



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchung der Wirkung von WHG 56T an verschiedenen isolierten Präparaten von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.pharm.)

Verfasser: Mona Sabry El Tahan
Matrikel-Nummer: 0448555
Studienrichtung/Studienzweig
(lt. Studienblatt): Pharmazie
Betreuer: Christian Studenik

Wien, März 2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Diplomarbeit unterstützt und begleitet haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für seine Betreuung während der gesamten Diplomarbeit bedanken. Seine Hilfsbereitschaft und Geduld ermöglichte mir ein angenehmes und motiviertes Arbeiten.

Weiters möchte ich mich bei Herrn Peter Höflich bedanken, der uns jederzeit bei allen labortechnischen Problemen hilfreich zur Seite stand.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich zu jeder Zeit motiviert haben mein Studium abzuschließen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Beeinflussung der Reizbildung und Erregungsleitung im Herzen	6
1.2	Aktionspotential	8
1.3	Ionenkanäle	10
1.3.1	Natriumkanal	11
1.3.2	Calcium und Calciumkanäle	12
1.3.3	Calciumantagonisten	16
1.3.4	Kaliumkanäle	18
1.4	Einfluss des vegetativen Nervensystems.....	21
1.4.1	Parasympathikus.....	21
1.4.2	Sympathikus	22
1.5	Ätiologie und Pathogenese von Herzrhythmusstörungen	23
2	Material und Methoden	26
2.1	Versuchstiere.....	26
2.2	Entnahme und Präparation der Organe	26
2.2.1	Isolierung des terminalen Ileum.....	26
2.2.2	Isolierung der Arteria pulmonalis	27
2.2.3	Isolierung des rechten Vorhofs	27
2.2.4	Isolierung der rechten Papillarmuskeln.....	27
2.2.6	Isolierung der Aorta	28
2.3	Physiologische Nährlösung:	28
2.3.1	Physiologische Nährlösung für den rechten Vorhof,den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum.	29
2.3.2	Physiologische Nährlösung für Aorta	29

2.4	Versuchsordnung:	30
2.5	Versuchsapparatur	30
2.5.1	Versuchsapparatur A	31
2.5.2	Versuchsapparatur B	34
2.5.3	Kraftwandler	35
2.5.4	Gasversorgung	35
2.7	Versuchsablauf	36
2.7.1	Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis	36
2.7.2	Versuchsablauf bei Aorta	36
2.7.3	Versuchsablauf bei rechten Vorhöfe	36
2.7.4	Versuchsablauf bei terminalen Ilea	37
2.7.5	Versuchsablauf bei Papillarskel	37
2.8	Auswertung	38
2.8.1	Auswertung der Versuchsreihe mit rechten Vorhöfen	38
2.8.2	Auswertung der Versuchsreihe mit Papillarmuskeln	38
2.8.3	Auswertung der Versuchsreihe mit Aorta, terminalem Ileum und Arteria pulmonalis	38
2.8.4	Statistik	39
2.8.5	Substanzen und Löslichkeit	39
3	Ergebnisse:	40
3.1	Wirkungen der Testsubstanz WHG 56T auf isolierten Organe von Meerschweinchen	40
3.1.1	Wirkung auf das terminale Ileum	40
3.1.2	Wirkung auf die Aorta	43
3.1.3	Wirkung auf die Arteria pulmonalis	46

3.1.4	Wirkung auf rechte Vorhöfe.	49
3.1.5	Wirkung auf den Papillarmuskel.....	52
4	Diskussion.....	55
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis.....	58
7	Lebenslauf.....	62

1 Einleitung

1.1 *Beeinflussung der Reizbildung und Erregungsleitung im Herzen*

Das Herz besitzt zwei Typen von Herzmuskelzellen: Zellen, die Impulse bilden und weiterleiten und Zellen, die solche Impulse mit einer Kontraktion beantworten; letztere stellen die Arbeitsmuskulatur des Herzens, das Myokard, dar. Der Reiz(Impuls-)bildung geschieht innerhalb des Organs, was als Autorhythmie oder Automatie des Herzens bezeichnet wird.

Das Herz gehört zu den rhythmisch arbeitenden Organen. Es ist dazu durch sein Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem befähigt. Daneben greifen Sympathikus und Parasympathikus regulierend in die Herztätigkeit ein, ohne sie primär auszulösen. Selbstständige rhythmische Erregungsbildung des Herzens ohne Einwirkung eines äußeren Reizes wird als kardiale Autorhythmie oder Herzautomatismus bezeichnet.

Ein überschwelliger Reiz des Herzens führt nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz aufgrund der funktionellen Einheit der Herzmuskelzellen zu einer vollständigen Erregung und Kontraktion.

Die Reizbildung des Herzens erfolgt normalerweise im Sinusknoten; er ist der physiologische Schrittmacher des Herzens und bestimmt den Abstand zwischen zwei Aktionspotentialen (= Herzfrequenz 60-80/min). Bei Ausfall des Sinusknotens übernehmen der Atrioventrikularknoten und die Purkinje-Fasern die Schrittmacherfunktion und werden deshalb als potentielle oder subsidiäre Schrittmacher bezeichnet.

Die Zellen des Sinusknoten im rechten Vorhof haben die Funktion eines physiologischen Schrittmachers, da dort im regelmäßigen Intervallen (in Ruhe 0,71s) eine elektrische Erregung gebildet wird. Sie erreicht über die Vorhofmuskulatur rasch den Atrioventrikulären (AV-)Knoten. Er ist der einzige Überleitungsweg zwischen Vorhöfen und Ventrikeln. Die Weiterleitung durch den AV-Knoten erfolgt stark verzögert, sie erfordert ca. 0,16 s. Dadurch entsteht eine Siebwirkung, d. h. Aktionspotentiale von sehr hoher Frequenz können den AV-Knoten nicht passieren.

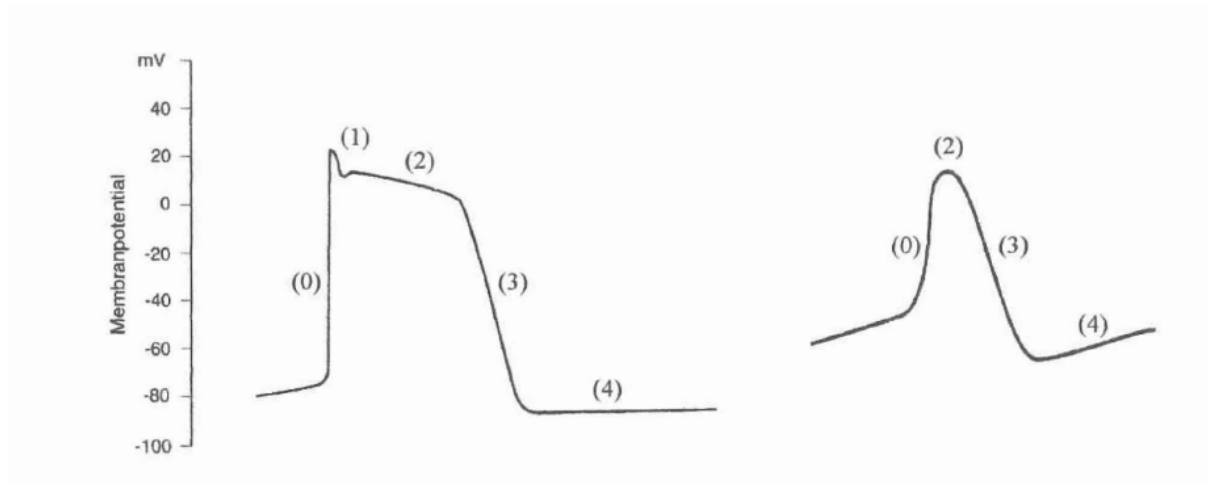
Von dort gelangt die Erregung über die beiden Tawara-Schenke I des Hiss-Bündels und deren fächerförmige Aufzweigung (Purkinje-Fasern) in die Kammermuskulatur. Insgesamt ist die Aktivierung der gesamten Muskulatur beider Ventrikel in weniger als 0,1 s abgeschlossen.

AV-Knoten und Purkinje-Fasern treten erst bei Ausfall eines übergeordneten Schrittmachers in Aktion und werden als potentielle oder subsidiäre Schrittmacher bezeichnet. Dieses Erregungsleitungssystem besonders glykogenreicher Herzmuskelzellen, durch das die infolge spontaner Erregungsbildung rhythmisch ausgelösten Aktionspotentiale (Membranpotentialänderung) fortgeleitet werden, ist für eine synchrone und hämodynamisch effektive Kontraktion des Herzmuskels verantwortlich (Forth et al. 1996).

1.2 Aktionspotential

Die Veränderungen des Membranpotentials während einer Herzaktion (Aktionspotential) resultieren aus Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen verschiedener ionaler Einwärts- und Auswärtsströme.

Abbildung 1: Aktionspotentiale von Papillarmuskel und Sinusknoten



Das Aktionspotential setzt sich aus fünf Phasen zusammen:

Beginnend mit Phase 0 erfolgt bei Papillarmuskeln und Purkinje-Fasern eine schnelle Depolarisation (Aufstrichphase). Ein Reiz depolarisiert die Zelle bis zu einem Schwellenpotential, bei dem sich die Natriumkanäle schlagartig öffnen und so das Aktionspotential steil ansteigt. Bei Schrittmacherzellen (Sinusknoten, AVKnoten) liegt der Natriumkanal im inaktiven Zustand vor; die Phase 0 (langsame Depolarisation) wird in diesen Zellen durch den Einstrom von Ca^{2+} getragen. In Phase 1, einer transienten unvollständigen Repolarisation, schließen die Natriumkanäle wieder blitzartig; das Aktionspotential fällt leicht ab und ein kurz anhaltender Kaliumausstrom verursacht eine Kerbe in der Kurve.

Während Phase 2 erreicht der nach Phase 0 zunehmende Einstrom von Ca^{2+} seinen Höhepunkt und hält - im Gleichgewicht mit einem geringen Kaliumausstrom - das Potential auf einem Plateau. Diese Plateauphase ist das Charakteristikum des myokardialen Aktionspotentials.

Der Ca^{2+} -Einstrom fließt durch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle, die langsamer als Natriumkanäle inaktiviert werden, und führt auch gleichzeitig zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Zur leichten Repolarisation während dieser Phase trägt ein Kaliumkanal bei, der sich bei Depolarisation langsam öffnet "delayed rectifier".

Die Phase 3 repräsentiert die Repolarisation und ist für die Wiederherstellung des Ruhezustandes verantwortlich. Die eigentliche Repolarisation ist auf einen repolarisierenden Kaliumausstrom zurückzuführen und setzt sich aus zwei Kaliumströmen zusammen; aus dem "delayed rectifier" (I_d , der die initiale Phase der Repolarisation bestimmt, und einem "inward rectifier" (I_{KI}), der durch Depolarisation abgeschaltet wird, sich aber bei zunehmender Repolarisation wieder öffnet.

Während des gesamten Aktionspotentials ist die Membran depolarisiert und damit vor einem weiteren depolarisierenden Reiz geschützt - sie ist refraktär. Während der Phase 4 besteht ein Ruhemembranpotential (-80 bis -90 mV), welches durch I_{KI} aufrechterhalten wird. An allen Zellen, die zur spontanen Impulsbildung fähig sind (Sinusknoten, AV-Knoten, Papillarmuskel) herrscht in der Phase 4 eine langsame Depolarisation, die durch einen langsam abnehmenden Kaliumauswärtsstrom (I_K), einen Calcium-Einwärtsstrom (T-Typ) und einen nicht selektiven Na^+/K^+ -Einwärtsstrom ("funny current" I_f) verursacht wird (Carmeliet 1990).

1.3 Ionenkanäle

Verantwortlich für die Erregungsleitung im Herzen ist ein Membranpotential, das sich unidirektional ausbreitet. Das jeweils transmembranäre Potential einer Zelle wird bestimmt durch die Konzentration verschiedener Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ auf beiden Seiten der Membran und durch die Membranpermeabilität für jedes dieser Ionen. Sie passieren die Membran durch ionenselektive Kanäle; dabei handelt es sich um transmembranäre Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und zusammen eine Pore bilden. Kanäle sind nicht nur ionenselektiv sondern auch selektiv bezüglich des Mechanismus, der ihre Öffnung auslöst; so werden spannungsabhängige Kanäle von ligandengesteuerten Kanälen unterschieden, die durch Bindung eines Transmitters reguliert werden.

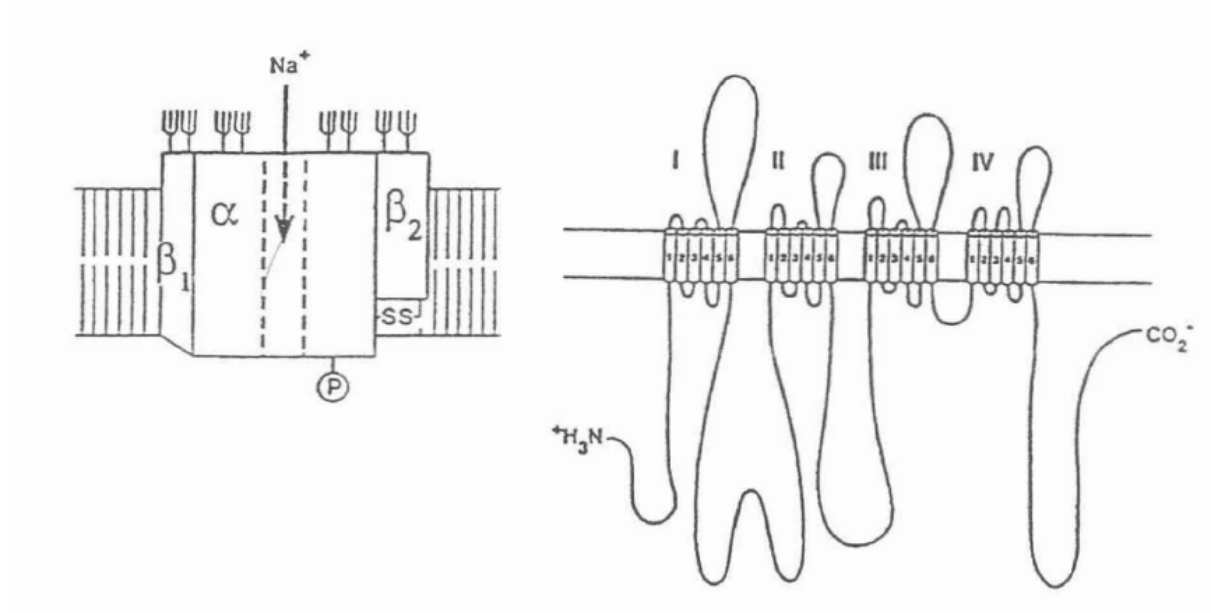
Ionen passieren Kanäle durch Diffusion; das heißt Grundvoraussetzung für jeden Ionenfluß ist eine Konzentrationsdifferenz auf beiden Seiten der Membran. Während des Ruhepotentials herrscht im extrazellulären Raum ein positives und im intrazellulären Raum ein negatives Potential. Im Extrazellularraum ist Na^+ das quantitativ wichtigste Kation, im Intrazellularraum hingegen K^+ . Natrium- und Calcium-Ströme fließen immer ins Zellinnere; Kaliumströme sind Auswärtsströme. Wenn Ionen fließen lassen sie eine gegensinnige Ladung zurück und es entsteht ein elektrischer Gradient.

Entgegen dem Konzentrationsgefälle werden die Ionen über Ionenpumpen transportiert (aktiver Transport). Die notwendige Transportenergie wird über die Spaltung von Adenosintriphosphat verfügbar.

Die Na^+/K^+ -Austauschpumpe (pump-current) pumpt eingeströmtes Na^+ wieder aus der Zelle hinaus und ausgeströmtes K^+ wieder ins Zellinnere zurück; dabei werden 3 Natriumionen gegen 2 Kaliumionen transportiert. Für den Auswärtstransport von Calcium ist ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus (exchange current) verantwortlich, der 3 Natriumionen gegen 1 Calciumion transportiert (Forth et al. 1996).

1.3.1 Natriumkanal

Abbildung 2: Modell des Natriumkanals und Struktur der α -Untereinheit



Der Natriumkanal besteht aus drei Polypeptiduntereinheiten (α , β_1 , β_2), die gefaltet in der Phospholipidmembran der Zelle liegen. Die α -Untereinheit stellt den eigentlichen Kanal dar. Die Kanalpore wird aus vier identischen Domänen, welche aus je sechs transmembranären α -Helix-Segmenten bestehen, gebildet. Die einzelnen Segmente sind über Schleifen aus Aminosäuren verbunden; die Schleifen zur Außenseite bilden ein Selektivitätsfilter, die Schleifen zur Innenseite bilden Gates (rn-Gate: Aktivierungsgate, h-Gate: Inaktivierungsgate).

Während der Ruhephase des Aktionspotentials liegt der Natriumkanal im "ruhenden Zustand" (rn-Gate geschlossen, h-Gate offen) vor, wobei die Schleifen die Kanalpore verschließen. Durch Depolarisation öffnet die Kanalpore und der Kanal geht in den "offenen Zustand" (rn- und h-Gate offen) über, was der Aufstrichphase im Aktionspotential entspricht. Gleich darauf schließt das h-Gate den Kanal; in diesem "inaktiven Zustand" (rn-Gate offen, h-Gate geschlossen) ist der Kanal durch eine erneute Depolarisation nicht aktivierbar. Der Kanal ist refraktär. Mit fortschreitender Repolarisation geht der Kanal wieder in den "ruhenden Zustand" über und es kann eine erneute Depolarisation ausgelöst werden (Forth et al. 1996).

Papillarmuskeln und Purkinje-Fasern haben eine schnelle Depolarisationsrate. Die schnelle Depolarisation wird durch Aktivierung des Natriumkanals ausgelöst. Bei Schrittmacherzellen (Sinusknoten, AV-Knoten), welche eine langsame Depolarisationsrate aufweisen, liegt der Natriumkanal im "inaktiven Zustand" vor. Tetrodotoxin (Gift des Kugelfisches) blockiert selektiv den spannungsabhängigen Natriumkanal und verhindert dadurch eine Depolarisation. Batrachotoxin (Gift des Pfeilgift-Frosches) öffnet den spannungsabhängigen Natriumkanal indem es selektiv und irreversibel an das h-Gate bindet (Forth et al. 1996).

1.3.2 Calcium und Calciumkanäle

Der menschliche Körper enthält etwa 1000 g Calcium davon sind ca. 99% in Form von Apatit (natürlich vorkommendes Mineral aus mind. 90% Calciumfluoridphosphat) im Skelett gebunden. Neben der wichtigen Funktion, die es hierbei beim Knochenaufbau erfüllt, spielt es in zahlreichen anderen physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle.

Ca^{2+} -Ionen wirken bei allen Muskeltypen als Aktivatoren, indem sie die Spaltung von Adenosintriphosphat und damit eine Umwandlung von chemischer Energie in Kontraktion induzieren. Calcium stellt einen der wichtigsten Botenstoffe der Zelle dar: es befördert positive Ladungen durch spezielle Kanäle der Zellmembran, sog. Calciumkanäle, und bewirkt dadurch eine Zellmembrandepolarisation.

Calciumkanäle sind entwicklungsgeschichtlich eine Eigenschaft erregbarer Zellen, die meist schon vor den Na^+ -Kanälen vorhanden war. Diese Kanäle, die den Einstrom von Calciumionen kontrollieren, bestehen aus Glycoproteinen, die in die Lipidschicht der Membran eingebettet sind (Curtis und Catterall, 1985). Im Gegensatz zu anderen, beispielweise Na^+ -Kanälen, haben sie keine konstante Form, sie variieren vielmehr in ihrer Leitfähigkeit, Potentialabhängigkeit und bei Inaktivierungsprozessen wie Blockaden durch Ionen (z.B. Cd^{2+} oder Ni^{2+}), Calciumantagonisten oder Toxinen.

Mit Hilfe der "patch-clamp-Methode" konnten verschiedene Calcium-Kanaltypen gefunden werden (Hamill et al., 1981). In manchen Kanälen wurde vorübergehender, kurzer Calciumeinstrom beobachtet. Diese erhielten den Namen T-Typ. andere Kanäle zeigten wiederum einen langandauernden Einstrom. diese wurden L-Typ-Calciumkanäle genannt (Reuter, 1986).

Calciumkanäle lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: in spannungsabhängige Kanäle, die das Einströmen von extrazellulärem Calcium ermöglichen und in Kanäle, die zur Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol dienen (Winifred 1992).

Spannungsabhängige Calciumkanäle werden durch Veränderungen des transmembranären Potentials gesteuert. Der Calciumkanal im sarkoplasmatischen Retikulum wird entweder elektrisch oder durch Calcium aktiviert.

Weiters gibt es auch noch rezeptorgesteuerte Calciumkanäle, die unter der Kontrolle von Liganden stehen. In manchen Kanälen wurde ein vorübergehender, kurzer Calciueinstrom beobachtet - sie erhielten den Namen T-Typ ("transient-type"); andere zeigten einen lang andauernden Einstrom - sie würden Calciumkanäle vom L-Typ ("long lasting-type") genannt (Reuter 1986).

Heute werden die spannungsabhängigen Calciumkanäle (VGCC) in vier Untergruppen eingeteilt und als L-, T-, N- und P-Typ-Calciumkanäle bezeichnet (Tsien et al. 1988). Sie unterscheiden sich durch Leitfähigkeit und Schwellenpotential.

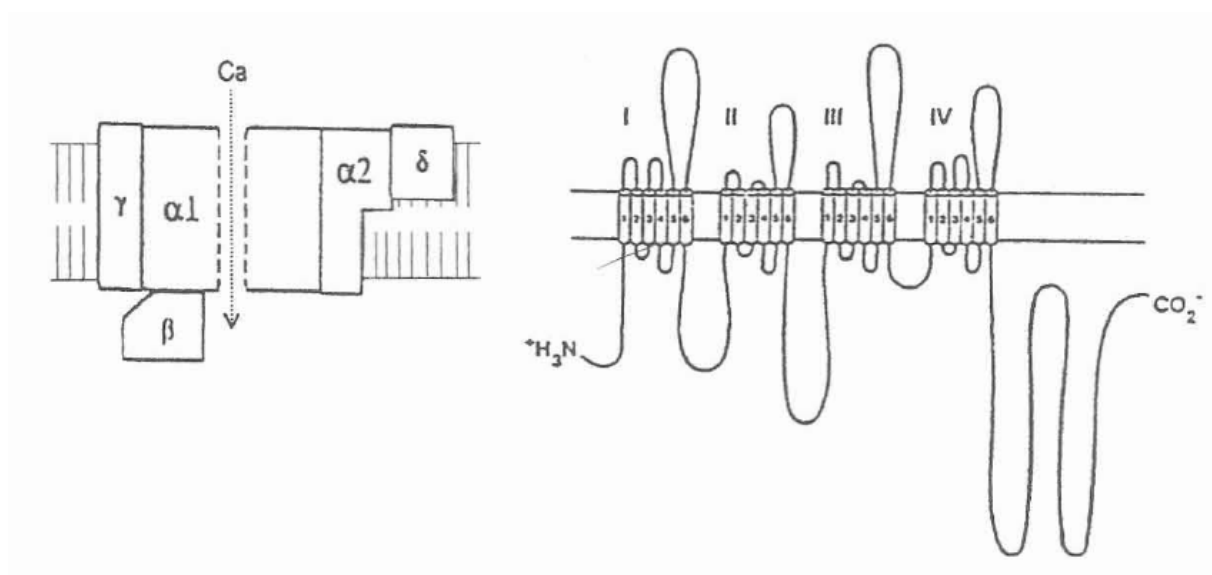
So benötigen etwa Calciumkanäle vom L- und N-Typ starke Membrandepolarisation für ihre Aktivierung, während sich andere schon bei einer geringeren Membrandepolarisation öffnen. Die Leitfähigkeit ist ein Maß für die Durchlässigkeit, mit der ein bestimmtes Ion einen Kanal passieren kann; sie ist bei Kanälen vom L-Typ für Calcium hoch (etwa 25 pS), nimmt bei N-Typ (12-20 pS) und bei P-Typ (10-12 pS) ab und ist beim TTyp (etwa 8 pS) am niedrigsten. Auch die Ionenselektivität ist bemerkenswert; so können beispielsweise Calciumionen etwa hundert mal besser Calciumkanäle passieren als Natriumionen. Bei Abwesenheit von Calciumionen können aber auch Natriumströme durch diesen Kanal fließen, wobei bereits mikromolare Calciumkonzentrationen diesen Durchstrom stoppen (Tsien et al. 1987).

Der L-Typ Calciumkanal ist während der Plateauphase des Aktionspotentials sowie für die langsame Depolarisation von Schrittmacherzellen (Sinusknoten, AV-Knoten) von Bedeutung. Weiters spielt er bei pathophysiologischen Vorgängen, wie zum Beispiel beim Auftreten von frühen Nachdepolarisationen, eine Rolle. Den T-Typ Calcium Kanal findet man in Schrittmacherzellen, weil er an der langsame diastolische Depolarisation beteiligt ist.

T- und L-Typ des Calciumkanals haben Triggerfunktion für die Kontraktion, da sie indirekt die Öffnung des Calciumkanals im sarkoplasmatischen Retikulum bewirken; ob der SR-Ca-Kanal öffnet oder nicht hängt von der Calcium- und ATP Konzentration in der Zelle ab. P- und N-Typ

Calciumkanäle findet man vor allem in Nervenzellen, wo sie für die Neurotransmitter Freisetzung bedeutsam sind.

Abbildung 3: Modell des L-Typ Calciumkanals und Struktur der α -Untereinheit



Der spannungsabhängige Calciumkanal vom L-Typ besteht insgesamt aus fünf Polypeptiduntereinheiten (α I, α 2, β , γ , δ). Die α -Untereinheit ist ähnlich der α -Untereinheit des Natriumkanals aufgebaut; sie kleidet die Innenseite des Kanals aus und besteht aus vier homologen Domänen mit je sechs transmembranären Segmenten (S1 - S6). S4 weist in jeder dritten oder vierten Position der Aminosäuresequenz eine positiv geladene Aminosäure (Lysin, Arginin) auf, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um einen Spannungssensor handelt. Der β -Komponente obliegt die Regulation der spannungsabhängigen Kinetik. Die transmembranären Segmente sind durch extra- und intrazelluläre Aminosäureschleifen verbunden; diese Schleifen bilden nach außen hin ein Selektivitätsfilter und nach innen Gates.

Im Ruhezustand ist das L-Typ-VGCC-Protein aufgeladen, phosphoryliert (an der α -Untereinheit) und damit aktivierbar. Durch Depolarisation wird es aktiviert – der Kanal wird geöffnet – und geht dann in den inaktiven, dephosphorylierten und geschlossenen Zustand über.

Die L-Kanäle sind die Zielstrukturen der therapeutisch eingesetzten Calciumkanalblocker (Calciumantagonisten). Die Bindungsstellen der klassischen Calciumantagonisten – wie

Dihydropyridine (z.B. Nifedipin), Phenylalkylamine (z.B. Verapamil) und Benzothiazepine (z.B. Diltiazem) - sind an der α -Untereinheit lokalisiert (Catterall und Striessnig 1992).

Calciumantagonisten hemmen den transmembranären Calciumeinstrom durch die L-Typ-Kanäle, ohne gleichzeitig Natriumströme deutlich zu beeinflussen (Fleckenstein et al. 1967). Durch die daraus resultierende Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration transformiert die Ca^{2+} -abhängige myofibrilläre ATPase im Augenblick der Erregung weniger phosphatgebundene Energie in mechanische Arbeit, wodurch es zur Senkung der Kontraktionskraft (negativ inotrope Wirkung) und des Sauerstoffbedarfs kommt.

Die negativ chronotrope Wirkung lässt sich dadurch erklären, dass auch die Membranen der Schrittmacherzellen des Sinus- und AV-Knotens über ein Calciumtransportsystem verfügen, sodaß Calciumantagonisten sowohl die Aktivität nomotoper Autonomiezentren als auch die Erregungsleitung hemmen (Fleckenstein und Grün 1996). Phenylalkylamine und Benzothiazepine (quartäre Stickstoffverbindungen) scheinen schnelleren Zugang zu ihrer Rezeptorstruktur zu bekommen, wenn sich der Kanal häufig öffnet. Es ist daher wahrscheinlich, daß ihre Rezeptorstruktur auf der intrazellulären Seite des Kanalproteins liegt. Ihre Wirkung ist potentialabhängig und frequenzabhängig. Sie wirken umso besser, desto stärker die Zellmembran depolarisiert ist und ihre Wirkung nimmt mit steigender Herzfrequenz zu (Fleckenstein und Grün 1994).

Im Gegensatz dazu binden Dihydropyridine mit hoher Affinität an den inaktiven (geschlossenen) Kanal, was darauf schließen lässt, dass ihre Rezeptorstruktur auf der extrazellulären Seite des Kanalproteins liegt. Sie sind in ihrer Wirkung weder von der Herzfrequenz noch vom Membranpotential abhängig (Lydtin und Trenkwalder 1988).

Dihydropyridine können die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des L-Typ Calciumkanals, je nach ihrer Struktur, hemmen oder fördern. Nifedipin hemmt die Öffnung des Kanals, während ein Enantiomer von Bay K 8644 die Öffnungswahrscheinlichkeit des Calciumkanals erhöht. Dieses Enantiomer von Bay K 8644 wird als Calciumkanal-Agonist (Ca^{2+} -Kanal-Aktivator) bezeichnet.

1.3.3 Calciumantagonisten

Calciumantagonisten sind Substanzen, die spezifisch und vorhersehend den langsamen Einwärtsstrom von Calciumionen hemmen. Andere Effekte, wie zum Beispiel eine Hemmung des raschen Natriumeinstroms, dürfen im Vergleich dazu keine Rolle spielen (Fleckenstein 1984).

Calciumantagonisten imitieren dabei die Wirkung eines Calciummangels oder Entzugs. Demzufolge lassen sich die Wirkung von Calciumantagonisten durch eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bis auf wenige Ausnahmen aufheben (Lydtin und Trenkwalder 1988).

Die Steuerung der myokardialen Kontraktilität beruht auf elektromechanischen Kopplungsprozessen, wobei Calciumionen als Mittlersubstanz zwischen Membranerregung und intrazellulärer Myofibrillenverkürzung fungieren.

Der erste Schritt im Zuge der elektromechanischen Kopplungsreaktion besteht in einer Steigerung der Calciumpermeabilität der Sarkolemmembran im Augenblick der Erregung. Calciumionen dringen während der Dauer des Aktionspotentials ins Innere der Myokardfasern ein und lösen damit die letztlich zur Kontraktion führende Kettenreaktion aus. Durch eine Blockade des Calciumkanals durch Calciumantagonisten wird der Kontraktionskraft vermindert, was sich am besten am isolierten Herzmuskel nachweisen lässt (Singh et al. 1984)

Einteilung der Calciumantagonisten:

1. Verapamil-Gruppe:

mit vorherrschender Wirkung am Herzen auf Myokard und Erregungsleitungssystem.

Vertreter:

- Tiapamil
- Gallopamil
- Verapamil

2. Diltiazem -Gruppe:

Calciumantagonist mit Wirkung an der glatten Muskulatur bei gleichzeitiger Wirkung auf Myokard und Erregungsleitungssystem

Diltiazem ist ein Benzothiazepin-Derivat. Entscheidend für die biologische Aktivität ist die Alkylaminoalkyl-Substitution am Stickstoffatom. Die Substanz wurde Anfang 70er Jahre in Japan synthetisiert, ist nicht lichtempfindlich und in Wasser leicht, in Alkohol schwer löslich (Lydtin und Trenkwalder 1988).

3. Dihydropyridin-Gruppe

Sogenannte periphere Calciumantagonisten mit vorherrschender Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur.

Vertreter: Nifedipin, Nitrendipin, Nimodipin, Nisoldipin und Niludipin, Nicardipin, Felodipin

4. Andere Calciumantagonisten

- Piperazin-Gruppe Lidoflazin, Cinnarizin, Flunarizin
- Prenylamin
- Fendilin
- Perhexilin
- Etafenon
- Cyclandelat
- Bepridil

1.3.4. Kaliumkanäle

Man kennt heute ein breites Spektrum an Kaliumkanälen mit unterschiedlichen Strukturen, Funktionen und charakteristischen Verteilungen in verschiedenen Geweben. Die Kaliumkanäle werden in drei spannungsabhängige und vier agonistenabhängige ($IK_{(ACh)}$, $IK_{(ATP)}$, $IK_{(Na)}$, $IK_{(Ca)}$ -Kanäle eingeteilt. Spannungsabhängige Kaliumkanäle werden durch Veränderung des Membranpotentials geöffnet oder geschlossen (Robertson und Steinberg 1990, Adams und Nonner 1990).

Der IK_1 (inward rectifier channel) ist für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich. Er wird durch Hyperpolarisation aktiviert und bei Membrandepolarisation inaktiviert. Weiters besteht eine Abhängigkeit des Öffnungszustandes von der extrazellulären Kaliumkonzentration. Ist dies e hoch, muss eine positivere Membranspannung vorliegen, um einen Ionenstrom auslösen zu können. IK_1 ist im Sinusknoten nicht vorhanden.

Der I_K (delayed outward rectifier channel) setzt sich aus den Komponenten IK_s (slow), IK_r (rapid) und IK_{ur} (ultra rapid) zusammen und ist während der Repolarisationsphase wichtig. Er transportiert im geöffneten Zustand eine größere Kaliummenge zellauswärts. Nach der Aktivierung des Kanals durch Membrandepolarisation startet der Ionentransport zeitverzögert, steigt bei anhaltender Depolarisation rasch an und bleibt bestehen. Bei anhaltendem Depolarisationsreiz kommt es zu einer langsamen Inaktivierung; ein Prozess, der an Zellen mit Schrittmacherfunktion für die diastolische Depolarisation mitverantwortlich ist.

Der I_{TO} (transient outward rectifier channel) leitet die rasche Repolarisation der Purkinje-Fasern ein. Dieser Kanaltyp wird unmittelbar nach Beginn der Depolarisation aktiviert, wodurch die Permeabilität rasch ansteigt aber noch während der Depolarisationsphase spontan wieder abfällt. Die Permeabilität ist nach einer, dem Depolarisationsschritt vorangegangenen Hyperpolarisation am höchsten.

Der $IK_{(ACh)}$ (Acetylcholin abhängiger Kaliumkanal) ist ein Beispiel für eine Signaltransduktion unter Vermittlung eines Guaninnucleotid-bindenden Proteins. Der Rezeptor ist durch ein G-

Protein an ein Effektorprotein, den Ionenkanal, gekoppelt und wird nach Stimulation der muskarinischen Rezeptoren zur Öffnung angeregt. Über diesen Mechanismus hyperpolarisiert Acetylcholin die Herzmuskelzellen und hemmt deren elektrische Aktivität.

Dieser Kanal ist mitverantwortlich für das Ruhepotential, ist aber auch während des Aktionspotentials nicht völlig abgeschaltet. Eine bedeutende Rolle spielt er im Parasympathikus, wo Acetylcholin ein wichtiger Transmitter ist.

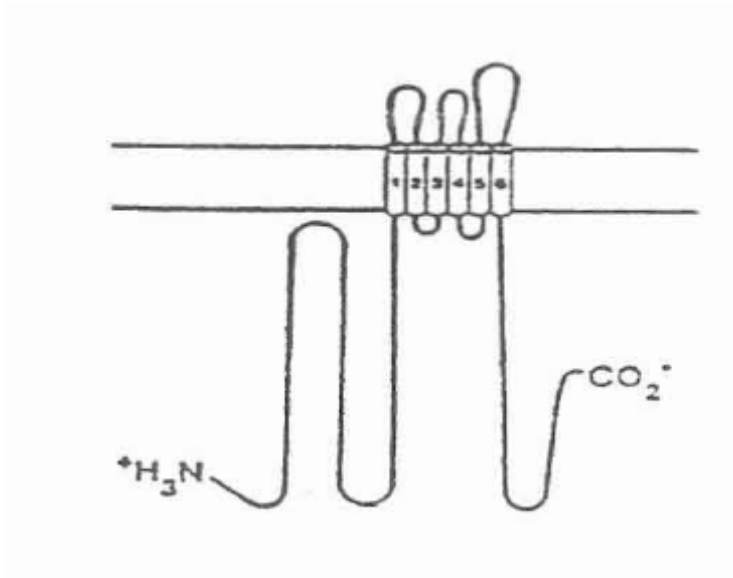
Der ATP-sensitive Kaliumkanal ($IK_{(ATP)}$) öffnet nur, wenn die intrazelluläre ATP-Konzentration unter einen bestimmten Wert (2 mmol) sinkt. Eine Aktivierung dieses Kanals führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Es kommt dadurch zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und in der Folge zur Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Blockierung des ATP-abhängigen Kaliumkanals durch Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid) führt zur Depolarisation der Zellmembran, wodurch spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden (Quast et al. 1994). Der $IK_{(ATP)}$ spielt unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle im Herz, hat aber pathophysiologische Bedeutung (Hypoxie, Ischämie); bei Ischämie des Herzmuskels führt ein Absinken des intrazellulären ATP-Gehaltes zum Öffnen des $IK_{(ATP)}$ -Kanals.

Weiters findet man diesen Kanaltyp an der glatten Muskulatur, im Gehirn und in den β -Zellen des Pankreas, wo er an der Insulinsekretion beteiligt ist. Die physiologische Rolle des natriumabhängigen Kaliumkanals ($IK_{(Na)}$) ist noch weitgehend unklar. Er wird bei erhöhter Natriumkonzentration aktiviert und ist vermutlich von pathophysiologischer Bedeutung.

Der Kaliumkanal wird durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert und ist von untergeordneter Bedeutung.

Abbildung 4: Struktur des Kanalproteins der Kaliumkanäle der S4-Familie



Sie bestehen aus sechs transmembranären Segmenten; das vierte Segment zeigt eine hohe Übereinstimmung mit korrespondierenden Segmenten von spannungsabhängigen Natrium - und Calciumkanälen.

Der IK_1 und der $IK_{(ATP)}$ bestehen aus Monomeren mit nur zwei membrandurchdringenden Segmenten. Weiters wurden spannungsabhängige Kaliumkanäle gefunden, die nur aus einer einfachen membrandurchdringenden α -Helix bestehen und als "minK" (minimal Kaliumkanal) bezeichnet werden. Es ist aber noch unklar, wieviele dieser Untereinheiten benötigt werden, um einen funktionstüchtigen Kanal zu bilden. Man beobachtete einen, durch minK induzierten, langsam aktivierenden inward rectifier K^+ -channel" und es wird angenommen, dass minK. im Herzen die langsame Komponente der delayed rectifier channel-Ströme darstellt (Latorre und Labarca 1996, Aaronson und Benham 1996).

1.4. Einfluss des vegetativen Nervensystems

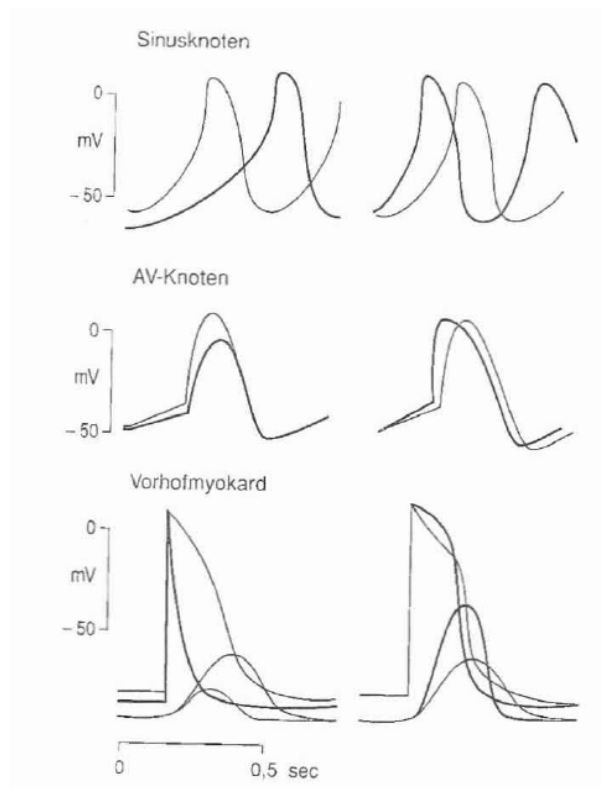
1.4.1. Parasympathikus

Acetylcholin aktiviert über M2-Muskarinrezeptoren, die in supraventrikulären Abschnitten des Erregungsleitungssystems in hoher Zahl vorhanden sind, einen GProtein (G_i)-modulierten Kalium-Strom $I_{K(ACh)}$. Die Zunahme des $I_{K(ACh)}$ wirkt sich auf die einzelnen Abschnitte des Aktionspotentials unterschiedlich aus:

Am Sinusknoten Frequenzverlangsamung durch Erhöhung des maximalen diastolischen Potentials und Abflachung der diastolischen Depolarisation. An Zellen mit „slow response“-Potentialen Verzögerung der Aufstrichphase (Phase 0), so dass am AV-Knoten die Überleitung verlängert wird. Der durch den Vagus verstärkte Kalium-Ausstrom wirkt dem in dieser Phase dominierenden Calcium-Einstrom entgegen.

Über eine beschleunigte Repolarisation resultiert eine Verkürzung der Refraktärzeit am Vorhof.

Abbildung 5: Einfluss des vegetativen Nervensystems auf das Aktionspotential



1.4.2.Sympathikus

Noradrenalin bewirkt über β -Adrenozeptoren (vornehmlich vom β_1 -Subtyp) einen cAMP-Anstieg in der Zelle und dadurch über die cAMP-gesteuerte Proteinkinase A schließlich eine Phosphorylierung und Öffnung von Calcium-Kanälen. In Schrittmacherzellen erleichtert es die hyperpolarisationsbedingte Aktivierung cAMP gesteuerter Einwärtsströme, die die diastolische Depolarisation mitbestimmen. Dadurch wird das Aktionspotential beeinflusst:

Die Steilheit der diastolischen Depolarisation nimmt zu und resultiert in einer Erhöhung der Sinusfrequenz.

Bedingt durch die verkürzte Dauer des Calcium-Einstroms in die Zelle, vermindert der Vagus die Kontraktionskraft im Vorhof, der Sympathikus führt umgekehrt über eine Verbesserung des Calcium-Einstroms zu einer verstärkten Kontraktion .

1.5. Ätiologie und Pathogenese von Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen sind Störungen der Herzschlagfolge als Ausdruck einer Irritation oder manifesten Schädigung im Bereich des Reizleitungssystems des Herzens.

Das Herz verfügt über eigenen Taktgeber, der elektrische Impulse (kleine elektrische Ströme) regelmäßig aussendet. Der Strom wird in einem Zentrum, dem Sinusknoten, der sich im rechten Vorhof an der Mündung der Vena cava superior befindet, erzeugt. Das besondere an diesem Zentrum ist, dass der Strom automatisch gebildet wird. Von Sinusknoten wird der Strom dann auf die Vorhofmuskulatur weiter geleitet bis zu einem zweiten Zentrum, dem AV-Knoten. Dieses Zentrum liegt zwischen den Vorhöfen und den Kammern. Weiter gelangt der Strom über verschiedene Muskelfasern in die Kammerscheidewand zur Herzspitze und von dort zur gesamten Kammermuskulatur. Diese zieht sich dann im Rhythmus des elektrischen Impulses zusammen und erschlafft wieder.

Das Ruhepotential einer Herzmuskelfaser beträgt -80 mV. Die einzelnen Faser sind im allgemeinen durch Zellmembranen voneinander getrennt, dennoch verbreitet sich die Depolarisationswelle - durch das Vorhandensein sogenannter "gap junctions" wie in einem Syncytium (Ganorg 1979). In diesem komplexen System kann die Stromleitung an jeder Stelle verändert oder unterbrochen sein. Die Erregung der Herzmuskulatur kommt dann aus dem Rhythmus, man spricht von Herzrhythmusstörungen.

Zum besseren Verständnis der Pathogenese von Herzrhythmusstörungen ist eine Kenntnis über den Aufbau und die Funktionsweise des Herzens erforderlich:

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan mit der Aufgabe, durch wechselndes Zusammenziehen (Kontraktion der Vorhöfe , Kontraktion der Kammer) und Erschlaffung des Herzmuskels den Blutstrom in den Gefäßen in Bewegung zu halten. Dadurch werden den Organen wichtige Nährstoffe zugeführt.

Das Herz besitzt vier Klappen, die alle eine Ventilfunktion haben:

Mitralklappe , Aortenklappe, Pulmonalklappe und Trikuspidalklappe. Der Herzmuskel selbst wird über die Herzkranzgefäße (Koronararterien) ernährt. Arrhythmien werden nach ihrer Frequenz in bradykarde Rhythmusstörungen (Abfall des Pulsschlags unter 60 pro Minute) und tachykarde

Rhythmusstörungen (Steigerung des Pulsschlags auf über 100 pro Minute), ihrem Ursprung als supraventrikuläre Rhythmusstörungen (entstehen im Vorhof, Sinusknoten oder AVKnoten) und ventrikuläre Rhythmusstörungen (entstehen in den Kammern) klassifiziert.

Zu Behandlung der Herzrhythmusstörungen werden Antiarrhythmika und Elektrotherapie verwendet. Die meisten Antiarrhythmika beeinflussen das Aktionspotential des Herzens in unterschiedlichen Phasen der De- und Repolarisation, in dem die Passage der einzelnen Ionen (Natrium , Kalium, Calcium) durch die Zellmembran gehemmt wird.

Bei extrazellulärer Registrierung ähnelt das Aktionspotential dem QRS-Komplex des EKG.

Von Vaughan Williams (1970) werden die Antiarrhythmika nach ihrem elektrophysiologischen Hauptangriffspunkt in Klasse I - IV eingeteilt. Die Wirkung von Klasse I Antiarrhythmika, die als Natriumkanalblocker bezeichnet werden, besteht in einer Verzögerung der Leistungsgeschwindigkeit und damit der Erregungsausbreitung. Die typische Veränderung am Aktionspotential ist eine Verzögerung der Phase O. Folge der Natriumkanalhemmung ist eine Verlängerung der Refraktärzeit, das heißt der Zeit, bis der Natrium-Kanal sich von seiner Inaktivierung völlig erholt hat. Die Kontraktionskraft wird herabgesetzt.

Aufgrund einer unterschiedlichen Beeinflussung der Repolarisation und damit unterschiedlichen Dauer der Aktionspotentiale können drei Gruppen (IA, IB, IC) unterschieden werden (Campbell 1983).

Die Klasse II Antiarrhythmika (β -Adrenozeptor-Blocker) antagonisieren die elektrophysiologischen Effekte endogener Catecholamine. Dabei nimmt die Sinusfrequenz ab, und AV-Überleitung wird verzögert (erhöhte Siebwirkung).

Amiodaron und andere Klasse III Antiarrhythmika wirken in der Regel nicht negativ inotrop. Sie Verzögern den repolarisierenden Kalium-Ausstrom, was mit einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und damit der absoluten Refraktärzeit verbunden ist. Dieses kann wiederum eine Verlängerung des Calcium-Einstroms und damit eine Zunahme der Kontraktionskraft bewirken (Schlölz 1990).

Klasse IV Antiarrhythmika sind Calciumantagonisten (Calciumkanalblocker), die direkt den Calcium-Einstrom während des Aktionspotentials hemmen. Ihre antiarrhythmische Wirkung beruht auf der Unterdrückung des Calcium-Einstroms in Phase 2 des Aktionspotentials, der für die

Depolarisation des Sinus- und vor allem des AV-Knotens große Bedeutung hat. Dies erklärt die starke Wirksamkeit bei Reentry-Tachyarrythmien (Bourgeois et al. 1994).

Calciumantagonisten sind nicht nur chemisch eine heterogene Substanzgruppe, sie unterscheiden sich auch deutlich in Qualität und Quantität ihrer Wirkung in den verschiedenen Geweben (Winter et al. 1995). Dies ist der Fall bei den Calciumantagonisten, nämlich Verapamil, Diltiazem und Nifedipin, die trotz der Tatsache, dass sie alle an die α_1 -Untereinheit des Calciumkanals vom L-Typ binden, pharmakologische Unterschiede in der Gewebsspezifität zeigen (Glossmann und Striessnig 1990). Bei Vorhofflimmern und -flattern werden sie am häufigsten angewendet.

Bradykarde Herzrhythmusstörungen werden symptomatisch mit Atropin und/oder β -Sympathomimetika (Isoprenalin, Orciprenalin) behandelt. Meist ist jedoch ein temporärer Schrittmacher erforderlich, um bei eventuell auftretenden tachykarden Rhythmusstörungen (ausgelöst durch Hypokaliämie, Hypoxie oder Azidose) eine gezielte antiarrhythmische Therapie einleiten zu können. Die als Folge von kardiogenem Schock und arterieller Vasodilatation wird mit Calcium (1-2 g Calciumgluconat i.v.), Dopamin, Dobutamin, Adrenalin bzw. Noradrenalin (Lydtin und Trenkwalder 1988).

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für den praktischen teil dieser Diplomarbeit wurden isolierte, präparierte, gesunde, männliche und weibliche Meerschweinchen aus dem institut für Laborgenetik in Himberg verwendet. Alle Meerscheinchchen haben ein Körpergewicht von 300-600g.

Die Tiere wurden durch Genickschläge getötet um einen schnellen und schmerzlosen Tod zu gewährleisten.

2.2. Entnahme und Präparation der Organe

Der Thorax wurde mittels einer schere nach der Tötung geöffnet. das Herz relativ rasch entnommen und in einer vorher zubereiteten Elektrolytlösung (Tyrode) aufbewahrt um einen Sauerstoffmangel (Hypoxie) zu vermeiden und Koagulation des Blutes vorzubeugen.

Die zubereitete Elektrolytelösung enthält Oxymix (95% O₂ ,5% CO₂).

2.2.1. Isolierung des terminalen ileum

Nach der Entnahme des Herzes wurde die Bauchdecke mit Hilfe einer Schere aufgeschnitten.

Ungefähr 20 cm des vor dem Caecum gelegenen terminalen Ileum wurde entnommen. Das jejunale Ende wurde mit einem Bindfaden markiert. um später für die Präparation einen Orientierungshilfe zu haben. Der Dünndarm wurde sowohl oberhalb der Markierung, als auch oberhalb des Anschlusses des Caecums durchtrennt.

Dieses isolierte Darmstück wird in einer physiologischen Nährlösung aufbewahrt und bis zur weitem Präparation mit oxymix begast.

Für die weitere Verarbeitung wurde ungefähr ein 1 cm langes Stück unter dem Mikroskop des schräg abgeschnitten. Das Darmstück wurde mit zwei Stecknadeln in dem Korkboden mit Nährlösung fixiert und von Fett mit Hilfe einer Federschere befreit. Die beiden Enden mussten mit verschieden färbigen Faden gekennzeichnet werden. Am abgetrennten Stück des Darms wurden zwei Haken montiert. Das verwendete Darmstück musste offen bleiben, um lumbales Einwirken der Testsubstanz gewährleisten zu können.

2.2.2. Isolierung der Arteria pulmonalis

Nach der Tötung wurde der Brustkorb vorsichtig mit einer Schere geöffnet, um das schlagende Herz rasch zu entnehmen und das schlagende Herz wurde in physiologische Nährlösung gelegt, die mit Oxymix durchgeperlt wurde. Das enthaltene Blut wurde schnell ausgespült um Blutgrinnung zu vermeiden.

Zur weiteren Präparation wurde eine Petrischale, welche mit einem Kork ausgekleidet ist und mit Nährlösung gefüllt ist, genommen.

Die rechte und linke Pulmonalarterie wurden so nahe wie möglich am Herzen abgeschnitten.

Anschließend wurde die Arterie von Fett und Muskelgewebe befreit und in 3 mm kleine Stücke zerteilt.

Entweder wird diese direkt in die Versuchsanordnung eingespannt, oder in einem Becherglas mit Tyrode aufbewahrt und begast.

2.2.3. Isolierung des rechten Vorhofs

Unter dem Mikroskop wurde vom Herz vorsichtig Lungen und Fettgewebe entfernt, um nicht den Sinusknoten der sich in der rechten Vorhofwand befindet, zu verletzen.

Der rechte Vorhof wird abtrennt und an den beiden Enden zwei Silberhäkchen befestigt. Dieses Präparat wurde in Tyrode bis zum Versuchbeginn aufbewahrt und begast.

2.2.4. Isolierung der rechten Papillarmuskel

Der rechte Ventrikel wird über die Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet. Die rechte Kammer wurde aufgeklappt und mit Stecknadeln fixiert. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde ein Silberhäkchen mittels eines Fadens befestigt, danach die Sehne durchtrennt und der Papillarmuskel isoliert.

Die Präpariert Papillarmuskel wurde in Tyrode aufbewahrt und mit Oxymix begast.

2.2.5. Isolierung der Aorta

Die Isolierung der Aorta ist der letzter schritt nach Entfernung des Herzens und des Darms. Der Thorax wurde vollständig geöffnet. Die Wirbelsäule wurde nach vorne gedrückt und mit Nährlösung abgespült. Dabei war darauf zu achten, dass das Gefäß nicht überdehnt wird.

Während ein Helfer das Tier weiter hielt, wurde die Aorta mit einer Pinzette festgehalten und mit einer Präparierschere entlang der Wirbelsäule abgeschnitten. Hierbei musste man ganz vorsichtig sein, da man leicht die Aortawand verletzen konnte.

Nach Entnahme der Aorta wurde diese in eine Petrischale mit Korkboden und gefüllt mit einer physiologischen Nährlösung überführt und mit Oxymix begast.

Unter dem Mikroskop wurde die Aorta im Korkboden mit Stecknadeln fixiert, anschließend mit Pinzette und Federschere von Muskel- und Fettgewebe befreit. Man musste Löcher im Präparat vermeiden.

Man konnte fünf bis acht Ringe gewinnen. Jedes Stück ist ungefähr zwei mm breit. Die von den Stecknadeln durchlöcherten Stücke durften nicht verwendet werden.

2.3. Physiologische Nährlösung

Die physiologische Nährlösung ist Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Versuche und für die Aufbewahrung der isolierten Organe.

Die physiologische Nährlösung genant auch Tyrode wurde jeden Tag frisch zubereitet.

Der pH-Wert musste von (7,2- 7,4) sein.

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

Die physiologische Nährlösung zur Aufbewahrung der Präparate wurde frisch zubereitet. Sie entsprach somit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung mit folgender Zusammensetzung

Tab 1: Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung:

Stocklösung	mmol/l
NaCl	114,90
KCl	4,73
NaHCO ₃	24,90
CaCl ₂	3,20
MgSO ₄	1,18
KH ₂ PO ₄	1,18
Glucose	10,00

2.3.2. Physiologische Nährlösung für Aorta

Für die Versuche an der Aorta wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet,

Tab 2: Zusammensetzung für die physiologische Nährlösung der Aorta.

Stocklösung	mmol/l
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaHCO ₃	11,90
CaCl ₂	3,20
MgSO ₄	5,80
KH ₂ PO ₄	1,40
Glucose	10,00

2.4. Versuchsanordnung

Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffversorgung mussten immer während des gesamten Versuchs gleich sein.

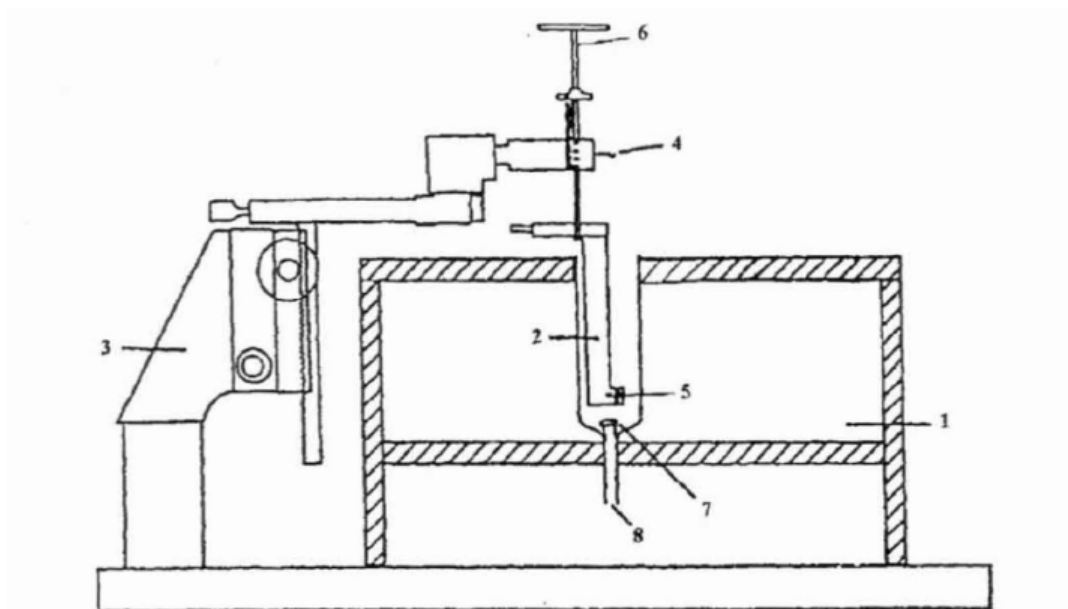
Für die Versuche standen zwei Versuchsaapparaturen (A und B) zur Auswahl.

Für den Papillarmuskel Versuch wurde Apparat B verwendet. Für die anderen Organe wurden die Apparat A verwendet.

Beide Versuchsaapparaturen hatten dasselbe Funktionsprinzip.

2.5. Versuchsaapparat

Abbildung 6: Versuchsaapparat (A) für Papillarmuskeln



1) Wasserbad

2) Organ Halterung

3) Stativ mit
Stativschlitten

4) Aufhängevorrichtung

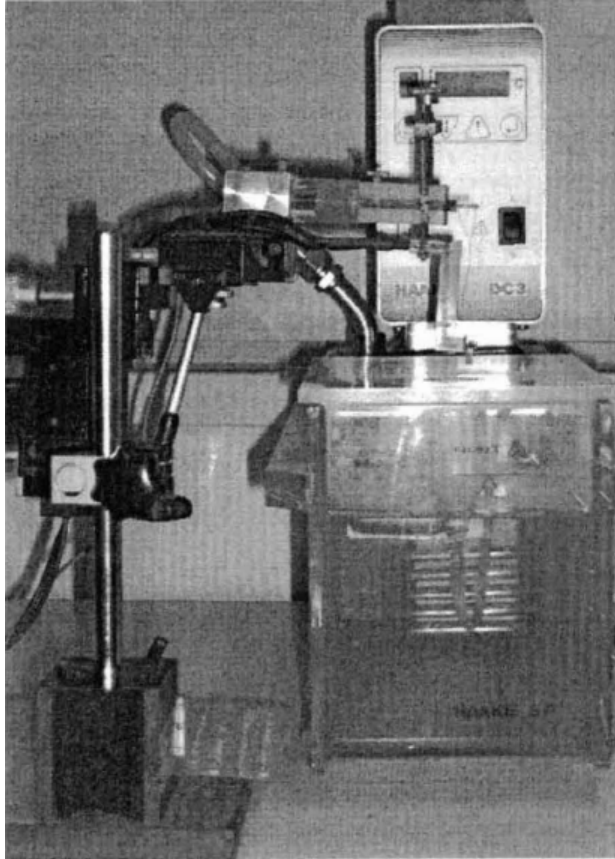
5) Elektrode

6) Feintrieb

7) Muskelkammer

8) Gaszufuhr mit
Fritte

Abbildung 7: Originalabbildung der Versuchsanordnung A:



2.5.1. Versuchsanordnung A

Die Versuchsanordnung A beinhaltet ein Organbad, das in ein Wasserbad getaucht wurde, welches aus Acrylglas bestand und mit Aqua destillata befüllt war, und dessen Temperatur mittels Heizspirale und Thermostat bei Versuchen mit dem Papillarmuskel bei $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, bei allen anderen Versuchen bei $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ konstant gehalten wurde.

Das Organbad wurde mit der jeweiligen physiologischen Tyrode befüllt und um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, mit Oxymix durchperlt. Dies war notwendig, um den physiologischen pH-Wert aufrechtzuerhalten.

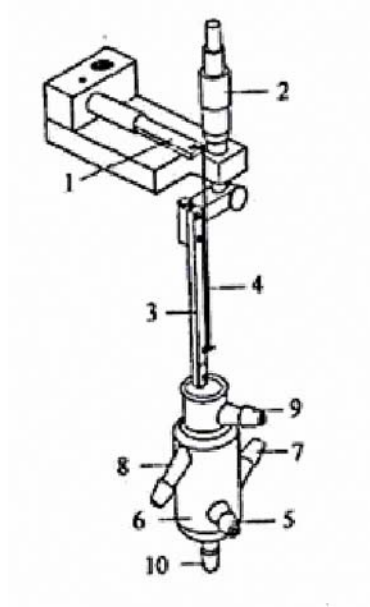
Um eine Spülung und einen Wechsel der Elektrolytlösung durchzuführen, musste man eine Kunststoffspritze, an die ein Gummischlauch befestigt wurde, zur Hand nehmen. Die Papillarmuskeln wurden mit Hilfe des zuvor befestigten Silberhäkchens an einem Silberdraht, der an der Apparatur direkt mit dem Kraftwandler verbunden war, befestigt. Das andere Ende des Präparates wurde mit einer Kunststoffplatte mittels Schraubmechanismus festgeklemmt, wodurch

ein Kontakt mit der Silber-Silberchloriddraht-Kathode zustande kam. Um den Vorgang des Einspannens zu verkürzen, sollte möglichst rasch gearbeitet werden, um die Zeit der Minderversorgung des Präparates möglichst zu minimieren.

Für das Herausnehmen oder für das Absenken der Präparate war an der Apparatur ein Stativschlitten befestigt und sobald nun so das Organ in das Bad eingebracht worden war, konnte mittels Feintrieb die spezifische Vorspannung eingestellt werden. Diese Feinjustierung war nötig, um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

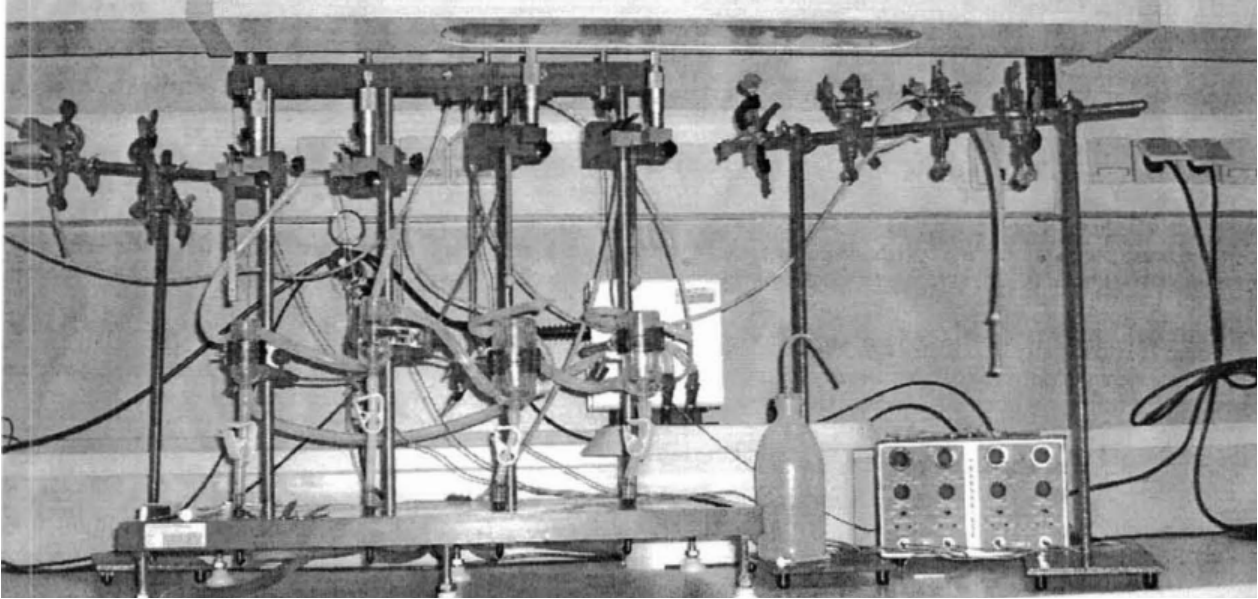
Der Kraftwandler, das eigentliche Messgerät, befand sich weiter oben am Stativ und konnte samt Organhalterung mit Hilfe des Stativschlittens ins Organbad abgesenkt werden. Seine Aufgabe war es die Kontraktionen in Stromimpulse zu transformieren und ein Verstärker Transbridge TM-4 Channel Transducer Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) diente 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 8: Versuchsanordnung (B) für terminales Ileum, Aorta, Arteria pulmonalis, rechter Vorhof.



- | | |
|---------------------|----------------------|
| 1 Kraftwandler | 6 Organbad |
| 2 Mikrometer | 7 Zulauf Wasserbad |
| 3 Organ Halterung | 8 Ablauf Wasserbad |
| 4 | |
| Aufhängevorrichtung | 9 Zulauf Nährlösung |
| 5 Gaszufuhr | 10 Ablauf Nährlösung |

Abbildung 9: Originalabbildung der Versuchsanordnung (B)



2.5.2. Versuchsanordnung B

Im Vergleich zu Versuchsanordnung A, sind bei Apparatur B nur die Fixierungsmöglichkeit der Organe und die Ausführung des Organbades leicht modifiziert.

Im Organbad, ein doppelwandiges Glasgefäß, zirkulierte konstant temperiertes Wasser, um physiologische Bedingungen aufrechtzuerhalten. Ein Abflussschlauch, der sich am Boden des Organbades befand, war mit einer Quetschklemme verschlossen und diente zum Wechseln oder Entfernen der Tyrode.

Bei Versuchen mit der Arteria pulmonalis und der Aorta wurde das ringförmige Präparat, welches auf zwei Silberhäkchen aufgefädelt wurde, über diese mit Kraftwandler verbunden. Die Gasversorgung und die Wasserversorgung erfolgten von der Seite über Schlauchanschlüsse. Für die Organbefestigung wurden ein Silberdraht, der am Steg befestigt war, und ein zweiter, der an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers eingehängt war, benutzt. Hierbei musste wieder darauf geachtet werden, zügig und vorsichtig, ohne das Präparat zu überdehnen, vorzugehen. Nach dem Einspannen musste, um die maximale Kontraktionskraft zu erreichen, über das Mikrometer die Vorspannung eingestellt werden und danach erfolgte die Übertragung der Ergebnisse über den Kraftwandler und einen Verstärker zum Schreiber, wie bereits beschrieben bei der Apparatur A.

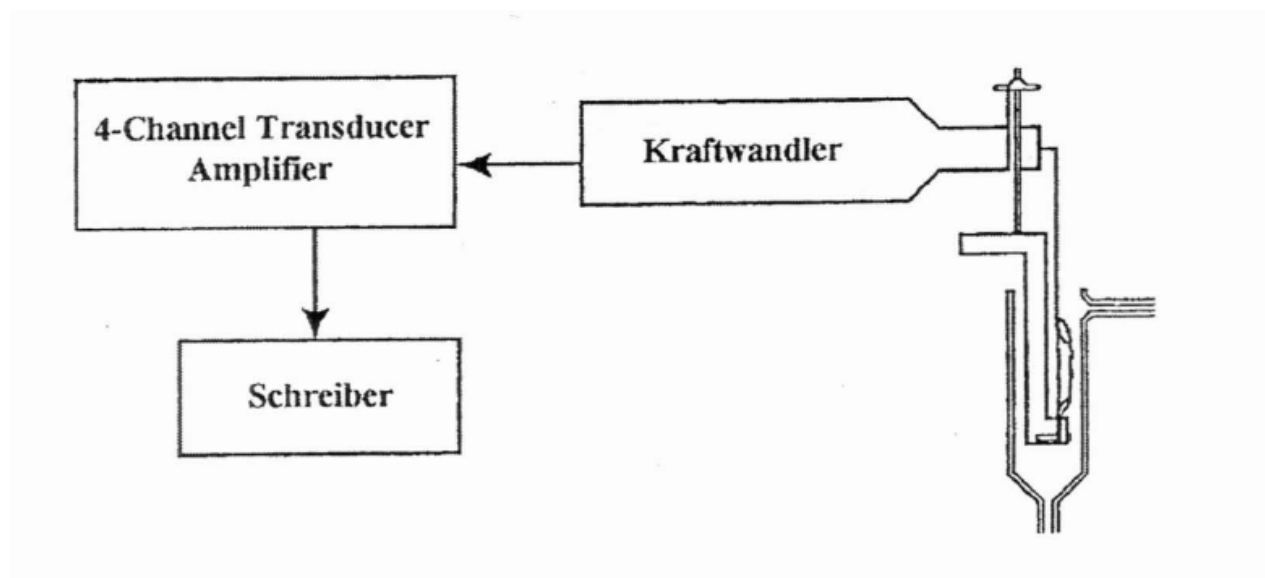
2.5.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler, dessen Hauptaufgabe es war, die isometrischen Kontraktionen zu messen, transformierte die mechanische Kraft, mit der sich das eingespannte Organ kontrahierte, in ein elektrisches Signal, welches anschließend durch einen Verstärker (4-Channel-Transducer von World Precision Instruments, FL, USA) verstärkt wurde.

Zur Dokumentation diente ein Schreiber mit automatischem Papiervorschub, der es mit Filzschreiber auf Millimeterpapier aufzeichnete.

Zum besseren Verständnis der Signalgewinnungskaskade soll die nachfolgende Abbildung dienen.

Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



2.5.4. Gasversorgung

Die Gasversorgung wurde über eine zentrale Gasflasche gewährleistet. Von den einzelnen Ventilen im Versuchsraum führten Plastikschläuche zu den Versuchsaapparaturen, die am Ende mit einer Fritte versehen waren, um den Gasstrom fein im Organbad zu verteilen. Um die ausströmende Gasmenge regulieren zu können, wurden Schraubklemmen an den Schläuchen angebracht.

Zur Gasversorgung, die vom Beginn bis zum Ende des Versuches konstant gehalten werden musste, stand ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, mit dem Namen Oxymix zur Verfügung.

Es diene zur ausreichenden Sauerstoffversorgung der isolierten Organe, zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts von 7,2-7,4 und zur Gewährleistung einer homogenen Verteilung der Testsubstanz im Organbad.

2.7. Versuchsablauf

2.7.1. Versuchsablauf bei der Arteria pulmonalis

Das ringförmig präparierte Organ wird am Silberdraht eingehängt und gemeinsam mit der Organhalterung in das Organbad gesenkt, das mit Krebs-Henseleit-Lösung befüllt war. Die Badtemperatur war immer 37 °C und über gesamten Versuchsablauf konstant. Die Organe wurden vorgespannt (9,8 mN). Danach wurde ein 90 mmolare KCl zur Kontraktion der Arteria pulmonalis dazugegeben.

Nach 90 minütiger Kontrolle wurde die Testsubstanz in Konzentrationen von 1 µmol, 3 µmol, 10 µmol, 30 µmol und 100 µmol jeweils für 45 Minuten zugesetzt. Die Veränderungen der Kontraktionskraft, wurden mittels Schreiber aufgezeichnet.

2.7.2. Versuchsablauf bei Aorta

Die Arbeitsvorgänge bei diesen Versuchen entsprachen jenen bei der Arteria pulmonalis, wobei eine Vorspannung von 19,6 mN angelegt wurde.

2.7.3. Versuchsablauf bei rechten Vorhöfen

Nachdem der Vorhof isoliert und präpariert war, wurde er so rasch wie möglich in die vorbereitete Apparatur eingespannt die mit dem Nährlösung gefüllt war. Während des gesamten Versuchesablaufs wurde eine Vorspannung von 10,4mN angelegt. Danach wurde die Kontrollphase begonnen, alle 5 min wurde die Schlagfrequenz über 6 cm des Millimeterpapiers mit einem Papiervorschub von 5 mm/s aufgezeichnet.

Nach konstanter Schlagfrequenz wurde die Kontrollphase beendet und wurde mit der Zugabe der Testsubstanz (1µmol, 3µmol,10 µmol, 30µmol, 100µmol) jeweils für 45 Minuten begonnen.

2.7.4. Versuchsablauf bei terminalen Ilea

Zuerst wurde die Muskelkammer mit physiologischer Nährlösung gefüllt und das vorbereitete Darmstück wurde im Apparat aufgehängt, sodass das jejunale Ende nach oben und das caecale Ende nach unten zeigten.

Schreiber und Verstärker wurden aktiviert und es wurde Vorspannung von 4,9mN angelegt. Nach 20 min wurde die KCL Lösung (60 mmol/l) zur Kontraktion des terminalen Ileum dazugegeben. Nach Einstellen eines Plateaus begann man mit der Zugabe der Testsubstanz, die kumulativ erfolgte. Jeweils nach 45 min wurde die nächst höhere Konzentration zugegeben.

2.7.5. Versuchsablauf bei Papillarmuskel

Der bereits präparierte Papillarmuskel wird in die Versuchsapparatur eingespannt. Ein Ende des Präparates wird mittels Silberhaken in die Apparatur befestigt und das andere Ende wird über einen Schraubmechanismus an Kunststoffplatte festgemacht.

Der befestigte Papillarmuskel wird in Organbad eingetaucht, die mit Nährlösung gefüllt wurde und eine Vorspannung von 3,92 mN wurde angelegt. Während der gesamten Zeit des Versuchs musste nachjustiert werden (Reiter 1967)..

Nach einer Anpassungszeit von 10 min wurde der Papillarmuskel mit der elektrischen Stimulierung zur Kontraktion angeregt, weil der Papillarmuskel keine Spontanaktivität aufweist. Dieser Reiz wurde durch ein Reizgerät (Rechteckimpulse mit einer Dauer von 3 ms, bei Reizfrequenz von 1 Hz) erzeugt. Während der Kontrollphase von 45 Minuten wurden alle 5 Minuten drei Kontraktion Amplituden mittels Schreiber aufgezeichnet. Nach konstanten Kontraktionamplituden wurde die Testsubstanz, in abständen von 45 Minuten kumulativ zugegeben. Alle 5 Minuten für ca .5 Sekunden wurde eine Messung der Kontraktionamplituden mit einem Schreibgerät registriert.

2.8. Auswertung

2.8.1. Auswertung der Versuchsreihe mit rechten Vorhöfen

Die Spontanfrequenz wurde alle 5 Minuten vom Schreiber mit einem Papiervorschub von 5mm/s über eine Strecke von 6 cm auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet.

Die abgezählten Schläge wurden mit 5 multipliziert, um die Schläge pro Minuten zu errechnen.

2.8.2. Auswertung der Versuchsreihe mit Papillarmuskeln

Beim Papillarmuskel wurden als Messgröße die Kontraktionsamplituden mit der Einheit mN ausgewertet, die mit einem Schreiber während des Versuchsablaufes aufgezeichnet wurden. Die Amplituden wurden abgemessen und mit dem ermittelten Eichungsfaktor umgerechnet.

2.8.3. Auswertung der Versuchsreihe mit Aorta, terminalem Ileum und Arteria pulmonalis

Bei diesen isolierten Organen wurden während des gesamten Versuchsablaufes Kontraktionskurven erstellt, die mit dem Schreiber aufgezeichnet wurden.

Die Kurven wurden mit einem Lineal abgemessen und mit dem Eichungsfaktor multipliziert.

2.8.4. Statistik:

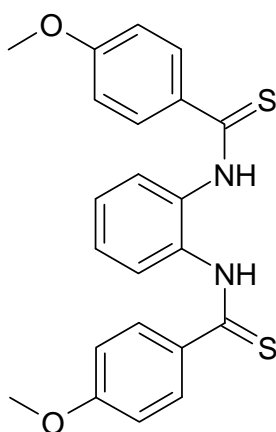
Die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler dieser Mittelwerte (SEM) aus n Versuchen wurden aus den Messdaten der einzelnen Versuchserien ermittelt. Die EC_{50} –Werte in $\mu\text{mol/l}$ wurde aus den Graphiken der Konzentration –Wirkungskurven errechnet.. Der Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen wurde zur Berechnung der Signifikanz herangezogen. Signifikanz bedeutet eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($P < 0,05$) ,<1% ($< P 0,01$) oder < 0,1% ($p < 0,001$).

2.8.5. Substanzen und Löslichkeit

Substanzen: Testsubstanz war WHG 56T

Abbildung 11:

WHG 56T



N1-{2-[(4-methoxybenzothioyl)amino]phenyl}-4-methoxy-1-benzolcarbothioamid

Diese Substanz wurde am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Lösung erfolgte in DMSO.

3. Ergebnisse

3.1. Wirkungen der Testsubstanz WHG 56T auf isolierte Organe von Meerschweinchen

3.1.1. Wirkung auf das terminale Ileum

Es wurde die Veränderung der Kontraktionskraft des terminalen Ileum durch die Testsubstanz WHG 56T, wie in Kapitel 2.9.4. beschrieben, untersucht. Es wurde ein EC_{50} -Wert von 2,64 $\mu\text{mol/l}$ gefunden.

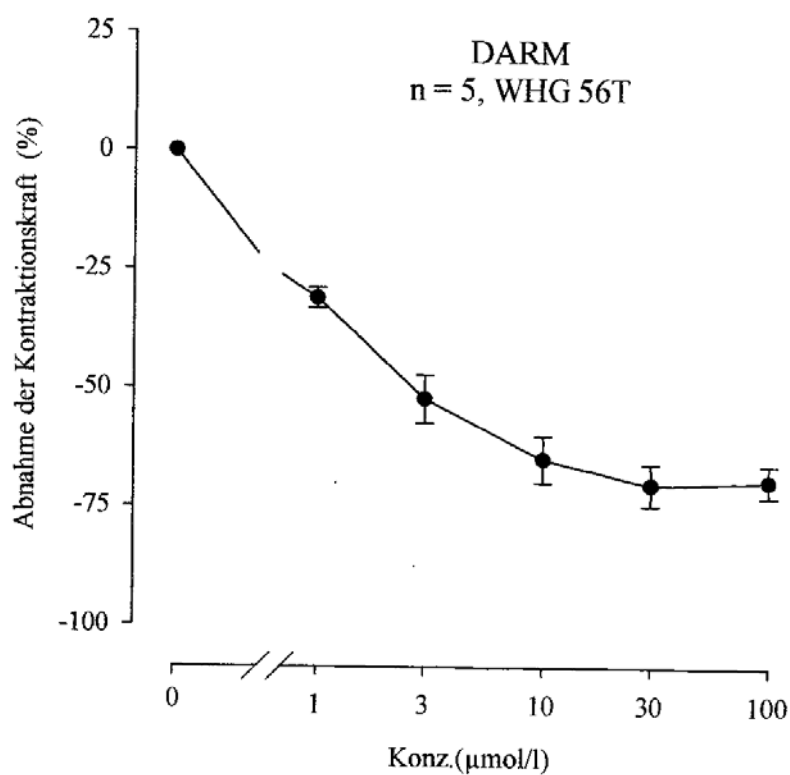
Tab. 2: Wirkung von WHG 56T auf die Kontraktionskraft (f_c) des terminalen Ileum

WHG 56T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumwahr- Scheinlichkeit P
Kontrolle	15,9246 \pm 2,132	100 \pm 0	5	n.s.
1	10,9934 \pm 2,65	69,034 \pm 2,1699	5	0,05
3	7,7132 \pm 2,2283	47,875 \pm 5,0579	5	0,05
10	5,355 \pm 1,2147	35,202 \pm 4,8705	5	0,01
30	4,415 \pm 0,8418	29,79 \pm 4,3829	5	0,01
100	4,582 \pm 0,7518	30,62 \pm 3.37	5	0,01

Legende zu Tabelle 2:

In dieser Tabelle sind die Konzentrationsangaben, Irrtumwahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) in mN und in Prozent aus fünf Versuchen dargestellt.

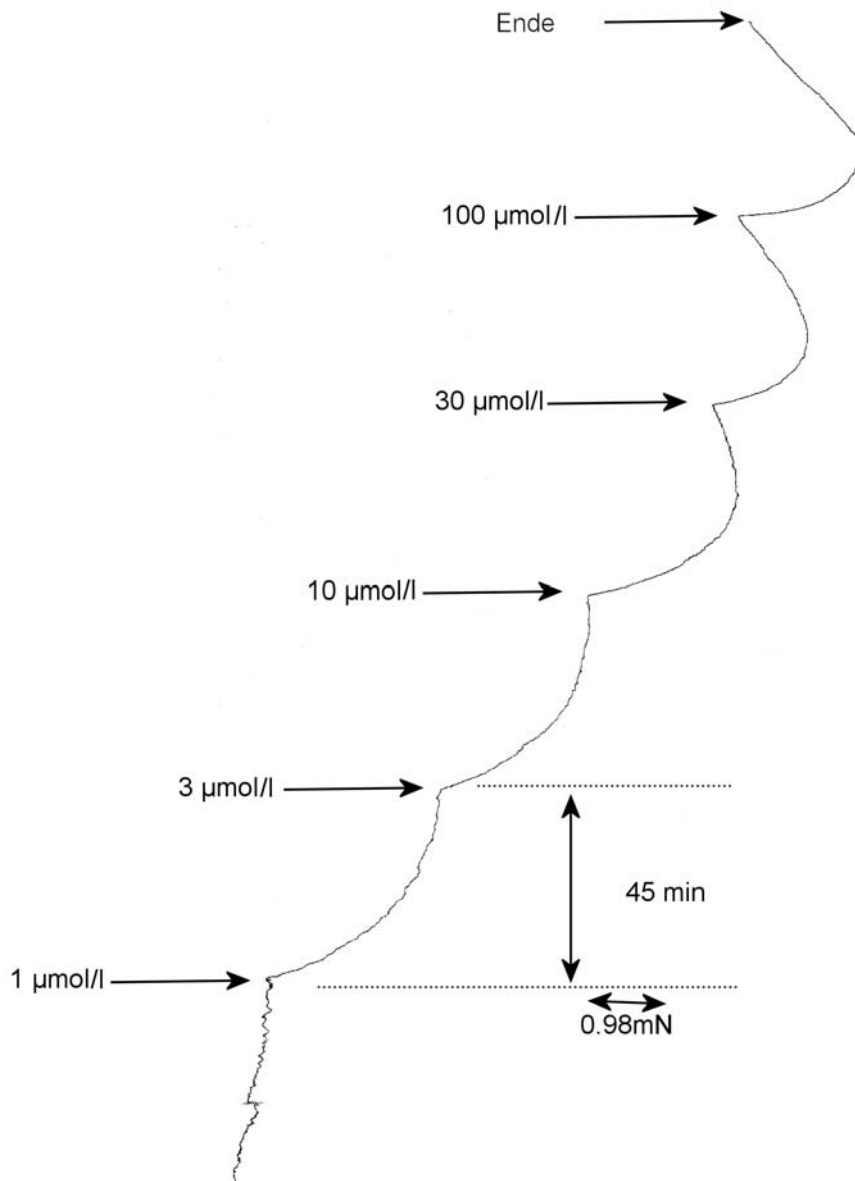
Abb. 11: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 56T auf das terminale Ileum



Legende zu Abbildung 11:

In der Abbildung wurden auf der x-Achse die Konzentrationsstufen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent infolge der Einwirkung von WHG 56T dargestellt. Die arithmetischen Mittelwerte werden als Punkte aus fünf Versuchen und die Standardfehler als Balken dargestellt.

Abb. 12: Originalregistrierung der Kontraktionskraft eines isolierten terminalen Ileum unter Einwirkung von WHG 56T



Legende zu Abbildung 12:

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum

3.1.2. Wirkung auf die Aorta

Es wurde die Wirkung der Testsubstanz WHG56T an isolierten Aorta des Meerschweinchens getestet. Die Testsubstanzen wurden in Konzentration 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/l}$ untersucht.

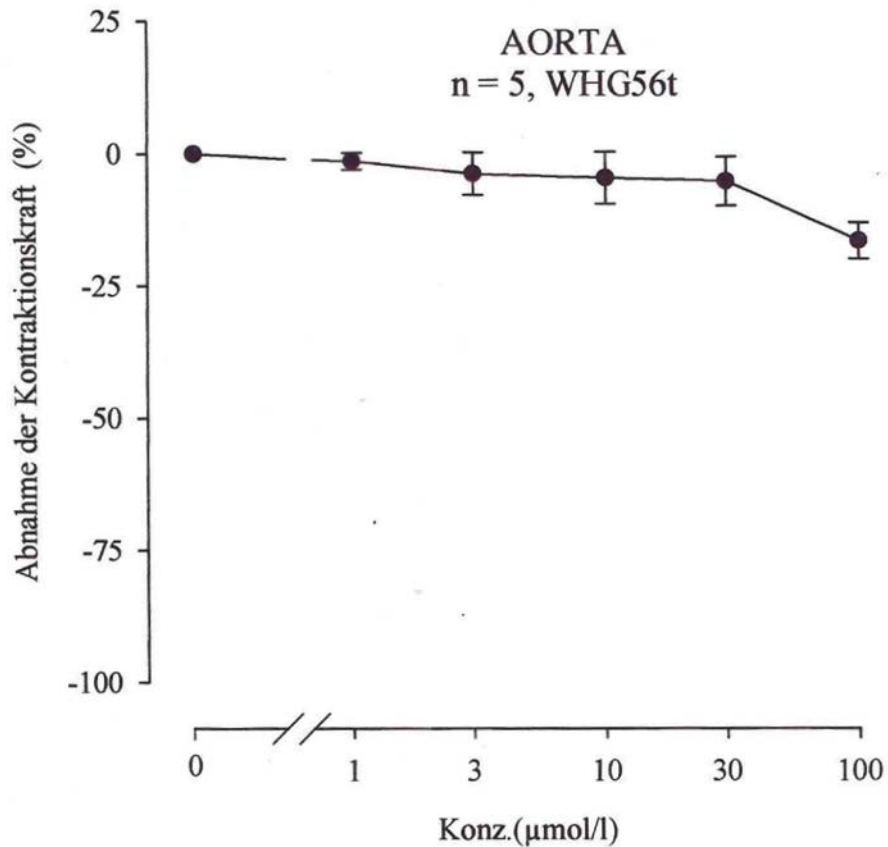
Tab. 3: Wirkung von WHG 56T auf die Kontraktionskraft (f_c) der isolierten Aorta

WHG 56T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumwahr- Scheinlichkeit P
Kontrolle	8,99 \pm 1,01	100 \pm 0	5	n.s
1	8,83 \pm 0,91	98,62 \pm 1,56	5	n.s
3	8,54 \pm 0,81	96,23 \pm 4,04	5	n.s
10	8,44 \pm 0,77	95,40 \pm 4,90	5	n.s
30	8,40 \pm 0,79	94,81 \pm 4,64	5	n.s
100	8,34 \pm 0,79	93,99 \pm 4,21	5	n.s

Legende zu Tabelle 3 :

In dieser Tabelle sind die Konzentrationsangaben, Irrtumwahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) in mN und in Prozent aus fünf Versuchen dargestellt.

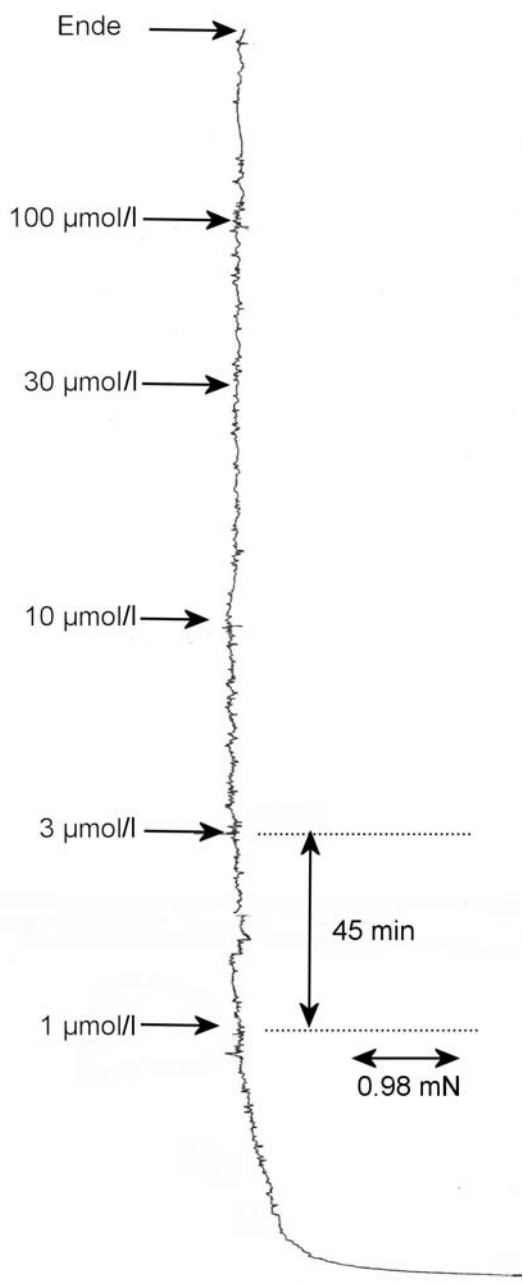
Abb. 13: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 56T auf die Aorta



Legende zu Abbildung 13:

In der Abbildung wurden auf der x-Achse die Konzentrationsstufen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent infolge der Einwirkung von WHG 56T dargestellt. Die arithmetischen Mittelwerte werden als Punkte aus fünf Versuchen und die Standerfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 14: Originalregistrierung der Kontraktionskraft einer isolierten Aorta unter Einwirkung von WHG 56T



Legende Zu Abbildung 14:

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft an der Aorta.

3.1.3. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Es wurde die Veränderung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis durch die Testsubstanz anhand von 5 Versuchen durchgeführt.

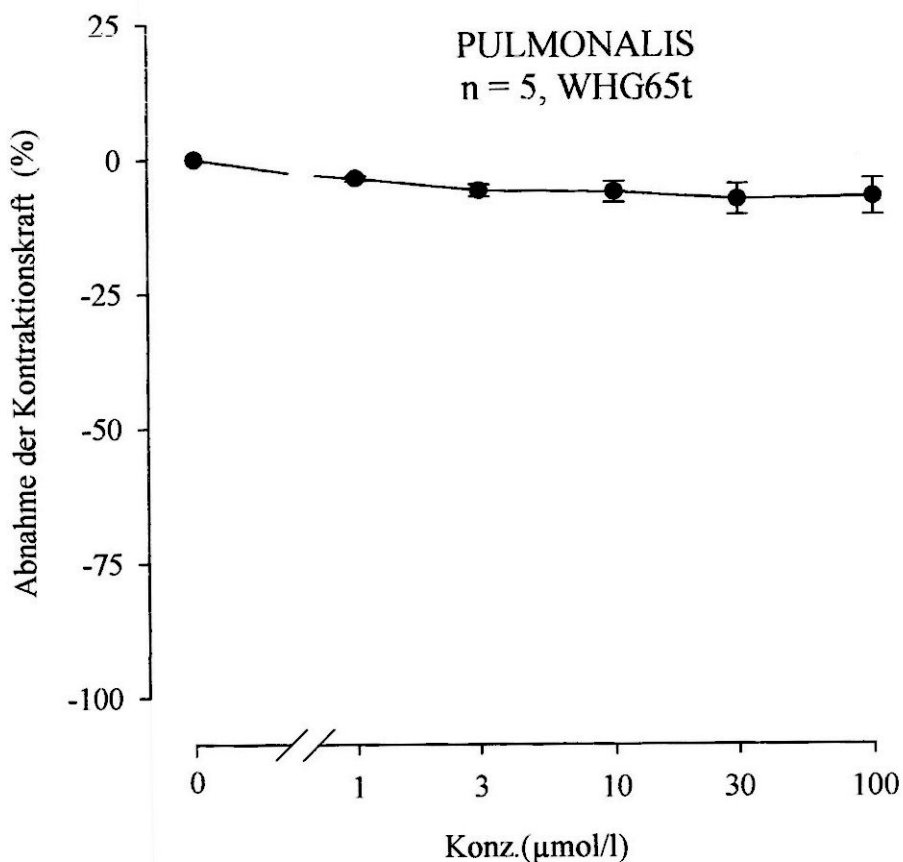
Tab. 4: Wirkung von WHG 56T auf die Kontraktionskraft (f_c) der isolierten Arteria Pulmonalis:

WHG 56T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumwahr- Scheinlichkeit P
Kontrolle	14,34 \pm 4,01	100 \pm 0	5	n.s
1	13,79 \pm 3,81	96,39 \pm 0,43	5	n.s
3	13,41 \pm 3,61	94,01 \pm 1,14	5	n.s
10	13,21 \pm 3,40	93,70 \pm 2,00	5	n.s
30	12,92 \pm 3,22	92,28 \pm 2,85	5	n.s
100	12,90 \pm 3,14	92,67 \pm 3,43	5	n.s

Legende zu Tabelle 4 :

In dieser Tabelle sind die Konzentrationsangaben, Irrtumwahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) in mN und in Prozent aus fünf Versuchen dargestellt.

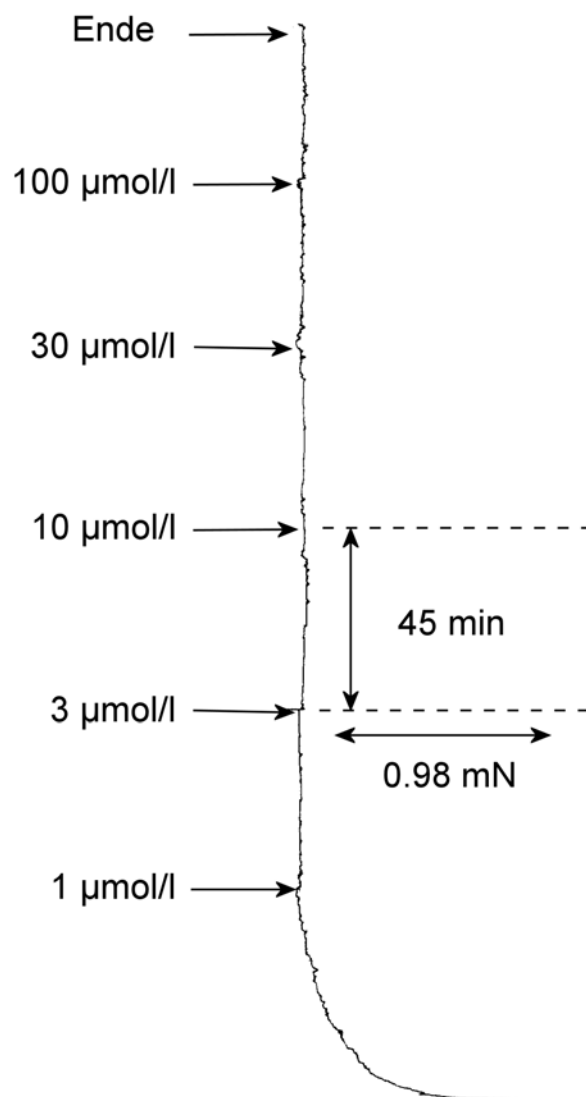
Abb. 15: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 56T auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 15:

In der Abbildung wurden auf der x-Achse die Konzentrationsstufen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent infolge der Einwirkung von WHG 56T dargestellt. Die arithmetischen Mittelwerte werden als Punkte aus fünf Versuchen und die Standerfehler als Balken dargestellt.

Abbildung 16: Originalregistrierung der Kontraktionskraft einer isolierten Arteria pulmonalis unter Einwirkung von WHG 56T



Legende zu Abbildung 16:

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis.

3.1.4. Wirkung auf rechte Vorhöfe

Nach einer Kontrollzeit wurde die chronotrope Wirkung von Substanz WHG 56T in unterschiedlichen Konzentrationen von (1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) getestet.

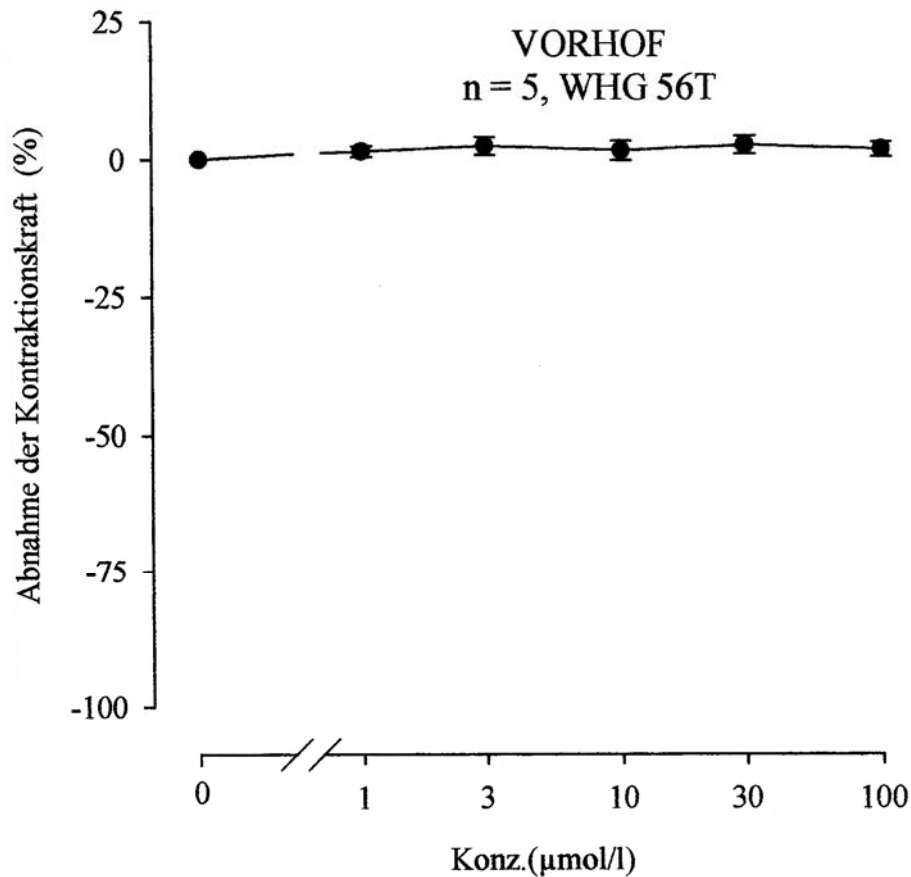
Tab. 5: Wirkung von WHG 56T auf die Schlagfrequenz (f_c) isolierter rechter Vorhöfe:

WHG 56T ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumwahr- Scheinlichkeit P
Kontrolle	209 \pm 13,36	100 \pm 0	5	n.s
1	212 \pm 12,90	101,48 \pm 0,98	5	n.s
3	214 \pm 12,98	102,48 \pm 1,62	5	n.s
10	212 \pm 12,10	101,62 \pm 1,73	5	n.s
30	214 \pm 11,55	102,64 \pm 1,60	5	n.s
100	213 \pm 13,09	101,9 \pm 1,33	5	n.s

Legende zu Tabelle 5:

In dieser Tabelle sind die Konzentrationsangaben, Irrtumwahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) in mN und in Prozent aus fünf Versuchen dargestellt.

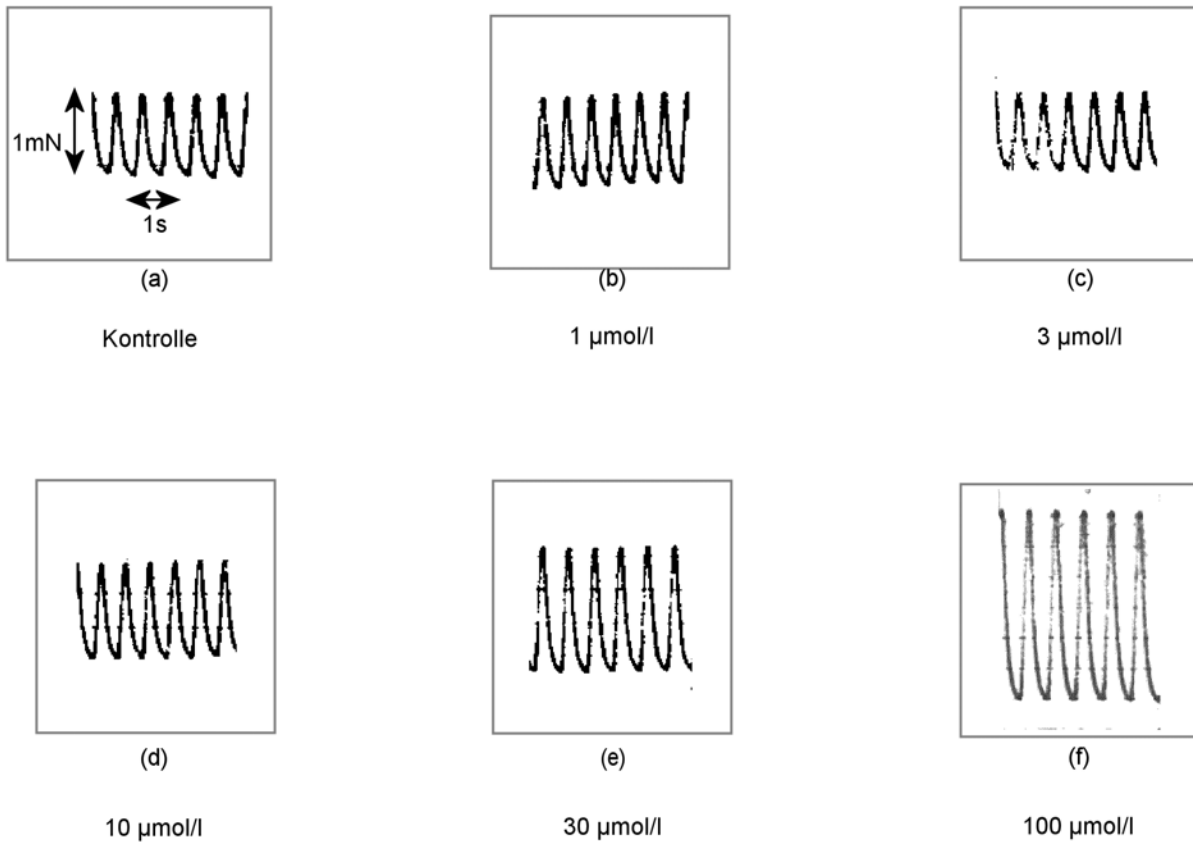
Abb. 17: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 56T auf rechte Vorhöfe



Legende zu Abbildung 17:

In der Abbildung wurden auf der x-Achse die Konzentrationsstufen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent infolge der Einwirkung von WHG 56T dargestellt. Die arithmetischen Mittelwerte werden als Punkte aus fünf Versuchen und die Standardfehler als Balken dargestellt

Abb. 18: Originalregistrierung der Schlagfrequenz am rechten Vorhof unter Einwirkung von WHG 56T



Legende zu Abbildung 18:

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Änderung der Schlagfrequenz am rechten Vorhof.

:

3.1.5. Wirkung auf den Papillarmuskel

Die Testsubstanz wurde auf die inotrope Wirkung untersucht. Es wurde fünf Versuche in Konzentrationen von 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt.

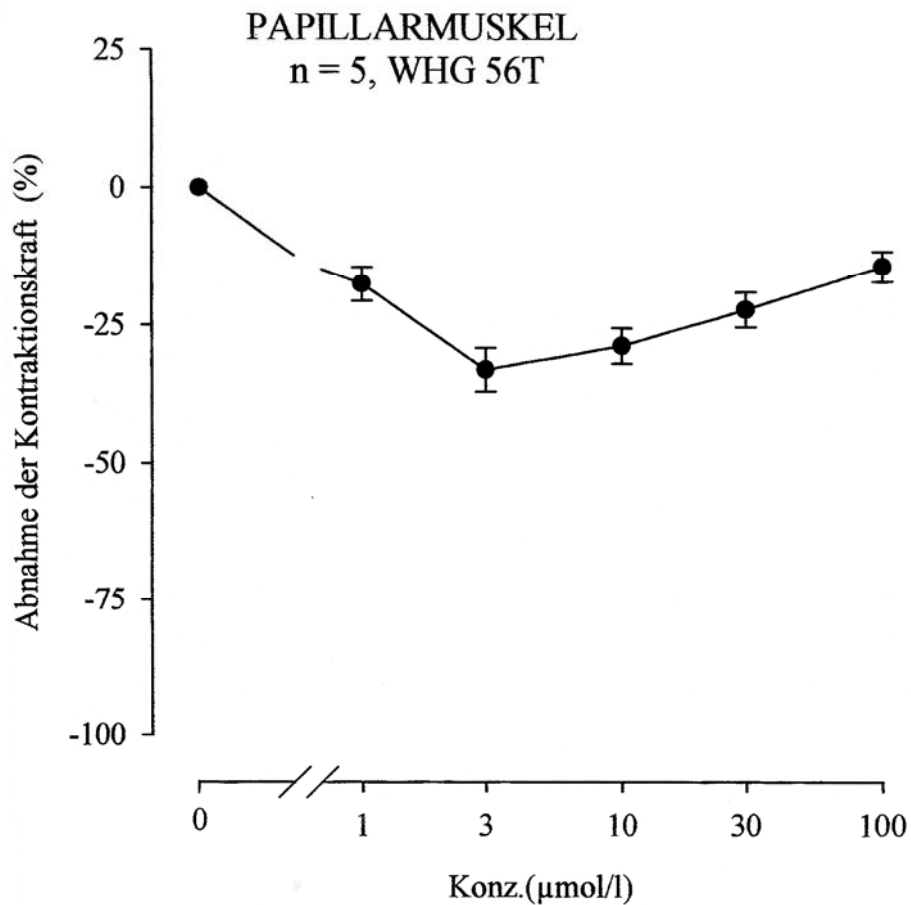
Tab. 6: Wirkung von WHG 56T auf die Kontraktionskraft (f_c) isolierten papillar muskel:

WHG 56T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumwahr- Scheinlichkeit P
Kontrolle	1,05 \pm 0,37	100 \pm 0	5	n.s
1	0.89 \pm 0,34	82,468 \pm 3,0674	5	n.s
3	0,74 \pm 0,30	66.995 \pm 3,9665	5	n.s
10	0,79 \pm 0,32	71,3186 \pm 3,1722	5	n.s
30	0,84 \pm 0,32	77,822 \pm 3,1177	5	n.s
100	0,93 \pm 0,35	85,75 \pm 2,798	5	n.s

Legende zu Tabelle 6:

In dieser Tabelle sind die Konzentrationsangaben, Irrtumwahrscheinlichkeiten, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) in mN und in Prozent aus fünf versuchen dargestellt.

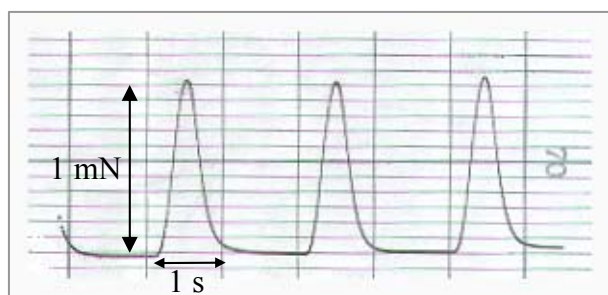
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 56T auf den Papillarmuskel



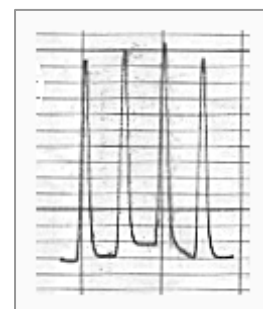
Legende zu Abbildung 19:

In der Abbildung wurden auf der x-Achse die Konzentrationsstufen der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent infolge der Einwirkung von WHG 56T dargestellt. Die arithmetischen Mittelwerte werden als Punkte aus fünf Versuchen und die Standerfehler als Balken dargestellt

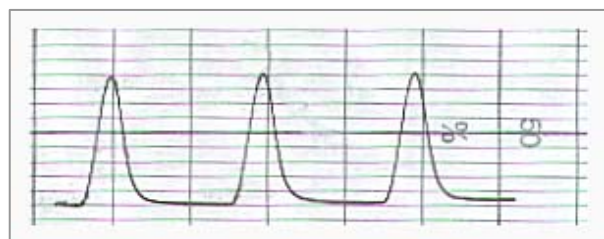
Abb. 20: Originalregistrierung der Kontraktionskraft eines isolierten Papillarmuskels unter Einwirkung von WHG 56T



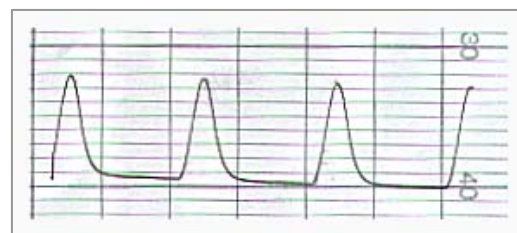
1 µmol/l



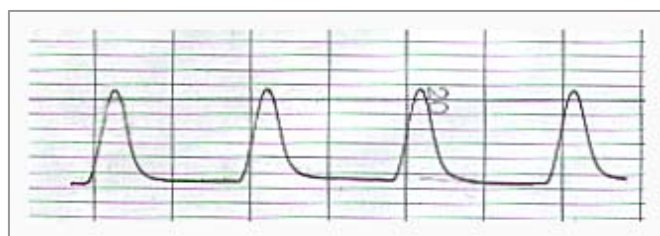
Control



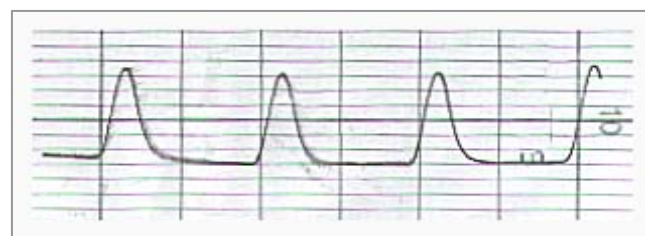
3 µmol/l



10 µmol/l



30 µmol/l



100 µmol/l

Legende zu Abbildung 20:

Die Originalregistrierung des Schreibers zeigt die Änderung der Kontraktionskraft am Papillarmuskel.

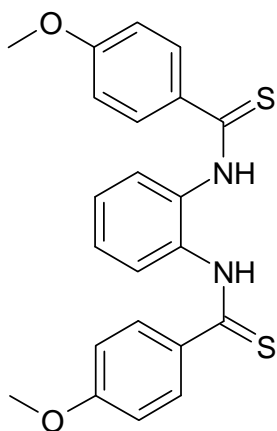
4. Diskussion

Diltiazem, ein Benzothiazepin-Derivat, ist ein "slow-channel"-Blocker, der seine Hauptwirkung an Sinus und AV-Knoten entfaltet. Diltiazem kann nicht nur bei der vasospastischen, sondern auch bei stabilen und instabilen Angina pectoris eingesetzt werden.

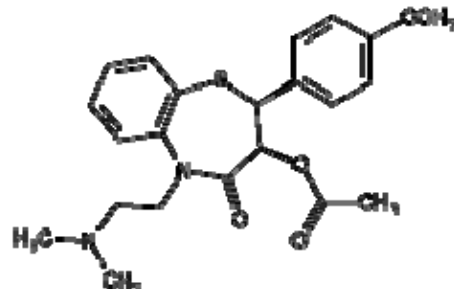
Durch die Blockade des Calciumeinstroms in die Myokardzellen kommt es durch Diltiazem zu einer Verminderung des ATP-Verbrauchs, was wiederum zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs führt und klinisch gesehen die Angina pectoris-Symptomatik reduziert (Fleckenstein-Grün 1994). Diltiazem wirkt auch kardioprotektiv, indem es das Herz vor den deletären Folgen einer intrazellularen Calciumüberladung bewahrt. Hierdurch können zusätzliche calciumbedingte Myokardschaden bei Anoxie verhütet werden, sodass sich die Ischämietoleranz verbessert.

Diltiazem hat eine klare Wirkung auf den Herzmuskel. Diltiazem hat eine negativ inotrope Wirkung. Es führt zu einem bescheidenen Rückgang der Kontraktilität und reduziert Myokard-Sauerstoff-Verbrauch. Außerdem hat eine negativ chronotrope Wirkung (Senkung der Herzfrequenz). Dieser Effekt wird durch Verlangsamung des SA-Knoten bewirkt.

Abb 21:



WHG56T



Diltiazem

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Wirkung WHG56T auf die Kontraktionskraft und Spontanaktivität isolierter Präparate des Meerschweinchenherzens untersucht. Die Testsubstanz weist auch strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Calciumantagonisten Diltiazem auf.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Unterschiede in ihrer Wirkung auf die Spontanaktivität und die Kontraktionskraft des Herzens, sowie Unterschiede bezüglich ihrer relaxierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur festzustellen.

Es wurde die Wirkung von WHG56T auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter Papillarmuskeln, die Spontanaktivität rechter Vorhöfe, die Spasmolyse an terminalen Ilea und die Vasodilatation an der Gefäßmuskulatur untersucht.

Die Substanz WHG56T hat eine anfangs schwach negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel, welche in einer Konzentration ab 30 $\mu\text{mol/l}$ wieder aufgehoben wird. Am rechten Vorhof zeigt WHG56T keine signifikante Wirkung auf die Schlagfrequenz.

An der Gefäßmuskulatur zeigte sich ebenfalls keine signifikante vasodilatierende Wirkung. Die Testsubstanz bewirkte am terminalen Ileum einen starken spasmolytischen Effekt mit einem EC_{50} -Wert von 2,64 $\mu\text{mol/l}$.

Die untersuchte Substanz hat somit gewebsspezifische Eigenschaften.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Testsubstanz WHG56T auf ihre negativ inotrope, chronotrope Wirkung an verschiedenen Präparaten des Meerschweinchens untersucht. Alle Versuchsreihen wurden nach der von Reiter(1967) beschriebenen Methode zur isometrischen Kontraktionsmessung an isolierten Präparaten von Meerschweinchen durchgeführt. Die isolierten Präparate wurden in Organbad eingebracht, das mit physiologischer, kontinuierlich mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) durchgeperlter Elektrolytlösung gefüllt war. Die Substanz wurde bis zu einer Konzentration von 100µmol/l getestet.

An spontan schlagenden rechten Vorhöfen hat die Testsubstanz keine Wirkung auf Schlagfrequenz und die zeigt keine signifikante chronotrope Wirkung.

An elektrische stimulierten Papillarmuskeln zeigte die Substanz eine schwach negativ inotrope Wirkung bis zu Konzentration 30µmol/l .

Die Testsubstanz hatte keine Wirkung auf kontrahierte Gefäße wie Aorta und Arteria pulmonalis.

An terminalen Ilea zeigte die Testsubstanz eine starke spamsolytische Wirkung und somit einen gewebespezifischen Effekt.

6. Literaturverzeichnis

Aaronson PI, Benham CO (1996) Potassium Channel Electrophysiology in Vascular Smooth Muscle Cells and the Site of Action of Potassium Channel Openers. In: Evans JM, Hamilton TC, Longman SO, Stamp G (eds.). Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Taylor & Francis Ltd, London-Bristol pp 157-172

Adams OJ, Nonner W (1990) Voltage-dependent potassium channels: gating, ion permeation and block. In: Potassium Channels - structure, classification, function and therapeutic potential. Ellis Horwood Series in pharmaceutical technology, Ellis Horwood Limited, Chichester pp 40-42

Buljubasic N, Marijic J, Stowe OF, Gross GJ, Kampine JP, Bosnjak ZJ (1991) Comparative cardiac effects of KT-362 and Verapamil in isolated hearts correlation to calcium channel current depression. J Cardiovasc Pharmacol 102: 1741-1778

Catterall WA, Striessnig J (1992) Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. Trends Pharmacol Sci 13:256-262

Carmeliet E (1990) The cardiac action potential. In: Rosen MR, Janse MJ, Wit AL (eds) Cardiac electrophysiology: a textbook. Mount Kisco, Futura Publishing Company, pp 55-62

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

Faber NE, Gross GJ (1989) Collateral blood flow following acute coronary artery occlusion: comparison of a new intracellular calcium antagonist (KT-362) and diltiazem. J Cardiovasc Pharmacol 14:66-72

Fleckenstein A, Döring HJ, Kammermeier H (1967) Experimental heart failure due to inhibition of utilisation of high-energy phosphates. In: Proceedings of an International Symposium on the Coronary Circulation and Energetics of the Myocardium, Milano 1966. Karger, Basel, New York, pp 220-236

Fleckerstein-Grün G (1994) Historical development of calcium antagonism. In memoriam Albrecht Fleckenstein (1917-1992). High Blood Pressure 3:284-290
Fleckerstein-Grün G (1996) Die Geschichte der Entdeckung und klinischen Anwendung von Calciumantagonisten. In: Kübler W, Tritthart HA (eds) Calciumantagonisten: Forschung und Klinik, Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. Steinkopf-Verlag, Darmstadt, pp 1-15

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp 363-367; 420-421

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

Halbwidl T (1999) Untersuchung der Wirkung zweier Pyridothiazinderivate auf die Spontanaktivität und Kontraktionskraft isolierter Präparate des Meerschweinchenherzens, Diplomarbeit, Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien 28-51

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

Latorre R, Labarca P (1996) Potassium Channels : Diversity, Assembly and Differential Expression. In: Evans JM, Hamilton TC, Longman SD, Stemp G (eds.) Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Taylor & Francis Ltd, London-Bristol pp 123-155

Lydin H, Trenkelder P (1988) Calciumantagonisten. Eine kritische Analyse. Springer Verlag pp 7-22

Nakajima H, Hoshiyama M, Yamashita K, Kiyomoto A (1975) Effect of diltiazem on electrical and mechanical activity of isolated cardiac ventricular muscle of guinea pig. *Jpn J Pharmacol* 25:383-392

Quast U, Gullon JM, Cavero I (1994) Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 28:805-810

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

Reuter H (1986) Voltage-dependent mechanisms for raising intracellular free calcium concentration: calcium channels. In: *Calcium and the cell*. Ciba Foundation Symposium 122, Wiley J and sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore pp 5-22

Robertson DW, Steinberg MI (1990) Potassium Channel Modulators: Scientific Applications and therapeutic promise. *J Med Chem* 33:1529-1541

Rohleder S (2000) Untersuchung von 2,3-Dihydro-1-[3-(2-phenylethylamino) propionyl]-1H-pyrido[2,3-b][1,4]thiazin monooxalat (MPIO) und 1-[3-[2-(2,4-Dichlorphenyl) ethylamino]propionyl]-2,3-dihydro-1H-pyrido[2,3-b][1,4]thiazin monooxalat (MP60) auf ihre negativ inotrope und negativ chronotrope Wirkung an isolierten Papillarmuskeln und rechten Vorhöfen des Meerschweinchenherzens. Diplomarbeit, Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien 27-46

Saikawa T, Nagamoto Y, Arita M (1977) Electrophysiologic effects of diltiazem, a new channel inhibitor on canine cardiac fibers. *Jap Heart J* 18:235-244

Schmid R (2000) Untersuchung der Wirkung von neuen Pyridothiazin-Derivaten auf isolierte Herzmuskelpräparate und glatte Muskulatur von Meerschweinchen. Diplomarbeit, Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien 20-46

Silbemagl S, Despopoulos A (1991) Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart pp 164-165

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ in arterial smooth muscle. *Science* 245,177-180

Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL (1987) Calcium channels : Mechanism of selectivity, permeation and block. *Annu Rev Biophys Chem* 16:265-290

Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Thins* 11:431-438

Winifred GN (1992) Molekulare Biologie der spannungsabhängigen auf Calcium-Antagonisten ansprechende Calciumkanäle. In: *Calcium-Antagonisten der zweiten Generation*. Springer Verlag pp 26-27

7. Lebenslauf

VORNAME : Mona
NACHNAME : El Tahan
GEBUTSDATUM : 22.2.1977
GEBUTSORT : Ägypten / Alexandria
STATTS-
BÜRIGERSCHAFT : Ägypten
FAMILIENSTAND : Verheiratet

SCHULE /AUSBILDUNG: 1984 – 1990 Volksschule (Alexandria)
1990 – 1993 AHS (Unterstufe)
1993 – 1995 AHS (Oberstufe)
1995 Matura

STUDIUM : 1996 – 2001 Studium Pharmazie
in Ägypten / Alexandria
2007 – 2009 Nostrifikation (Pharmazie) an der
Universität Wien

BERUFSERFAHRUNG : 2002 – 2004 Apothekerin in Alexandria