennt. Der so erhaltene Teil des Ileums wurde zur weiteren Verwendung in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

Die Präparation des Organs erfolgte wieder unter dem Mikroskop, in einer Petrischale mit Elektrolytlösung unter Begasung. Vom Ileum terminalis wurden ca. 1cm lange Stücke mit einer Federgriff-Mikroschere abgetrennt. Der obere Teil des Darmes wurde mit einer Präpariernadel fixiert, welche die Unterlippe des Lumens hielt. Zuerst musste der Darm vorsichtig gereinigt werden. Das wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und einer Elektrolytlösung zum Spülen vorgenommen.

Wichtig dabei war, die glatte Muskulatur des Dünndarms nicht zu verletzen. Weder durch zu starke Dehnung noch durch unachtsame Reinigung mit der Pasteur-Pipette.

Nach der Reinigung konnte eine Schlinge mit Bindfaden angeknüpft werden, welche lediglich die Hälfte des Lumens einschnürte um einen Ein- und Ausgang für die spätere Beschichtung mit der Testsubstanz zu erhalten. Am oberen Ende wurde zur Markierung roter Bindfaden verwendet, am unteren Ende ein schwarzer Bindfaden. Sobald die Schlingen richtig saßen wurden Silberhaken eingeknüpft, die als spätere Halterung in den Organbädern dienten.

### ***2.3.5. Isolierung der Aorta***

Nachdem das Herz und ein Teil des Ileums terminalis isoliert worden war, bestand der nächste Arbeitsschritt darin, einen Teil der Aorta, welche am Rückgrat des Versuchstiers lokalisiert war, zu extrahieren. Um einen ungehinderten Zugriff zum Rückgrat zu erhalten, mussten Thorax und Bauchraum von anderen Organen freigemacht werden. Bei leichter Überstreckung der Wirbelsäule, die ein Hohlkreuz beim Versuchstier erwirkte, wurde die Aorta am cranialen Ende mit einer Pinzette fixiert und mit einer Feder-Mikroschere caudal abgelöst. Mit leicht distalem

Zug der Pinzette wurden die, an der Aorta lateral befindlichen Gewebe, mit der Schere abgetrennt. Immer mit Bedacht Überdehnungen und Verletzungen der Aorta zu vermeiden.

Das extrahierte Organ wurde anschließend in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt. Die Präparation der Aorta erfolgte abermals in einer Petrischale unter dem Mikroskop.

Das um die Aorta befindliche Fettgewebe sowie gestocktes Blut im Lumen wurden mittels Pinzette und Federgriff-Mikroschere wegpräpariert. Eine Präpariernadel half bei der Befestigung am Korkboden der Petrischale. Die gesäuberte Aorta wurde danach auf Löcher und Beschädigungen untersucht, anschließend mit der Schere in Millimeter kleine Ringe geschnitten und diese bis zur weiteren Verwendung in Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt. Nur unversehrte Aorta-Ringe waren für den Versuch brauchbar.

## **2.4. Versuchsanordnung und Apparaturen**

Für die praktische Arbeit an isolierten Organen der Versuchstiere wurden zwei unterschiedliche Apparaturen verwendet, die jedoch dem gleichen Funktionsprinzip entsprachen. Bei beiden Apparaturen handelte es sich um Organbäder mit Aufhängevorrichtungen für Organe unterschiedlichen Typs.

Eine Apparatur wurde für die Papillarmuskeltestreihe verwendet (in weiterer Folge als Apparatur 1 bezeichnet), die andere Apparatur für Arteria pulmonalis-, Aorta-, Ileum- und Atriumtests benutzt. Beide Apparaturen eigneten sich zur Erzeugung physiologischer Bedingungen, was für die Tests unerlässlich war.

Es handelte sich jeweils um Glasbehältnisse, welche mit  $35 \pm 1 \text{ C}^\circ$  (für Musculi papillares) beziehungsweise  $37 \pm 1 \text{ C}^\circ$  (für Arteria pulmonalis, Aorta, Ileum und Atrium) temperiertem Wasser umspült wurden. Im Glasbehältnis befand sich somit temperierte Elektrolytlösung. Unter ständiger Begasung wurden die Versuchsorgane im Gerät eingespannt und über einen angeschlossenen Schreiber Daten aufgezeichnet.

### **2.4.1. Apparatur 1**

Apparatur 1 wurde für die Testreihe der Papillarmuskeln verwendet und entsprach einem Organbad aus Glas (Organkammer), welches in ein mit Aqua purificata gefülltes Becken ragte. Das Organbad wurde über einen Kunststoffschlauch, der am Ende mit einer Fritte versehen war, mit Carbogen versorgt. Das diente der Sauerstoffversorgung des Organs. Die Begasung erfolgte vom unteren Ende des Organbades aus.

Bei dem Becken, welches das Organbad umgab, handelte es sich um einen Badthermostat „HAAKE“ von Thermo Fisher Scientific. Dieser temperierte das Wasserbad über einer Heizspirale.

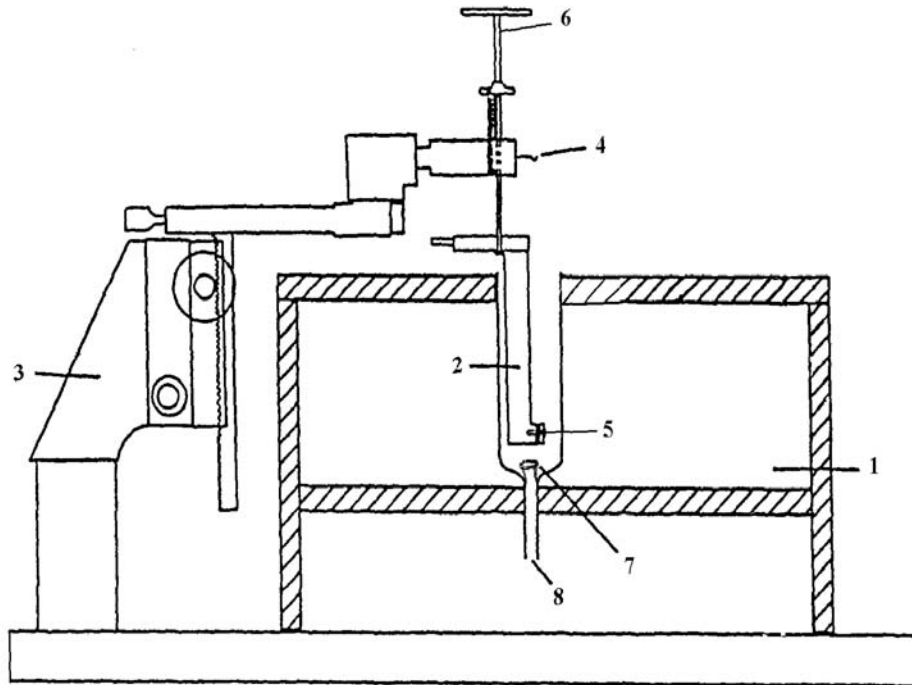
Das transparente mit Aqua purificata gefüllte Becken bestand aus Polymethylmethacrylat (PMMA) und ermöglichte es, die Organe während des Versuchs zu betrachten beziehungsweise Fehlerquellen, wie beispielsweise eine getrübe Elektrolytlösung, unzureichende Carbogenversorgung oder das Ausreißen des befestigten Organs rechtzeitig zu erkennen.

In die Organkammer ragte eine Aufhängevorrichtung mit Organhalterung und einer Elektrode am unteren Ende. Die Aufhängevorrichtung war an einem Stativ befestigt, das mit Grob- und Feintrieb versehen war. Dieses diente zum Absenken des Organs beziehungsweise um die Vorspannung zu erreichen. An der Aufhängevorrichtung war ein Silberdraht befestigt, welcher den mit einem Silberhaken versehenen Papillarmuskel hielt und mit dem Stativ verbunden war. Das freie Ende des Papillarmuskel wurde über eine Kunststoff-Schraubklemme an der Platinkathode befestigt. Mit dem Feintrieb an der Aufhängevorrichtung wurde die Vorspannung des Muskels eingestellt.

Der Muskel wurde über Elektroden der Apparatur elektrisch gereizt. Ein Kraftwandler, der an einen „Transbridge™ Verstärker“ (4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) angeschlossen war, wandelte die Kontraktionsimpulse in Stromimpulse um, welche mit einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) aufgezeichnet wurden. Kontraktionsfrequenz und Kontraktionsamplituden waren dadurch messbar.

Besonderes Augenmerk musste auf einen stabilen und erschütterungsfreien Untergrund gelegt werden, da die kleinste Erschütterung zu einem verfälschten Ergebnis führen konnte. Ebenso könnte ein in unmittelbarer Nähe des Verstärkers befindliches Mobiltelefon und die von diesem ausgehende Strahlung bei ein- oder abgehenden Anrufen eine Verfälschung der Aufzeichnungen zur Folge haben (Elektromagnetische Strahlung).

Die Reinigung des Organbades erfolgte durch Absaugen der Elektrolytlösung mit Hilfe einer Spritze sowie mehrmaliges Durchspülen mit Aqua purificata. Hartnäckige Ablagerungen wurden mit einer Bürste gereinigt.



**Abbildung 1: Apparatur 1**

1 Wasserbad

2 Organhalterung

3 Stativ mit Stativschlitten

4 Aufhängevorrichtung

5 Elektrode

6 Feintrieb

7 Muskelkammer

8 Gaszufuhr / Fritte



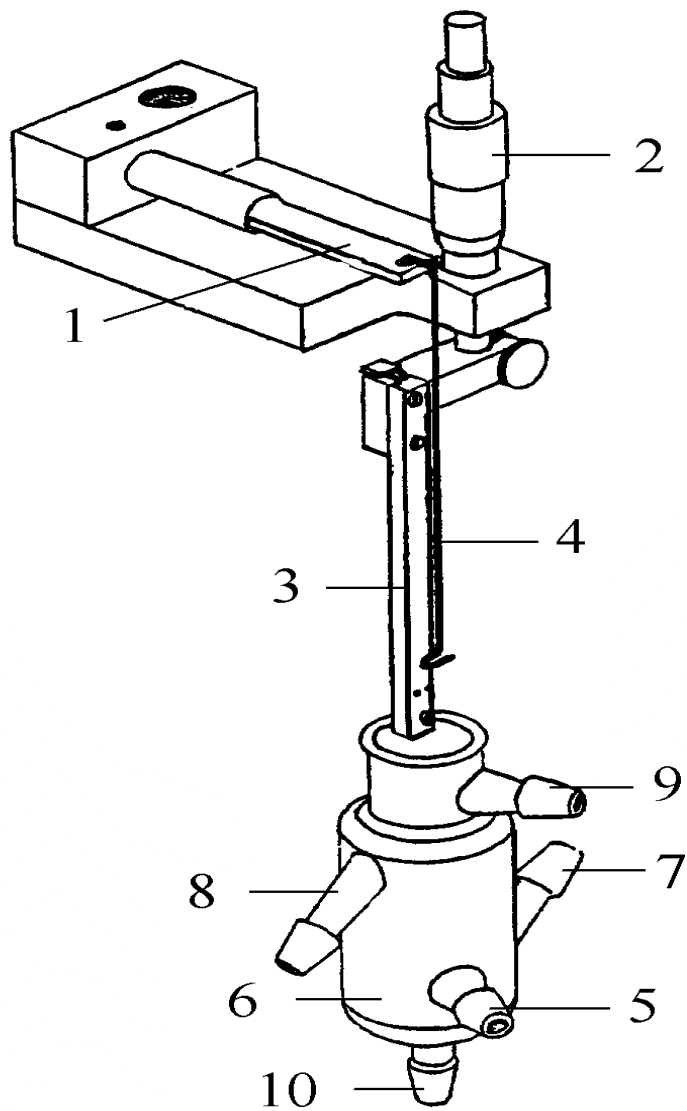
### **2.4.2. Apparatur 2**

Apparatur 2 funktionierte nach demselben Prinzip wie Apparatur 1.

Mit dieser Apparatur wurden die Versuche mit den Organen Arteria pulmonalis, Aorta, Ileum und Atrium durchgeführt. Der Unterschied bei diesem Gerät zur Apparatur 1 lag in der Beschaffenheit des Organbades, das aus einer doppelwandigen Glas-Organ kammer bestand in der das temperierte Aqua purificata zirkulierte. Das Organbad war mit einem Wasserzufluss und Abfluss in der Kammer zwischen der Doppelglaswand versehen. Weiters mit einem Zu- und Ablauf für die Elektrolytlösung und einer eingebauten Fritte für die Gaszufuhr. Alle Zu- und Ausgänge mussten von Ablagerungen sauber gehalten werden um einen reibungslosen Versuchsablauf zu gewährleisten.

Die Organhalterung zur Befestigung an der Unterseite des Organs ragte in das Organbad. Für die Befestigung des oberen Organteils wurde Silberdraht verwendet.

Der Kraftwandler führte über einen „Transbridge™“ Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) zu einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands), welcher die Messungen auf Millimeterpapier aufzeichnete.



**Abbildung 2: Apparatur 2**

1 Kraftwandler

2 Mikrometer

3 Organhalterung

4 Aufhängevorrichtung

5 Gaszufuhr

6 Organbad

7 Zulauf Wasserbad

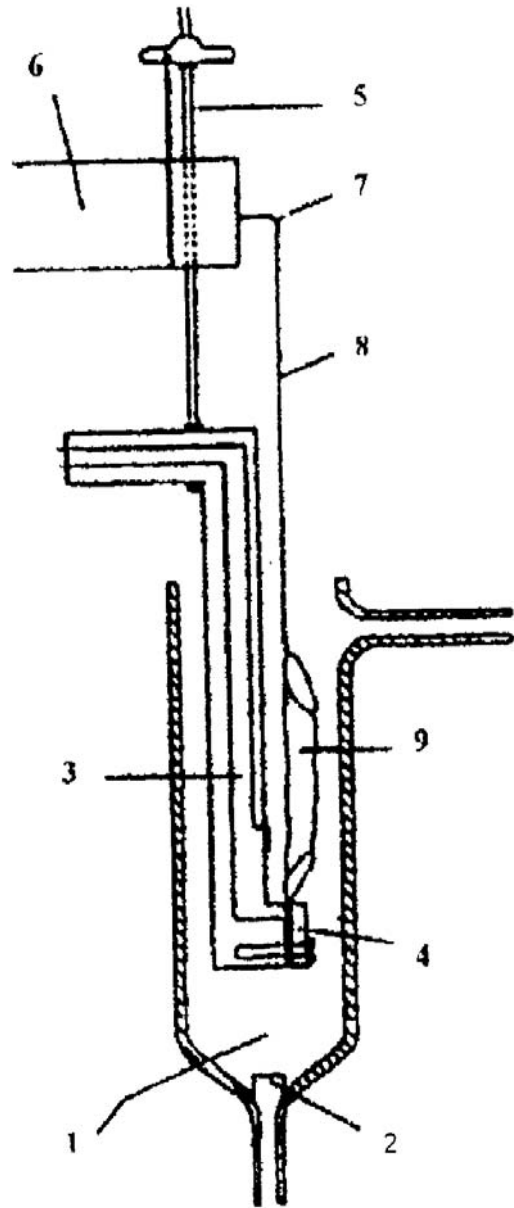
8 Ablauf Wasserbad

9 Zulauf Elektrolytlösung

10 Ablauf Elektrolytlösung

**Abbildung 3: Eingespanntes Präparat in der Organkammer**

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

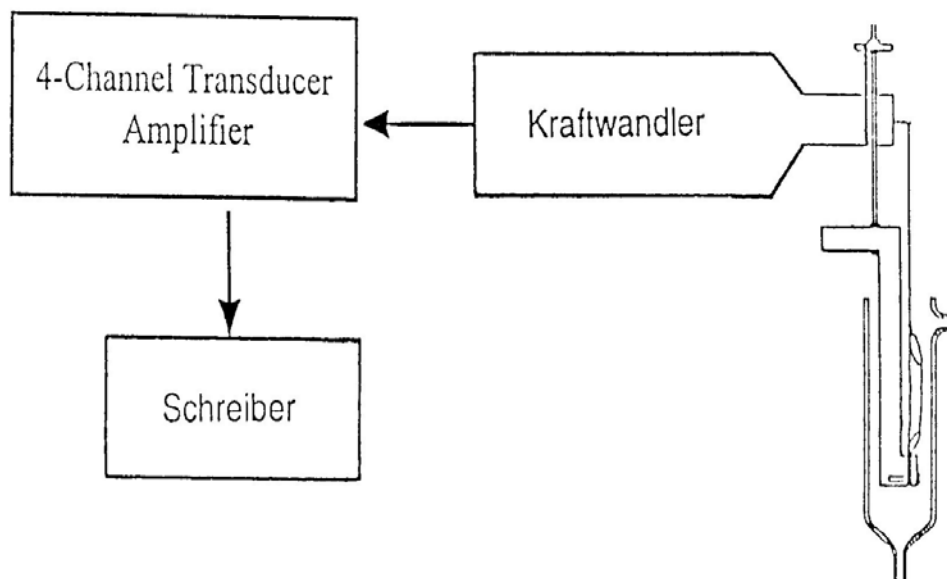


### 2.4.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler sorgte mit Hilfe eines Transducers samt Verstärker (AE875 Aksjeselkapet Mikro-Elektronik, Horten, Norwegen) für die Umwandlung eines mechanischen Reizes in eine elektrische Kennzahl.

So wurde die Kontraktionsänderung des laufenden Versuchs mit einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

*Abbildung 4: Kraftwandler*



#### **2.4.4. Gasversorgung**

Die Gasversorgung der Organe stellte eine signifikante Schlüsselrolle bei allen Versuchen dar. Nur durch Sicherstellung dieser konnte ein physiologischer pH-Wert (7,4) eingehalten werden, Organe mit ausreichendem Sauerstoff versorgt und die eingebrachte Testsubstanz homogenisiert werden.

Da eine konstante Gaszufuhr mit gleichbleibender Güte und Intensität unverzichtbar war wurde auf eine zentrale Gasversorgung auf der Universität zurückgegriffen. Von einer Gasleitstelle wurde Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) über Ventile im Versuchslabor verfügbar gemacht. Von den Gasauslassventilen führten elastische Kunststoffschläuche, mit Fritten zur Feinverteilung des Gases an den Enden, direkt zu den Versuchsanordnungen. Im Organbad wurde die Elektrolytlösung gleichmäßig mit Carbogen durchperlt.

Zur Feinregelung des quantitativen Gasausstoßes waren an den Schläuchen bekneifende verstellbare Stellrädchen montiert.

Auf Grund der Wichtigkeit der konstanten Carbogenversorgung wurde bei Apparatur 1 ein transparentes Wasserbad gewählt, um die Gaszufuhr ins Organbad jederzeit kontrollieren zu können.

## **2.5. Durchführung der Versuche**

Die Versuche wurden jeden Tag mit gleichbleibender Methodik und unter identen Bedingungen durchgeführt (Reiter 1967). Täglich wurde eine frische Elektrolytlösung hergestellt und je ein Versuchstier zur Organentnahme verwendet. Ebenso die Präparation der einzelnen Organe und Organteile erfolgte jeweils vor Beginn der Versuche auf die gleich Art und Weise.

Im Versuchslabor waren acht Organbäder, zwei Exemplare von Apparatur 1 sowie sechs Modelle von Apparatur 2 als parallele Arbeitsbereiche bereitgestellt.

### **2.5.1. Arteria pulmonalis**

Nach der Herzentnahme von dem Versuchstier wurde der benötigte Teil der Arteria pulmonalis so nah wie möglich vom Truncus pulmonalis des Herzens abgetrennt und in mehreren Arbeitsschritten von Fett- und Muskelgewebe gesäubert. Der erhaltene Arterienring wurde in Elektrolytlösung unter Begasung mit Carbogen in Apparatur 2 eingespannt.

Zuerst wurde das Organbad zur Reinigung mindestens zweimal mit Elektrolytlösung gespült und gesäubert. Das Wasserbad musste eine Temperatur von  $37 \pm 1 \text{ C}^\circ$  betragen und die Elektrolytlösung ebenfalls auf diese Temperatur erwärmt sein. Die Füllmenge des Organbades betrug 25 ml Elektrolytlösung.

Die Arteria pulmonalis wurde zügig in das Organbad transferiert. Zwischen dem Silberdraht der Aufhängevorrichtung und dem unteren Ende der Organhalterung, ähnlich einem Gummiring, wurde das Arterienstück eingespannt und in das Bad abgesenkt.

Der Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) wurde eingeschaltet und mit dem Stellrädchen auf Position „Null“ gefahren. Das Organ wurde im Ausmaß von 9,81 mN einer Vorspannung unterzogen, was einer Größenordnung von 10 cm am Schreiber entsprach.

Hierzu drehte man vorsichtig am Feintrieb gegen den Uhrzeigersinn, das Organ wurde gespannt. Bei erreichter Vorspannung wurde der Verstärker („Transbridge™“ Verstärker 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) eingeschaltet und mit ihm die Schreiberposition auf die Nulllinie („zero“) zurückgestellt, jetzt wurde das Verstärkerrad verriegelt. Das Organ wurde nun für 20 Minuten einer Anpassungsphase unterzogen.

Nach der Anpassungsphase wurde der Schreiber, eingestellt auf 5 mV / speed 1 ( mm / min) bei 10 cm Vorspannung, mittels „record on“ und „pen down“ zur Aufzeichnung aktiviert. Die Elektrolytlösung wurde abgelassen und durch 25 ml Kaliumchlorid- Lösung (0,67g KCl in 100 ml Elektrolytlösung) ersetzt. Die Arterie wurde nun über einen längeren Zeitraum maximal kontrahiert. Bei erreichter Kontraktion konnte man über den Schreiber ein Plateau erkennen. Das war der geeignete Zeitpunkt um mit der Zugabe der gelösten Testsubstanz zu beginnen. Jeweils nach 45 Minuten wurde die Testsubstanz in fünf verschiedenen Konzentrationen kumulativ mittels Finnipipette zugegeben und die veränderte Kontraktionskraft des Organs aufgezeichnet.

### **2.5.2. Aorta**

Zunächst wurde das Organbad zur Reinigung mindestens zweimal mit Elektrolytlösung gespült und gesäubert. Das Wasserbad musste eine Temperatur von  $37 \pm 1 \text{ C}^\circ$  betragen und die Elektrolytlösung ebenfalls auf diese Temperatur erwärmt sein. Die Füllmenge des Organbades betrug 25 ml Elektrolytlösung.

Das Aortenstück wurde unverzüglich in das Organbad transferiert. Zwischen Silberdraht der Aufhängevorrichtung und dem unteren Ende der Organhalterung, ähnlich einem Gummiring, wurde der Aortenring eingespannt und in das Bad abgesenkt.

Der Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) wurde eingeschaltet und mit dem Stellrädchen auf Position „Null“ gefahren. Das Organ wurde im Ausmaß von 9,81 mN einer Vorspannung unterzogen, was einer Größenordnung von 10 cm am Millimeterpapier entsprach. Hierzu drehte man auch hier vorsichtig am Feintrieb gegen den Uhrzeigersinn, das Organ wurde gespannt. Bei erreichter Vorspannung wurde der Verstärker („Transbridge™“ Verstärker 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments,

Sarasota, FL, USA) eingeschaltet und die Schreiberposition auf die Nulllinie („zero“) zurückgestellt, jetzt wurde das Verstärkerrad verriegelt. Das Organ wurde nun für 20 Minuten einer Anpassungsphase unterzogen.

Nach der Anpassungsphase wurde der Schreiber von 10 mV auf 5 mV umgestellt und bei speed 1 zur Aufzeichnung aktiviert („record on „/ „pen down“).

25 ml Elektrolytlösung wurde abgelassen und gegen 25 ml Kaliumchlorid-Lösung (0,67g KCl in 100ml Elektrolytlösung) ausgetauscht. Die Erreichung des Plateaus wurde abgewartet. Anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanz, wie bei Arteria pulmonalis.

### ***2.5.3. Ileum terminalis***

Das Organbad wurde zur Reinigung mindestens zweimal mit Elektrolytlösung gespült und gesäubert. Das Wasserbad musste eine Temperatur von  $37 \pm 1$  C° betragen und ebenfalls die Elektrolytlösung auf diese Temperatur erwärmt sein. Die Füllmenge des Organbades betrug 25 ml Elektrolytlösung.

Der Ileum wurde unverzüglich in das Organbad transferiert und mittels zweier angeknüpfter Silberhaken am Silberdraht der Aufhängevorrichtung und a, unteren Ende der Organhalterung befestigt.

Der Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) wurde eingeschaltet und mit dem Stellrädchen auf Position „Null“ gefahren. Nun wurde das Organ einer Vorspannung im Ausmaß von 4,90 mN unterzogen, was einer Größenordnung von 5 cm am Millimeterpapier entsprach.

Hierzu drehte man wiederum vorsichtig am Feintrieb gegen den Uhrzeigersinn, das Organ wurde gespannt. Bei erreichter Vorspannung wurde der Verstärker („Transbridge™“ Verstärker 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) eingeschaltet und die Schreiberposition auf die Nulllinie („zero“) zurückgestellt, jetzt wurde das Verstärkerrad verriegelt. Das Organ wurde nun für 20 Minuten einer Anpassungsphase unterzogen.



Nach der Anpassungsphase wurde der Schreiber, der auf 5 mV / speed 1 (mm / min) bei 5 cm Vorspannung eingestellt war, mittels „record on“ und „pen down“ zur Aufzeichnung aktiviert.

Die Elektrolytlösung wurde gegen 25 ml Kaliumchlorid-Lösung ausgetauscht. Diese besaß im Gegensatz zu Arteria pulmonalis / Aorta eine andere Konzentration. 0,45g Kaliumchlorid in 100 ml Elektrolytlösung.

Sobald das Plateau erreicht war, konnte die Testsubstanz nach demselben Schema wie bei Arteria pulmonalis und Aorta zugegeben werden.

#### ***2.5.4. Atrium dexter***

Der zur Aufhängung präparierte Atrium wurde wie der Ileum terminalis in das Organbad von Apparatur 2 eingehängt und befestigt.

Der Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) wurde eingeschaltet und mit dem Stellrädchen auf Position „Null“ gefahren. Nun wurde das Organ einer Vorspannung im Ausmaß von 10,4 mN entzogen, was einer Größenordnung von 10,4 cm am Millimeterpapier entsprach.

Hierzu drehte man vorsichtig am Feintrieb gegen den Uhrzeigersinn, das Organ wurde gespannt. Bei erreichter Vorspannung wurde der Verstärker („Transbridge™“ Verstärker 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) eingeschaltet und die Schreiberposition auf die Nulllinie („zero“) zurückgestellt, jetzt wurde das Verstärkerrad verriegelt. Das Organ wurde nun für 20 Minuten einer Anpassungsphase unterzogen.

Nach der Anpassungsphase wurde mit der Kontrolle der Schlagfrequenz bei 5 mV / speed 5 und 10,4 cm Vorspannung begonnen. Jeweils nach fünf Minuten wurde daher eine Aufzeichnung der Schlagfrequenz vorgenommen und jene Frequenzen abgezählt und verglichen, die über sechs Zentimeter am Millimeterpapier gelaufenen waren. Sobald die Schlagfrequenz einen konstanten Wert erreicht hatte, konnte mit Zugabe der Testsubstanz begonnen werden, nach jeweils 45

Minuten eine neue Konzentration kumulativ. Die Schlagfrequenz des Atriums wurde nun nach jeweils fünf Minuten aufgezeichnet und verglichen.

Nahm die Intensität bei gleichbleibender Frequenz der einzelnen Schläge zu stark ab, um sie abzählen zu können, wurde am Schreiber auf 2 mV beziehungsweise 1 mV umgeschaltet. Kontrolle und Schlagfrequenz, bei entsprechenden Konzentrationen, wurden laufend in Protokollen festgehalten.

### **2.5.5. *Musculi papillares***

Der für die Versuche vorbereitete Papillarmuskel wurde in Apparatur 1 eingespannt. Hierfür wurde das Muskelende mit dem Silberhaken oben an der Organhalterung befestigt. Das andere Ende wurde mit Hilfe der Schraubklemme an der Kathode fixiert. Der so eingespannte Muskel wurde in das Organbad, das mit 25 ml, auf  $35 \pm 1 \text{ C}^\circ$  erwärmte, Elektrolytlösung befüllt war, abgesenkt und gleichmäßig mit Carbogen begast.

Der Schreiber („Flatbed Recorder“ BD 112 dual channel, Kipp & Zonen, Netherlands) wurde eingeschaltet und mit dem Stellrädchen auf Position „Null“ gefahren. Nun wurde das Organ einer Vorspannung im Ausmaß von 3,92 mN, was einer Größenordnung von 4 cm auf dem Millimeterpapier entsprach, unterzogen. Die zur Aufzeichnung verwendeten Schreibereinstellungen betragen 5 mV / speed 5 und konnten bei auf 2 mV umgestellt werden. Die Vorspannung musste im Verlauf des Tests immer wieder kontrolliert und adjustiert werden.

Da der Papillarmuskel keinen immanenten Schrittmacher besaß, musste er elektrisch gereizt werden, um zu kontrahieren. Für diesen Zweck wurde der „Accupulser A 310“ (World Precision Instruments Hamden, FL, USA) verwendet. Der Muskel wurde pro Sekunde einmal gereizt, ein Wert von 10 % über der Minimalreizschwelle war hierbei optimal.

Bis die Kontraktionsamplituden konstant waren, dauerte es oft 1-2 Stunden, dann wurde mit Kontrollmessungen nach jeweils fünf Minuten begonnen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanz nach jeweils 45 Minuten bei steigender Konzentration kumulativ.

## 2.6. Testsubstanzen

Die untersuchten Substanzen WHG41 und WHG47 stellen neuartige Dianilid Derivate dar. Diese wurden von Mag. Pharm. Walter Granig synthetisiert und von Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Medizinische und Pharmazeutische Chemie zur Verfügung gestellt.

Bei den Versuchen wurde mit Lösungen der Testsubstanzen gearbeitet. Durch kumulative Zugabe der Substanzen musste eine maximale Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  im Organbad erreicht werden. Um dies zu bewerkstelligen, wurde die berechnete Menge Testsubstanz in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mittels Finnimikropipette zugetropft. Die zu erreichenden Konzentrationen im Organbad betragen 1  $\mu\text{mol/l}$ , 3  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 30  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$ . In Intervallen von 45 Minuten wurde die Konzentration erhöht um „steady state“ Bedingungen zu erreichen.

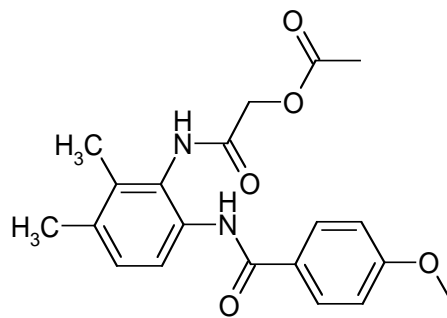
**Tabelle 2: Substanzeinwaage**

<i>Substanzeinwaage</i>			
<i>Substanz</i>	<i>Molare Masse M</i>	<i>25 ml Organbad</i>	<i>8 ml Organbad</i>
<i>WHG41</i>	<i>370,41 g/l</i>	<i>0,92 mg</i>	<i>0,29 mg</i>
<i>WHG47</i>	<i>360,34 g/l</i>	<i>0,90 mg</i>	<i>0,28 mg</i>

## 2.7. Strukturen der Testsubstanzen und Diltiazem

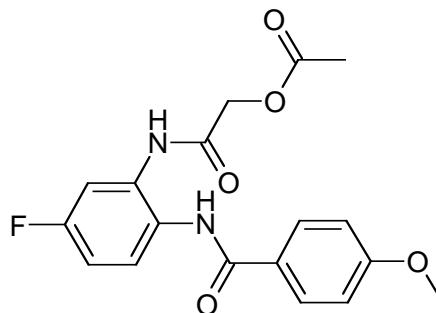
Abbildung 5: Strukturformeln der Testsubstanzen und von Diltiazem

WHG41



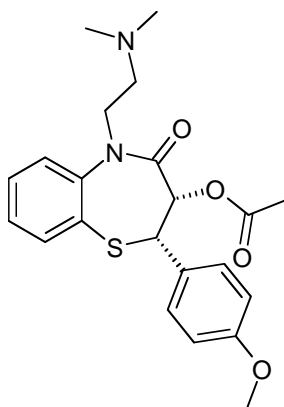
**WHG41:** 3-{6-[(4-methoxybenzoyl)amino]-2,3-dimethylphenyl}-2-oxoethylacetat

WHG47



**WHG47:** 3-{5-fluoro-2-[(4-methoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

## DILTIAZEM



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

WHG41 und WHG47 sind Dianilide und wurden von Diltiazem strukturell abgeleitet.

Dabei wurde der Thiazepinring des Diltiazems zwischen C2 und C3 geöffnet, und das Schwefelatom an einer Stelle durch ein Amid ersetzt. Der am Amid gebundene methoxyphenyl Rest ist gleich dem des Diltiazems. Die Ringöffnung führt zum Verlust der Chiralitätszentren an Position 2 und Position 3. Der dimethylaminoethyl-Rest des Diltiazems ist bei WHG41 und WHG47 nicht mehr vorhanden, die Seitenkette an N in Position 5 trägt einen 2-oxoethylacetat Rest.

WHG41 hat zwei methyl Gruppen in Position 2 und Position 3 des Dianilids. WHG47 trägt ein Fluor in Position 5 des Dianilids zur Erhöhung der Lipophilie.

## **2.8. Auswertung**

### **2.8.1. Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis**

Bei diesen Versuchen erhielt man Kontraktionskurven, ausgehend von einer maximalen Kontraktion mittels KCl und deren Verlauf nach Zugabe der Testsubstanzen. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und dieser Zeitpunkt auf der Kontraktionskurve vermerkt. Der Abstand dieser Punkte von der Nulllinie wurde mit einem Lineal abgemessen und mit einem Eichfaktor multipliziert. Der Kontrollwert von 100 % entsprach jener der „steady state“ Bedingung zum Ende der Kontrollzeit nach Start des Versuchs.

### **2.8.2. Atrium dexter**

Es galt die Änderung der Chronotropie zu untersuchen. Hierfür wurde jeweils nach fünf Minuten über zwölf Sekunden die Frequenz mit einem Schreiber (automatischer Papiervorschub 5mm pro Sekunde) aufgezeichnet und danach abgezählt. Diese Frequenz mit dem Faktor fünf multipliziert ergab die Anzahl der Schläge pro Minute.

Diese Vorgehensweise wurde bei sämtlichen Konzentrationen der Testsubstanz angewendet. Um die erworbenen Daten statistisch erfassen zu können wurde mit dem „Student t-Test“ hinsichtlich der Signifikanz gearbeitet, wobei Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5 \%$  als signifikant und Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 0,1 \%$  als hochsignifikant betrachtet wurden.

### ***2.8.3. Musculi papillares***

Untersucht wurde die Kontraktionskraft in mN gemessen. Hierfür wurde jeweils nach Minuten die Papillaramplitude aufgezeichnet und mit einem Lineal vermessen. Das Messergebnis wurde mit dem Eichfaktor der Versuchsapparatur multipliziert und tabellarisch erfasst.

Eine „steady state“ Bedingung der Kontrollamplitude wurde mit 100 % gesetzt und alle Messwerte demnach in Relation dazu.

### ***2.8.4. EDV Erfassung***

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programs „SigmaPlot 8.0“ berechnet, welches vom Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien zur Verfügung gestellt wurde.

### **3. ERGEBNISSE**

#### ***3.1. Wirkung von WHG41 auf isolierte Organe von Meerschweinchen***

##### ***3.1.1. Auswertung Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminalis***

Präparate der glatten Muskulatur wurden in Zusammenhang mit den Untersuchungen auf eine Veränderung der Kontraktion beobachtet. Somit musste das Gewebe der Präparate zu Beginn des Versuches zunächst maximal vorkontrahiert werden, um eine Änderung der Spannung nach Zugabe der Testsubstanz nachvollziehen zu können. Vorkontrahiert wurden die einzelnen Organpräparate mit eigens angefertigten KCL-Lösungen.

Erstellt wurden Kontraktionskurven über einen angeschlossenen Schreiber. Jene Punkte der Kurve, an denen Konzentrationszugaben erfolgten, wurden markiert. Der Abstand dieser Punkte von der Nulllinie wurde mit einem Lineal abgemessen und mit einem Eichfaktor multipliziert. Der Kontrollwert von 100 % entsprach der der „steady state“ Bedingung zum Ende der Kontrollzeit, nach dem Start des Versuchs. Mittelwerte der Messdaten wurden in das Graphikprogramm übertragen.

##### ***3.1.2. Wirkung von WHG41 auf Arteria pulmonalis***

Das vorbereitete Stück Arteria pulmonalis wurde mit der Testsubstanz WHG41 beschickt und auf eine Veränderung der Kontraktionskraft beobachtet. Nach fünf Versuchen ergab sich ein Mittelwert der Kontrollwerte, welcher mit  $23,48 \pm 3,33$  mN zu 100 % der Kontraktionskraft entsprach.



In dieser Testreihe zeigte sich eine stete Abnahme der Kontraktionskraft mit jeder weiteren Konzentrationszugabe von WHG41.

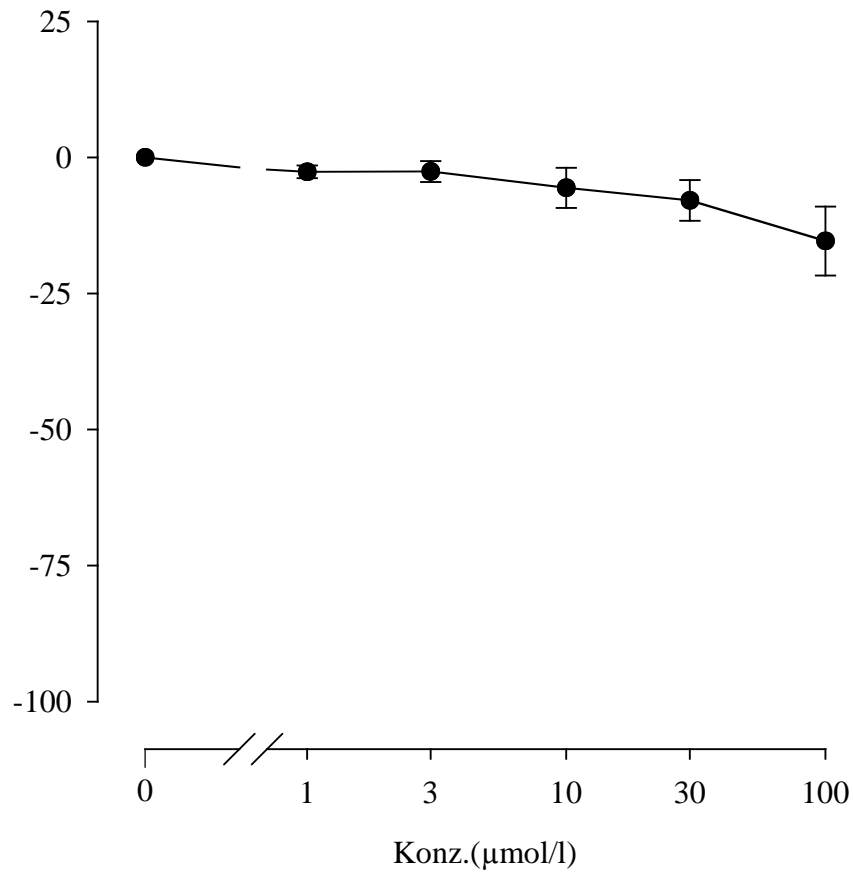
**Tabelle 3: Wirkung von WHG41 auf Arteria pulmonalis**

<b>WHG41 Arteria pulmonalis</b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	23,48 $\pm$ 3,33	0 $\pm$ 0	5	-
1	22,80 $\pm$ 2,99	-2,64 $\pm$ 1,15	5	n. s.
3	22,77 $\pm$ 2,99	-2,58 $\pm$ 1,93	5	n. s.
10	22,41 $\pm$ 3,02	-5,58 $\pm$ 3,69	5	n. s.
30	21,52 $\pm$ 2,79	-7,90 $\pm$ 3,74	5	n. s.
100	20,49 $\pm$ 2,37	-15,36 $\pm$ 6,33	5	n. s.

**Legende zu Tabelle 3:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

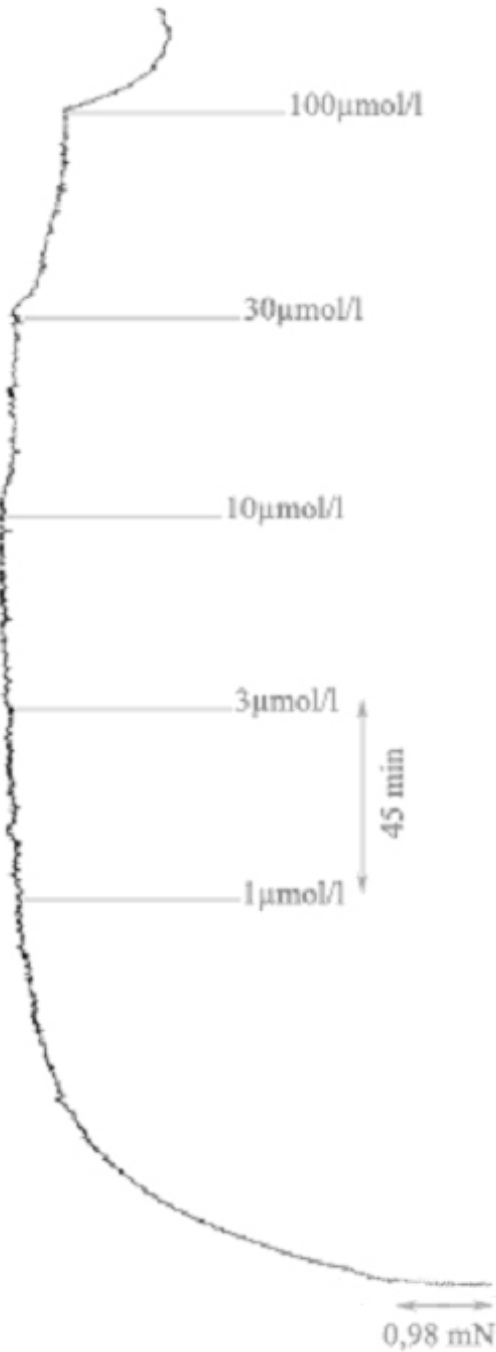
**Abbildung 6: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG41 an Arteria pulmonalis**



**Legende zur Abbildung 6:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG41 bei Arteria pulmonalis. Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate hingegen die zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die schwarzen Punkte markieren die Abnahme der Kontraktionskraft während die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte die jeweiligen Standardfehler erkennen lassen.

**Abbildung 7: Gescannte Kontraktionskurve von WHG41 bei Arteria pulmonalis**



**Legende zur Abbildung 7:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG41. Jeweils nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### 3.1.3. Wirkung von WHG41 auf die Aorta

Das Aortenpräparat wurde zunächst mit KCl-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit der Testsubstanz WHG41 in verschiedenen Konzentrationen beschickt.

Aus fünf Versuchen wurde der Mittelwert des Kontrollwertes errechnet und die weiteren Ergebnisse zu diesem in Relation gesetzt. Der Kontrollwert betrug  $10,88 \pm 1,38$  mN.

Ausgehend vom Mittelwert der Kontrollwerte befanden sich die Mittelwerte der verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz aus fünf Versuchen leicht im positiven Bereich, der Standardfehler erlaubte jedoch eine Abnahme der Kontraktion bei  $100 \mu\text{mol/l}$ .

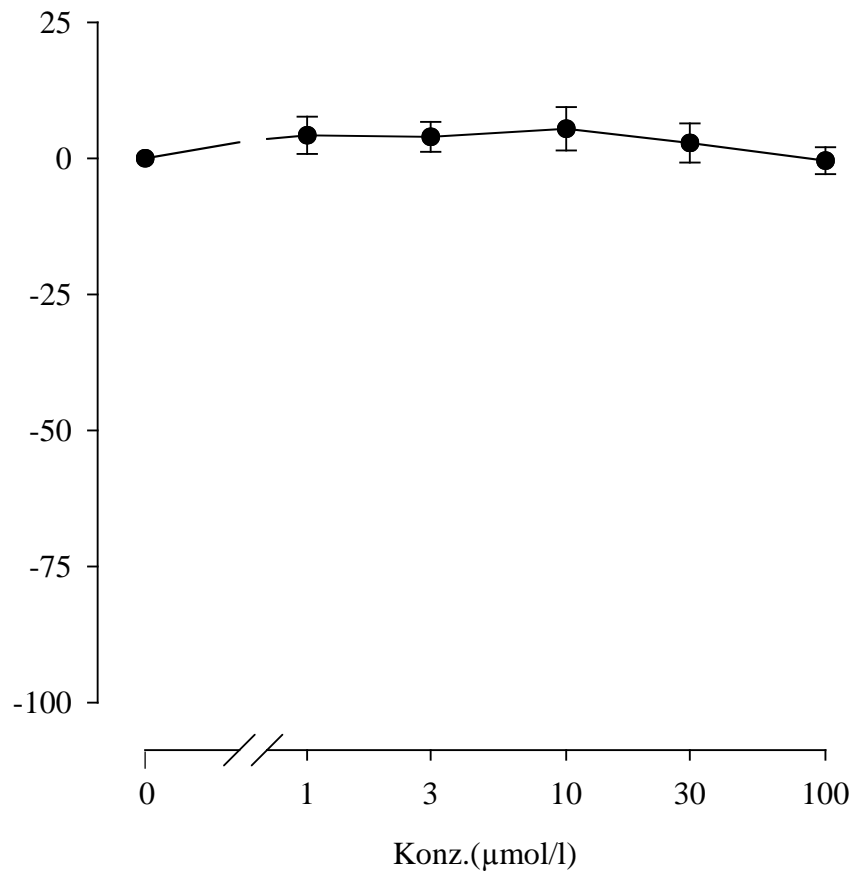
**Tabelle 4: Wirkung von WHG41 auf die Aorta**

WHG41 Aorta				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$10,88 \pm 1,38$	$0 \pm 0$	5	-
1	$11,52 \pm 1,83$	$4,24 \pm 3,43$	5	n. s.
3	$11,41 \pm 1,64$	$3,94 \pm 2,75$	5	n. s.
10	$11,56 \pm 1,65$	$5,44 \pm 3,99$	5	n. s.
30	$11,29 \pm 1,65$	$2,82 \pm 3,61$	5	n. s.
100	$10,94 \pm 1,58$	$-0,42 \pm 2,48$	5	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 4:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

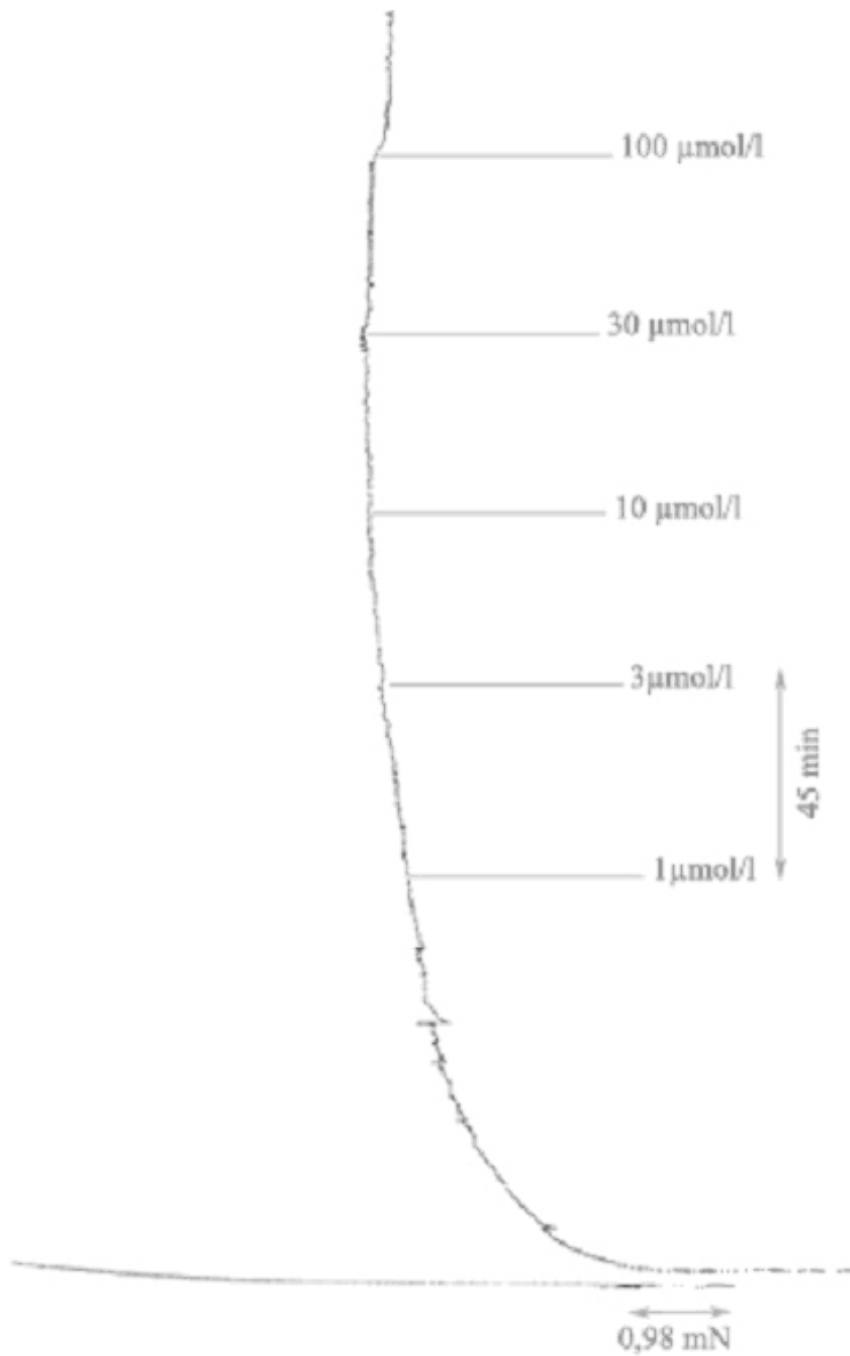
**Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG41 bei der Aorta**



**Legende zur Abbildung 8:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG41 bei der Aorta. Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate zeigt die zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die schwarzen Punkte markieren die Mittelwerte der Abnahme der Kontraktionskraft während die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte die jeweiligen Standardfehler zeigen.

**Abbildung 9: Gescannte Kontraktionskurve von WHG41 der Aorta**



**Legende zur Abbildung 9:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG41. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### 3.1.4. Wirkung von WHG41 auf *Ileum terminalis*

Dünndarmpräparate wurden mit WHG41 auf eine Änderung der Kontraktion untersucht. Nach der Vorkontraktion mittels KCl-Lösung wurde WHG41 in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Der Kontrollwert bei fünf Versuchen beträgt  $13,13 \pm 1,73$  mN. Bei diesem Versuch ist eine deutliche Abnahme der Kontraktion zu erkennen, welche sich von -1,32 % bei 1  $\mu\text{mol}$  bis zu -54,02 % bei der letzten Konzentration erstreckt.

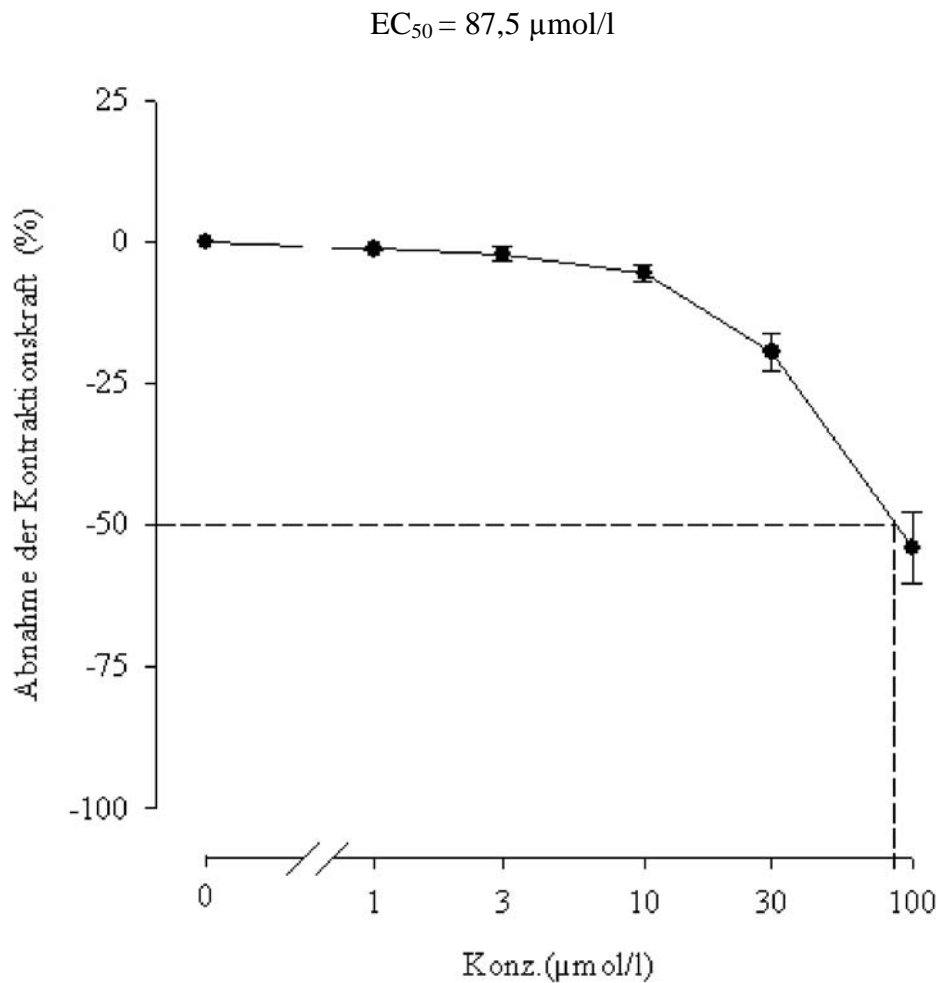
**Tabelle 5: Wirkung von WHG41 auf *Ileum terminalis***

<b>WHG41 <i>Ileum terminalis</i></b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$13,13 \pm 1,73$	$0 \pm 0$	5	-
1	$12,96 \pm 1,70$	$-1,32 \pm 0,29$	5	n. s.
3	$12,80 \pm 1,60$	$-2,16 \pm 1,26$	5	n. s.
10	$12,33 \pm 1,53$	$-5,67 \pm 1,50$	5	n. s.
30	$10,46 \pm 1,27$	$-19,59 \pm 3,21$	5	n. s.
100	$7,28 \pm 1,26$	$-54,02 \pm 6,12$	5	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 5:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in Nm und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

**Abbildung 10.: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG41 bei Ileum terminalis**

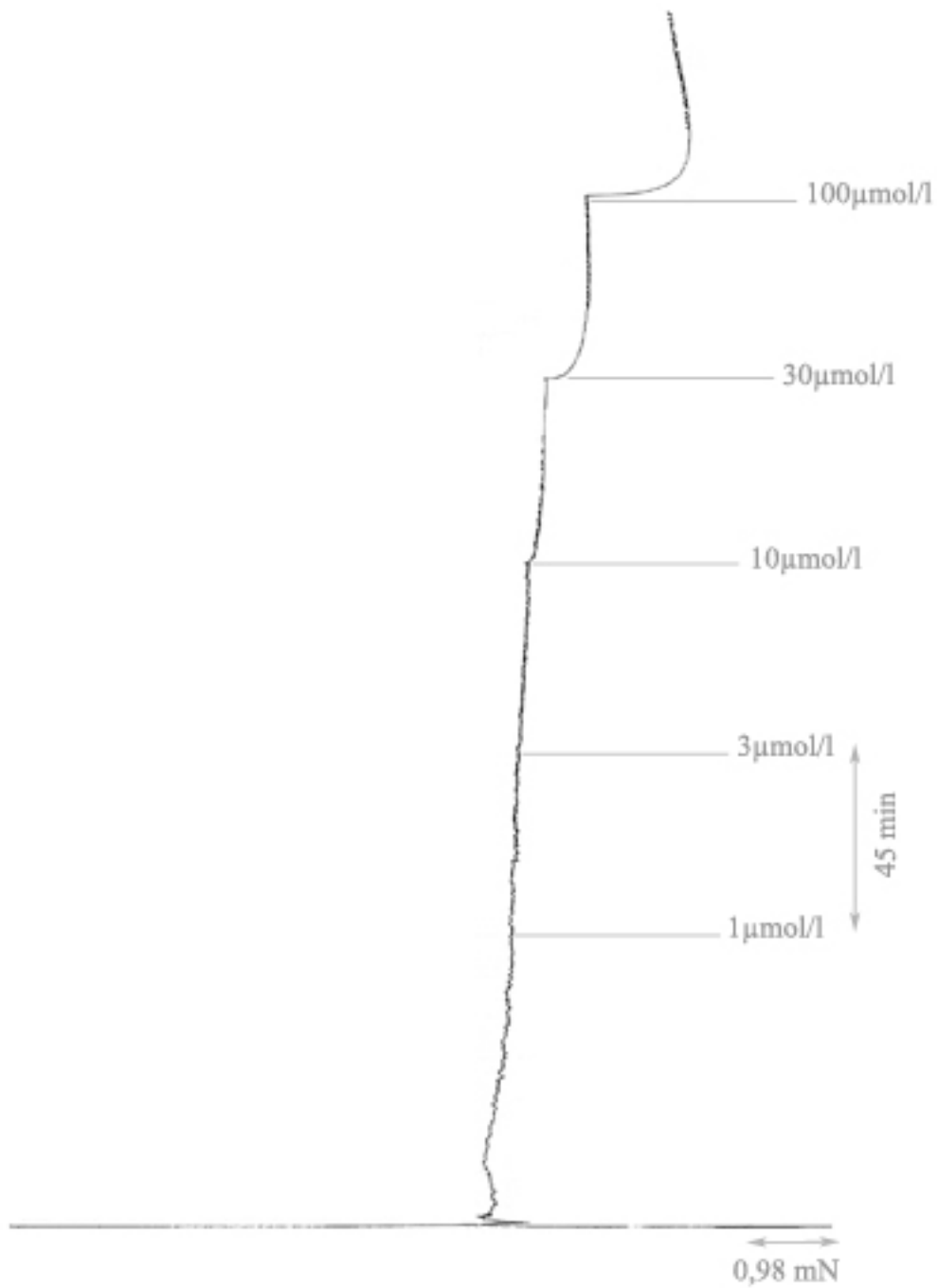


**Legende zur Abbildung 10:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG41 bei Ileum terminalis. Die y-Achse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die x-Achse die kumulativ zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die schwarzen Punkte markieren die Mittelwerte der Abnahme der Kontraktionskraft. Die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte die jeweiligen Standardfehler. Mit der strichlierten Linie ist der  $EC_{50}$  Wert gekennzeichnet.



**Abbildung 11: Gescannte Kontraktionskurve von WHG41 bei Ileum terminalis**



**Legende zur Abbildung 11:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG41. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### ***3.1.5. Auswertung der Musculi papillares***

Bei diesen Präparaten wurde die Kontraktionskraft dokumentiert, die mit einem Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet wurde. Anhand des Papiers gemessen, wobei 1 cm 0,981 mN entsprach, wurde mit dem Eichfaktor multipliziert und die Werte in Tabellen übertragen.

Es galt eine Änderung der Inotropie nach Zugabe von WHG41 zu dokumentieren.

### ***3.1.6. Wirkung von WHG41 auf Musculi papillares***

WHG41 wurde an Papillarmuskeln getestet um eine Änderung der Kontraktionskraft erkennen zu können. Aus fünf Versuchen wurden die Mittelwerte der Kontrollwerte errechnet und als Standard festgelegt.

Bei dieser Versuchsreihe ließ sich eine Abnahme der Kontraktionskraft erkennen, beginnend bei 1  $\mu\text{mol/l}$ . Innerhalb der steten Abnahme kam es bei 30  $\mu\text{mol/l}$  zu einem kurzen Anstieg der Kontraktionskraft.

**Tabelle 6: Wirkung von WHG41 auf Musculi papillares**

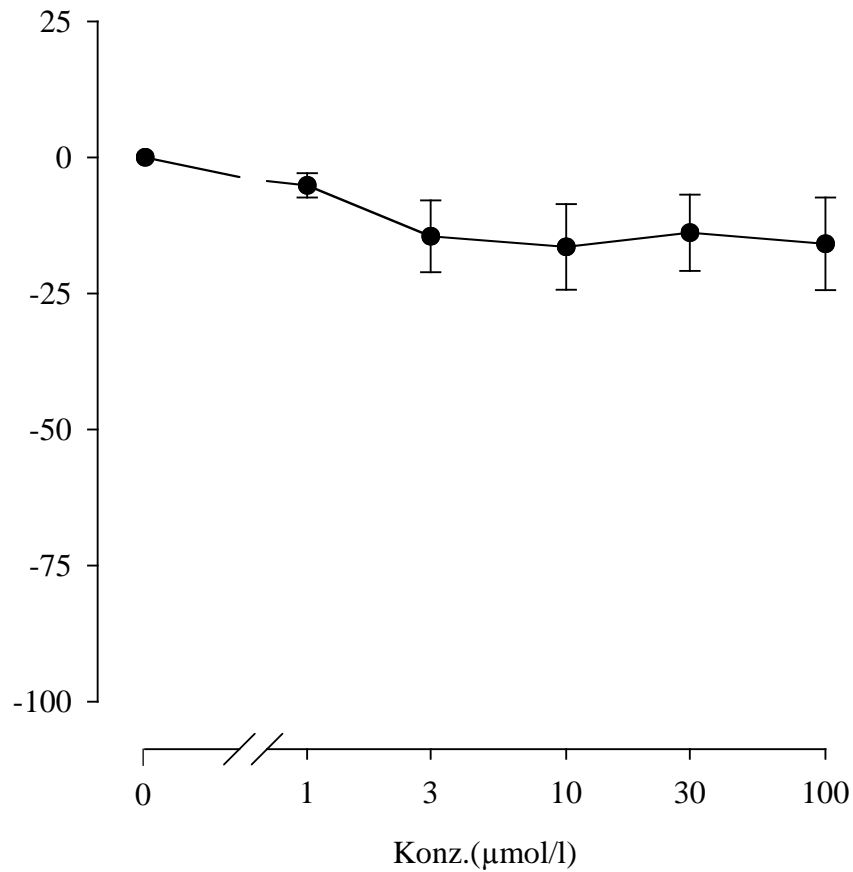
<b>WHG41</b>				
<b>Musculi papillares</b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,28 $\pm$ 0,25	0 $\pm$ 0	5	-
1	1,21 $\pm$ 0,23	-5,13 $\pm$ 2,25	5	n. s.
3	1,16 $\pm$ 0,29	-14,49 $\pm$ 6,60	5	n. s.
10	1,11 $\pm$ 0,28	-16,45 $\pm$ 7,87	5	n. s.
30	1,15 $\pm$ 0,29	-13,83 $\pm$ 7,00	5	n. s.
100	1,13 $\pm$ 0,30	-15,88 $\pm$ 8,50	5	n. s.

**Legende zu Tabelle 6:**

fc = arithmetisches Mittel der Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler in mN

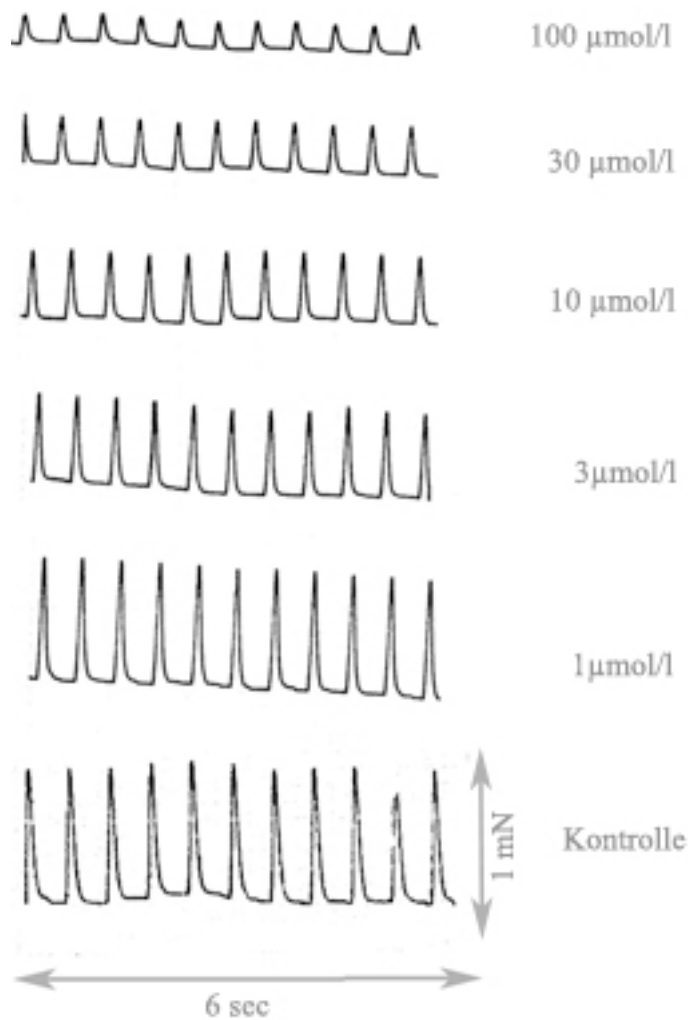
**Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG41 bei Musculi papillares**



**Legende zu Abbildung 12:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG41 bei Musculi papillares. Auf der y-Achse ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%) angegeben, die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die einzelnen Punkte markieren die Mittelwerte der Änderung der Kontraktionskraft. Die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte zeigen die dazugehörigen Standardfehler.

**Abbildung 13: Gescannte Kurven der Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von WHG41**



**Legende zu Abbildung 13:**

Die Aufnahme zeigt die Änderung der Kontraktionskraftamplitude nach Zugabe der Testsubstanz WHG41 in Intervallen von 45 Minuten. Die Zugabe erfolgte kumulativ.

### ***3.1.7. Auswertung von Atrium dexter***

Den Versuchen lag die Suche nach Änderungen der Chronotropie zu Grunde, nachdem die Testsubstanz WHG41 kumulativ zugegeben wurde.

Die Schlagfrequenz wurde aufgezeichnet und ausgezählt.

### ***3.1.8. Wirkung von WHG41 auf Atrium dexter***

Der Mittelwert der Kontrollen nach fünf Versuchen lag bei  $243 \pm 11,90$  Schlägen pro Minute und entsprach somit 100 %.

Davon abgeleitet kam es nach Zugabe der ersten drei Konzentrationen zu einer leichten Erhöhung der Schlagfrequenz pro Minute. Ab  $30 \mu\text{mol/l}$  nahm die Schlagfrequenz pro Minute ab. Bei  $100 \mu\text{mol/l}$  wies sie im Mittel  $210 \pm 6,32$  Schläge auf.

**Tabelle 7: Wirkung von WHG41 auf Atrium dexter**

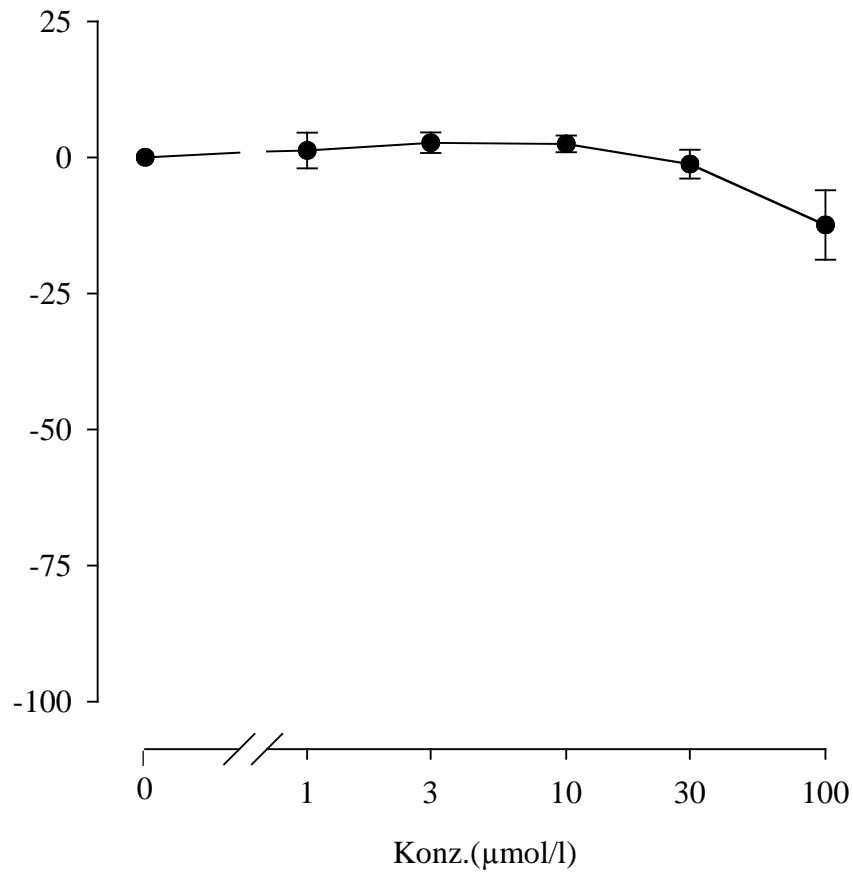
<b>WHG41</b>				
<b>Atrium dexter</b>				
$\mu\text{mol/l}$	f +/- SEM	f +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	243 $\pm$ 11,90	0 $\pm$ 0	5	-
1	245 $\pm$ 8,94	1,28 $\pm$ 3,27	5	n. s.
3	249 $\pm$ 10,17	2,70 $\pm$ 1,90	5	n. s.
10	249 $\pm$ 12,39	2,49 $\pm$ 1,53	5	n. s.
30	239 $\pm$ 7,81	-1,23 $\pm$ 2,64	5	n. s.
100	210 $\pm$ 6,32	-12,42 $\pm$ 6,38	5	n. s.

**Legende zu Tabelle 7:**

f = Mittelwerte der Schlagfrequenz/ Minute

SEM = Standardfehler

**Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG41 bei Atrium dexter**

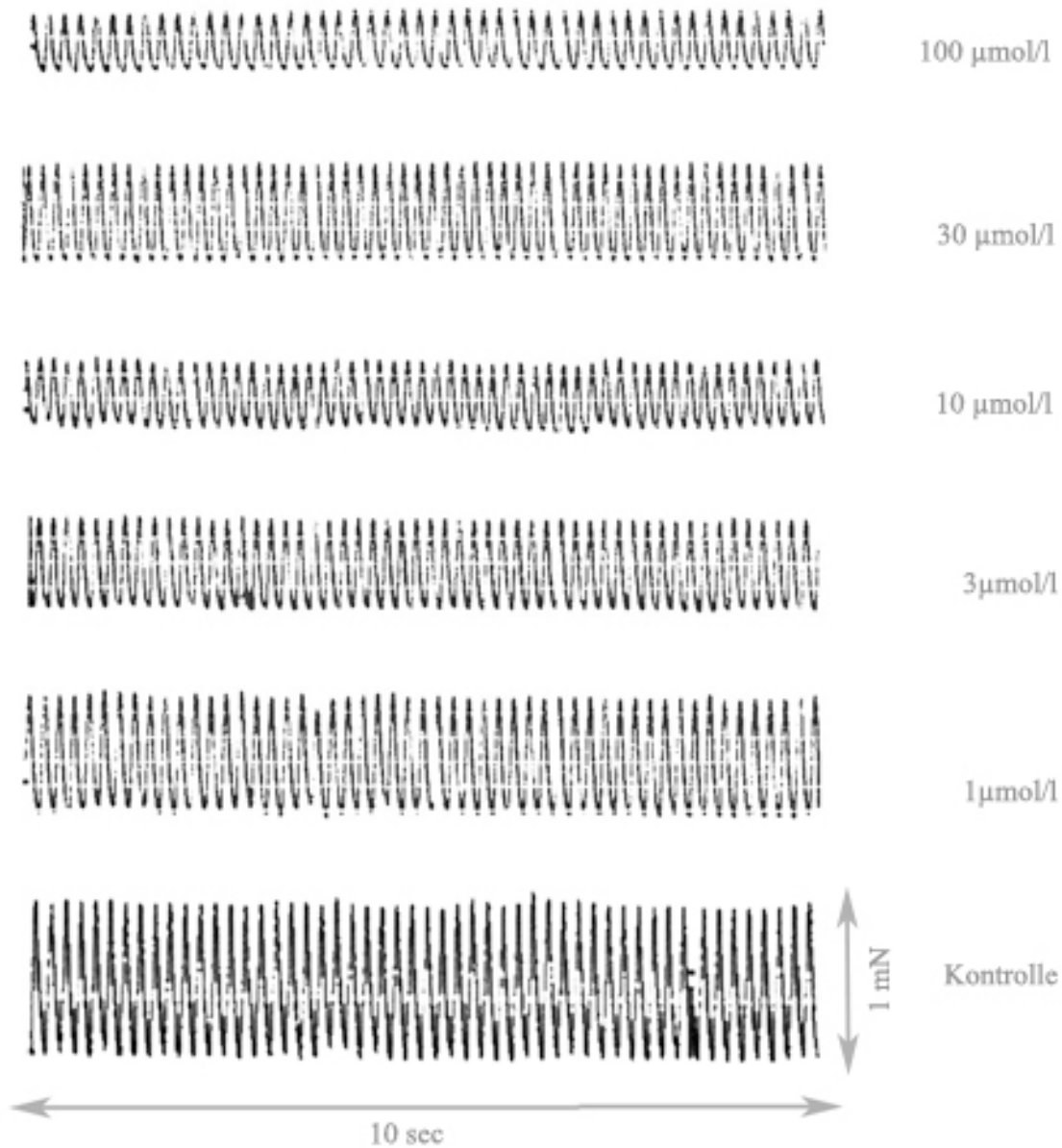


**Legende zu Abbildung 14:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG41 bei Atrium dexter. Auf der Abszisse steht die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%) angegeben, die Ordinate zeigt die zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die Punkte markieren die Mittelwerte der Kontraktionskraft, die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte zeigen die dazugehörigen Standardfehler an.



**Abbildung 15.: Gescannte Abbildung der Wirkung von WHG41 auf die Schlagfrequenz von Atrium dexter**



**Legende zu Abbildung 15:**

Die Abbildung zeigt die Änderung der Schlagfrequenz des Vorhofes nach Zugabe von WHG41 in Intervallen von 45 Minuten. Gemessen und aufgezeichnet wurde in Abständen von fünf Minuten über einen Zeitraum von zwölf Sekunden.

### 3.2. Wirkung von WHG47 auf isolierte Organe von Meerschweinchen

#### 3.2.1. Wirkung von WHG47 auf Arteria pulmonalis

Das Präparat der Arteria pulmonalis wurde mit der Testsubstanz WHG47 beschickt. Die Mittelwerte der Kontrollphasen bei fünf Versuchen ergaben einen Kontrollwert von  $12,29 \pm 1,50$ .

Bei steigender Konzentration kam es zur steten Abnahme der Kontraktionskraft.

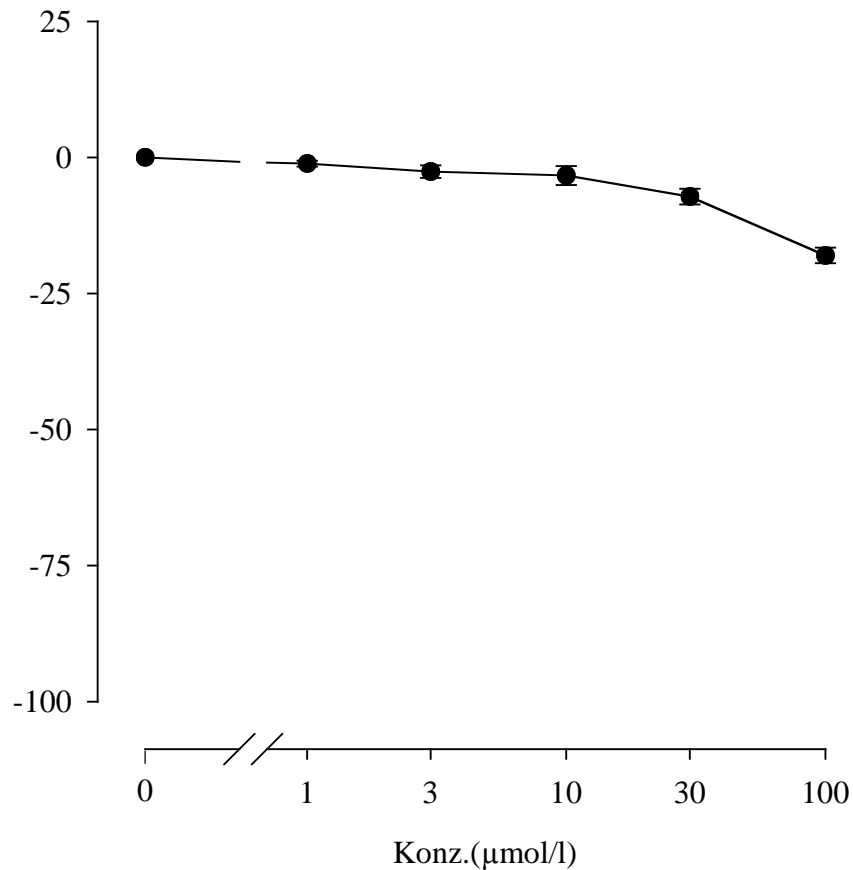
**Tabelle 8: Wirkung von WHG47 auf Arteria pulmonalis**

<b>WHG47 Arteria pulmonalis</b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$12,29 \pm 1,50$	$0 \pm 0$	5	-
1	$12,13 \pm 1,44$	$-1,14 \pm 0,56$	5	n. s.
3	$11,91 \pm 1,33$	$-2,61 \pm 1,15$	5	n. s.
10	$11,83 \pm 1,33$	$-3,33 \pm 1,73$	5	n. s.
30	$11,37 \pm 1,28$	$-7,19 \pm 1,45$	5	n. s.
100	$10,05 \pm 1,17$	$-18,01 \pm 1,43$	5	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 8:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%), daneben die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

**Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG47 bei Arteria pulmonalis**



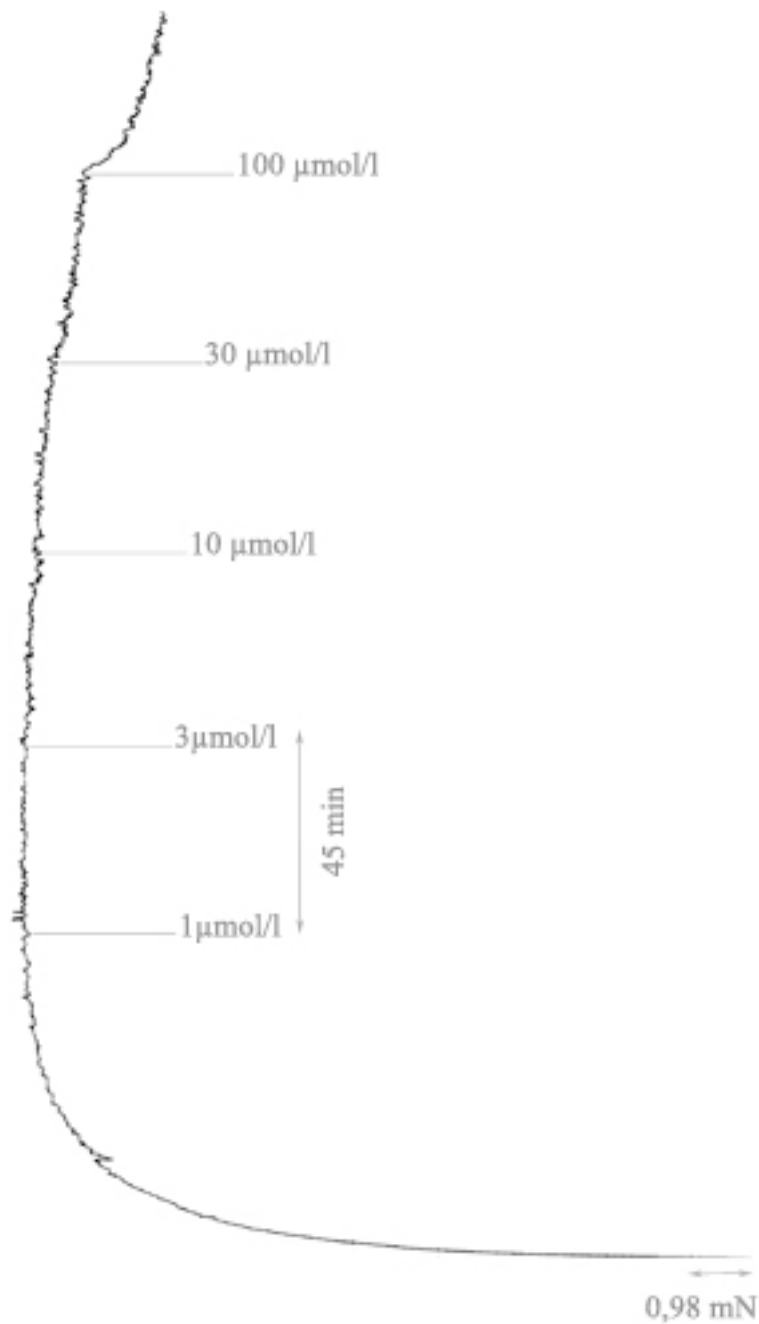
**Legende zu Abbildung 16:**

Die Abbildung zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG47 von Arteria pulmonalis.

Auf der Abszisse ist die Kontraktionskraft in Prozent (%) aufgetragen, auf der Ordinate hingegen die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$ . Durch die Punkte sind die Mittelwerte gekennzeichnet. Die Balken zeigen die errechneten Standardfehler an.

Erkennbar ist ein Abnahme der Kontraktionskraft.

*Abbildung 17: Gescannte Kontraktionskurve von WHG47 bei Arteria pulmonalis*



**Legende zu Abbildung 17:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG47. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### 3.2.2. Wirkung von WHG47 auf die Aorta

Das Aortenpräparat wurde zunächst mit KCl-Lösung vorkontrahiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von WHG47 beschickt.

Aus fünf Versuchen wurde der Mittelwert des Kontrollwertes errechnet und die weiteren Ergebnisse zu diesem Relation gesetzt. Der Kontrollwert beträgt  $8,56 \pm 1,65$  mN.

Bei steigender Konzentration der zugegebenen Testsubstanz war eine stete Abnahme der Kontraktionskraft hin zu  $-18,62 \pm 7,62$  % bei  $100 \mu\text{mol/l}$  erkennbar.

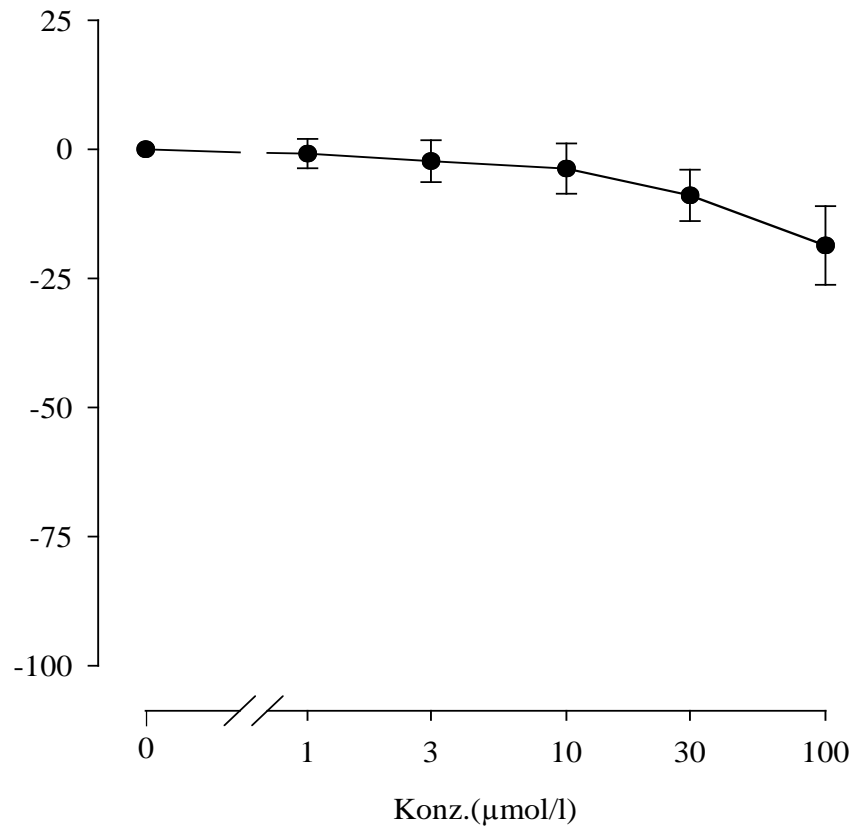
**Tabelle 9: Wirkung von WHG47 auf Aorta**

<b>WHG47 Aorta</b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$8,56 \pm 1,65$	$0 \pm 0$	5	-
1	$8,44 \pm 1,58$	$-0,83 \pm 2,84$	5	n. s.
3	$8,32 \pm 1,59$	$-2,29 \pm 4,04$	5	n. s.
10	$8,20 \pm 1,59$	$-3,73 \pm 4,87$	5	n. s.
30	$7,81 \pm 1,58$	$-8,92 \pm 4,96$	5	n. s.
100	$7,05 \pm 1,57$	$-18,62 \pm 7,62$	5	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 9:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

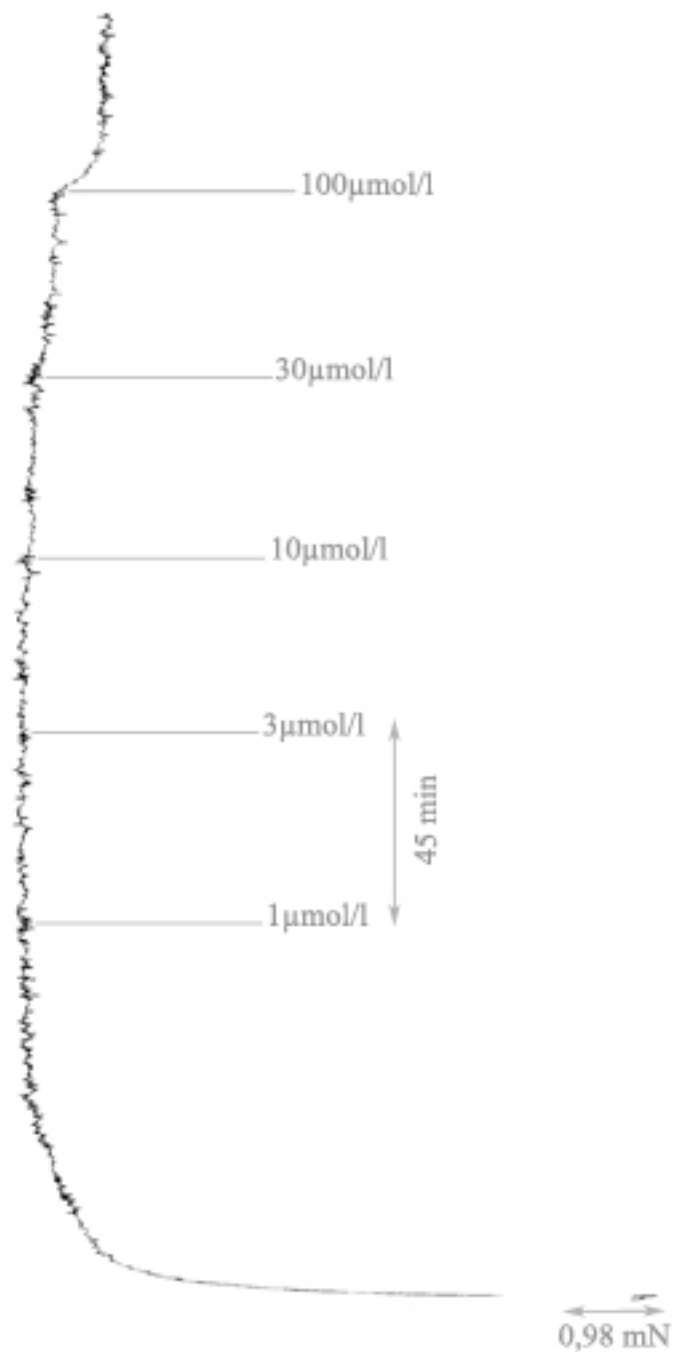
**Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG47 der Aorta**



**Legende zu Abbildung 18:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG47 bei der Aorta. Die Abszisse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die Ordinate die zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die schwarzen Punkte markieren die Mittelwerte der Abnahme der Kontraktionskraft während die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte die jeweiligen Standardfehler anzeigen.

**Abbildung 19: Gescannte Kontraktionskurve von WHG47 bei Aorta**



**Legende zur Abbildung 19:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG47. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### 3.2.3. Wirkung von WHG47 auf *Ileum terminalis*

Das Endstück des Dünndarms wurde nach ausreichender Vorkontraktion mittels KCl-Lösung mit der Testsubstanz WHG47 versetzt. Eine kumulative Zugabe der verschiedenen Konzentrationen in Abständen von 45 Minuten ergab nach fünf Versuchen einen errechneten Mittelwert des Kontrollwertes von  $9,62 \pm 1,67$  mN. Nach Zugabe der ersten Konzentrationsstufe von  $1 \mu\text{mol/l}$  ergab sich eine minimale Erhöhung der Kontraktionskraft auf  $9,65 \pm 1,61$  mN. Ab Konzentration  $3 \mu\text{mol/l}$  ist eine Abnahme der Kontraktionskraft, die bei  $-35,21 \pm 6,77$  % und  $100 \mu\text{mol/l}$  endet, erkennbar.

**Tabelle 10: Wirkung von WHG47 auf *Ileum terminalis***

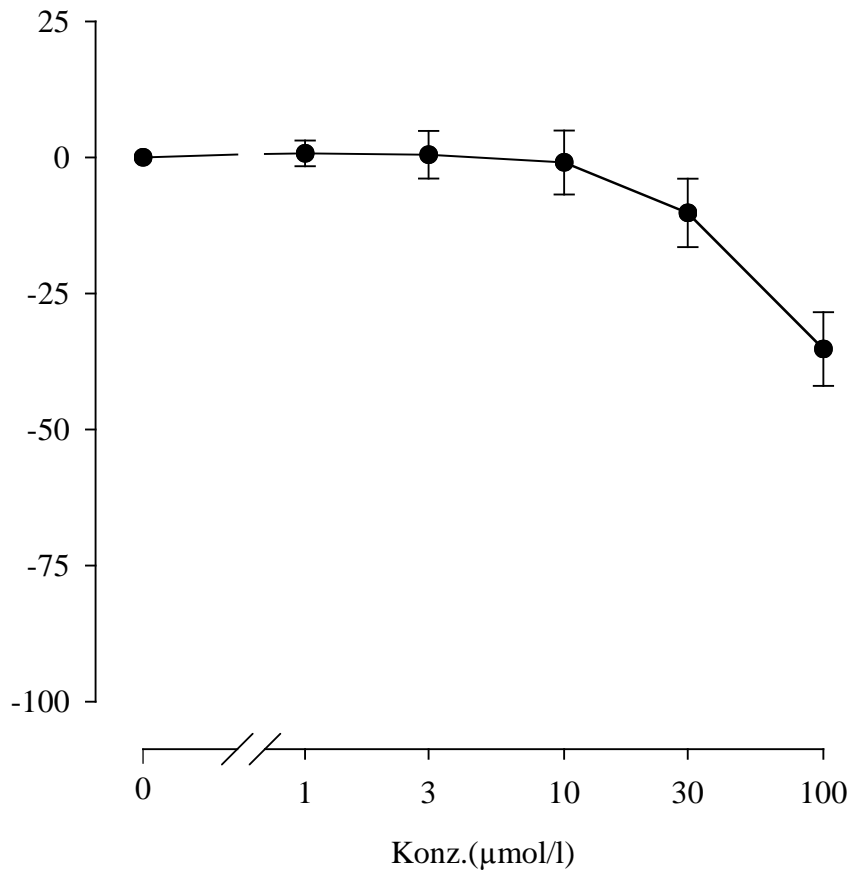
<b>WHG41 <i>Ileum terminalis</i></b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,62 \pm 1,67$	$0 \pm 0$	5	-
1	$9,65 \pm 1,61$	$0,74 \pm 2,37$	5	n. s.
3	$9,60 \pm 1,56$	$0,49 \pm 4,38$	5	n. s.
10	$9,48 \pm 1,62$	$-0,93 \pm 5,86$	5	n. s.
30	$8,72 \pm 1,69$	$-10,18 \pm 6,28$	5	n. s.
100	$6,31 \pm 1,32$	$-35,21 \pm 6,77$	5	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 10:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen der zugegebenen Testsubstanz, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in Nm und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche und deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).



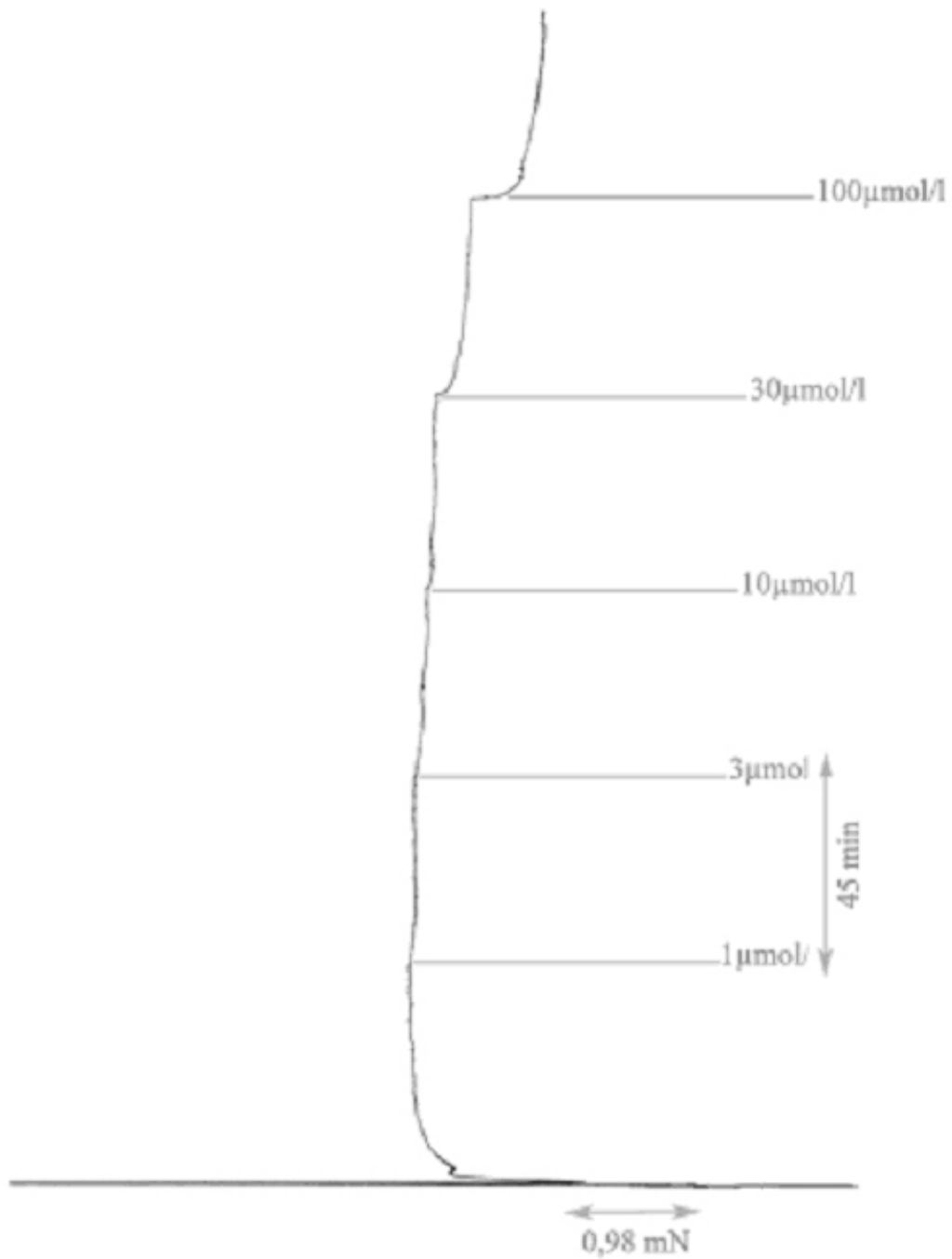
**Abbildung 20: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG47 bei Ileum terminalis**



**Legende zu Abbildung 20:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG47 bei Ileum terminalis. Die y-Achse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die x-Achse die kumulativ zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$ . Die schwarzen Punkte markieren die Mittelwerte der Abnahme der Kontraktionskraft, die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte die jeweiligen Standardfehler.

*Abbildung 21: Gescannte Kontraktionskurve von WHG47 bei Ileum terminalis*



**Legende zu Abbildung 21:**

Die Kontraktionskurve zeigt die Änderung der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz WHG47. Je nach 45 Minuten wurde Testsubstanz zugegeben und die Endpunkte markiert.

### 3.2.4. Auswertung der Musculi papillares

Bei den Präparaten wurde die Kontraktionskraft aufgezeichnet. Diese wurde mit Hilfe eines Schreibers auf Millimeterpapier erfasst. Ein Zentimeter auf dem Millimeterpapier entspricht hierbei 0,981 mN und wurde mit dem Eichfaktor multipliziert.

### 3.2.5. Wirkung von WHG47 auf Musculi papillares

Nach Zugabe der Testsubstanz WHG47 ergab sich nach vier Versuchen ein errechneter Mittelwert des Kontrollwertes von  $1,35 \pm 0,25$  mN. Erkennbar war, dass alle gemessenen Werte nach Zugabe der Konzentration 1  $\mu\text{mol/l}$  bis zu 100  $\mu\text{mol/l}$ , die Kontraktionskraft im positiven Bereich halten. Ein Maximum war nach Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  Zugabe mit  $10,06 \pm 5,04$  % erreicht.

**Tabelle 11: Wirkung von WHG47 auf Musculi papillares**

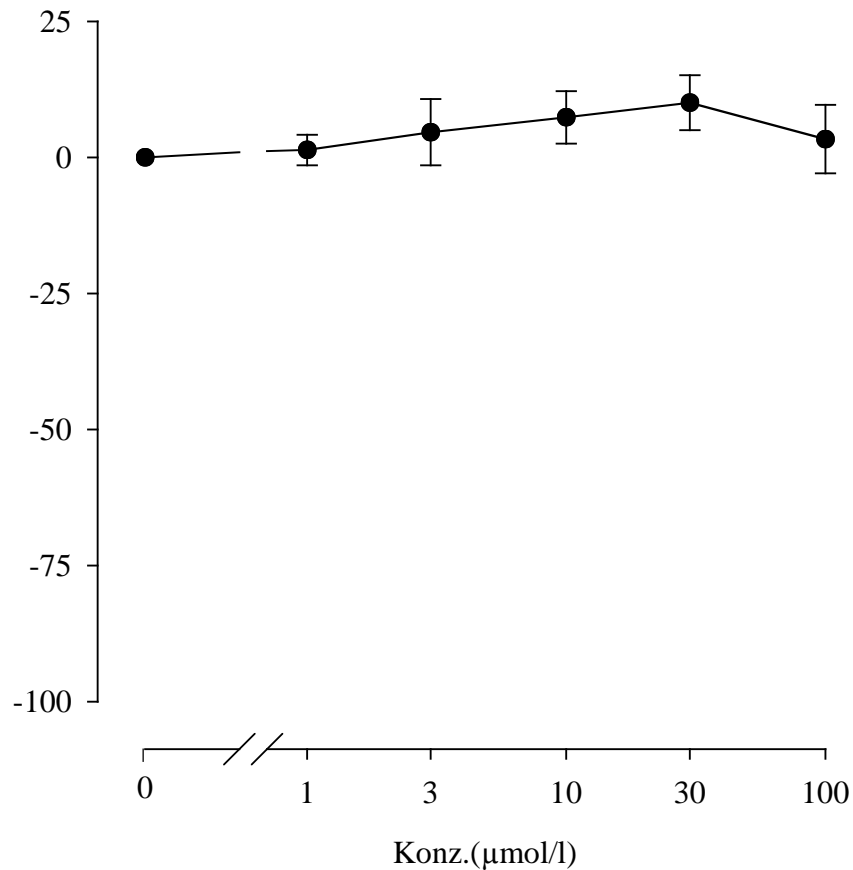
<b>WHG47 musculi papillares</b>				
$\mu\text{mol/l}$	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,35 \pm 0,25$	$0 \pm 0$	4	-
1	$1,37 \pm 0,25$	$1,37 \pm 2,81$	4	n. s.
3	$1,42 \pm 0,26$	$4,64 \pm 6,09$	4	n. s.
10	$1,46 \pm 0,28$	$7,37 \pm 4,81$	4	n. s.
30	$1,50 \pm 0,28$	$10,06 \pm 5,04$	4	n. s.
100	$1,50 \pm 0,37$	$3,36 \pm 6,30$	4	n. s.

#### **Legende zu Tabelle 11:**

fc = arithmetisches Mittel der Kontraktionskraft

SEM = Standardfehler in mN

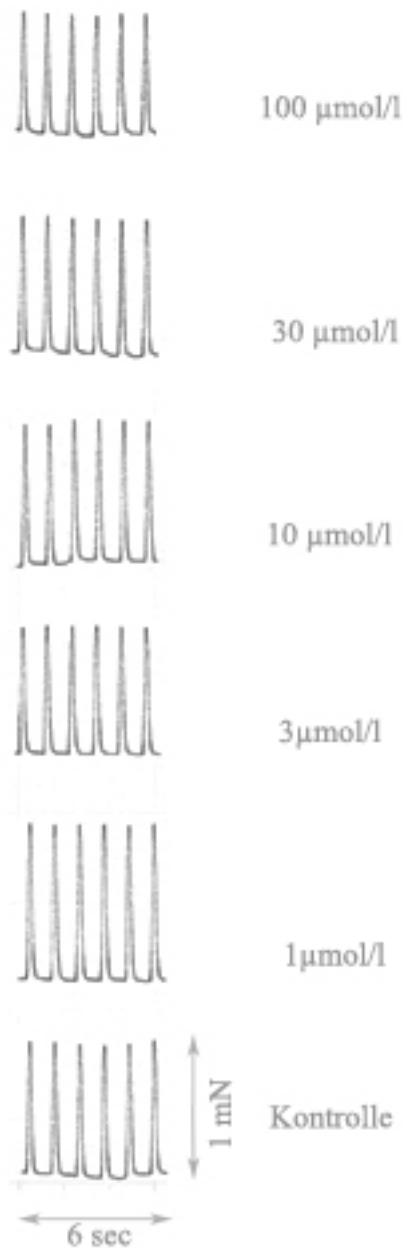
**Abbildung 22: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG47 bei Musculi papillares**



**Legende zu Abbildung 22:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG47 bei Musculi papillares. Die y-Achse zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%), die x-Achse die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l. Die einzelnen Punkte markieren die Mittelwerte der Änderung der Kontraktionskraft. Die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte zeigen die dazugehörigen Standardfehler an.

**Abbildung 23: Gescannte Kurven der Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von WHG47**



**Legende zu Abbildung 23:**

Die Aufnahme zeigt die Änderung der Kontraktionskraftamplitude nach Zugabe der Testsubstanz WHG47 verschiedener Konzentrationen in Intervallen von 45 Minuten.

### 3.2.6. Auswertung von Atrium dexter

Bei den Versuchen wurde auf eine Änderung der Chronotropie geachtet, nachdem die Testsubstanz WHG47 kumulativ zugegeben wurde.

Die Schlagfrequenz wurde aufgezeichnet und danach gezählt.

### 3.2.7. Wirkung von WHG47 auf Atrium dexter

Der Mittelwert der Kontrollwerte nach fünf Versuchen lag bei  $209 \pm 4,3$  Schlägen pro Minute und entsprach somit 100 %. Sämtliche, nach kumulativer Zugabe einzelner Testkonzentrationen, gemessenen Schlagfrequenzen, lagen über dem gemessenen Kontrollwert. Ihr Maximum lag nach 30  $\mu\text{mol/l}$  bei einer Schlagfrequenz von  $239 \pm 4,30$  Schlägen pro Minute, was  $14,53 \pm 2,95$  % entsprach.

**Tabelle 12: Wirkung von WHG47 auf Atrium dexter**

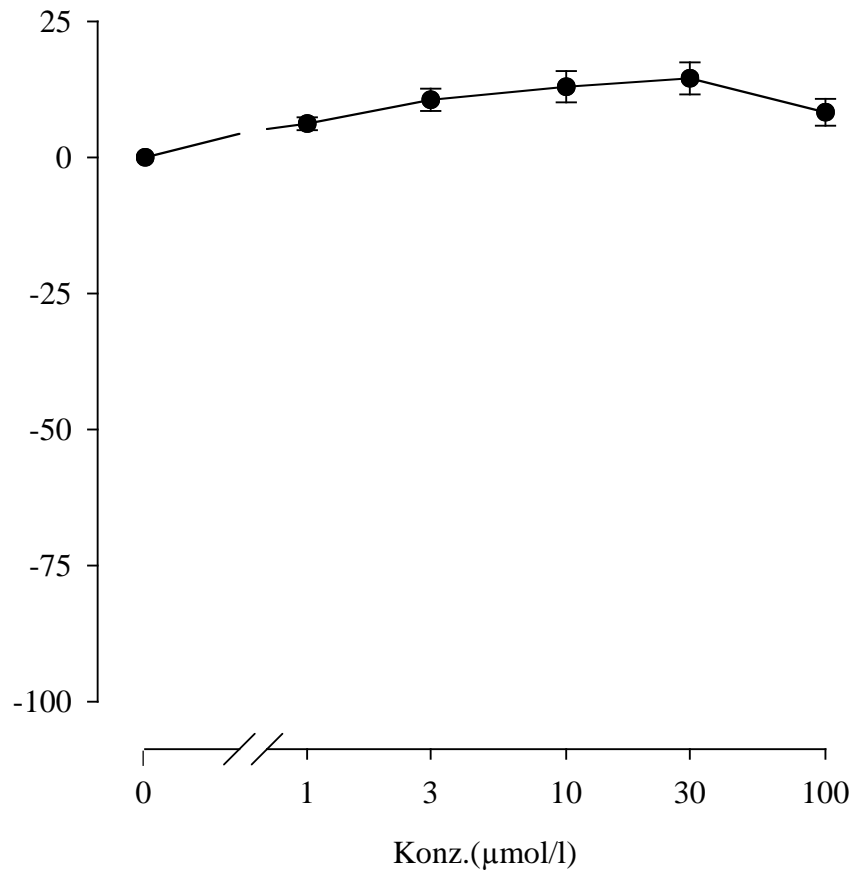
<b>WHG47 Atrium dexter</b>				
$\mu\text{mol/l}$	f +/- SEM	f +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$209 \pm 4,3$	$0 \pm 0$	5	-
1	$222 \pm 5,61$	$6,20 \pm 1,18$	5	n. s.
3	$231 \pm 5,34$	$10,58 \pm 2,04$	5	n. s.
10	$236 \pm 6,40$	$13,00 \pm 2,87$	5	n. s.
30	$239 \pm 4,30$	$14,53 \pm 2,95$	5	n. s.
100	$226 \pm 3,32$	$8,29 \pm 2,47$	5	n. s.

**Legende zu Tabelle 12:**

f = Mittelwerte der Schlagfrequenz/ Minute

SEM = Standardfehler

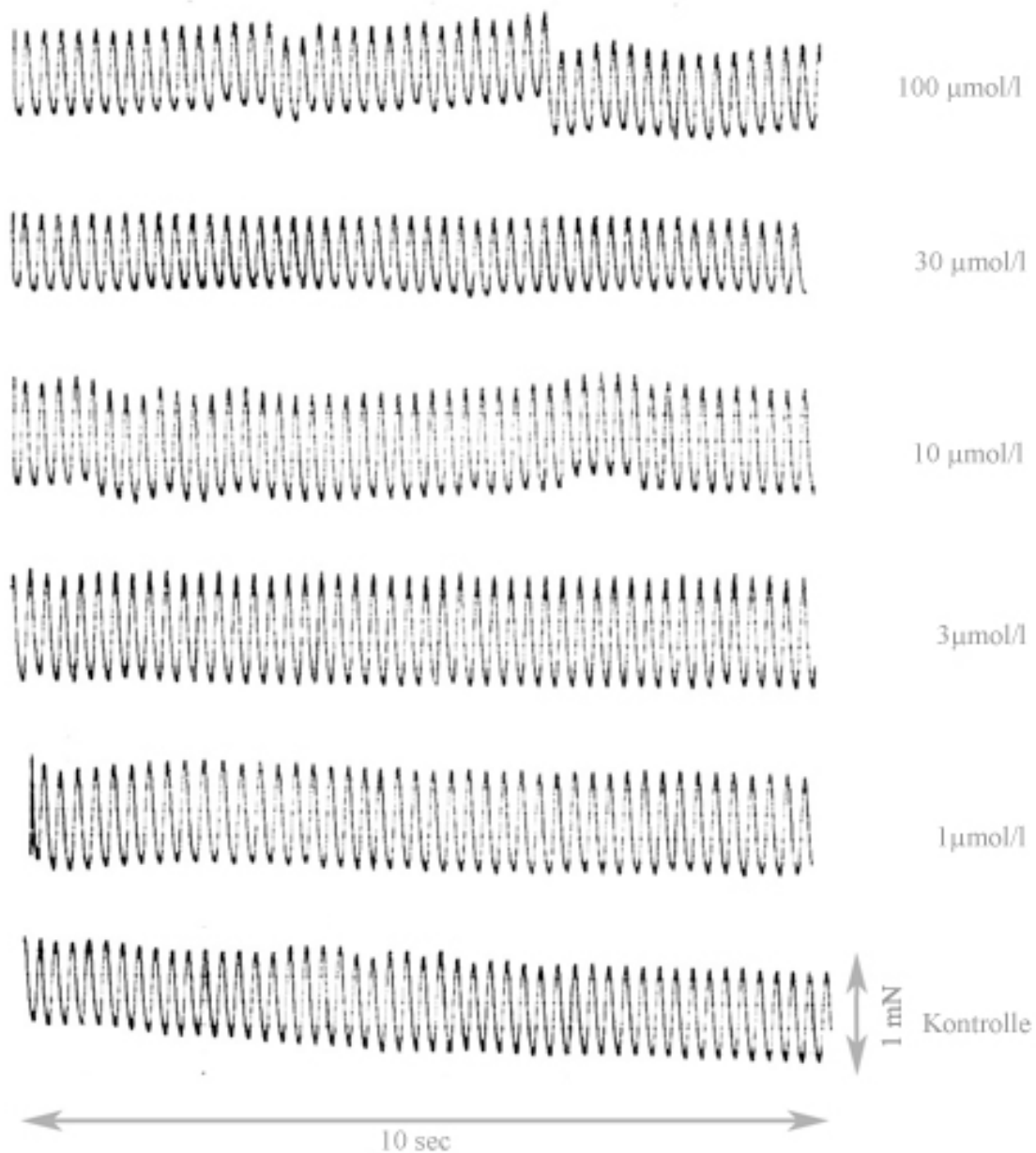
**Abbildung 24: Konzentrations- Wirkungskurve von WHG47 bei Atrium dexter**



**Legende zu Abbildung 24:**

Gezeigt wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz WHG47 bei Atrium dexter. Die Abszisse gibt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent (%) , die Ordinate die zugegebenen Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$  an. Die Punkte markieren die Mittelwerte der Kontraktionskraft, die Balken an Ober- und Unterseite dieser Punkte zeigen die dazugehörigen Standardfehler an.

**Abbildung 25: Gescannte Kurven der Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von WHG47**



**Legende zu Abbildung 25:**

Die Abbildung zeigt die Änderungen der Schlagfrequenz des Vorhofes nach Zugabe von WHG47 in Intervallen von 45 Minuten. Gemessen und aufgezeichnet wurde in Abständen von fünf Minuten über einen Zeitraum von zwölf Sekunden.



### ***3.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf isolierte Organe***

Als Lösungsmittel wurde bei den Versuchen Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Testsubstanzen verwendet. Zu beachten ist, dass DMSO selbst auch eine Wirkung auf die isolierten Organe besitzt und daher bei den erhaltenen Ergebnissen in die Berechnungen miteinbezogen werden muss, um exakte Werte zu erhalten.

Um den Einfluss von DMSO zu messen zu können, wurden die Versuche zunächst in adäquater Konzentration mit dem Lösungsmittel durchgeführt.

DMSO wurde, wie bei den Versuchen mit der Testsubstanz, je nach 45 Minuten kumulativ in den Testkonzentrationen  $1\mu\text{mol/l}$ ,  $3\mu\text{mol/l}$ ,  $10\mu\text{mol/l}$ ,  $30\mu\text{mol/l}$  und  $100\mu\text{mol/l}$  zugegeben.

### 3.3.1. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

DMSO verursacht bei einer Konzentration von 100 $\mu$ mol/l eine Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur von 100 % hin zu 97,09  $\pm$  1,03 %.

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

<b>DMSO Arteria pulmonalis</b>			
$\mu$ mol/l	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche
Kontrolle	8,43 $\pm$ 1,03	0 $\pm$ 0	3
1	8,62 $\pm$ 0,93	-2,72 $\pm$ 1,72	3
3	8,71 $\pm$ 0,85	-4,01 $\pm$ 3,05	3
10	8,69 $\pm$ 0,96	-3,39 $\pm$ 1,38	3
30	8,72 $\pm$ 0,98	-3,74 $\pm$ 1,24	3
100	8,66 $\pm$ 1,00	-2,91 $\pm$ 1,03	3

**Legende zu Tabelle 13:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO sowie Mittelwerte der Kontraktionsänderung mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) bei drei Versuchen.

### 3.3.2. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta

DMSO verursacht bei einer Konzentration von 100µmol/l eine Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur von 100 % hin zu 99,66 ±2,34 %.

**Tabelle 14: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Aorta**

<i>DMSO Aorta</i>			
µmol/l	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche
Kontrolle	9,78 ±2,14	0 ±0	3
1	10,00 ±2,23	-1,84 ±0,95	3
3	10,00 ±2,21	-1,93 ±0,91	3
10	9,95 ±2,20	-1,51 ±1,38	3
30	9,92 ±2,20	-1,08±2,46	3
100	9,83 ±2,15	-0,34 ±2,34	3

**Legende zu Tabelle 14:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche.

### 3.3.3. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft von *Ileum terminalis*

DMSO verursacht bei einer Konzentration von 100µmol/l eine Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur von 100 % hin zu  $80,65 \pm 4,26$  %.

**Tabelle 15: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft von *Ileum terminalis***

<b>DMSO <i>Ileum terminalis</i></b>			
<b>µmol/l</b>	<b>fc +/- SEM (mN)</b>	<b>fc +/- SEM (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche</b>
Kontrolle	30,54 ±10,19	0 ±0	3
1	30,26 ±10,18	-1,51 ±0,53	3
3	29,64 ±10,10	-4,56 ±1,92	3
10	29,09 ±10,28	-8,66 ±3,38	3
30	28,48 ±10,24	-11,59±3,65	3
100	28,83 ±10,12	-19,35 ±4,2	3

**Legende zu Tabelle 15:**

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche.

### 3.3.4. Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft der Musculi papillares

DMSO verursacht bei einer Konzentration von 100 $\mu$ mol/l eine Senkung der Kontraktionskraft von 100 % auf  $54,05 \pm 10,26$  %.

**Tabelle 16: Wirkung von DMSO auf die Kontraktionskraft von Musculi papillares**

<i>DMSO Musculi papillares</i>			
$\mu$ mol/l	fc +/- SEM (mN)	fc +/- SEM (%)	Anzahl der Versuche
Kontrolle	0,47 $\pm$ 0,06	0 $\pm$ 0	3
1	0,46 $\pm$ 0,08	-3,70 $\pm$ 3,70	3
3	0,43 $\pm$ 0,07	-10,42 $\pm$ 3,84	3
10	0,36 $\pm$ 0,05	-23,70 $\pm$ 90,82	3
30	0,29 $\pm$ 0,03	-73,40 $\pm$ 2,32	3
100	0,25 $\pm$ 0,02	-45,95 $\pm$ 10,26	3

**Legende zu Tabelle 16:**

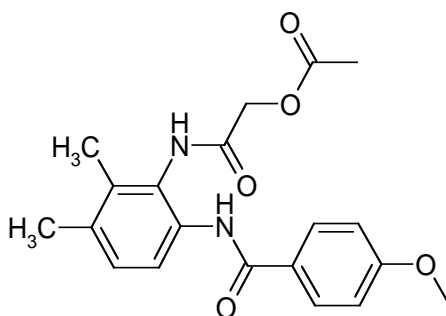
Die Tabelle zeigt die verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Mittelwerte der Kontraktionsänderungen mit Standardfehlern in mN und Prozent (%) sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Strukturen WHG41, WHG47 und Diltiazem

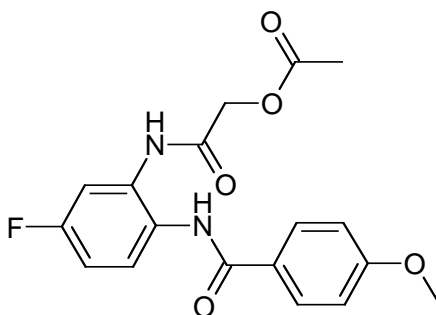
Abbildung 26: Strukturformeln der Testsubstanzen und von Diltiazem

WHG41



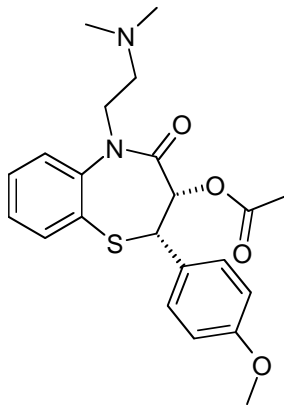
**WHG41:** 3-{6-[(4-methoxybenzoyl)amino]-2,3-dimethylphenyl}-2-oxoethylacetat

WHG47



**WHG47:** 3-{5-fluoro-2-[(4-methoxybenzoyl)amino]phenyl}-2-oxoethylacetat

## DILTIAZEM



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

WHG41 und WHG47 sind Dianilide und wurden von Diltiazem strukturell abgeleitet.

Dabei wurde der Thiazepinring des Diltiazems zwischen C2 und C3 geöffnet, und das Schwefelatom an einer Stelle durch ein Amid ersetzt. Der am Amid gebundene methoxyphenyl Rest ist gleich dem des Diltiazem. Die Ringöffnung führt zum Verlust der Chiralitätszentren an Position 2 und Position 3. Der dimethylaminoethyl-Rest des Diltiazems ist bei WHG41 und WHG47 nicht mehr vorhanden, die Seitenkette an N in Position 5 trägt einen 2-oxoethylacetat Rest.

WHG41 hat zwei methyl Gruppen in Position 2 und Position 3 des Dianilids. WHG47 trägt ein Fluor in Position 5 des Dianilids zur Erhöhung der Lipophilie.

#### ***4.2. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Arteria pulmonalis Präparaten***

Die Testsubstanzen WHG41 und WHG47 wurden an Arteria pulmonalis untersucht um eine Abnahme der Kontraktionskraft nachzuweisen. Diese wird als spasmolytisch erkannt.

WHG41 hatte als Kontrollwert nach fünf Versuchen bei 100% Kontraktionskraft  $23,48 \pm 3,33$  mN. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  ergab sich als Mittelwert der abgenommenen Kontraktionskraft  $-15,36 \pm 6,33$  mN. Ein  $\text{EC}_{50}$  wurde bei dieser Substanz nicht erreicht, die spasmolytische Wirkung war minimal.

WHG47 ergab als Mittelwert der Kontrollen nach fünf Versuchen  $12,29 \pm 1,50$  mN. Bei einer maximalen Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  ergab die Abnahme der Kontraktionskraft  $-18,01 \pm 1,43$  mN.

Wie schon bei WHG41 wurde eine stete Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet, die spasmolytische Wirkung war unter  $\text{EC}_{50}$ .

WHG47 wies eine stärkere Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis als WHG41 auf.

#### ***4.3. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Aorta Präparaten***

WHG41 hatte als Mittelwert der Kontrollwerte nach fünf Versuchen  $10,88 \pm 1,38$  mN. Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  wurde eine geringe Zunahme der Kontraktionskraft auf  $11,52 \pm 1,83$  beobachtet. Die Werte der weiteren Konzentrationen befanden sich leicht im positiven Bereich, was bei der Berechnung mittels Standardfehler auf eine Abnahme der Kontraktionskraft bei  $100\mu\text{mol/l}$  auf  $-0,42 \pm 2,48$  % führte. Eine spasmolytische Wirkung war sehr gering.



Bei WHG47 wurde ausgehend vom Mittelwert der Kontrollwerte, welcher  $8,65 \pm 1,65$  mN entsprach, eine Abnahme der Kontraktionskraft von  $7,05 \pm 1,57$  mN beobachtet. Das kam einer Abnahme von  $-18,62 \pm 7,62$  % gleich und war somit höher als bei WHG41. Bei beiden Testsubstanzen wurde  $EC_{50}$  nicht erreicht. Die Relaxation der glatten Muskulatur bei beiden Substanzen war minimal.

#### ***4.4. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Ileum terminalis Präparaten***

Bei den Ileum Präparaten wurde mit der Testsubstanz WHG41 ein  $EC_{50}$  erreicht. Der Mittelwert der Kontrollwerte betrug  $13,13 \pm 1,73$  mN. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  entsprach die Abnahme der Kontraktionskraft  $7,28 \pm 1,26$  mN und somit  $-54,02 \pm 6,12$ %. Eine spasmolytische Wirkung mit  $EC_{50}$  von  $87,5 \mu\text{mol/l}$  wurde erreicht. Die Testsubstanz WHG41 besitzt in ihrer Struktur kein Fluor Atom. Deshalb ist diese vermutlich besser auf die glatte Muskulatur wirksam.

WHG47 führte ebenso zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, ausgehend vom Mittelwert der Kontrollwerte  $9,62 \pm 1,67$  mN hin zu  $6,31 \pm 1,32$  mN, bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$ . Das entsprach  $-35,21 \pm 6,77$  %. Die Abnahme der Kontraktionskraft war nicht so schwerwiegend wie bei WHG41.

#### ***4.5. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Musculi papillares Präparaten***

An den isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchen wurde untersucht, ob WHG41 und WHG47 inotrope Wirkungen haben.

WHG41 ergab eine negativ inotrope Wirkung während WHG47 eine positiv inotrope Wirkung aufwies.

Bei WHG41 ließ sich eine Abnahme der Kontraktionskraft bei 1  $\mu\text{mol/l}$  erkennen, vom Mittelwert der Kontrolle  $1,28 \pm 0,25$  mN bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ . Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu einem kleinen Anstieg der Kontraktionskraft, der bei 100  $\mu\text{mol/l}$  wieder auf  $1,13 \pm 0,30$  mN sank. Ein Abwärtstrend der Kontraktionskraft war erkennbar, somit war WHG41 minimal negativ inotrop. Ein  $\text{EC}_{50}$  wurde allerdings nicht erreicht.

WHG47 zeigte eine positiv inotrope Wirkung im geringen Ausmaß von  $3,36 \pm 6,30$  %. Im Vergleich zu Diltiazem, das einen negativ inotropen Effekt mit  $\text{EC}_{50}$  bei  $\geq 5,0$   $\mu\text{mol/l}$  besaß (Erker et al. 1996), lagen WHG41 und WHG47 darunter. Grund ist, dass bei beiden Testsubstanzen kein  $\text{EC}_{50}$  erreicht wurde.

Vergleichend mit Verapamil, das einen negativ inotropen Effekt mit  $\text{EC}_{50}$  bei 0,27  $\mu\text{mol/l}$  aufwies (Buljubasic et al. 1991), konnten bei WHG41 und WHG47 keine  $\text{EC}_{50}$  Werte erreicht werden.

#### ***4.6. Vergleich der Wirkung von WHG41 und WHG47 an Atrium dexter Präparaten***

WHG41 zeigte eine negativ chronotrope Wirkung während WHG47 positiv chronotrop wirkte. Beide Wirkungen waren in einem sehr geringen Ausmaß zu beobachten und erreichten keinen  $\text{EC}_{50}$  Wert.

WHG41 hatte beim Mittelwert der Kontrollen  $243 \pm 11,90$  Schläge pro Minute. Nach einer kurzen Zunahme der Schläge pro Minute bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf  $249 \pm 12,39$  Schläge pro Minute sank Anzahl der Schläge auf  $210 \pm 6,32$  pro Minute ab. Die Abnahme entsprach somit  $-12,42 \pm 6,38$  %.

WHG47 steigerte die Anzahl der Schläge pro Minute von  $209 \pm 4,3$  als Mittelwert der Kontrollen auf  $226 \pm 3,32$  Schläge pro Minute, was einem Wert von  $8,29 \pm 2,47$ % entsprach.

Diltiazem besaß einen negativ chronotropen Effekt bei einem  $EC_{50}$  von  $\leq 0,8 \mu\text{mol/l}$  (Erker et al. 1996). WHG41 und WHG47 erreichten keinen  $EC_{50}$  Wert und wiesen keine vergleichbare Wirkung auf.

Verapamil hatte einen negativ chronotropen Effekt bei einem  $EC_{50}$  von  $8,0 \mu\text{mol/l}$  (Buljubasic et al. 1991), doch auch hier zeigten WHG41 und WHG47 keine vergleichbare Wirkung.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue synthetische Dianilide pharmakologisch untersucht. Bei den getesteten Substanzen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Die Testsubstanzen WHG41 und WHG47 wurden am Institut für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Untersucht wurden die Wirkungen von WHG41 und WHG47 an unterschiedlichen isolierten Organen von Meerschweinchen, die unter physiologischen Bedingungen in Organbädern mit den Testsubstanzen beschickt wurden.

Arteria pulmonalis-, Aorta- und Ileumpräparate dienten zur Beobachtung von Änderungen der Kontraktionskraft. Auf spasmolytische Eigenschaften wurde im Speziellen geachtet.

An Papillarmuskel- und Vorhofpräparaten wurden Veränderungen bezüglich inotropen sowie chronotropen Wirkungen untersucht, wobei Diltiazem und Verapamil, von der Struktur den Testsubstanzen ähnliche Calciumantagonisten, als Referenzsubstanzen herangezogen wurden.

An der glatten Muskulatur, Arteria pulmonalis, Aorta und terminalem Ileum konnten bei den getesteten Substanzen WHG41 und WHG47 kaum spasmolytische Wirkungen erkannt werden. Lediglich WHG41 erreichte bei Ileum terminalis einen  $EC_{50}$  Wert. Hier war eine spasmolytische Wirkung gegeben.

WHG41 erwies sich als negativ inotrop sowie in minimalem Ausmaß negativ chronotrop. WHG47 zeigte eine positiv inotrope und positiv chronotrope Wirkung. Die inotropen und chronotropen Wirkungen lagen jedoch unter der  $EC_{50}$  Schwelle.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

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

**Campbell NA (2000).** Biologie; Heidelberg, Berlin, Oxford; Spektrum Akademischer Verlag, S.166

**Catterall WA (2000).** Structure and regulation of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels  
*Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000/16:521-55.

**Dolphin AC.** A short history of voltage-gated calcium channels.  
*Br J Pharmacol.* 2006 Jan; 147 Suppl 1: 56-62.

**Erker T, Laimer I, Huck S, Boehm S, Studenik C, Heistracher P. (1996).** Synthesis and calcium antagonistic activity of 8-[N-[2-(3,4-dimethoxy- phenyl)ethyl]-beta-alanyl]-5,6,7,8-tetrahydrothieno[3,2-b][1,4]thiazepine fumarate.  
*Arch Pharm (Weinheim).* 1996 Jul; 329(7):347-51.

**Fleckenstein A.** History of calcium antagonists.  
*Circ Res.* 1983 Feb; 52(2 Pt 2):13-16.

**Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1992).** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, S.346

**Gangong WF (1979).** Lehrbuch der Medizinischen Physiologie, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S.60

**Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1986).** Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells.

J Gen Physiol. 1986 Sep; 88 (3): 293-319

**Hille B (1984).** Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates INC. Publishers Sunderland, Massachusetts p 1

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

**Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001).** Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Germany, S.66/525/559-560

**Martonosi AN, Pikula S.** The network of calcium regulation in muscle.

Acta Biochim Pol. 2003; 50 (1):1-30

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

**Silbernagel S, Despopoulos A (1988).** Taschenatlas der Physiologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany S.14-15/ 164

## 7. CURRICULUM VITAE

<i>Name</i>	Wilhelm Wulz
<i>Geburtsdatum</i>	10. Oktober 1979, Salzburg
<i>Eltern</i>	Mag. pharm. Wolfram Wulz, Apotheker Mag. pharm. Edith Wulz, Apothekerin
<i>Geschwister</i>	Monika Netterfield Mag. pharm. Birgit Wulz-Loimer
<i>1986 – 1990</i>	Volksschule Siezenheim bei Salzburg
<i>1990 – 1998</i>	Akademisches Gymnasium, Europagymnasium, Salzburg
<i>1999</i>	Allgemeiner Wehrdienst beim Bundesheer, Schwere Jägerkompanie Tamsweg und Militärkommando Salzburg
<i>1999 - 2008</i>	Pharmaziestudium Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Wien