



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Profil zweier neu synthetisierter
disubstituierter Azolderivate (MGdth8 und MGpy3·HCl) an
isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Dorian Hirschmann

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie, bei meiner Freundin Stephanie und bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für die Unterstützung während des Studiums und der Zeit in der diese Diplomarbeit entstanden ist herzlich bedanken.

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.2	Arterielle Hypertonie	2
1.3	Pulmonale arterielle Hypertonie.....	2
1.4	Koronare Herzkrankheit	3
1.5	Stickstoffmonoxid als Signalstoff.....	3
2	METHODEN	5
2.1	Testsubstanzen.....	5
2.1.1	Testsubstanz Nr.1 – MGdth8	5
2.1.2	Testsubstanz Nr.2 –MGpy3·HCl	5
2.1.3	Herstellung der Versuchslösung	6
2.1.4	Dimethylsulfoxid (DMSO).....	6
2.2	Versuchstiere	7
2.3	Versuchsorgane.....	7
2.3.1	Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader)	8
2.3.2	Truncus pulmonalis (Lungenstamm).....	8
2.3.3	Terminales Ileum (Endabschnitt des Hüftdarms)	8
2.3.4	Musculus papillaris (Papillarmuskel).....	8
2.3.5	Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof des Herzens).....	9
2.4	Organentnahme und Präparation	10
2.4.1	Allgemeines	10
2.4.2	Präparation der Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader)	10
2.4.3	Präparation des Truncus pulmonalis (Lungenstamm)	10
2.4.4	Präparation des terminalen Ileum (Hüftdarm).....	11
2.4.5	Präparation des Musculus papillaris (Papillarmuskel)	11
2.4.6	Präparation des Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof).....	11
2.5	Versuchsanordnung.....	12
2.5.1	Allgemeines	12
2.5.2	Apparatur 1	12
2.5.3	Apparatur 2	15
2.5.4	Nährlösung	16
2.5.5	Gasversorgung	17
2.5.6	Kaliumchlorid-Lösung zur Vorkontraktion	17
2.6	Versuchsablauf.....	17
2.6.1	Allgemeines	17
2.6.2	Versuchsablauf - Aorta descendens	19
2.6.3	Versuchsablauf - Truncus Pulmonalis.....	20
2.6.4	Versuchsablauf - Terminales Ileum.....	20
2.6.5	Versuchsablauf - Musculus papillaris	20
2.6.6	Versuchsablauf – Atrium cordis dextrum.....	21
2.6.7	Versuchsablauf zur Untersuchung des Wirkmechanismus	21
2.7	Datenauswertung	22
2.7.1	Allgemeines	22
2.7.2	Datenauswertung – Aorta descendens	23

2.7.3	Datenauswertung – Truncus pulmonalis	23
2.7.4	Datenauswertung – Terminales Ileum	24
2.7.5	Datenauswertung – Musculus papillaris.....	24
2.7.6	Datenauswertung – Atrium cordis dextrum	24
2.7.7	Datenauswertung der Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum	24
2.7.8	Statistische Mittel zur Beurteilung der Daten	25
3	ERGEBNISSE.....	26
3.1	Allgemeines.....	26
3.2	Ergebnisse – MGdth8	26
3.2.1	Ergebnisse – MGdth8 an der Aorta descendens.....	27
3.2.2	Ergebnisse – MGdth8 am Truncus pulmonalis	30
3.2.3	Ergebnisse – MGdth8 am terminalen Ileum	33
3.2.4	Ergebnisse – MGdth8 am Musculus papillaris.....	35
3.2.5	Ergebnisse – MGdth8 am Atrium cordis dextrum	38
3.3	Ergebnisse – MGpy3·HCl.....	41
3.3.1	Ergebnisse – MGpy3·HCl an der Aorta descendens	41
3.3.2	Ergebnisse – MGpy3·HCl am Truncus pulmonalis	44
3.3.3	Ergebnisse – MGpy3·HCl am terminalen Ileum	47
3.3.4	Ergebnisse – MGpy3·HCl am Musculus papillaris	50
3.3.5	Ergebnisse – MGpy3·HCl am Atrium cordis dextrum	53
3.3.6	Ergebnisse der Untersuchungen zum Wirkmechanismus von MGpy3·HCl am terminalen Ileum	56
4	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	59
4.1	Interpretation der Ergebnisse – MGdth8	59
4.1.1	Beurteilung der Daten.....	59
4.1.2	Schlussfolgerungen und mögliche weitere Versuche	59
4.2	Interpretation der Ergebnisse – MGpy3·HCl.....	60
4.2.1	Beurteilung der Daten.....	60
4.2.2	Interpretation der Ergebnisse der Analyse des Wirkmechanismus	61
4.2.3	Anwendungspotential von MGpy3·HCl	61
4.2.4	Mögliche Gründe für die Unterschiede in der Wirkung der beiden Testsubstanzen	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	65
7	CURRICULUM VITAE	66

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Allgemeines

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist die Dokumentation eines Screenings zweier Testsubstanzen welche am Department für pharmazeutische/medizinische Chemie des Pharmaziezentrum der Universität Wien von der Arbeitsgruppe um Professor Thomas Erker als Wirkstoffe mit Potential zur vasodilatierenden (gefäßerweiternden) Wirkung synthetisiert wurden. Die beiden Substanzen besitzen eine gemeinsame chemische Grundstruktur und wurden im Rahmen des Screenings in mehreren Versuchsreihen auf ihre Wirkungen getestet. Im Zentrum der dafür herangezogenen Methoden stehen isometrische Messungen der Kontraktionen isolierter Organe von Meerschweinchen, deren Durchführung den praktischer Teil dieser Diplomarbeit darstellt. Durch die Verwendung verschiedener Organe war es möglich für die beiden Testsubstanzen je ein Wirkungsprofil im Sinne einer Organspezifität zu erstellen.

Dabei wurden Wirkungen auf den Kontraktionszustand von Blutgefäßen, einen Teil des Darms und Teile des Herzens dokumentiert. Dieses Screening sollte nicht dazu dienen, einen Wirkstoff als zukünftigen Arzneistoff zu identifizieren, sondern stellt lediglich eine grobe Orientierung dar, die Aufschluss darüber geben kann ob eine Substanz eine Selektivität für ein bestimmtes Organ bzw. eine spezifische Wirkung aufweist. Diese Information ist insofern von Interesse als nach diesem Vorgehen mit einer ausreichenden Anzahl an Substanzen derselben Wirkstoff-Klasse/Grundstruktur eine Struktur-Wirkungs-Beziehung hergestellt werden kann. So ist es im weiteren Verlauf der Wirkstoffsynthese möglich bei der Herstellung neuer Substanzen einem konkreten Plan bezüglich deren erwünschter Wirkung zu folgen und nach den so erschlossenen Möglichkeiten die Grundlagen für die rationale Entwicklung künftig als Arzneistoff anwendbarer Substanzen zu legen. Diese Arbeit ist somit nur ein Schritt von vielen auf dem Weg der Synthese eines neuen Arzneistoffes bzw. einer neuen Arzneistoffgruppe.

Da unabhängig von den im Verlauf dieser Diplomarbeit gewonnenen Erkenntnissen über andere Effekte grundsätzlich die Wirkung der Vasodilatation im Vordergrund steht, sollen an dieser Stelle die drei Krankheitsbilder und die bisherigen Therapiemöglichkeiten der

arteriellen Hypertonie, der pulmonalen arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzkrankheit kurz und überblicksmäßig erläutert werden.

1.2 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist definiert durch eine chronische Erhöhung des arteriellen Blutdruckes, nach WHO-Kriterien über 140 mm Hg systolischen bzw. 90 mm Hg diastolischen Wert und kann verschiedene Ursachen und Ausprägungen haben. Neben der ursächlichen Behandlung einer sekundären Hypertonie erfolgt die Therapie der primären oder idiopathischen Hypertonie (also einer Hypertonie für die keine Ursache auffindbar ist) um die Folgeerscheinungen eines solch dauerhaft erhöhten Blutdruckes zu verhindern, welche durch die körpereigenen Kompensationsmechanismen zustande kommen und eine Hypertrophie und verminderte Elastizität der Gefäßwände und des Herzens beinhaltet, die wiederum zu Erkrankungen wie Arteriosklerose und Herzinsuffizienz führt welche irreversible Endpunkte der Hypertonie darstellen hauptsächlich mit Arzneistoffen aus vier Wirkstoffgruppen. Diese beinhalten die ACE-Hemmer (und Sartane), Betaadrenozeptorenblocker, Kalziumkanalblocker und Diuretika. Neben diesen Grundpfeilern der Therapie der arteriellen Hypertonie existieren auch noch weitere gängige Wirkstoffe sowie kaum eingesetzte aber grundsätzlich vasodilatierende Wirkstoffe wie Hydralazin, Dihydralazin, PDE4-Hemmer, Alphaadrenorezeptorenblocker, Reninantagonisten und andere (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High blood Pressure. 2003).

1.3 Pulmonale arterielle Hypertonie

Die pulmonale arterielle Hypertonie ist eine zu den „seltenen Krankheiten“ (Prävalenz: weniger als fünf pro 10.000 Einwohner) gehörende chronische Erhöhung des Blutdruckes im Lungenkreislauf, die analog zur arteriellen Hypertonie ihren irreversiblen Endpunkt bei fehlender Behandlung in einer Rechtsherzhypertrophie und einer verringerten Elastizität der Gefäßwände des Lungenkreislaufes hat, welche durch die eine verminderte Auswurfleistung des Herzens und dem erhöhten Gefäßwiderstand gegen den dieses arbeiten muss zu einer massiven Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme und -versorgung führt, welche sich unter anderem durch starke Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit und relativ hohe Letalität bemerkbar macht. Ein normaler Blutdruckwert

des Lungenkreislaufes beträgt laut WHO unter 20 mm Hg. Zur Standardtherapie herangezogen werden unter anderem typischerweise PDE-5-Hemmer wie Sildenafil und Endothelin-Antagonisten wie Bosentan (Eddahibi et al. 2002).

1.4 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) entwickelt sich zumeist auf Basis von Arteriosklerose der Herzkranzgefäße – also jener Gefäße, die dazu dienen den Herzmuskel mit Blut zu versorgen. In der Folge entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf im Herzmuskel und es kommt auf Grund der Laktatakkumulation im Rahmen der anaeroben Glykolyse zur Angina pectoris (starken retrosternale Schmerzen), dem typischen Symptom der KHK.

Da die Entwicklung einer KHK unter anderem Abhängig von Lebensgewohnheiten wie Ernährung, Rauchen und körperlicher Betätigung ist und die KHK in ihrem Verlauf die Risiken von akuten Manifestationen wie Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz drastisch erhöht, verwundert es nicht, dass sie an erster Stelle der Todesursachen in den Industrienationen steht.

Zur symptomatischen Behandlung der Angina pectoris kommen typischerweise Nitrate und andere Stickstoffmonoxid-freisetzende Substanzen (NO-Donatoren) zum Einsatz, die durch eine Dilatation der Herzkranzgefäße eine adäquate Sauerstoffversorgung des Herzmuskels wiederherstellen (Classen et al. 2006, Renz-Polster et al. 2004).

Da der Mechanismus der NO-Freisetzung auch der postulierte Wirkmechanismus der in dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen ist, wird die physiologische und medizinische Bedeutung von NO im Folgenden erläutert.

1.5 Stickstoffmonoxid als Signalstoff

Das im Zentrum des Wirkmechanismus der beiden untersuchten Substanzen stehende Molekül Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gas welches bevor es im Laufe der 1980er Jahre als ebendieses identifiziert werden konnte wegen seiner vasodilatierenden Wirkung als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet wurde. Dieses Molekül wird nach

Verabreichung von NO-freisetzenden Substanzen entweder hydrolytisch bzw. in Folge der Biotransformation enzymatisch freigegeben oder durch Stimulation des in Endothelzellen vorhandenen Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) in gesteigerter Menge produziert. Die zu einem gewissen Grad auch ohne äußeren Einfluss auf Grund der stetig ablaufenden Synthese von NO aus L-Arginin – welche im Normalzustand im Gleichgewicht mit vielen anderen regulatorisch wirkenden Transmittern des komplexen Blutdruckkontrollsystems des menschlichen Körpers steht – resultierende Erhöhung der NO-Konzentration im Gefäßsystem, steigert die Aktivität des Enzyms Guanylylcyclase und damit die Menge dessen Produktes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) im Zytosol der beteiligten Zellen. In weiterer Folge sinkt über einen nicht genau bekannten Mechanismus, an welchem die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) durch das erwähnte cGMP jedoch eine Rolle spielt, die Konzentration der Kalziumionen (Ca^{++}), ein Zustand der für eine Verminderung der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur ausschlaggebend ist (Aktories et al. 2009).

In dieser Arbeit sollen nicht nur die Wirkungen der beiden Substanzen dokumentiert, sondern auch analysiert werden, inwieweit der beschriebene Wirkmechanismus auf die Substanzen zutreffend ist.

2 Methoden

2.1 Testsubstanzen

Zwei verschiedene Testsubstanzen wurden im Rahmen der beschriebenen Versuche analysiert. MGdth8 und MGpy3·HCl stellen sich als einander ähnliche Verbindungen dar, die nach der „MG-Grundstruktur“ aus drei verbundenen Ringsystemen bestehen, wobei das mittig angeordnete ein Heteroaromat ist und die beiden äußeren je einen Phenylrest darstellen, wobei einer dieser beiden Reste an Position 3 eine Propoxygruppe trägt.

Da die Verbindungen als eNOS-stimulierende Wirkstoffe synthetisiert wurden, sollten sie auf ihre generelle Wirksamkeit sowie auf den postulierten Wirkmechanismus untersucht werden.

2.1.1 Testsubstanz Nr.1 – MGdth8

Bei dem Molekül MGdth8 handelt es sich um die Verbindung 2-(3-propoxyphenyl)-5-phenyl-thiazol. Es besitzt einen Thiazolring und somit ein Stickstoff- und ein Schwefelatom.

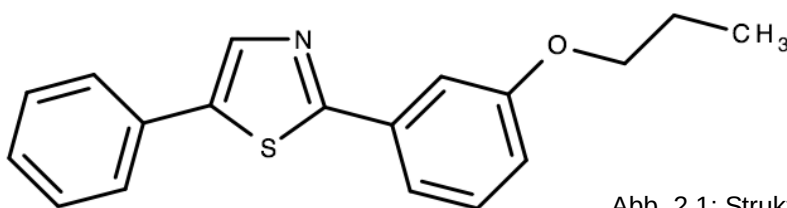


Abb. 2.1: Strukturformel der Testsubstanz MGdth8

2.1.2 Testsubstanz Nr.2 –MGpy3·HCl

Testsubstanz Nr. 2 ist das 3-Phenyl-5-(3-propoxyphenyl)-1H-pyrazol Hydrochlorid. Diese Verbindung enthält in ihrem Pyrazolring zwei Stickstoffatome. Sie kam als Hydrochlorid zur Anwendung, da sonst eine ausreichende Löslichkeit nicht gegeben wäre.

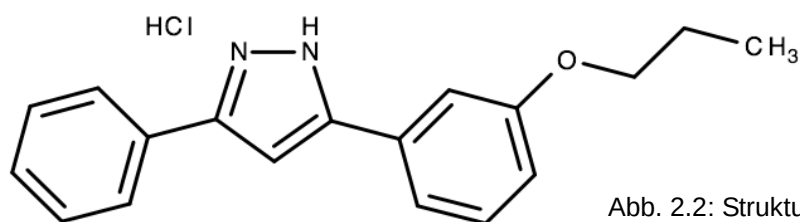


Abb. 2.2: Strukturformel der Testsubstanz MGpy3·HCl

2.1.3 Herstellung der Versuchslösung

Es wurde für jeden Versuch eine frische Lösung des Wirkstoffes nach Erfahrungswerten vorangegangener Arbeiten auf folgende Weise angefertigt: Auf Basis des Molekulargewichtes wurde eine Einwaage berechnet, die je nach verwendeter Apparatur zwei unterschiedliche Werte annehmen konnte, um im Testgefäß (= Organbad) bei maximaler Wirkstoffgabe eine Konzentration von 100 µmol/l zu erreichen. Die eingewogene Substanz wurde anschließend in 100µl Dimethylsulfoxid (siehe folgendes Unterkapitel) gelöst. In Tabelle 2.1 sind die Einwaagen für die jeweiligen Organbäder angeführt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Volumen des Organbades [ml]	Einwaage der Substanz [mg]
MGdth8	295,40	8	0,25
		25	0,74
MGpy3·HCl	314,81	8	0,27
		25	0,79

Tabelle 2.1: Einwaagen der Testsubstanz in Abhängigkeit zum Volumen des verwendeten Organbades

2.1.4 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das hygroskopische, farb- und geruchlose DMSO wird häufig für Versuche an lebenden Zellen und Organen verwendet, da es eine im Vergleich zu anderen organischen

Lösungsmitteln schwache zytotoxische Wirkung besitzt, welche in Konzentrationen von unter zehn Prozent vernachlässigbar ist. Beide in diesem Kapitel beschriebenen Testsubstanzen wurden für die Herstellung der Versuchslösungen in dieser Flüssigkeit gelöst, da eine ausreichende Wasserlöslichkeit nicht gegeben war (Douglas. 1946, Sexton. 1979, Da Violante et al. 2002).

Da sämtliche in den Versuchen studierte mögliche Wirkungen der Testsubstanzen (Einfluss auf Chronotropie, Inotropie und Gefäß- und Eingeweidemuskeltonus) auf die Versuchsorgane in geringer Ausprägung generell auch durch DMSO beeinflusst werden, mussten die Messwerte bei deren Auswertung diesbezüglich noch angeglichen werden, was durch Multiplikation der scheinbaren Substanzwirkung mit einem Korrekturfaktor, der in vorangegangenen Versuchen bereits ermittelt worden war bewerkstelligt wurde (Hintersteininger. 2010).

2.2 Versuchstiere

Die für sämtliche Versuche verwendeten Organe stammten aus Meerschweinchen des TRIK-Stammes, diese nachvollziehbare Herkunft sollte die Verwendung von aus Inzucht hervorgegangenen Tieren verhindern. Die Wahl der Versuchstiere fiel hauptsächlich aus zwei Gründen auf diese Tierart. Zunächst sind die auf Zelloberflächen exprimierten Rezeptoren bzw. Ionenkanäle denen des Menschen sehr ähnlich und es lassen sich daher grundsätzlich Schlüsse auf Wirkungen von Testsubstanzen auch am Menschen ziehen. Eine Garantie für eine äquivalente Wirkung zwischen Meerschweinchen- und Menschenorgan ist dies dennoch nicht, ein Umstand der den Screening-Charakter dieser Methode hervorhebt. Außerdem ist auf Grund der zur Verfügung stehenden Apparaturen die Größe des Versuchsorgans beschränkt, die Organe der zwischen 250 und 600 Gramm schweren Meerschweinchen eignen sich daher gut für diesen Zweck.

2.3 Versuchsorgane

Im Folgenden werden die fünf verschiedenen Organsysteme beschrieben, an welchen die beiden Wirkstoffe getestet wurden. (Der an dieser Stelle und auch in späteren Kapiteln verwendete Begriff „Organsystem“ soll verdeutlichen, dass es sich bei dem darauf bezogenen Versuchsobjekt um eine der folgenden fünf Präparat-Arten handelt und nicht um ein einzelnes Organ.)

2.3.1 Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader)

Der absteigende Teil der Hauptschlagader, die das sauerstoffreiche Blut aus dem linken Ventrikel des Herzens in die Arterien des Blutkreislaufs führt wurde auf reaktive Senkung des Tonus seiner glatten Muskulatur nach Wirkstoffzugabe untersucht. Die Ergebnisse der Messwerte an diesem Organ geben somit Aufschluss über eine etwaige vasodilatorische Wirkung zumindest an arteriellen großen Gefäßen und sind somit Voraussetzung für einen zukünftig möglichen Einsatz getesteter Substanzen in der Behandlung der Hypertonie (Fanghänel et al. 2003).

2.3.2 Truncus pulmonalis (Lungenstamm)

Der Truncus pulmonalis ist der gemeinsame Gefäßstamm der beiden Lungenarterien, die das sauerstoffarme Blut aus dem rechten Ventrikel zum Zweck der Oxygenierung in die Lunge transportieren. Dieser Gefäßabschnitt ist insofern von Interesse, als Substanzen mit relaxierender Wirkung in diesem Bereich für die bereits in der Einleitung erwähnte Therapie der arteriellen pulmonalen Hypertonie in Frage kommen (Fanghänel et al. 2003).

2.3.3 Terminales Ileum (Endabschnitt des Hüftdarms)

Dieses Präparat stellt einen Teil des Dünndarms und somit des Gastrointestinaltraktes dar, dessen Hauptaufgabe der Weitertransport und die Resorption von Nahrungsbestandteilen ist. Er wurde für die Versuche herangezogen um eine mögliche spasmolytische Wirkung auf den Darm festzustellen, welche in der Bluthochdrucktherapie natürlich nicht erwünscht ist. Selektiv spasmolytisch auf den Darmtrakt wirkende Substanzen hingegen haben das Potential gegen Durchfallerkrankungen oder Koliken eingesetzt zu werden (Fanghänel et al. 2003).

2.3.4 Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Die Papillarmuskeln sind Ausstülpungen (Papillen) der Herzmuskulatur, die über Sehnen mit den Segelklappen des Herzens verbunden sind. Diese Segelklappen dienen als

flussrichtungsabhängige Ventile zwischen Vorhof und Kammer, die bei der Kontraktion des Herzmuskels ein Zurückströmen des Blutes von den Kammern in die Vorhöfe verhindern. Die Segelklappe zwischen rechtem Vorhof und rechter Kammer wird als Trikuspidalklappe bezeichnet und weist drei Papillarmuskelansätze auf, die Klappe zwischen linkem Vorhof und linker Kammer (Bikuspidalklappe) ist hingegen nur mit zwei solcher Muskeln verbunden.

Da die Papillarmuskeln in Abhängigkeit von der Kontraktionskraft des Herzmuskels (Inotropie) kontrahieren um ein Durchschlagen der Segelklappen in die Vorhöfe zu verhindern, lassen sich die durch Wirkstoffgabe veränderten und durch elektrische Reizung provozierten Kontraktionen stellvertretend für die Beeinflussung der Schlagkraft des Herzens messen (Fanghänel et al. 2003).

Eine negativ inotrope Wirkung der Testsubstanzen könnte einerseits nutzbringend in der Therapie der Hypertonie durch Minderung des systolischen Blutdruckes und auf Grund einer Ökonomisierung der Herzarbeit sein, da der Herzmuskel durch eine solche Wirkung einen geringeren Sauerstoffbedarf aufweist (ähnlich den Beta-Adrenozeptoren-Blockern), wäre andererseits im Sinne einer Organselektivität jedoch nicht erwünscht, da sich dadurch auch unerwünschte Effekte ergeben könnten (Aktories et al. 2009).

2.3.5 Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof des Herzens)

Der rechte Vorhof des Herzens, der im lebenden Organismus die Aufgabe hat, Blut in den rechten Ventrikel zu pumpen, beherbergt den Sinusknoten, der primäre Schrittmacher des Erregungssystems des Herzens. Die von ihm generierten Aktionspotentiale breiten sich normalerweise in einer gerichteten Bewegung über das Herz aus und ermöglichen einen gezielten Kontraktionsablauf. Durch diese autonome Funktion des Sinusknotens konnte direkt der Einfluss von Testsubstanzen auf die Herzfrequenz (Chronotropie) gemessen werden. Die Wirkung einer Substanz auf die Schlagfrequenz des Herzmuskels wäre für einen geplanten Einsatz in der Bluthochdrucktherapie definitiv unerwünscht (Fanghänel et al. 2003).

2.4 Organentnahme und Präparation

2.4.1 Allgemeines

Um die Organe rasch isolieren und präparieren zu können und die Tieren nicht physischem und psychischem Stress auszusetzen wurden die Meerschweinchen durch einen Genickschlag getötet. Danach wurden Brust- und Bauchraum umgehend eröffnet. Nach der Entnahme wurden die Organe so bald wie möglich präpariert, dieser Schritt erfolgte in einer Kristallisierschale, auf deren Boden eine Korkplatte aufgelegt wurde um Organe und Organteile mit Stecknadeln fixieren zu können. Diese Präparierschalen waren stets mit Nährlösung (siehe Kapitel 2.5.4) gefüllt um eine möglichst lange Haltbarkeit der Präparate zu gewährleisten. Auch in der Zeit, die zwischen Entnahme und Präparation verstrich wurden die Organe in dieser Nährlösung aufbewahrt. Der Präparationsschritt erfolgte auf Grund der geringen Größe der Organe immer unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung und Verwendung von Pinzette und Federgriffschere, zwei Werkzeuge die eine sehr genaue Arbeitsweise auch im kleinen Maßstab ermöglichen.

2.4.2 Präparation der Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader)

Nachdem die Hauptschlagader von Fett- und Bindegewebe befreit wurde erfolgte eine Zerteilung in ca. 1,5 mm breite Stücke. Durch diese nun ringförmige Struktur konnten die Teile der Aorta einfach und ohne weitere Hilfsmittel in der Versuchsanordnung fixiert werden.

2.4.3 Präparation des Truncus pulmonalis (Lungenstamm)

Der gemeinsame Gefäßstamm der beiden Lungenarterien wurde in gleicher Weise präpariert wie die Aorta descendens und konnte somit ebenfalls ohne weitere Hilfsmittel in der Versuchsanordnung befestigt werden.

2.4.4 Präparation des terminalen Ileum (Hüft darm)

Um einen Teil des Ileum in die Apparatur einzubringen, war es notwendig ein ca. 0,5 cm langes Stück aus dem Darm herauszuschneiden und nach Abschrägen der beiden Enden an beiden Seiten je einen Haken aus Draht mit Bindfaden zu befestigen. Das schräge Zuschneiden der Enden war ein wichtiger Schritt bei der Präparation, da nach Anbringen der Haken nur so ein Offenbleiben des Darmlumens und somit eine Versorgung desselben mit Nährlösung bzw. Wirkstoff gewährleistet werden konnte.

2.4.5 Präparation des Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Noch während der Entnahme aller vorhandenen Papillarmuskel durch Herausschneiden aus den eröffneten Ventrikeln wurden an diese jeweils ein Drahhaken mittels Bindfaden befestigt. Die Befestigung erfolgte stets am Ursprungsende des Muskels, also dem das mit der Herzwand verwachsen war und nicht mit der Herzklappe.

2.4.6 Präparation des Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)

Der rechte Vorhof wurde mit mehreren Schnitten durch das Muskel- und Bindegewebe dem Herzen entnommen. Dabei war darauf zu achten, vor allem im Bereich des rechten Herzohres (Auricula cordis dextra) keine zum Herz gehörenden Strukturen zu „vergessen“ da sich in dieser Region der Sinusknoten (primärer Schrittmacher des Herzens) befindet ohne welchen eine erfolgreiche Messung der Herzfrequenz nicht möglich wäre. Außerdem wurde an der dem Herzzentrum abgewandten Seite ein kleines Stück Fettgewebe übriggelassen um eine Richtungsorientierung zu ermöglichen. Das Einbringen in die Versuchsanordnung erfolgte nun durch Befestigung von Drahhaken mit Bindfaden an oberem und unterem Ende des Präparates wobei auf Grund der Reproduzierbarkeit des Versuches der Vorhof immer mit der dem Herzzentrum abgewandten Seite nach oben eingespannt wurde.

2.5 Versuchsanordnung

2.5.1 Allgemeines

Das Grundprinzip auf dem die Versuchsanordnung basiert ist die Ermöglichung der Messung der Kontraktionskraft der Organe. Diese wurde bewerkstelligt indem das jeweilige Organ an seinem unteren Ende nicht beweglich befestigt wurde und das obere Ende durch einen Draht mit einem Kraftwandler verbunden wurde. Dieser Kraftwandler war nun das ausschlaggebende Element um mechanische Bewegungen der Organe in elektrische Signale umzuwandeln, wobei ein stetiger Stromfluss durch den enthaltenen Dehnungsmessstreifen bei erfolgter Dehnung auf größeren Widerstand traf. Diese Widerstandsänderungen während des Versuchs wurden mit einem Verstärker amplifiziert und von dem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

Während des gesamten Messvorganges befand sich das Organ in einem beheizbaren Behältnis – die Versuche wurden bei einer Temperatur von $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt – das mit Nährlösung gefüllt und von einem Gasgemisch (siehe Unterkapitel 2.5.5) durchströmt wurde um physiologische Bedingungen zu simulieren und somit eine ausreichende Lebensdauer der Präparate zu gewährleisten. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Apparatur-Typen, die in den beiden nachstehenden Unterkapiteln beschrieben werden durchgeführt wobei Apparatur 2 ausschließlich für Messungen am Papillarmuskelpräparat verwendet wurde.

2.5.2 Apparatur 1

Die in Abbildung 2.1 dargestellte Apparatur 1 wurde für die Messungen an folgenden Organen verwendet: Aorta descendens, Truncus pulmonalis, terminales Ileum und Atrium cordis dextrum. Sie bestand aus einem Metallgestell, auf dem drei unabhängig voneinander zu bedienende (für drei verschiedene Versuche) Glasbehältnisse befestigt waren, die durch ihren doppelwandigen Aufbau und Einspeisung in einen Warmwasserkreislauf ein Durchströmen mit Wasser und damit eine Temperaturregulierung ermöglichten. In dem Behältnis selbst befanden sich je nach Fassungsvermögen 25 ml oder 8 ml Nährlösung (für die Einwaage des Wirkstoffes musste

dieses Volumen berücksichtigt werden – siehe dazu Tabelle 2.1) und das zu untersuchende Organ, welches entweder direkt (Aorta descendes und Truncus pulmonalis) oder durch den an ihm befestigten Haken (Atrium cordis dextrum und Ileum) an einem abstehenden, um einen in das Behältnis eintauchenden Metallstab, der sich zur Befestigung des Organs nach oben und zum Eintauchen in das Organbad nach unten verschieben ließ, gewickelten Draht befestigt wurde. Das obere Ende des Organs wurde in gleicher Weise in das hakenförmig gebogenen Ende eines längeren Drahtes, der mit dem Kraftwandler verbunden und auch von diesem gehalten wurde, eingehängt. Durch diesen Aufbau konnten die auftretenden und nachlassenden Kontraktionen der untersuchten Organe sich über den Zug am oberen Draht auf den Kraftwandler ausbreiten. Eine Vorspannung des Messsystems ließ sich durch Einstellen der Höhe des Kraftwandlers mit der Feintriebschraube erreichen. Diese Vorspannung war bedeutend für die Reproduzierbarkeit der Messungen, denn sie ermöglichte einen Beginn der Messung bei einer bekannten und für jedes der fünf verwendeten Organsystemen individuellen Spannung wodurch sich die im Laufe des Versuches gemessenen Abweichungen zwischen den Versuchen vergleichen ließen. Die für die Vorspannung verwendeten Werte sind Erfahrungswerte aus vorangegangenen Versuchen.

Die Glasbehältnisse besaßen außerdem jeweils eine kleine Öffnung durch die mit Hilfe eines angeschlossenen Schlauches das Gasgemisch welches für die Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen notwendig war eintreten konnte. Die einströmende Gasmenge ließ sich durch Stellschrauben welche den Schlauch zusammenpressten dosieren.

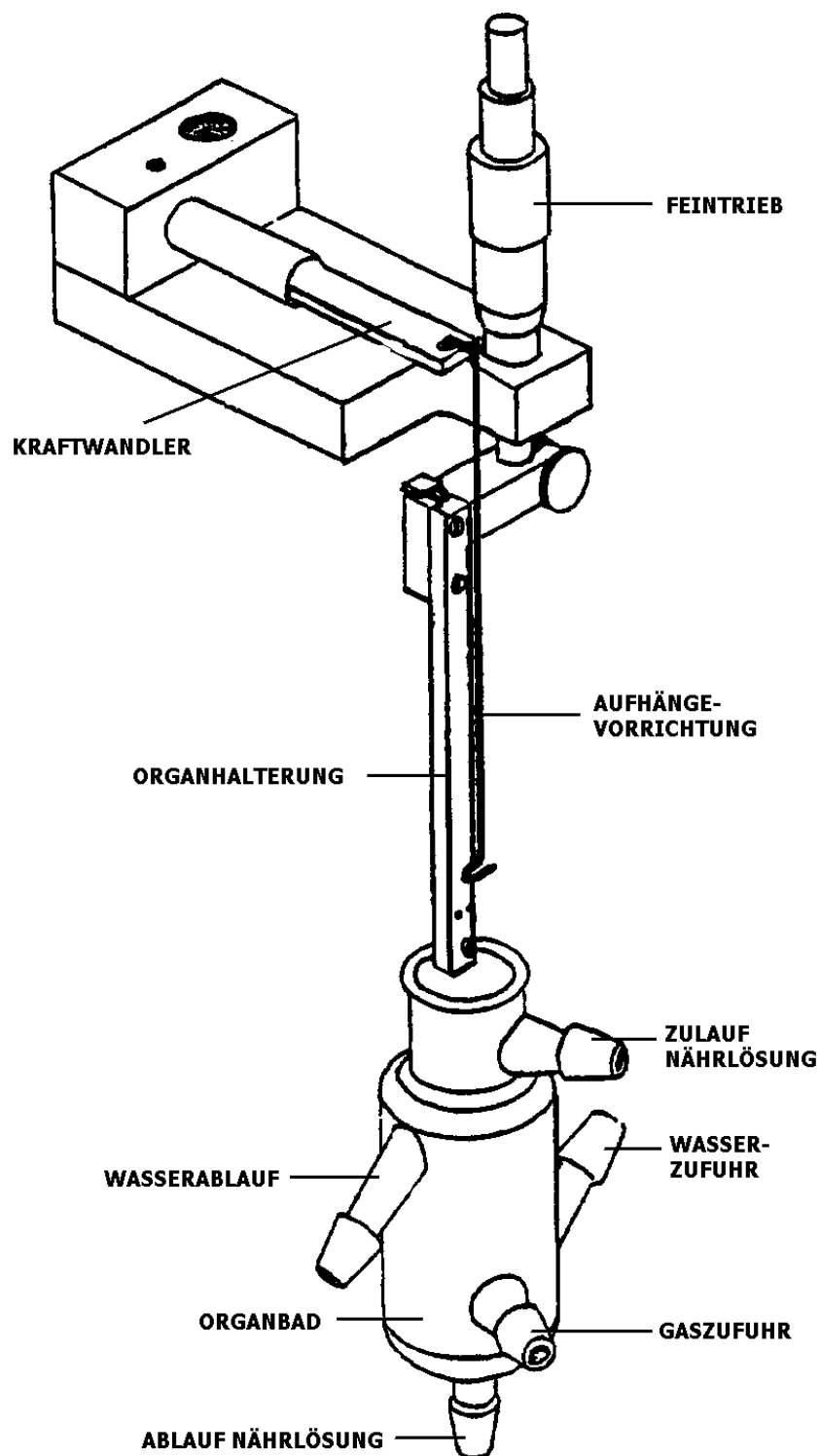


Abb.2.1: Apparatur 1 zur Kontraktionsmessung der Präparate von Aorta descendens, Truncus pulmonalis, Ileum und Atrium cordis dextrum

2.5.3 Apparatur 2

Versuche die mit Apparatur 2 (Abb.2.2) durchgeführt wurden waren ausschließlich jene die der Untersuchung der Papillarmuskelpräparate dienten. Dem gleichen Prinzip wie Apparatur 1 folgend unterschied sich Apparatur 2 dadurch, dass das ebenfalls 25 ml fassende Organbad eine Vertiefung in einer Kunststoffplatte war, die auf einem Wasserbad aufgebracht wurde. Auch hier wurde durch einen angeschlossenen Schlauch die Gasversorgung der Nährlösung ermöglicht. Außerdem wurde die Fixierung des Musculus papillaris am eintauchenden Metallstab nicht an einem abstehenden Draht sondern durch Klemmung zwischen einer Platinelektrode und einer parallel dazu liegende Plexiglasscheibe bewerkstelligt. Diese beiden quadratischen Elemente waren durch eine Schraube mit der sich auch deren Abstand verringern und das Organ somit einklemmen ließ an dem Metallstab befestigt. Die erwähnte Elektrode ermöglichte durch ihre Verbindung mit einem elektrischen Impulsgeber eine pulsierende Reizung des Papillarmuskels in deren Folge der Muskel kontrahierte. Das andere Ende des Muskels wurde wie bei der vorangegangenen Apparatur an seinem Haken durch einen Draht am Kraftwandler befestigt. Auch bei dieser Versuchsanordnung war ein Verstärker zwischen Kraftwandler und Schreiber geschaltet.

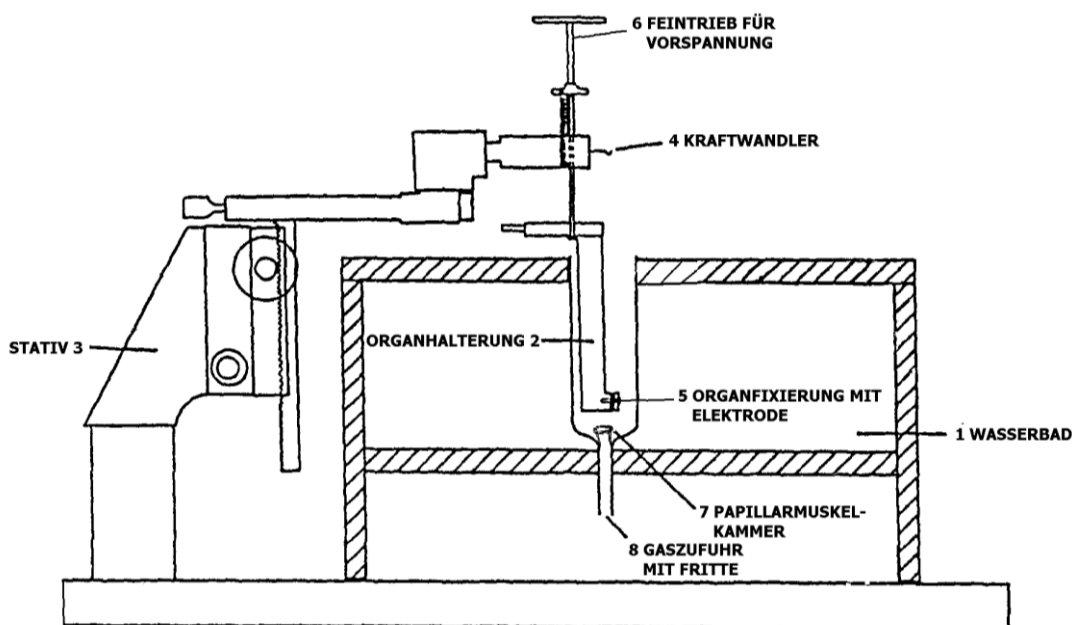


Abb.2.2: Apparatur 2 zur Kontraktionsreizung und -messung der Präparate des Papillarmuskels

2.5.4 Nährlösung

Die für die Aufbewahrung während der Präparation, den Versuchen und etwaigen Wartezeiten zwischen diesen Schritten verwendete Nährlösung, die nötig war um die Organe vor Austrocknung zu schützen, einen physiologischen osmotischen Druck und pH-Wert und die Versorgung mit Elektrolyten und Nährstoffen (Glucose) zu sichern wurde nach dem Vorbild der sogenannten Krebs-Henseleit-Lösung angefertigt deren modifizierte Zusammensetzung in Tabelle 2.2 beschrieben ist. Sie wurde für jeden Versuchstag frisch in einer Menge von zwei Litern zubereitet um Keimbeseidelungen entgegenzuwirken und vor Verwendung zehn Minuten lang mit der im nächsten Unterkapitel beschriebenen Gasmischung durchströmt, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und pH-Wert zu erreichen. Die CaCl_2 -Lösung wurde als letzter Bestandteil zugetropft um ein Ausfallen zu verhindern.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Stammlösung	Stammlösung pro Liter Nährlösung [ml]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,442	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,550	50,33g/5l	35,00	4,73
NaHCO_3	84,010	125,00g/5l	83,70	24,91
MgSO_4	120,370	147,02g/5l	1,18	0,29
KH_2PO_4	136,090	62,00g/250ml	1,18	2,15
CaCl_2	110,980	34,00g/250ml	3,20	3,92

Substanz	Molare Masse [g/mol]		Menge [g/l]	Konzentration [mol/l]
Glucose	180,160	als Reinsubstanz	1,98	356,72

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Nährlösung

2.5.5 Gasversorgung

Das Gasgemisch mit dem die Nährlösung durchströmt wurde wies eine Zusammensetzung von 95 Prozent Sauerstoff (O₂) und fünf Prozent Kohlendioxid (CO₂) auf (OxymixTM). Der Einsatz dieses Gases lässt sich einerseits durch die notwendige Sauerstoffversorgung, die während der Versuche gewährleistet werden musste um ein Absterben der Organe durch Sauerstoffmangel zu verhindern, andererseits durch die damit erreichte Stabilisierung eines physiologischen pH-Wertes (ca. 7,4) erklären. Zusätzlich ermöglichte der Gaseinstrom auch eine bessere Verteilung des zugesetzten Wirkstoffes im Organbad. Aus diesen Gründen war unbedingt auf eine über die gesamte Zeit des Versuches anhaltende Gasversorgung zu achten.

2.5.6 Kaliumchlorid-Lösung zur Vorkontraktion

Für die Versuche an den Organen Aorta descendens, Truncus pulmonalis und Ileum war der Einsatz einer Kaliumchlorid-Lösung notwendig, deren Konzentration entweder 90mmol/l (Aorta descendens und Truncus pulmonalis) oder 60mmol/l (Ileum) betrug. Durch den Austausch der reinen Nährlösung durch diese Kaliumchlorid-Lösung wurde eine maximale Kontraktion des Organs erreicht, welche notwendig war um eine relaxierende Wirkung auf die Muskulatur nachzuweisen. Die Herstellung erfolgte kurz vor Versuchsbeginn in einem 100ml-Messkolben, in dem für die höher konzentrierte Lösung für die Blutgefäße 670mg und für die niedriger konzentrierte Lösung für das Darmpräparat 450mg auf je 100ml mit Nährlösung aufgefüllt wurden.

2.6 Versuchsablauf

2.6.1 Allgemeines

Der Versuchsablauf folgte bei allen Organsystemen grundsätzlich dem selben Prinzip, nämlich dem der Messung der Kontraktion eines Organs zunächst ohne und anschließend mit dem zu untersuchenden Wirkstoff wobei ebendiese Testsubstanz erst nach einer Kontrollzeit von 45 Minuten oder – falls innerhalb dieser Zeit noch keine Konstanz der Muskelfunktion eingetreten war – diese abgewartet wurde. Die Wirkstoff-Zugabe erfolgte

nach dem in Tabelle 2.3 dargestellten Schema, durch welches im Rahmen einer kumulativen Zugabe nach einer Gesamtzeit von 180 Minuten (also drei Stunden) die maximale Konzentration von 100µmol/l erreicht wurde. Im Anschluss wurde erneut noch eine Zeitspanne von 45 Minuten, in denen das Organ der Höchstdosierung ausgesetzt war, abgewartet und der Versuch beendet. Die Apparaturen wurden vor der Befüllung mit Nährlösung mehrmals mit destilliertem Wasser gespült um Verunreinigungen und die Einwirkung von etwaigen Wirkstoffresten zu verhindern. Beim Einbringen der Organe in die Apparatur musste besonders darauf geachtet werden, sie nicht zu überdehnen, da die Muskelfasern sonst geschädigt und somit keine brauchbaren Ergebnisse mehr erzielt werden konnten. Trotz dieser sensiblen Beschaffenheit der Organe, war es nötig eine je nach Organsystem unterschiedliche Vorspannung in das System einzubringen, um eine Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu erreichen. Die verwendeten Vorspannungen sind Erfahrungswerte aus vorangegangenen Versuchsreihen, die so übernommen wurden und werden in den folgenden Unterkapiteln bei den jeweiligen Organ-Präparaten angeführt.

Verstrichene Zeit [min]	Pipettiertes Volumen der Testsubstanzlösung [µl]	Konzentration im Organbad [µmol/l]
45 bzw. Konstanz	3	1
90	7	3
135	20	10
180	70	100

2.3: Schema der kumulativen Wirkstoffzugabe

Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsabläufen für die verschiedenen Organsysteme ergaben sich aus deren Funktion und betreffen neben unterschiedlichen Versuchsbedingungen und Voreinstellungen der Gerätschaften auch den Einsatz einer Kaliumchlorid-Lösung bei Aorta descendens, Truncus pulmonalis und Ileum, deren Funktion und Zusammensetzung im Unterkapitel 2.5.6 erläutert wurde.

Ist im Folgenden von den Schreiber-Einstellungen „1mV“, „2mV“, „5mV“ und „10mV“ die Rede, bezieht sich dies auf die Anzahl an Millivolt, die einer Auslenkung des

Schreibgerätes von einem Zentimeter entsprechen (siehe Tabelle 2.4). Diese verschiedenen Einstellungen wurden für die Einbringung der Vorspannung als Orientierung genutzt, außerdem konnten sie während des Versuches bei den Messungen an den Präparaten des Vorhofes geändert werden, um bei abnehmender Kontraktionskraft weiterhin die Möglichkeit der Auswertung zu garantieren, da bei diesem Organsystem lediglich die Messung der Frequenz der Kontraktionen und nicht deren Kraft von Interesse war.

Sensibilitätseinstellung des Schreibers [Millivolt, mV]	Auslenkung des Schreibers [Zentimeter, cm]	Kontraktionsänderung des Organs [Millinewton, mN]
10	1	1,96
5	1	0,98
2	1	0,39
1	1	0,20

Tabelle 2.4: Einstellungen der Schreiber-Sensibilität

2.6.2 Versuchsablauf - Aorta descendens

Die Fixierung des Präparates erfolgte ohne Hilfsmittel durch Einhängen des ringförmigen Organstückes zwischen oberen mit dem Kraftwandler verbundenen und unteren am Metallstab fixierten Draht der Apparatur 1. Die Vorspannung bei den Aorta-Präparaten betrug 19,6mN, was auf dem Schreiber einer Auslenkung von zehn Zentimetern bei der Einstellung „10mV“ entsprach. Nachdem diese Einstellung erreicht war folgte eine Akklimatisierung des Organs von 20 Minuten woraufhin der Schreiber auf Null gesetzt und auf „5mV“ umgestellt wurde. An dieser Stelle wurde eine maximale Kontraktion des Blutgefäßes durch Zugabe der Kaliumchlorid-Lösung (90mmol/l) provoziert. Ab diesem Zeitpunkt begannen die 45 Minuten, die bis zur Zugabe der ersten Wirkstoffkonzentration verstreichen mussten. Resultierte aus dieser Kontraktionsreizung eine konstante Auslenkung des Schreibers um mindestens fünf Zentimeter, so konnte der Versuch weitergeführt werden. Andernfalls wurde der Versuch abgebrochen und ein neues Präparat verwendet. Nun erfolgte die Einspritzung des Wirkstoffes mittels Kolbenhubpipette nach dem in Kapitel 2.5.6 angeführten Pipettierschema.

2.6.3 Versuchsablauf - Truncus Pulmonalis

Die Präparate des Truncus pulmonalis wurden mit der Ausnahme einer geringeren Vorspannung – hier wurde mit 9,81mN gearbeitet (Auslenkung zehn Zentimeter bei „5mV“) – in gleicher Weise behandelt und auch in die Apparatur 1 eingebracht wie die der Aorta descendens.

2.6.4 Versuchsablauf - Terminales Ileum

Mit den zuvor angebrachten Haken wurde das Präparat zwischen oberen und unteren Draht in der Apparatur 1 fixiert. Mit einer Vorspannung von fünf Zentimeter bei „5mV“ (entspricht 4,92 mN) wurde es anschließend 20 Minuten akklimatisiert und der Schreiber auf Null gesetzt. Danach folgte ein Kontraktionsreiz mit Kaliumchlorid-Lösung (60mmol/l) durch Ersetzen der Nährlösung und wie aus den vorangegangenen Beschreibungen nach 45 Minuten bzw. konstanter Kontraktion der Start der Wirkstoffzugabe. Es wurden nur Präparate weiterverwendet, deren Kontraktion sich nach der Zugabe der Kaliumchlorid-Lösung durch eine konstante Auslenkung von mindestens fünf Zentimetern am Schreiber bemerkbar machten.

2.6.5 Versuchsablauf - Musculus papillaris

Der zwischen Elektrode und Plexiglasscheibe befestigte Papillarmuskel, der mit dem angebrachten Haken oben mit dem Kraftwandler des Apparates 2 verbunden war, wurde auf eine Vorspannung von 3,92mN (vier Zentimeter bei „5mV“) gebracht und umgehend im Sekundentakt durch die über die Elektrode vermittelten vom elektrischen Impulsgeber ausgehenden Stromschläge zur Kontraktion gereizt. Es folgte eine 20 minütige Akklimatisierungsphase, nach der der Muskel 45 Minuten lang (ähnlich den anderen Organen) in regelmäßigen fünf-Minuten-Abständen auf Konstanz geprüft wurde. Das ausschlaggebende Kriterium für den Beginn der Wirkstoffeinbringung war in diesem Fall ein über diesen Kontrollzeitraum maximales Abweichen der vom Schreiber aufgezeichneten Amplitude der Kontraktionskraft von einem Millimeter. Die Messung selbst fand bei den Einstellungen „2mV“ oder „1mV“ statt (je nach individueller Kraft des Präparates), durfte im Laufe des Versuches jedoch nicht mehr geändert werden um die Messergebnisse nicht zu verfälschen.

Für die Reizung wurde ein Rechteckimpuls mit einer Dauer von 10ms und einer Frequenz von 60Hz eingeleitet. Zunächst wurde durch Änderung der abgegebenen Stromstärke die Reizschwelle ermittelt und anschließend diese Mindeststromstärke um zehn Prozent erhöht. Anzumerken ist an dieser Stelle noch, dass eine deutlich höhere als zehn Prozent über der Reizschwelle gelegene Stromstärke für die Reizung zu vermeiden war, da eine rasche Entleerung der Catecholaminspeicher des Präparates zu einer ebenso schnellen Aktivitätseinstellung desselben geführt hätte.

Etwaige Spontanaktivitäten des Papillarmuskel ließen sich auf noch vorhandene Purkinje-Fasern zurückführen, sie hielten aber durch ihre Kurzlebigkeit nie über die Akklimatisierungszeit von 20 Minuten an und führten somit nicht zu einer Beeinträchtigung der Versuche.

2.6.6 Versuchsablauf – Atrium cordis dextrum

Der Vorhof wurde wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben mit den beiden Haken in der Apparatur fixiert. Es folgte das Einstellen der Vorspannung, welche auf 9,81mN (zehn Zentimeter bei „5mV“) festgelegt war. Da die spontane regelmäßige Aktivität des Sinusknotens bei diesem Präparat im Gegensatz zu den anderen Organen eine Messung der Kontraktionsfrequenz ohne zusätzliche Reizung gestattete folgte danach eine 20-minütige Akklimatisierung nach welcher umgehend die ersten Probeaufzeichnungen im fünf-Minuten-Takt für jeweils sechs Sekunden durchgeführt wurden. Nach Erreichen einer konstanten Kontraktionsfrequenz, mindestens jedoch 45 Minuten wurde die erste Wirkstoffkonzentration zugegeben. Auch die folgenden Messungen wurden in den selben Zeitintervallen wie die Probeaufzeichnungen durchgeführt.

2.6.7 Versuchsablauf zur Untersuchung des Wirkmechanismus

Um den postulierten Wirkmechanismus der NO-Freisetzung (siehe Einleitung) zu untersuchen wurde neben den Messungen der bloßen Wirkung der Testsubstanzen auf die fünf verschiedenen Organsysteme auch eine Versuchsreihe mit modifiziertem Ablauf durchgeführt.

Dazu wurde zum Präparat, welches bis zu der Phase des Versuchs, in der die Gabe der ersten Wirkstoffkonzentration erfolgt in gleicher Weise präpariert und (wie im Kapitel 2.4.4 beschrieben) in die Messapparatur eingebracht worden war, zunächst der NO-Synthase-Antagonist Nitro-L-arginin zugegeben und nach 45 Minuten die EC₅₀-Konzentration der Testsubstanz durch Zugabe der dafür notwendigen Substanzmenge – gelöst in DMSO – im Organbad eingestellt. Nach weiteren 45 Minuten Messzeit wurde der Versuch beendet (Krejcy et al. 1993).

Da für diese Versuchsreihe die EC₅₀-Konzentration der Testsubstanz bekannt sein musste, war es notwendig diese aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve vorangegangener Messungen an einem Organsystem, an welchem die Substanz ausreichende Wirkung zeigte, zu ermitteln.

Gearbeitet wurde mit einer wässrigen Lösung des Nitro-L-arginin mit einer Konzentration von 100µMol, deren adäquate Beschaffenheit durch Feststofflösung in einem Ultraschall-Wasserbad sichergestellt wurde.

Diese Versuchsreihe gab Aufschluss über eine Beteiligung der NO-Synthase am Wirkmechanismus der Testsubstanz (siehe Kapitel 3.3.5).

2.7 Datenauswertung

2.7.1 Allgemeines

Sämtliche Kontraktionen, als elektrische Signale vom Verstärker an den Schreiber weitergeleitet, wurden von letzterem durch ein montiertes Schreibgerät auf automatisch abgerolltes Endlosmillimeterpapier aufgezeichnet, dessen Vorschubgeschwindigkeit je nach Organsystem unterschiedlich eingestellt werden konnte. Dadurch wurden je nach Versuchsanordnung eine oder mehrere Kurven geschrieben, deren Verläufe mit einem Lineal ausgemessen wurden um die Änderungen der Kontraktionen in Abhängigkeit der verstrichenen Zeit und somit der Wirkstoff-Dosis, der das Organ während des Versuches ausgesetzt war dokumentieren zu können. Aus den so erhaltenen Daten konnte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve konstruiert werden, welche unter Zuhilfenahme des Computer-Programms „Sigma Plot 9“ erstellt wurde.

2.7.2 Datenauswertung – Aorta descendens

Die Auswertung erfolgte durch Messung der Kurvenhöhen an der ersten Markierung, welche den Zeitpunkt der Einstellung der ersten Wirkstoffkonzentration noch vor deren Einfluss und somit den Zustand der maximalen Kontraktion darstellt und den weiteren vier Markierungen durch welche der Kontraktionszustand der Aorta descendens während der vier Wirkstoffkonzentrationen bzw. auch das Ende des Versuches gekennzeichnet waren. Ein nach dem Anstieg durch die Kontraktion (ausgelöst durch die Zugabe der KCl-Lösung) ausschließlich nur gering abnehmender, nahezu waagrechter Verlauf der Kurve bedeutet somit, dass keine Wirkung erzielt wurde. Eine vorhandene Wirkung hingegen äußert sich durch einen stufenförmigen Abfall der anschließend bis zum Wirkungseintritt der nächsthöheren Wirkstoffkonzentration auf dem niedrigeren Niveau wieder waagrecht verlaufenden Kurve. Verlor die Kurve jedoch stetig über die gesamte Versuchszeit an Höhe, musste auf einen wirkstoffunabhängigen Kontraktionsverlust des Organs geschlossen werden, was dazu führte, dass ein solches Messergebnis auf Grund der fehlenden Aussagekraft des Versuches nicht weiter dokumentiert wurde.

Da die Kurvenzeichnung des Schreibers stets mit der „5mV“-Einstellung erfolgte, war ein Abfall der Kurve um einen Zentimeter dementsprechend als vom Kraftwandler übermittelte Spannungsverringerung von fünf Millivolt und daher als Verminderung der Kontraktion des Organs um 0,98mN zu interpretieren.

2.7.3 Datenauswertung – Truncus pulmonalis

Die Auswertung der geschriebenen Kurve verlief bei den Versuchen an Präparaten des Truncus pulmonalis in gleicher Weise wie im vorangegangenen Kapitel über die Datenauswertung von Versuchen an Präparaten der Aorta descendens beschrieben.

2.7.4 Datenauswertung – Terminales Ileum

Da auch bei dieser Versuchsreihe der Ablauf der Datenauswertung dem selben Prinzip folgte wie bei den Präparaten der Aorta descendens ist auch die Datenauswertung des Präparates „Terminales Ileum“ ebendiesem vorangegangenen Kapitel zu entnehmen.

2.7.5 Datenauswertung – Musculus papillaris

Die Kontraktionsänderungen des Musculus papillaris während des Versuchs wurden stets an der zuletzt aufgezeichneten Kurveneinheit – diese beinhaltete immer sechs Kontraktionen (entspricht einer Aufzeichnung von sechs Sekunden Dauer) – des Zeitraums von 45 Minuten, in dem je eine Wirkstoffkonzentration auf das Organ einwirkte und in welchem alle fünf Minuten je eine solche Kurveneinheit aufgezeichnet wurde gemessen. Die vorangegangenen acht aufgezeichneten Kurveneinheiten konnten zur Überprüfung der Konstanz herangezogen werden.

Die Aufzeichnungen wurden mit dem Lineal abgemessen und je nach verwendeter Sensibilitätseinstellung des Schreibers in den korrespondierenden Millinewton-Betrag umgerechnet.

2.7.6 Datenauswertung – Atrium cordis dextrum

Wie bei der Auswertung der Messungen an Präparaten des Papillarmuskels wurden Aufzeichnungen von sechs Sekunden Dauer im Fünfminutentakt durchgeführt und die jeweils letzte eines 45-minütigen Wirkstoffkonzentrations-Intervalls für die Auswertung herangezogen. Durch Auszählen der Kontraktionen in einer Sechsssekunden-Einheit und der Multiplikation mit dem Faktor zehn wurde die Frequenz (Schläge pro Minute) ermittelt.

2.7.7 Datenauswertung der Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum

Der aufgezeichnete Kurvenverlauf ließ folgende Interpretationen über die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) am Wirkmechanismus zu: Ein Absinken der Kontraktionskraft auf die Hälfte des Maximums bedeutet eine geringe oder nicht vorhandene und kein bzw. ein

vermindertes Absinken der Kurve, eine je nach Ausprägung dieser Verminderung starke bis mäßige Abhängigkeit des Wirkmechanismus von dem Enzym eNOS.

2.7.8 Statistische Mittel zur Beurteilung der Daten

Für die statistische Datenbeurteilung wurde der gepaarte Student-t-Test angewendet, wobei folgende Signifikanzniveaus definiert wurden: $P < 0,05$: Signifikanz gegeben, $P < 0,01$: hohe Signifikanz gegeben, $P < 0,001$: sehr hohe Signifikanz gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Die Messergebnisse werden im Folgenden beschrieben, die Werte in einer Tabelle aufgelistet und pro Organsystem und Wirkstoff mit je einem Graphen, der die Wirkung in Prozent der maximal möglichen Wirkung in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration (= Konzentrations-Wirkungs-Kurve) wiedergibt dargestellt. Außerdem ist die Kontraktionskurve in einer digitalisierten Abbildung einer Originalaufzeichnung der jeweiligen Versuchsreihe (= Kontraktionskurve) abgebildet. Die Pfeile kennzeichnen in den Abbildungen von Versuchen an den Organen Aorta descendens, Truncus pulmonalis und Ileum die Zeitpunkte der jeweils nebenstehenden Konzentrationseinstellungen. Bei den Abbildungen der Kontraktionskurven von Musculus papillaris und Atrium cordis dextrum geben die nebenstehenden Zahlen jene Konzentrationen an, die zum Zeitpunkt der Aufzeichnung bereits 45 Minuten auf das Organ eingewirkt hatten.

In den Tabellen wird der Mittelwert der Kontraktionskraft der untersuchten Organe mit f_c [mN] und der relative mittlere Anteil um den sich diese vermindert bzw. erhöht mit f_c [%] bezeichnet. Bei den Messergebnissen der Präparate des Atrium cordis dextrum steht f [Hz] für den Mittelwert der Frequenz und f [%] für den relativen Anteil deren mittleren Verminderung/Erhöhung. Weitere verwendete Abkürzungen sind SEM für den Standardfehler und P für die Irrtumswahrscheinlichkeit (nicht signifikante Werte werden durch die Abkürzung n.s. gekennzeichnet).

Alle Werte bezüglich Kontraktionskraft und -frequenz werden bereits abzüglich der Effekte des Lösungsmittels (DMSO) angegeben.

3.2 Ergebnisse – MGdth8

Die Substanz MGdth8 zeigte an keinem der Organsysteme in der verabreichten Dosis eine ausgeprägte Wirkung. Am höchsten war diese noch an den Präparaten der Aorta descendens, die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wiesen aber keine Signifikanz auf.

3.2.1 Ergebnisse – MGdth8 an der Aorta descendens

Der vasodilatorische Effekt auf die vier Präparate der Aorta descendens machte bei der Höchstkonzentration von 100µmol/l durchschnittlich 14,46 Prozent eines größtmöglichen Effekts aus (SEM = ±2,08). Dies entspricht einer geringen und nicht signifikanten Wirkung auf dieses Organsystem.

Die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb.3.1) zeigt eine abfallende Entwicklung, die ob ihrer Gleichmäßigkeit eher für eine wirkstoffunabhängige Verringerung der Kontraktionskraft der Organe spricht. Die Kontraktionskurve in Abbildung 3.2 zeigt deutlich den geringen Einfluss von MGdth8 auf dieses Präparat der Aorta descendens.

Konzentration [µmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	8,99 ± 2,74	100 ± 0	4	-
3	9,04 ± 2,69	+0,67 ± 3,13	4	n.s.
10	8,64 ± 2,63	-3,96 ± 1,76	4	n.s.
30	8,09 ± 2,21	-8,16 ± 2,93	4	n.s.
100	7,64 ± 2,25	-14,46 ± 2,08	4	n.s.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGdth8 an den Präparaten der Aorta descendens

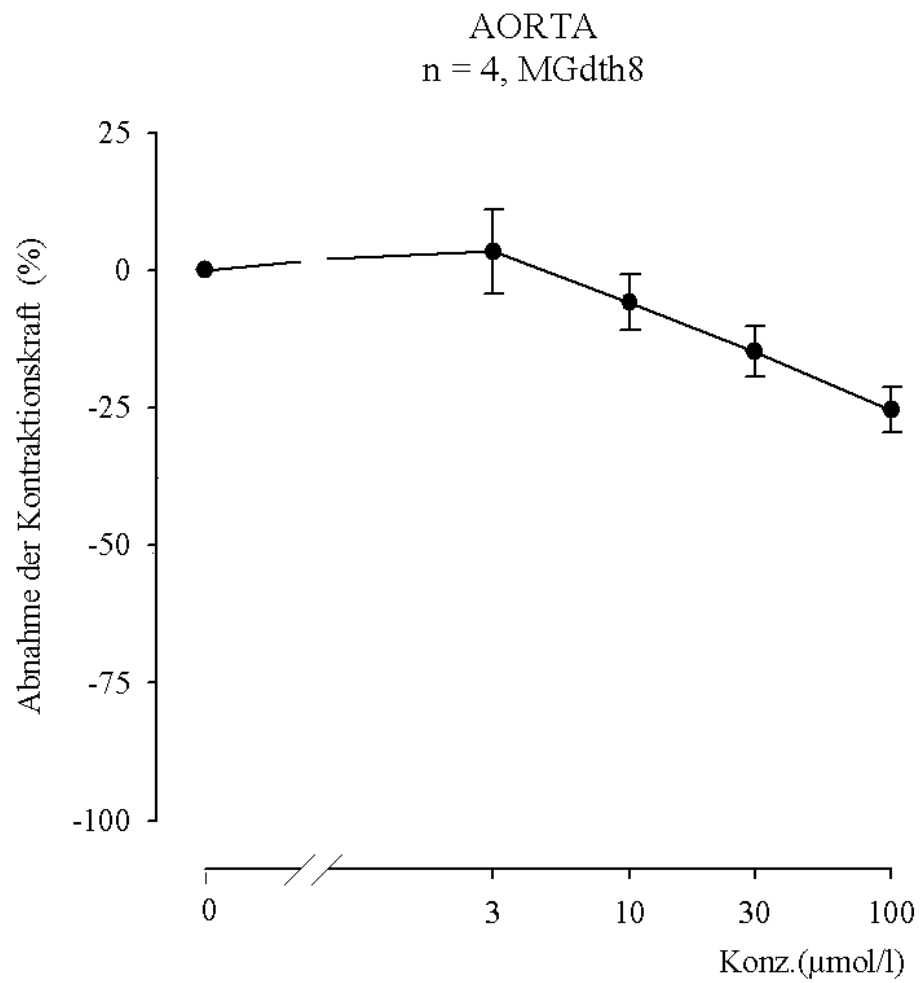


Abb.3.1: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth8 an den Präparaten der Aorta descendens (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

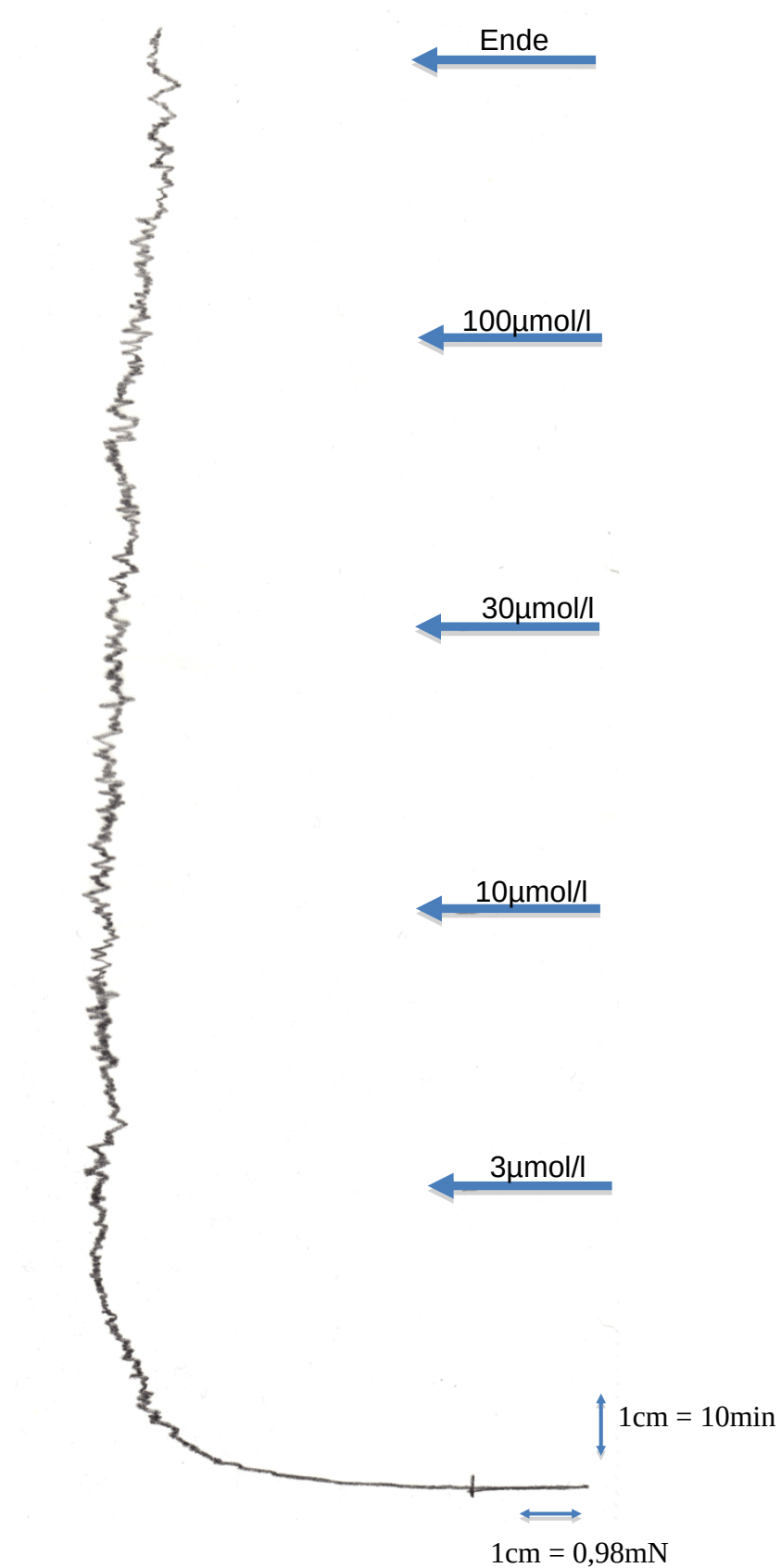


Abb.3.2: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta descendens unter Einfluss von MGdth8. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

3.2.2 Ergebnisse – MGdth8 am Truncus pulmonalis

Der Effekt von MGdth8 auf die vier Präparate des Truncus pulmonalis war mit 6,82 Prozent (SEM = $\pm 2,01$) durchschnittlicher relativer Senkung der maximalen Kontraktion bei der Höchstkonzentration sehr gering und wies bei den Konzentrationen 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Signifikanz auf.

Die sehr flache Konzentrationswirkungskurve in Abbildung 3.3 und der nahezu unveränderte Verlauf der Kontraktionskurve (Abb. 3.4) verdeutlichen, wie gering dieser Effekt ausgeprägt ist.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	$11,96 \pm 1,81$	100 ± 0	4	-
3	$11,38 \pm 1,76$	$-4,95 \pm 1,55$	4	n.s.
10	$11,43 \pm 1,72$	$-4,41 \pm 1,23$	4	n.s.
30	$11,19 \pm 1,64$	$-6,27 \pm 1,74$	4	0,05
100	$11,09 \pm 1,55$	$-6,82 \pm 2,01$	4	0,05

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGdth8 an den Präparaten der Truncus pulmonalis

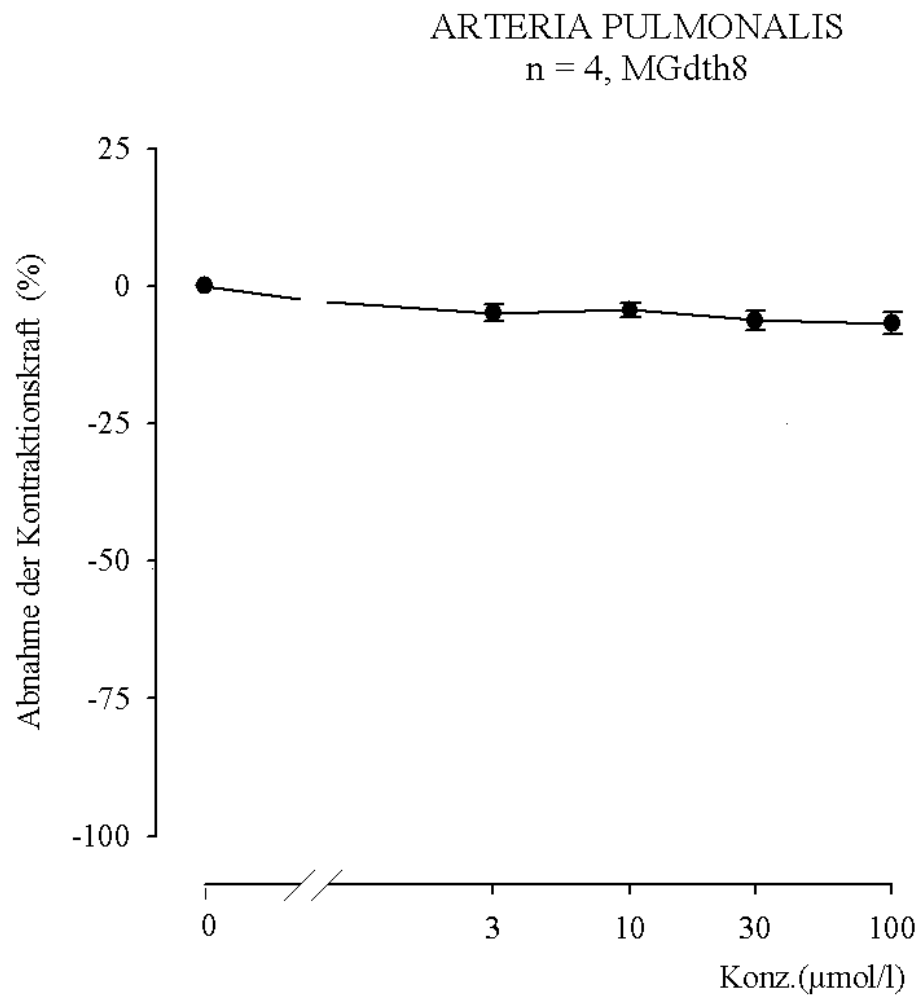


Abb.3.3: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth8 an den Präparaten des Truncus pulmonalis (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

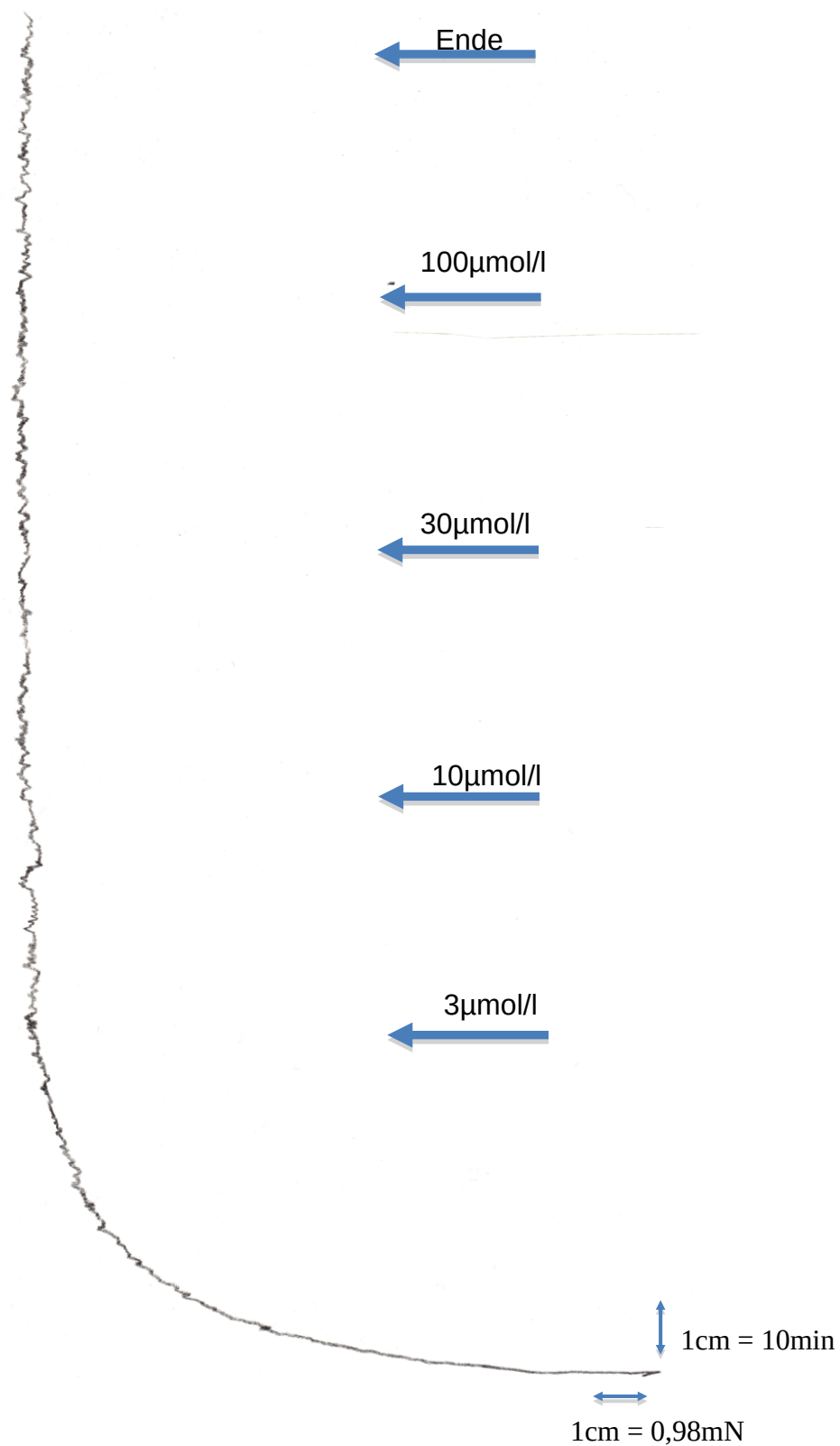


Abb.3.4: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Truncus pulmonalis unter Einfluss von MGdth8. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

3.2.3 Ergebnisse – MGdth8 am terminalen Ileum

Die spasmolytische Wirkung von MGdth8 auf die vier Präparate des terminalen Ileum äußerte sich bei maximaler Konzentration durch einen durchschnittlichen Effekt von -13,40 Prozent (SEM = $\pm 6,23$) des Kontrollwertes. Obwohl in der Kontraktionskurve (Abb.3.6) eine geringe aber deutliche Senkung genau bei Einbringung der höchsten Wirkstoffmenge zu sehen ist, sind diese Ergebnisse als nicht signifikant einzustufen.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	$8,50 \pm 1,42$	100 ± 0	4	-
3	$8,75 \pm 1,57$	$+2,22 \pm 1,42$	4	n.s.
7	$8,36 \pm 1,26$	$-0,64 \pm 3,77$	4	n.s.
30	$7,89 \pm 1,11$	$-5,28 \pm 5,62$	4	n.s.
100	$7,23 \pm 1,10$	$-13,40 \pm 6,23$	4	n.s.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGdth8 an den Präparaten des terminalen Ileum

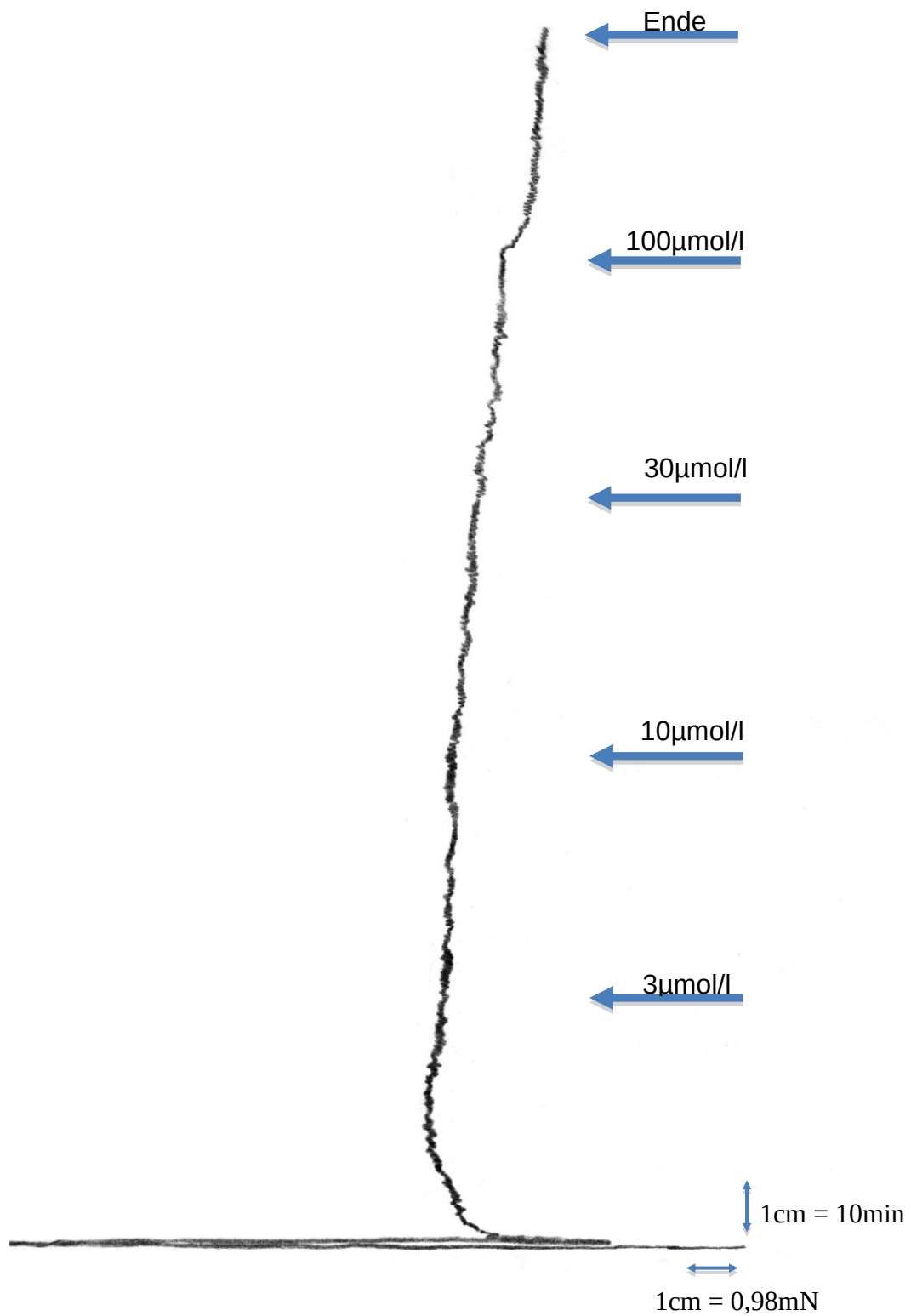


Abb.3.6: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileum unter Einfluss von MGdth8. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

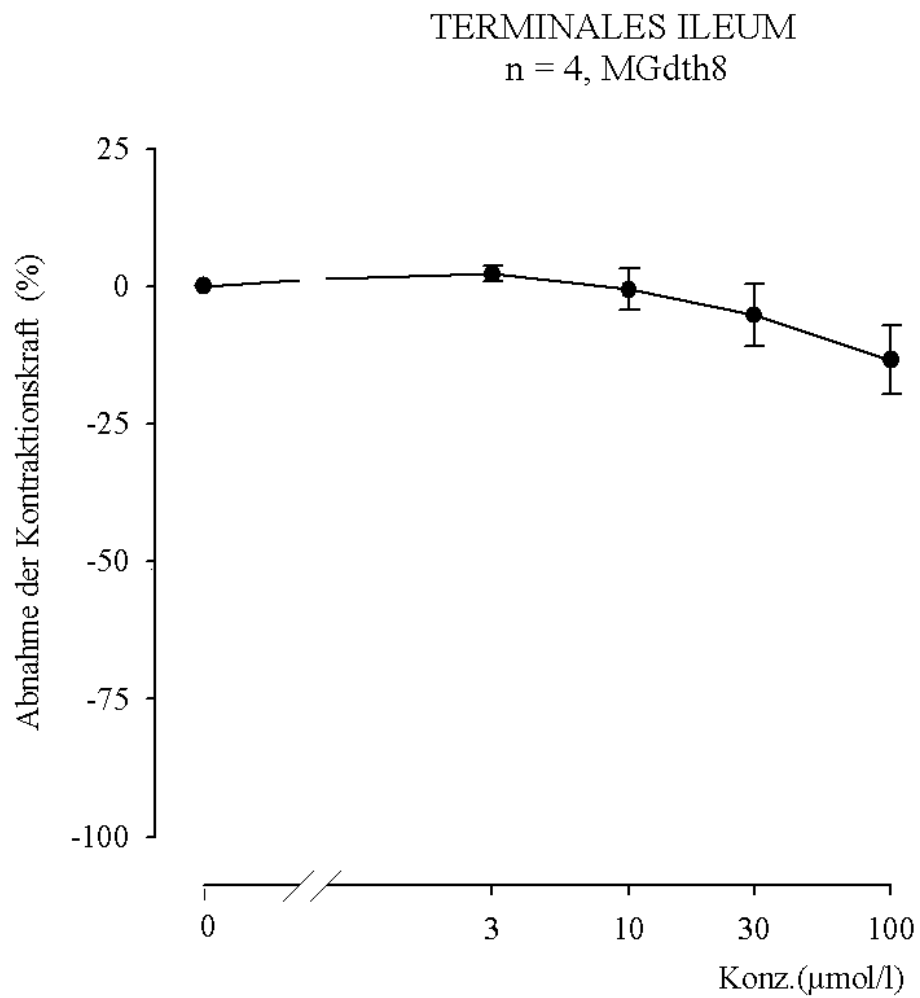


Abb.3.5: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth8 an den Präparaten des terminalen Ileum (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

PAPILLARMUSKEL
n = 4 MGdth8

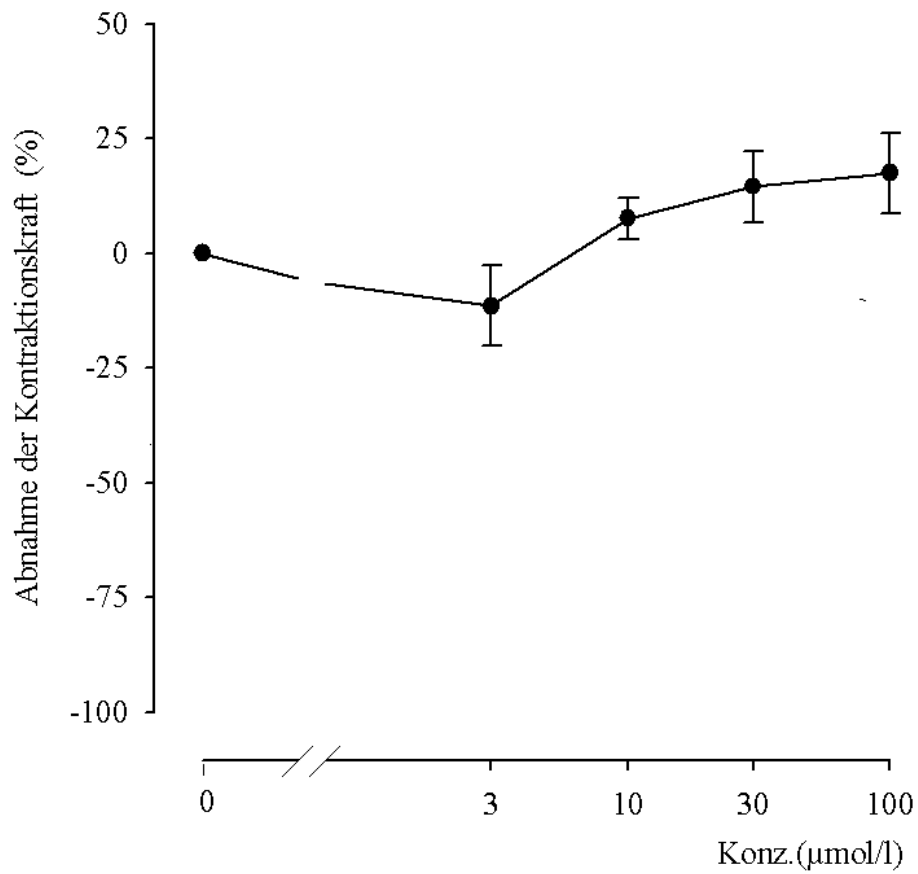


Abb.3.7: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth8 an den Präparaten des Musculus papillaris (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

↑
1cm = 0,98mN
← 1cm = 1sek

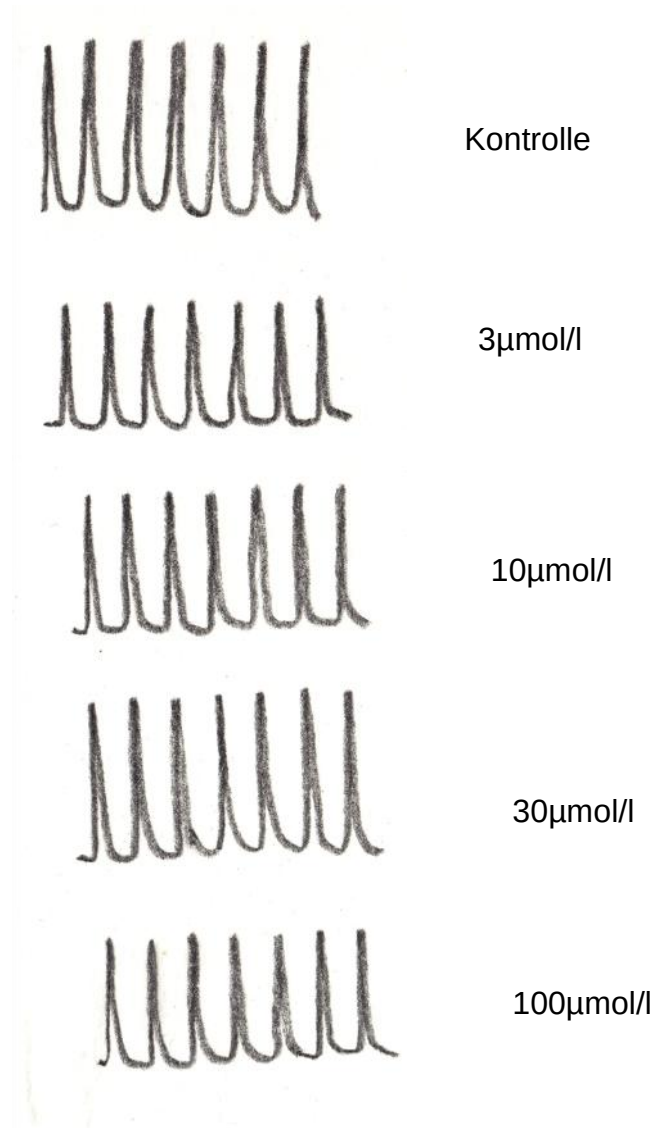


Abb.3.8: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Musculus papillaris unter Einfluss von MGdth8. Vertikale Ausdehnung: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Horizontale Ausdehnung: Zeit (1 Zentimeter = 1 Sekunde)

3.2.5 Ergebnisse – MGdth8 am Atrium cordis dextrum

Die äußerst geringe Wirkung von MGdth8 auf die vier Präparate des Atrium cordis dextrum – der durchschnittliche negativ chronotrope Effekt beträgt 6,24 Prozent (SEM = $\pm 5,32$) bei der Höchstkonzentration – weist keinen signifikanten Zusammenhang zur Konzentration auf. Erneut entwickelt sich die Konzentrations-Wirkungskurve flach.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	f $\pm$ SEM [Hz]	f $\pm$ SEM [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	237,50 $\pm$ 1,44	100 $\pm$ 0	4	-
3	235,00 $\pm$ 5,00	-1,02 $\pm$ 2,49	4	n.s.
10	240,00 $\pm$ 6,77	+1,10 $\pm$ 3,26	4	n.s.
30	236,25 $\pm$ 7,18	-0,48 $\pm$ 3,46	4	n.s.
100	222,50 $\pm$ 11,64	-6,24 $\pm$ 5,32	4	n.s.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGdth8 an den Präparaten des Atrium cordis dextrum

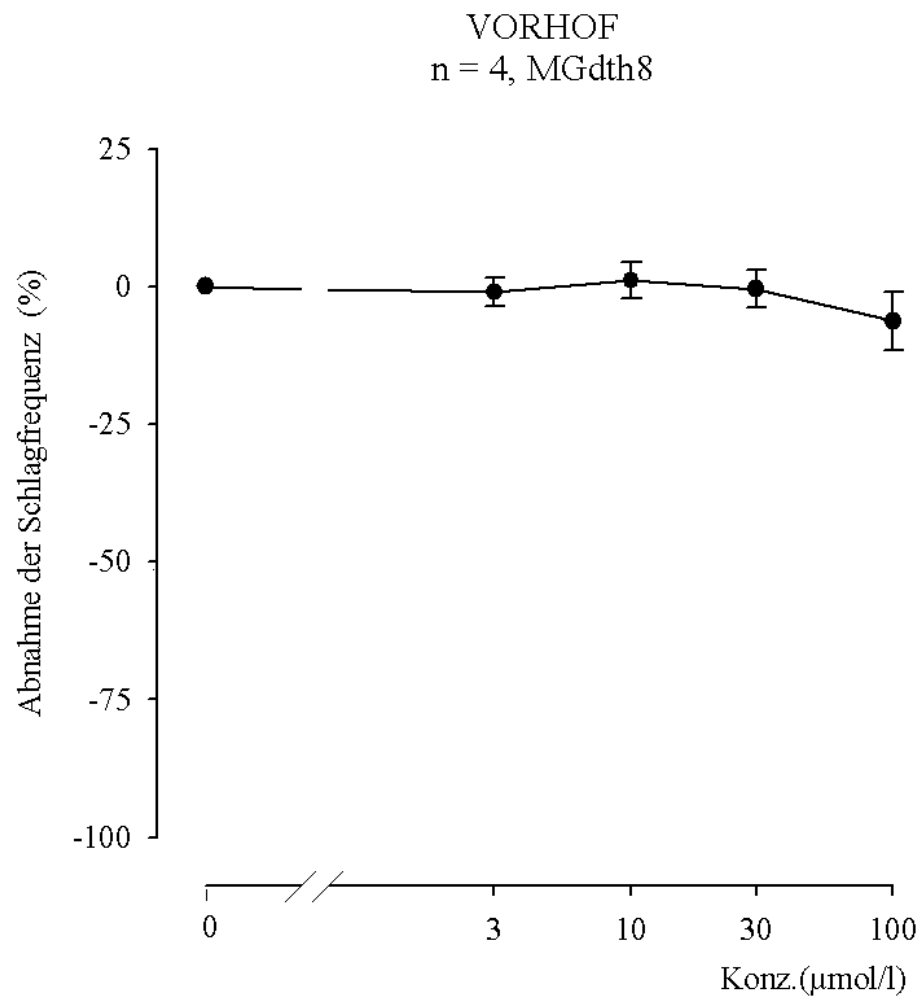


Abb.3.9: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth8 an den Präparaten des Atrium cordis dextrum (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Schlagfrequenz in Prozent)


1cm = 1sek

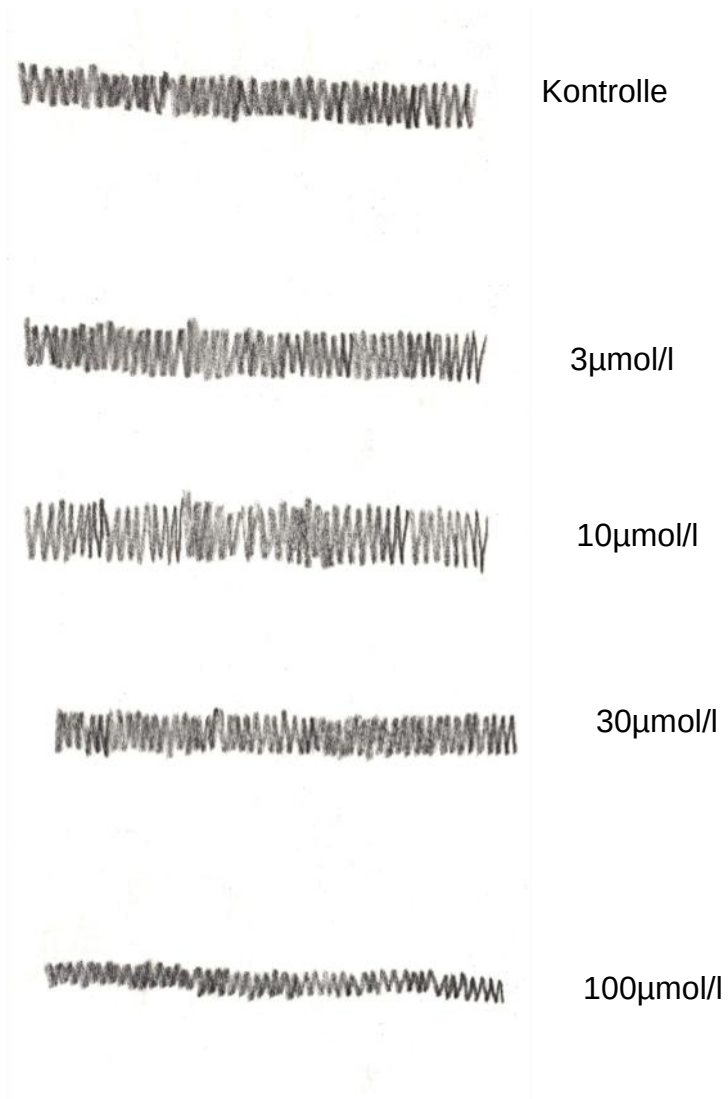


Abb.3.10: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Atrium cordis dextrum unter Einfluss von MGdth8. Horizontale Ausdehnung: Zeit (1 Zentimeter = 1 Sekunde)

3.3 Ergebnisse – MGpy3-HCl

Die zweite Testsubstanz MGpy3-HCl zeigte im Gegensatz zu MGdth8 eine ausgeprägte Aktivität, ihre Wirkung entfaltete sie auf alle in den Versuchsreihen untersuchten Organen – abgesehen vom Papillarmuskel – wobei jene auf die Präparate des terminalen Ileum die deutlichste war.

3.3.1 Ergebnisse – MGpy3-HCl an der Aorta descendens

Die Substanz MGpy3-HCl zeigte eine – ab der Konzentration von 10µmol/l signifikante und bei den beiden höheren Konzentrationen hoch signifikante – moderate vasodilatierende Wirkung. Da diese bei der Höchstkonzentration durchschnittlich 28,12 Prozent (SEM= ±4,31) einer größtmöglichen Dilatation betrug, ließ sich jedoch keine EC₅₀-Konzentration ermitteln. Die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb.3.11) fällt mit jeder Konzentrationserhöhung immer steiler ab, ein Indiz für eine tatsächliche Wirkung der Testsubstanz.

Konzentration [µmol/l]	f _c ± SEM [mN]	f _c ± SEM [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	11,10 ± 1,94	100 ± 0	4	-
3	10,81 ± 1,88	-2,69 ± 1,34	4	n.s.
10	10,49 ± 1,98	-6,26 ± 2,07	4	0,05
30	9,61 ± 1,94	-14,72 ± 3,02	4	0,01
100	8,19 ± 1,85	-28,12 ± 4,31	4	0,01

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGpy3-HCl an den Präparaten der Aorta descendens

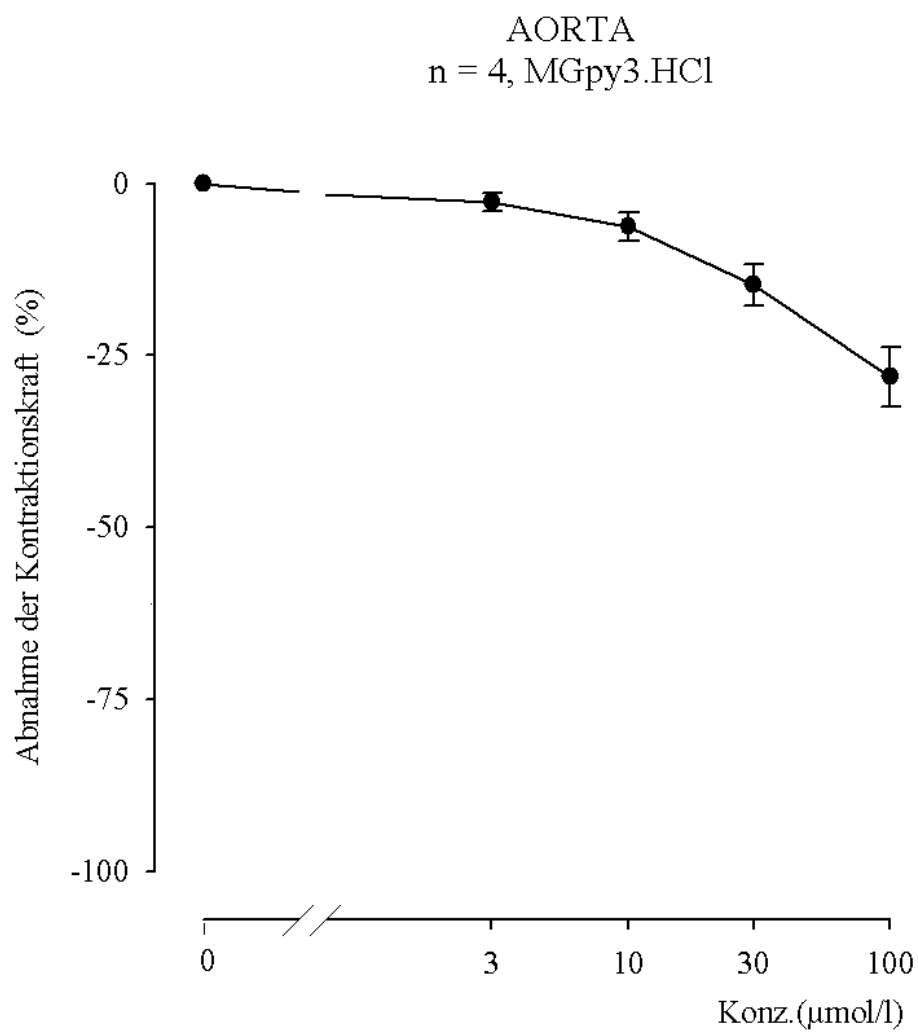


Abb.3.11: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGpy3·HCl an den Präparaten der Aorta descendens (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

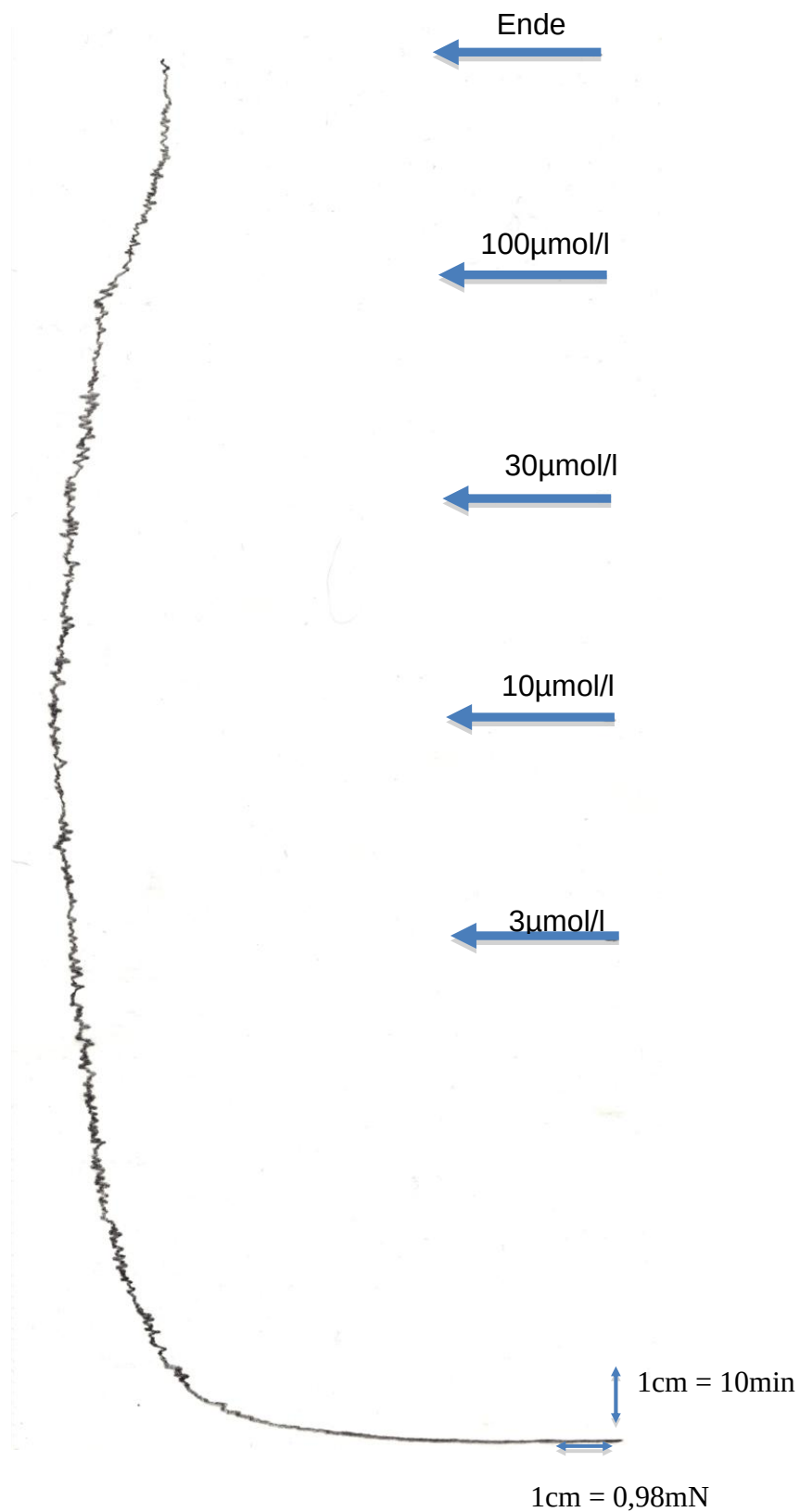


Abb.3.12: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta descendens unter Einfluss von MGpy3-HCl. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

3.3.2 Ergebnisse – MGpy3-HCl am Truncus pulmonalis

Der vasodilatierende Effekt von MGpy3-HCl auf die fünf Präparate des Truncus pulmonalis ist sehr deutlich – bei Höchstkonzentration entspricht die durchschnittliche Dilatation 45,45 Prozent (SEM = $\pm 8,27$) einer maximal möglichen Gefäßerschaffung – und ist hoch signifikant. Bis zur Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ ist ein moderates, bei weiterer Steigerung der Wirkstoffmenge ein starkes Abfallen der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb.3.13) erkennbar. Diese konzentrationsabhängige Wirkung schlägt sich auch auf das Profil der Kontraktionskurve (Abb.3.14) nieder.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	$11,31 \pm 2,03$	100 ± 0	5	-
3	$10,46 \pm 1,87$	$-7,38 \pm 1,48$	5	0,05
10	$9,95 \pm 1,82$	$-12,10 \pm 1,86$	5	0,01
30	$8,50 \pm 1,74$	$-25,64 \pm 4,52$	5	0,01
100	$6,04 \pm 1,31$	$-45,45 \pm 8,27$	5	0,01

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGpy3-HCl an den Präparaten des Truncus pulmonalis

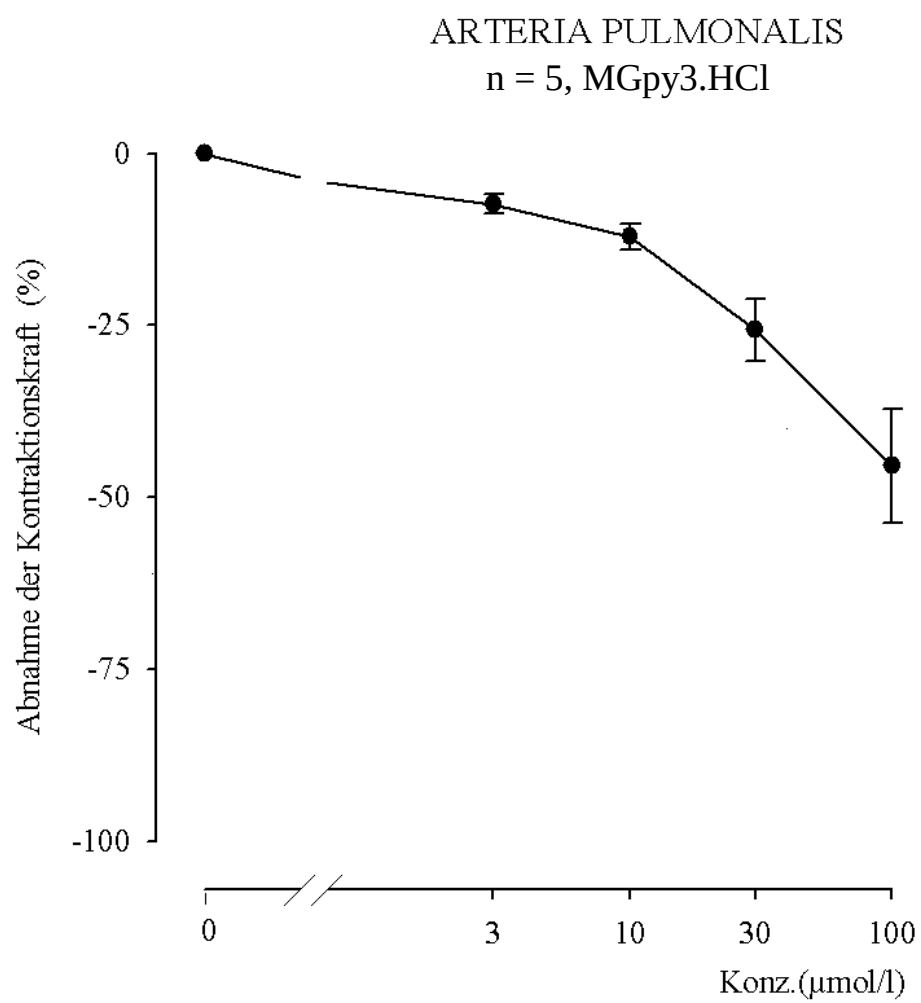


Abb.3.13: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGpy3-HCl an den Präparaten des Truncus pulmonalis (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

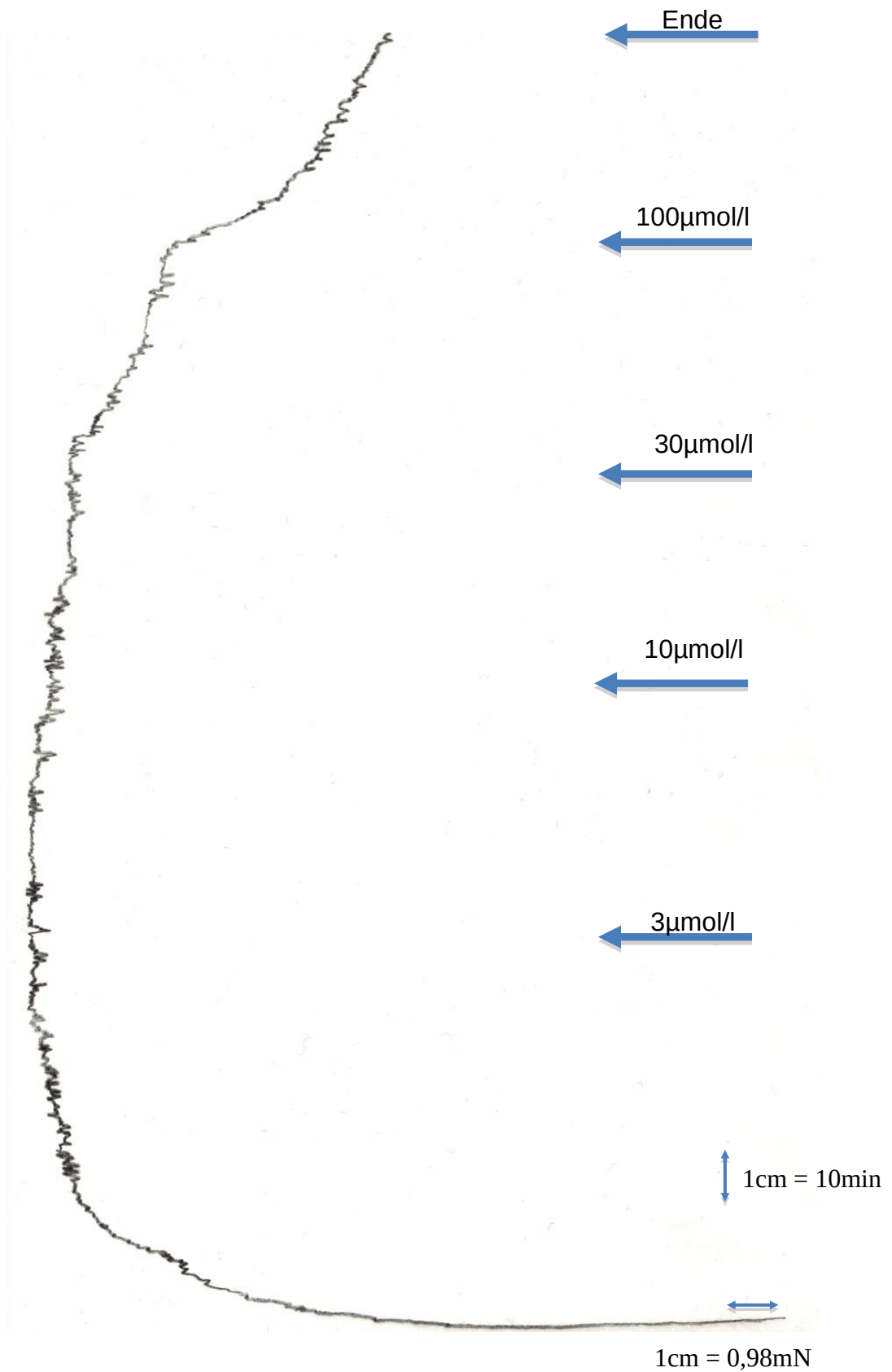


Abb.3.14: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Truncus pulmonalis unter Einfluss von MGpy3-HCl. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

3.3.3 Ergebnisse – MGpy3-HCl am terminalen Ileum

Das terminale Ileum ist das Organsystem, auf welches die Substanz MGpy3-HCl die stärkste Wirkung ausübte. An den fünf für die Versuche verwendeten Organen konnte ein maximaler spasmolytischer Effekt bei Höchstkonzentration von 70,12 Prozent (SEM= $\pm 7,28$) der größtmöglichen Wirkung nachgewiesen werden. Bei allen Konzentrationen ist hohe Signifikanz gegeben. Die in der Abbildung 3.15 eingezeichnete EC₅₀-Konzentration wurde graphisch ermittelt und beträgt 21,5 $\mu\text{mol/l}$. Im Verlauf der Kontraktionskurve in Abbildung 3.16 ist eine deutliche Stufenform erkennbar.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	$9,02 \pm 1,66$	100 ± 0	5	-
3	$8,08 \pm 1,50$	$-10,58 \pm 1,01$	5	0,01
10	$6,21 \pm 1,18$	$-31,57 \pm 3,33$	5	0,01
30	$3,77 \pm 0,81$	$-58,37 \pm 5,90$	5	0,01
100	$2,57 \pm 0,62$	$-70,12 \pm 7,28$	5	0,01

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGpy3-HCl an den Präparaten des terminalen Ileum

TERMINALES ILEUM

n = 5, MGpy3.HCl

EC50 = 21,5 $\mu\text{mol/l}$

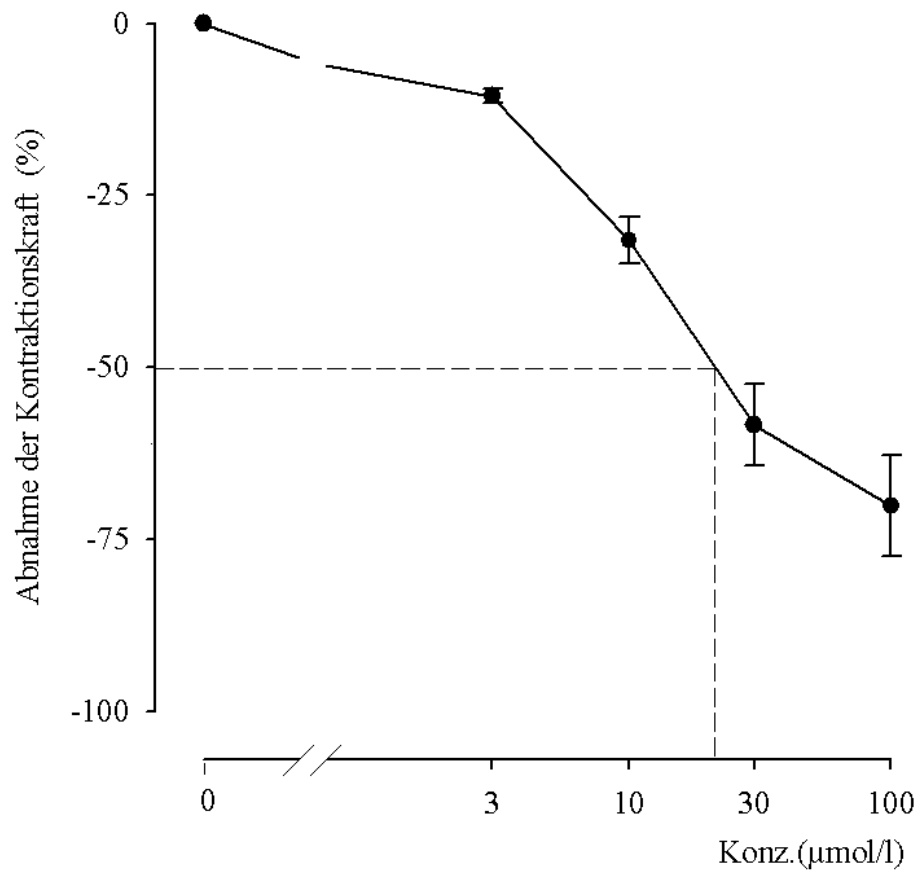


Abb.3.15: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGpy3-HCl an den Präparaten des terminalen Ileum (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

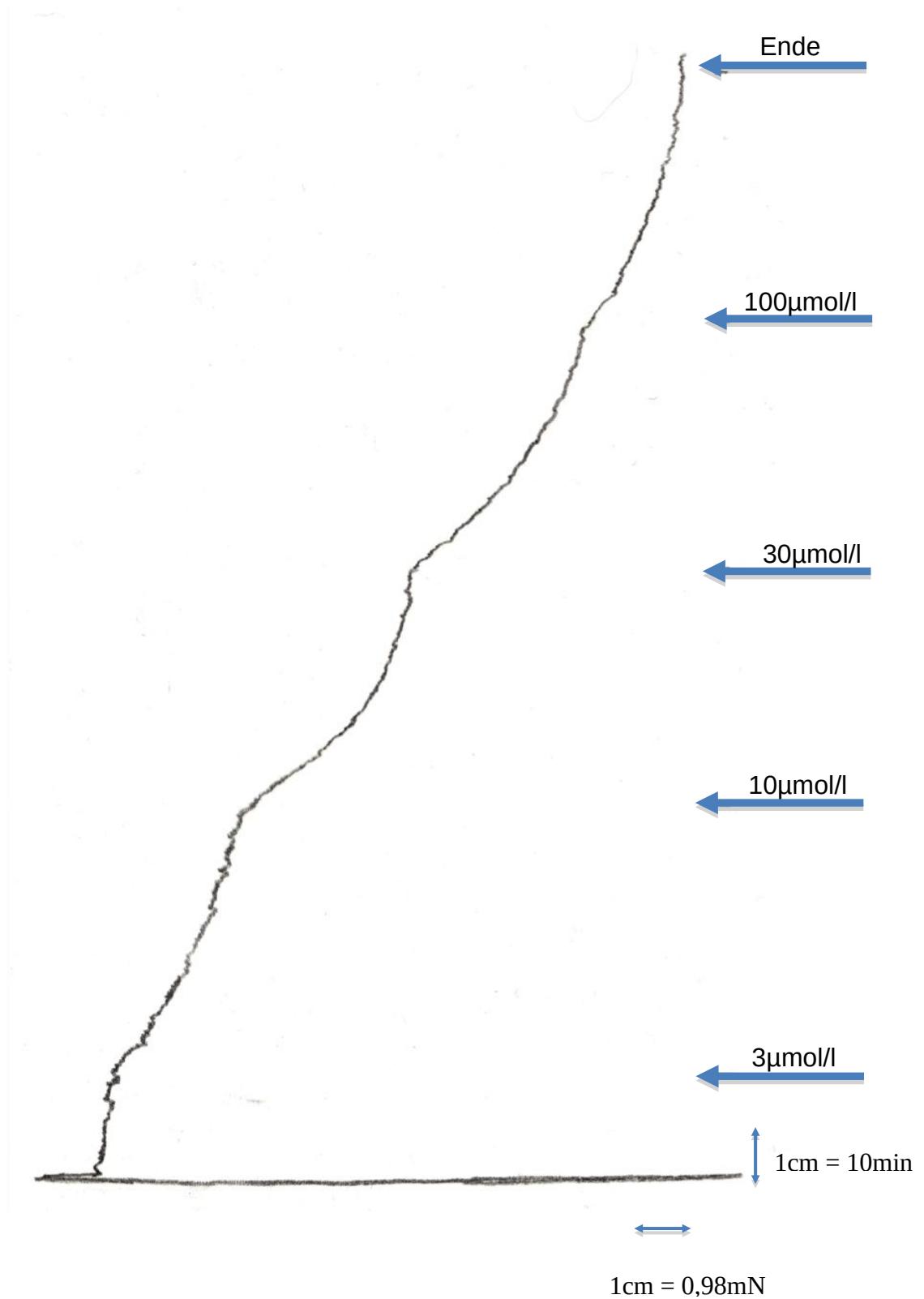


Abb.3.16: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileum unter Einfluss von MGpy3-HCl. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

3.3.4 Ergebnisse – MGpy3-HCl am Musculus papillaris

Die negativ inotrope Wirkung von MGpy3-HCl auf die drei Präparate des Papillarmuskels ist sehr gering ausgeprägt und weist keine Signifikanz auf. Das Fehlen eines reproduzierbaren Zusammenhangs äußert sich in Abbildung 3.17 in einem ungerichteten aufsteigenden und abfallenden Profil der Konzentrations-Wirkungskurve. Der in Abbildung 3.18 zu erkennende Abwärtstrend der Kontraktionskraft ist eher als fehlende Konstanz des Präparates zu deuten denn als Substanzwirkung.

Konzentration [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	$0,78 \pm 0,02$	100 ± 0	3	-
3	$0,74 \pm 0,07$	$-6,52 \pm 6,19$	3	n.s.
10	$0,75 \pm 0,06$	$-4,66 \pm 6,14$	3	n.s.
30	$0,76 \pm 0,03$	$-2,54 \pm 2,54$	3	n.s.
100	$0,70 \pm 0,06$	$-10,89 \pm 5,05$	3	n.s.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGpy3-HCl an den Präparaten des Musculus papillaris

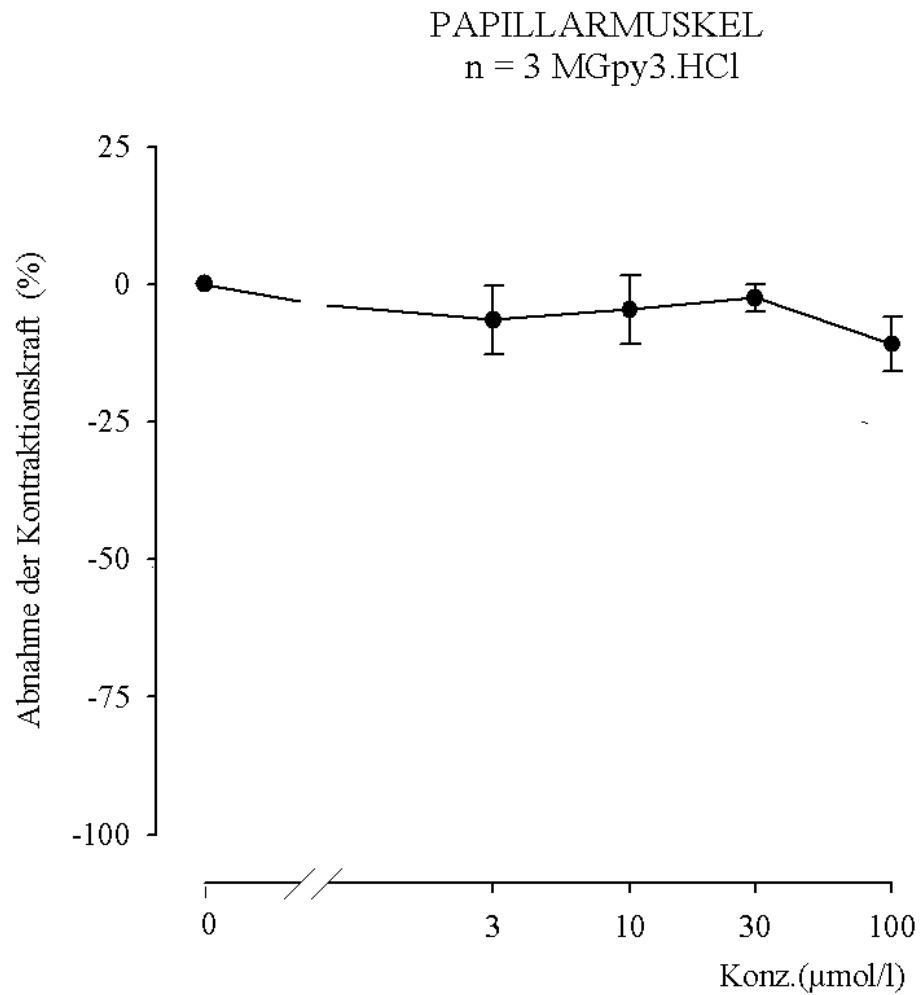


Abb.3.17: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGpy3-HCl an den Präparaten des Musculus papillaris (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in µmol/l, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent)

↑
1cm = 0,98mN
↔ 1cm = 1sek

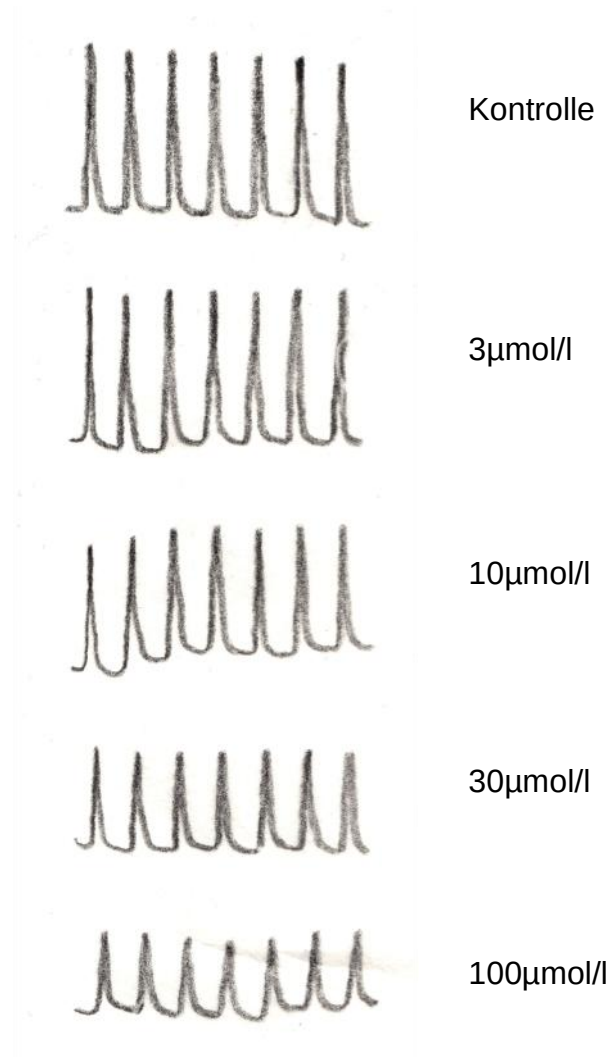


Abb.3.18: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Musculus papillaris unter Einfluss von MGpy3·HCl. Vertikale Ausdehnung: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Horizontale Ausdehnung: Zeit (1 Zentimeter = 1 Sekunde)

3.3.5 Ergebnisse – MGpy3-HCl am Atrium cordis dextrum

Die ab der Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ hoch bzw. sehr hoch signifikante negativ chronotrope Wirkung von MGpy3-HCl auf die fünf Präparate des rechten Vorhofes betrug bei der Höchstkonzentration im Durchschnitt 77,42 (SEM = $\pm 9,79$) und war damit stark ausgeprägt. Dieser Effekt ist sowohl an der stark abfallenden Tendenz der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb.3.19) als auch an der abnehmenden Dichte der Zacken der Kontraktionskurve (Abb.3.20), welche die Kontraktionen darstellen erkennbar.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	f $\pm$ SEM [Hz]	f $\pm$ SEM [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	243,00 $\pm$ 9,57	100 $\pm$ 0	5	-
3	241,00 $\pm$ 9,67	-0,83 $\pm$ 0,51	5	n.s.
10	234,00 $\pm$ 9,41	-3,70 $\pm$ 0,73	5	0,01
30	201,00 $\pm$ 5,10	-16,92 $\pm$ 2,87	5	0,01
100	56,00 $\pm$ 25,27	-77,42 $\pm$ 9,79	5	0,001

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Wirkungsmessung von MGpy3-HCl an den Präparaten des Atrium cordis dextrum

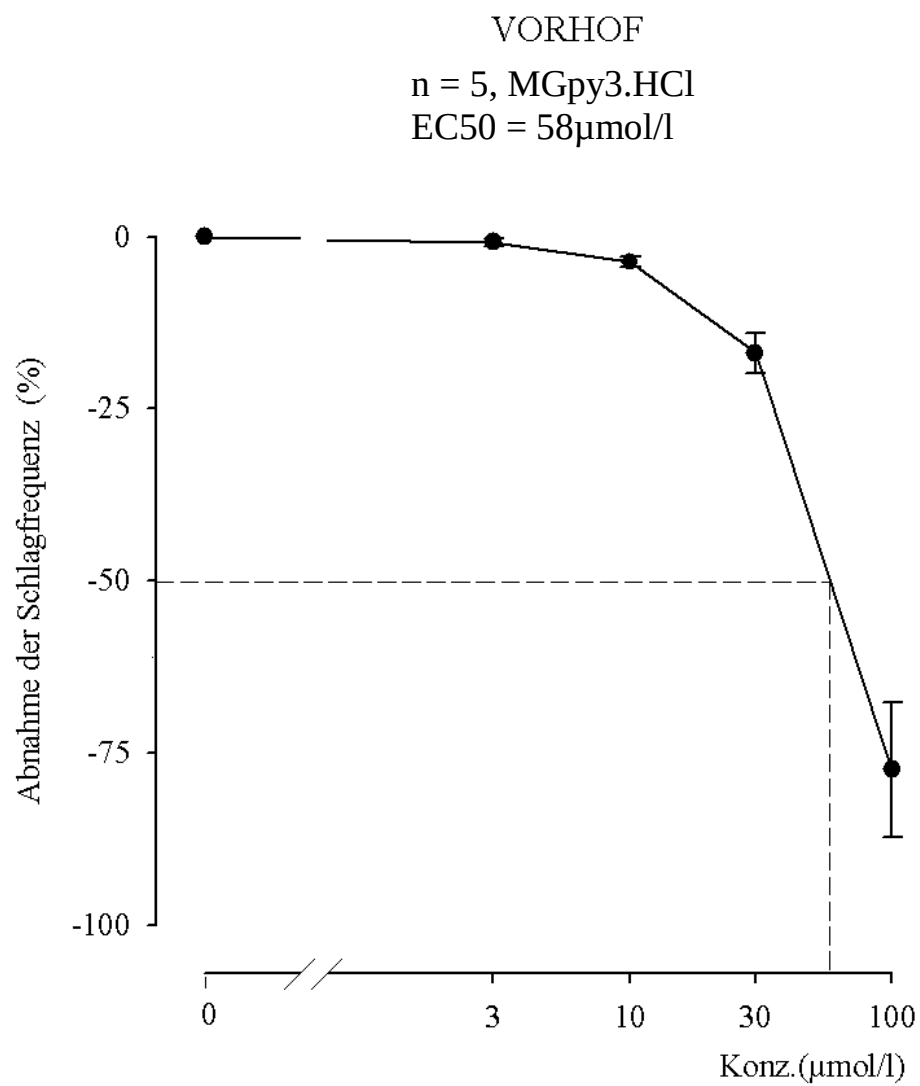


Abb.3.19: Durchschnittliche Konzentrations-Wirkungskurve von MGpy3-HCl an den Präparaten des Atrium cordis dextrum (Abszisse: Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$, semilogarithmisch, Ordinate: Änderung der Schlagfrequenz in Prozent)


1cm = 1s

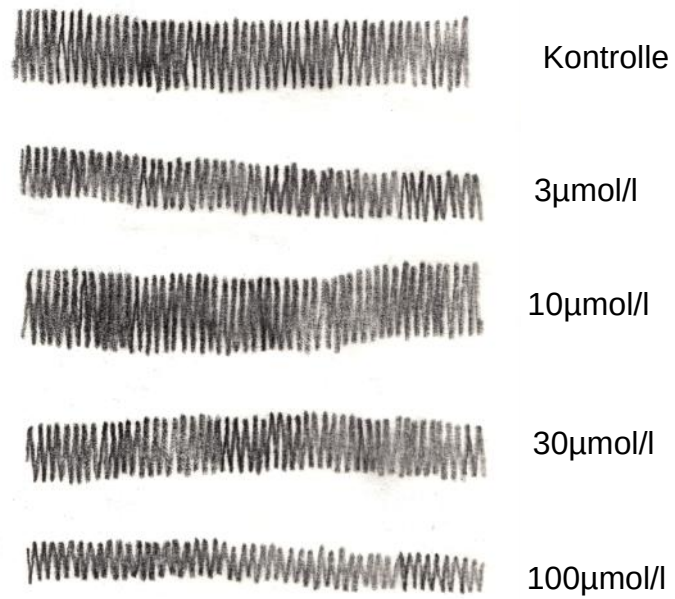


Abb.3.20: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des Atrium cordis dextrum unter Einfluss von MGpy3·HCl. Horizontale Ausdehnung: Zeit (1 Zentimeter = 1 Sekunde)

3.3.6 Ergebnisse der Untersuchungen zum Wirkmechanismus von MGpy3·HCl am terminalen Ileum

Nach einer geringfügigen, nicht signifikanten Vasodilatation nach der Zugabe des eNOS-hemmenden Nitro-L-arginin wurde im Rahmen der Einstellung auf die EC₅₀-Konzentration von MGpy3·HCl eine hoch signifikante Vasodilatation auf 58,80 Prozent (SEM= ± 10,71) der ursprünglichen Kontraktionskraft (zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe) festgestellt.

Auf Grund dieses Messergebnis lässt sich die Aussage treffen, dass die Beteiligung der eNOS am Wirkmechanismus von MGpy3·HCl nicht signifikant ist. Der in der Tabelle angegebene P-Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit bezieht sich lediglich auf die Wirkung der Testsubstanz, deren Signifikanz in vorangegangenen Versuchen bereits festgestellt wurde. Der Standardfehler von ± 10,71 bei einer Dilatationswirkung von durchschnittlich 41,20 Prozent ist jedoch zu hoch um hier von einem signifikanten Zusammenhang bezüglich des Wirkmechanismus zu sprechen. Die Abbildungen 3.23 und 3.24 zeigen die durchschnittliche Konzentration-Wirkungskurve bzw. die Kontraktionskurve einer Messung, an der die beschriebenen Effekte zu erkennen sind.

Zugegebene Substanz	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P
0 (Kontrollwert)	8,02 ± 1,16	100 ± 0	5	-
L-Nitro-L-arginin (100µmol)	7,84 ± 0,95	-2,24 ± 12,11	5	n.s.
MGpy3·HCl (EC ₅₀)	4,61 ± 0,84	-41,20 ± 10,71	5	0,01

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Analyse des Wirkmechanismus von MGpy3·HCl an den Präparaten des terminalen Ileum

**Terminales Ileum, Nitro-L-arginin
MGpy3.HCl, 25 μ mol/l
n=5**

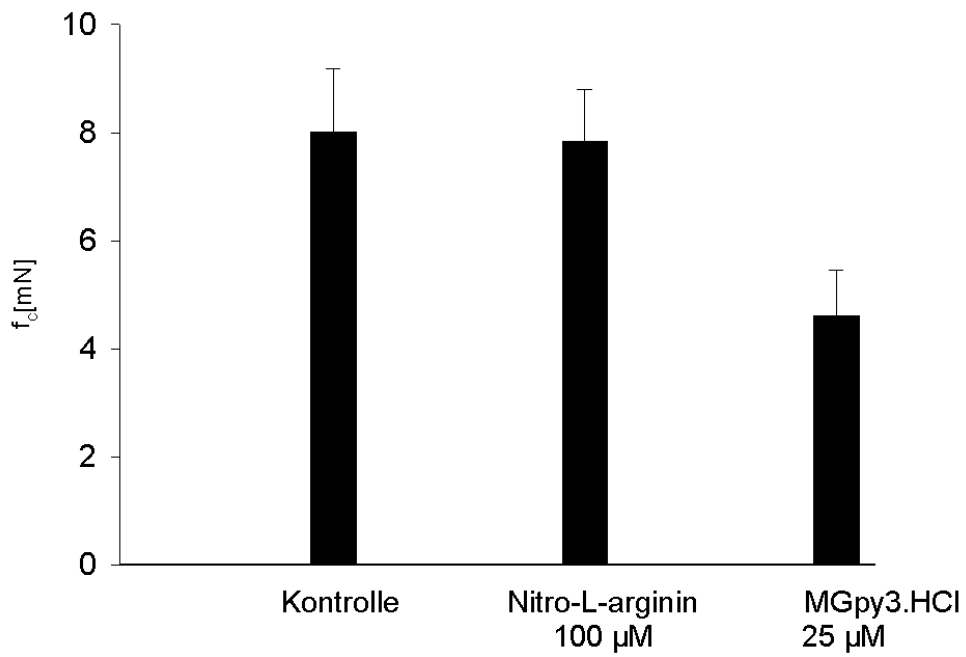


Abb.3.23: Durchschnittliche Kontraktionszustände der Präparate des terminalen Ileums unter der Einwirkung von Nitro-L-arginin und MGpy3·HCl (Kontraktionskraft in mN)

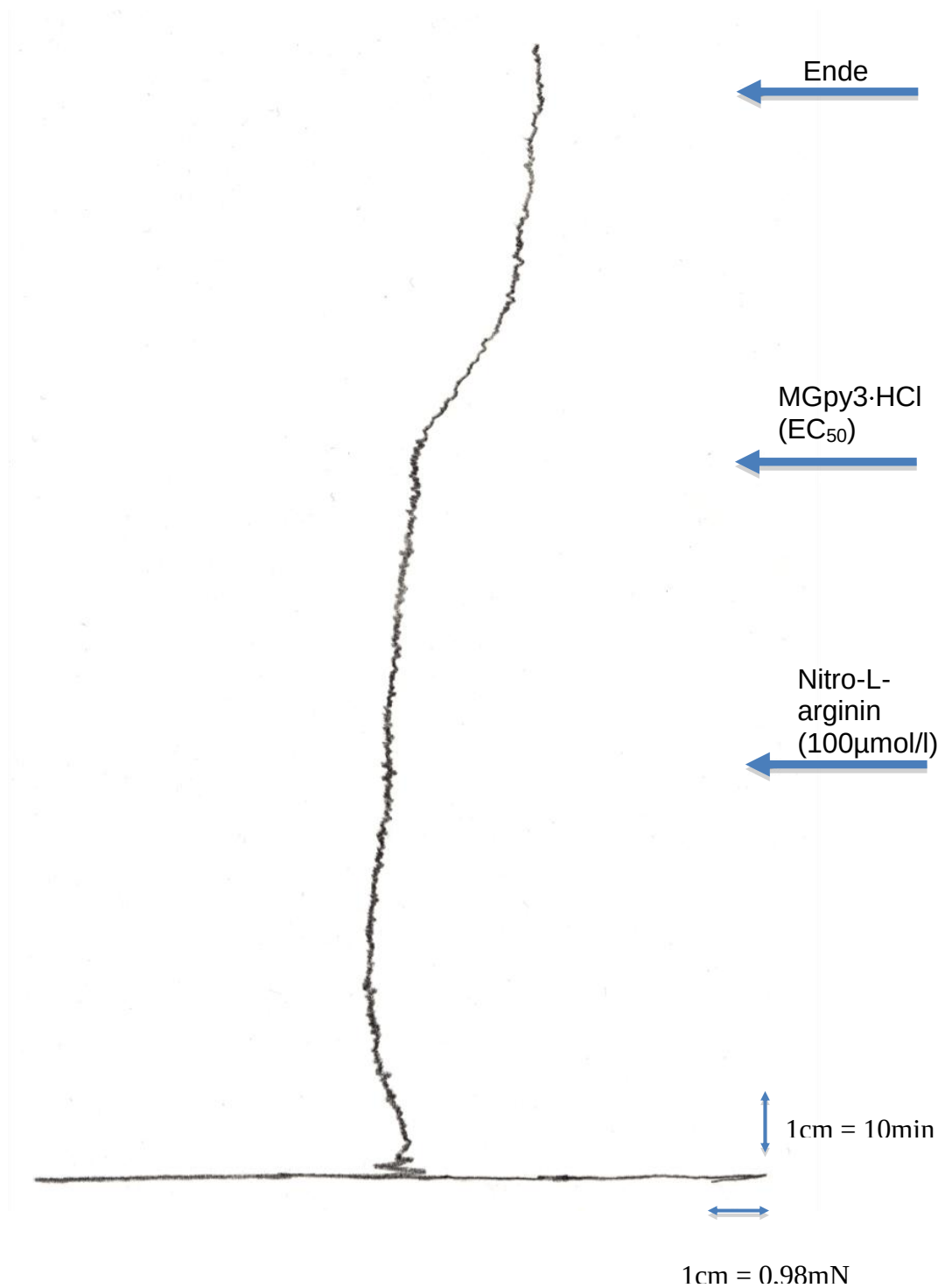


Abb.3.22: Digitalisierte Version einer Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileum unter Einfluss von Nitro-L- (Krejcy, Schwarzacher, & Raberger)arginin und MGpy3·HCl. Abszisse: Kraft (1 Zentimeter = 0,98 Millinewton), Ordinate: Zeit (1 Zentimeter = 10 Minuten)

4 Interpretation der Ergebnisse

4.1 Interpretation der Ergebnisse – MGdth8

4.1.1 Beurteilung der Daten

Die von der Testsubstanz MGdth8 verursachte äußerst geringe Vasodilatation an den Präparaten des Truncus pulmonalis wies bei den Konzentrationen 30µmol/l und 100µmol/l Signifikanz auf, diesem Umstand ist jedoch auf Grund der sehr schwachen Ausprägung der Wirkung mit Skepsis zu begegnen. Eine Wiederholung der Versuchsreihe an einer deutlich größeren Anzahl an Präparaten des Truncus pulmonalis könnte Aufschluss darüber geben, ob eine Wirkung dieser Substanz tatsächlich vorhanden ist oder ob die Abnahme der Gefäßkontraktion nur eine scheinbare z.B. auf Grund mangelnder „Qualität“ der verwendeten Organ-Präparate war.

4.1.2 Schlussfolgerungen und mögliche weitere Versuche

Eine etwaige tatsächlich signifikant nachweisbare Wirkung am Truncus pulmonalis wäre einerseits auf Grund der fehlenden Wirkung auf andere Organsysteme von großem Interesse, da sich eine solche organselektive Eigenschaft des Wirkstoffes in Zusammenhang mit der Struktur – das bedeutet im Falle der Substanz MGdth8 mit der Einbringung eines Schwefelatomes in das mittig gelegene Ringsystem des MG-Grundkörpers – bringen ließe, auf der anderen Seite kann zu einer solchen theoretischen Möglichkeit aus jetziger Position keine genaue Bewertung vorgenommen werden, da auf Basis der vorliegenden Daten der Effekt selbst bei maximaler Dosierung zu gering ist um als signifikant bzw. nachweisbar eingestuft zu werden.

Eine Möglichkeit für weitere Untersuchungen der Verbindung wäre somit Versuche mit deutlich höheren Dosierungen vorzunehmen, um eine sehr schwach ausgeprägte Wirkung zu kompensieren. Jedoch müssten in eine solche Versuchsreihe erneut sämtliche in den vorangegangenen Versuchen analysierte Organsysteme berücksichtigt werden, da auch

die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass es sich bei der Organselektivität – so eine Wirkung tatsächlich vorhanden ist – nur um eine scheinbare Eigenschaft handelt, welche dadurch begründet ist, dass die Präparate der Aorta descendens nur die höchste Sensitivität und keine Selektivität gegenüber der Wirkung der Substanz aufweisen. Dieser Effekt könnte bei stark erhöhter Konzentration demaskiert werden, wodurch eine diskutierte Organselektivität hinfällig wäre.

Außerdem müsste bei der Durchführung von Versuchen mit sehr viel höheren Konzentrationen der Umstand berücksichtigt werden, dass das verwendete Lösungsmittel DMSO nicht in uneingeschränktem Ausmaß zur Anwendung kommen darf, da seine Eigenwirkung die Messergebnisse z.B. durch zu starke toxische Wirkung, die zum Absterben des Versuchsorganes führt weiter verkomplizieren würde.

Solange nicht eine solche Versuchsreihe vorgenommen wurde ist also davon auszugehen, dass die Substanz MGdth8 in den für die hier beschriebenen Versuche üblichen Konzentrationen keine signifikante Wirkung in Form von Vasodilatation, Spasmolyse und Beeinflussung von Chronotropie oder Inotropie aufweist.

Diese Erkenntnis könnte grundsätzlich dahingehend interpretiert werden, dass sich das Vorhandensein eines Thiazolringes in der MG-Grundstruktur stark senkend auf die genannten Wirkungen niederschlägt. Diese Aussage lässt sich jedoch vorerst nur auf die vorliegende Substitution an den Stellen 3 und 5 treffen, da Stoffe der MG-Grundstruktur mit einem Thiazolring, welcher die Substituenten an anderen Stellen trägt noch keiner Testung auf eine vorhandene Wirkung unterzogen wurden. Ein Screening dieser Substanzen wäre von Interesse für die Ermittlung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung.

4.2 Interpretation der Ergebnisse – MGpy3·HCl

4.2.1 Beurteilung der Daten

Alle Wirkungen der Testsubstanz MGpy3·HCl können auf Grund ihrer mittelmäßigen bis starken Ausprägung generell als signifikant und reproduzierbar eingestuft werden. Abgesehen von den Präparaten des Papillarmuskels gab es kein Versuchsobjekt, bei dem nicht zumindest bei höchster Konzentration eine Wirkung von einem Viertel der gesamtmöglichen Wirkung verzeichnet wurde. Zu den Mechanismen über die die

Substanz diese teilweise starke Wirkung verursacht kann nach momentanem Erkenntnisstand auf Grund der Ergebnisse der Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Wirkmechanismus nur gemutmaßt werden.

4.2.2 Interpretation der Ergebnisse der Analyse des Wirkmechanismus

Neben einer Beteiligung des Enzyms eNOS, welche sich bei Betrachtung der Ergebnisse der Messungen der Effekte von Nitro-L-arginin und MGpy3-HCl auf die Präparate des terminalen Ileum ausschließen bzw. auf ein Minimum reduzieren lässt, da die mit der verabreichten Konzentration zu erwarteten Effekte nach Hemmung dieses Enzyms nur wenig bis nicht abgeschwächt eintraten, kommt eine Vielzahl von Wirkmechanismen für die von der Substanz ausgeübten Effekte in Betracht.

Eine Möglichkeit dafür, wie MGpy3-HCl seine Wirkung entfaltet wäre eine NO-Freisetzung ohne Beteiligung von eNOS. Stickstoffmonoxid könnte hydrolytisch oder durch andere Enzyme aus der Verbindung hervorgehen und so die in Kapitel 1.5 beschriebene Signalkaskade aktivieren.

Weitere theoretisch mögliche Wirkmechanismen, welche nicht nur ausschließlich sondern auch anteilmäßig an den beschriebenen Wirkungen beteiligt sein könnten sind neben unbekannten Mechanismen die Blockade von Angiotensinrezeptoren, Stimulation von Betaadrenozeptoren, Blockade von Alphaadrenozeptoren, Stimulation von Serotoninrezeptoren und andere (Aktories et al. 2009).

Warum der untersuchte Wirkstoff lediglich als Anhaltspunkt für die Synthese anderer Substanzen dienen kann bzw. selbst eine Vielzahl chemischer Modifikationen durchlaufen müsste um als Arzneistoff Anwendung zu finden, soll im Folgenden erörtert werden.

4.2.3 Anwendungspotential von MGpy3-HCl

Die Vasodilatation an den arteriellen Anteilen an großem Blutkreislauf bzw. Lungenkreislauf für die die Wirkung an den Präparaten von Aorta descendens und Truncus pulmonalis stellvertretend steht wäre zwar grundsätzlich von Interesse für eine Therapie der arteriellen Hypertonie bzw. der pulmonalen arteriellen Hypertonie, eine

Substanz wie MGpy3·HCl, welche diese Wirkungen vereint und sie somit nicht getrennt voneinander erzielt werden können wäre im Sinne einer geforderten Organselektivität jedoch nicht anwendbar. So wäre eine Behandlung der arteriellen pulmonalen Hypertonie mit Nebenwirkungen im Sinne einer systemischen Blutdrucksenkung verbunden und umgekehrt die Behandlung einer arteriellen Hypertonie mit einer Senkung des Blutdruckes im Lungenkreislauf.

Die vor allem bei hoher Dosierung stark negativ chronotrope Wirkung auf den Herzmuskel ist eine in der Bluthochdrucktherapie unerwünschte Wirkung. Sie würde das Herzzeitvolumen verringern und sich somit negativ auf die Blutversorgung des gesamten Körpers auswirken, was nicht nur bei körperlicher Betätigung zu starken Einschränkungen sondern auch bei an chronischer Herzinsuffizienz leidenden Personen zu einer akuten Dekompensation führen könnte.

Eine weitere Eigenschaft der Substanz MGpy3·HCl, welche in Anbetracht der Anwendung in der Therapie der arteriellen Hypertonie bzw. der arteriellen pulmonalen Hypertonie ein Problem darstellen würde, ist die sehr starke spasmolytische Wirkung auf den Darmtrakt (stellvertretend waren hier die Präparate des terminalen Ileum). Es ist davon auszugehen, dass Patienten, welche auf Grund von Hypertonie mit einem solchen Wirkstoff behandelt würden, an starker Verstopfung bis hin zum paralytischen Ileus leiden würden. Eine derartige unerwünschte Nebenwirkung stünde in keinem Verhältnis zum Nutzen einer Therapie auf welche ein Hypertoniepatient wohl ein Leben lang angewiesen wäre. Umgekehrt wäre die Substanz natürlich auch nicht im Rahmen von Durchfallerkrankungen einsetzbar da die spasmolytische Wirkung von den oben genannten – in diesem Fall – Nebenwirkungen an Gefäßsystem und Herz überschattet würden.

Eine negative Wirkung auf die Schlagkraft des Herzens (stellvertretend auf die Kontraktionskraft der Präparate des Musculus papillaris) – welche wie bereits erwähnt in den Versuchen nicht festgestellt wurde – könnte im Rahmen einer Bluthochdrucktherapie zwar therapeutisch genutzt werden (ähnlich den Betaadrenozeptorenblockern), ist aber nicht zwingend erforderlich.

Abgesehen von seinen unbekannten Eigenschaften auf verschiedene Parameter wie Toxizität, andere Wirkungen und Bioverfügbarkeit bezüglich einer Verabreichung an einen lebendigen Organismus weist MGpy3-HCl also auch in Bezug auf sein bekanntes Wirkungsprofil keine Eignung für eine zukünftige klinische Anwendung auf.

Die vasodilatorischen Eigenschaften auf die arteriellen Gefäße sowohl des Lungen- wie auch des großen Blutkreislaufes, die spasmolytische Wirkung auf den Darmtrakt, der negativ chronotrope Effekt auf den rechten Vorhof und das Fehlen eines Einflusses auf die Inotropie nun in Zusammenhang mit der Wirkstoffstruktur zu bringen, ist bei bisher zwei untersuchten Substanzen der MG-Grundstruktur grundsätzlich nicht möglich bzw. sinnvoll, es können jedoch Überlegungen zu den ausgeprägten Unterschieden in der Wirkung der beiden Testsubstanzen angestellt werden.

4.2.4 Mögliche Gründe für die Unterschiede in der Wirkung der beiden Testsubstanzen

Sollte der Wirkmechanismus der NO-Abspaltung für die Substanz MGpy3-HCl zutreffend sein, wäre eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Wirkung von MGdth8 eine Umlagerung der Molekülstruktur z.B. in Folge von Hydrolyse, die durch die andere Beschaffenheit von MGdth8 bei diesem Molekül nicht möglich ist. Interessant wäre im Rahmen dieser Überlegung eine Analyse weiterer MG-Substanzen, welche ebenfalls über zwei Stickstoffatome verfügen jedoch die Substituenten der MG-Grundstruktur an anderen Stellen tragen, bzw. die über gar keinen Stickstoffanteil verfügen. Möglicherweise ist für eine erfolgreiche Freisetzung von NO auch die Bindung zumindest eines Stickstoffatoms in der Struktur an ein anderes elektronegatives Atom notwendig, eine Situation die bei der Verbindung MGpy3-HCl im Pyrazolring vorliegt, nicht jedoch bei MGdth8, bei dem der Stickstoff lediglich von zwei Kohlenstoffatomen umgeben ist.

Ein anderer möglicher Grund für die fehlende Wirkung von MGdth8 ist die größere Raumforderung bzw. Polarität des Schwefelatoms im Vergleich zu dem bei MGpy3-HCl an der analogen Stelle vorliegenden Kohlenstoffatom. Die Bindung eines hypothetischen Enzyms, das die Wirkung erst durch Modifikation des Moleküls ermöglicht, könnte dadurch verhindert werden. Um einen solchen Mechanismus aufzudecken wären ebenfalls Analysen von weiteren Substanzen der MG-Grundstruktur von Interesse.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden zwei Substanzen (MGdth8 und MGpy3·HCl) auf ihre vasodilatorische, spasmolytische, negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung an isolierten Meerschweinchenorganen getestet. Die dafür notwendigen Versuche wurden anhand von isometrischen Kontraktionsmessungen, welche in Abhängigkeit von der zugegebenen Wirkstoffdosis aufgezeichnet wurden durchgeführt.

Das Ziel der Arbeit war es, Informationen über die organspezifischen Wirkungen der beiden Testsubstanzen zu erhalten um ein Wirkungsprofil zu erstellen und soweit dies möglich war in Zusammenhang mit deren chemischer Struktur zu bringen. Außerdem sollte der postulierte Wirkmechanismus der e-NOS-Stimulation näher untersucht werden.

Die praktischen Untersuchungen bedienten sich einiger bereits aus vorangegangenen ähnlichen Arbeiten bekannten und etablierten Methoden bezüglich der durchgeführten Organpräparationen und der Versuchsanordnungen.

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Unterschied der Aktivitäten der beiden Substanzen. So wies die Verbindung MGdth8 keinerlei signifikante Wirkung bezüglich Vasodilatation, Spasmolyse oder Beeinflussung von Inotropie und Chronotropie auf, der Testsubstanz MGpy3·HCl hingegen konnte eine signifikante vasodilatorische, spasmolytische und negativ chronotrope jedoch keine inotrope Wirkung zugeschrieben werden. Die Beteiligung der endothelialen NO-Synthase am Wirkmechanismus bestätigte sich nicht.

Auf Grund der Unterschiede in Struktur und Wirkung konnten jedoch Überlegungen zu deren Beziehung angestellt und Ansätze für weitere Versuchsreihen gefunden werden um vertiefende Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Substanzklasse zu erlangen.

6 Literaturverzeichnis

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

Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. 5. Auflage. Urban & Fischer-Verlag München 2006. ISBN 3-437-44405-0

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

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

Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S (2002) Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. European Respiratory Journal, 20 (6): 1559-72

Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. Waldeyer Anatomie des Menschen. 17 Auflage. Walter de Gruyter Berlin New York 2003

Hintersteininger M (2010). Kardiovaskuläre und spasmolytische Aktivität von zwei neuen Wirkstoffen (SWS 25a und WHG 58T) auf isolierte Organe von *Cavia porcellus*

Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High blood Pressure (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High blood pressure (2003) (abrufbar auf <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/express.pdf>)

Krejcy K, Schwarzacher S, Raberger G (1993) Distribution and metabolism of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester in canine blood in vitro. Naunyn Schmiedbergers Arch Pharmacol. 347:747-753

Renz-Polster K, Krautzig S, Braun J: Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Auflage. Urban und Fischer-Verlag München 2004, ISBN 3-437-41052-0

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

7 Curriculum Vitae

Name:	Dorian Hirschmann
Geburtsdatum:	06.08.1987
Wohnort:	Breitenfurt bei Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Schulbildung:	1993-1997: Volksschule St. Ursula, 1230 Wien 1997-2001: Gymnasium St. Ursula, 1230 Wien 2001-2006: IBC-International Business College Hetzendorf, 1230 Wien Ab Oktober 2006: Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Berufserfahrung:	Seit 2005: Geringfügige Anstellung „APO23“, Apotheke Kalksburg, 1230 Wien
Fähigkeiten und Kenntnisse:	Englisch und Französisch in Wort und Schrift Microsoft Word, Excel, Power Point