



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Profil eines neu synthetisierten
Kohlensäureesters (MAH61 HCl) an isolierten Organen von
Meerschweinchen“

Verfasser

Georg Berenda

Angestrebter akademische Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Ao. Univ.- Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik, der in den Monaten meiner Arbeit immer ein offenes Ohr für mich hatte; der mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und sich stets bemüht hat, für ein angenehmes, familiäres Arbeitsklima im Labor zu sorgen. Danke Christian

Des Weiteren bedanke ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker, dessen Arbeitsgruppe meinen Arzneistoff zur Verfügung gestellt hat. Danke Herr Professor

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Willibald und Margarete Berenda, die mich während des Studiums nicht nur finanziell, sondern vorallem emotional in leichten wie in schweren Zeiten unterstützt haben, stets Interesse an meinem Studium gezeigt haben und mich durch ihre Erziehung zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Außerdem gilt mein Dank meiner lieben Schwester Ursula, die sich als große Schwester stets für mich eingesetzt hat und eine Bereicherung in meinem Leben ist. Ich kann mich glücklich schätzen, Teil dieser Familie sein zu dürfen. Danke liebe Familie

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den wundervollen Menschen bedanken, die ich im Laufe dieses schönen, aber auch sehr harten Studiums kennenlernen durfte. Auch Ihr gabt mir den Mut und die Kraft, die Unterstützung und die richtigen Worte in jeglichen Situationen. Ich bin stolz Euch Freunde nennen zu dürfen. Danke meine Kollegen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Diplomarbeit	1
1.2. Vasodilatation	2
1.2.1. Definition.....	2
1.2.2. Mechanismen.....	2
1.2.3. Endogene Vasodilatoren	3
1.2.4. Exogene Vasodilatoren	3
1.3. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)	3
1.3.1. Funktion	3
1.3.2. Physiologische Bedeutung	4
1.4. Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.4.1. Struktur	4
1.4.2. Physiologische Bedeutung	4
2. Methoden und Materialien	5
2.1. Testsubstanz	5
2.1.1. MAH61 HCl	5
2.2. Nitro-L-Arginin	6
2.3. Lösungsmittel und Pipettierschema	6
2.3.1. Bereitung der Stammlösung von MAH61 HCl	6
2.3.2. Bereitung der Tyrodelösung	7
2.3.3. Bereitung der Kaliumchloridlösung	9
2.4. Versuchstiere	10
2.5. Organisolierung und Präparation	11
2.5.1. Entnahme der Organe	11
2.5.2. Präparation der Organe	12
2.5.2.1. Präparation des rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter)	13
2.5.2.2. Präparation des Papillarmuskel (Musculus papillaris)	14
2.5.2.3. Präparation der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	15
2.5.2.4. Präparation der Aorta (Aorta descendens)	16
2.5.2.5. Präparation des Dünndarms (Terminales Ileum)	17
2.6. Versuchsaufbau und Apparaturen	17
2.6.1. Apparatur A	19

2.6.2.	Apparatur B	20
2.6.3.	Der Kraftwandler	22
2.6.4.	Die Gasversorgung	23
2.7.	Die Versuchsdurchführung	24
2.7.1.	Versuchsablauf am Atrium cordis dexter	24
2.7.2.	Versuchsablauf am Musculus papillaris	25
2.7.3.	Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis	27
2.7.4.	Versuchsablauf an der Aorta descendens	27
2.7.5.	Versuchsablauf am terminalen Ileum	28
2.8.	Wirkung der Testsubstanz MAH 61 HCl in Kombination mit einem Antagonisten am terminalen Ileum	29
2.8.1.	Versuchsablauf mit Nitro-L-Arginin	29
2.9.	Auswertung der Daten und Statistik	29
2.9.1.	Atrium cordis dexter	29
2.9.2.	Musculus papillaris	29
2.9.3.	Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum	30
2.9.4.	Statistik	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Ergebnisse der Testsubstanz MAH61 HCl	31
3.1.1.	Ergebnisse am Atrium cordis dexter	31
3.1.2.	Ergebnisse am Musculus papillaris	34
3.1.3.	Ergebnisse an der Arteria pulmonalis	37
3.1.4.	Ergebnisse an der Aorta descendens	40
3.1.5.	Ergebnisse am terminalen Ileum	43
3.2.	Ergebnisse zur Bestimmung des Wirkmechanismusses	46
4.	Diskussion	49
4.1.	Versuchsreihen an der quergestreiften Herzmuskulatur	49
4.2.	Versuchsreihen an glattmuskulären Organen	50
4.3.	Versuchsreihen mit MAH61 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin	51
5.	Zusammenfassung	52
6.	Literaturverzeichnis	54
7.	Curriculum vitae	55

1. Einleitung

1.1. Ziel der Diplomarbeit

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die pharmakologische Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Die Testsubstanz, welche am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie unter Leitung von Ao.Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert wurde, leitet sich ursprünglich vom Naturstoff Resveratrol ab, der im Laufe der Jahre aber stark modifiziert wurde und dessen Grundstruktur in der vorliegenden Testsubstanz nur noch marginal erkennbar ist.

Die pharmakologische Wirkung der Substanz wurde an 5 verschiedenen Organen untersucht. An Präparaten vom absteigenden Teil der Aorta (Aorta descendens) und Lungenarterie (Arteria pulmonalis) wurde die vasodilatierende Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur, an Präparaten vom Darm (Terminales Ileum) wurde eine spasmolytische Wirkung getestet. An Präparaten des Rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter) wurde eine etwaige chronotrope Wirkung getestet, sowie an Präparaten am Papillarmuskel (Musculus papillaris) eine etwaige inotrope Wirkung. Wünschenswert wäre hier eine gewisse Gefäßselektivität.

Im zweiten Teil dieser Diplomarbeit wurden am Organ mit der stärksten Wirkung (niedrigster EC_{50} Wert), in meinem Fall das Präparat des terminalen Ileums, Versuche zur Erforschung des möglichen Wirkmechanismus, welcher in der Freisetzung von eNOS vermutet wurde, durchgeführt.

1.2. Vasodilatation

1.2.1 Definition

Unter dem Begriff Vasodilatation versteht man die Erweiterung von Blutgefäßen auf Grund der Erweiterung der muskulären Wände jener Gefäße. Die Dilatation entspricht der Erhöhung des Durchmessers des Gefäßlumens. Das Gegenteil von Vasodilatation ist die Vasokonstriktion.

(Definition nach Webster's New World Medical Dictionary 2008)

1.2.2. Mechanismen

Prinzipiell resultiert eine Vasodilatation aus der Relaxierung von glattem Muskelgewebe, welches die Gefäße umgibt. Diese kann entweder durch Erniedrigung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder durch Dephosphorylierung des kontraktilen Proteins Myosin zustande kommen. Im Grunde gibt es drei verschiedenen Mechanismen, welche zur Vasodilatation führen:

- 1) Durch Hyperpolarisation induzierte Vasodilatation: Durch Veränderung des Ruhepotentials der Zelle kommt es zu einer Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration.
- 2) Durch cAMP induzierte Vasodilatation: Durch eine Stimulierung des adrenergen Systems erhöht sich die Konzentration an cAMP und Proteinkinase A und erleichtert somit die Entfernung von Kalzium aus dem Zytoplasma.
- 3) Durch cGMP induzierte Vasodilatation: Durch Stimulierung der Proteinkinase G kann analog zum cAMP induzierten Mechanismus Kalzium leichter aus dem Zytoplasma entfernt werden. Dieser Mechanismus ist Grundlage der Wirkung unseres Nitrovasodilators.

(Webb et al. 2003)

1.2.3. Endogene Vasodilatoren

Populäre Vertreter der endogenen Vasodilatoren sind unter anderem Histamin, Prostacyclin, Adrenalin, Prostaglandin D₂, E₂, NO, Adenosin, L-Arginin, Bradykinin, CO₂ und Niacin.

(Boron et al. 2006)

1.2.4. Exogene Vasodilatoren

Zu den exogen zuführbaren Vasodilatoren zählen unter anderem Substanzen wie Ethanol, Capsaicin, Phosphodiesterase-5-hemmer wie Sildenafil, Tetrahydrocannabinol, Papaverin und Östrogen.

(Aktories et al. 2009)

1.3. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

1.3.2. Funktion

Das endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase Protein (eNOS) gehört wie seine Isoformen iNOS (induzierbar), nNOS (neuronal) und mtNOS (mitochondrial) zur Familie der NO-Synthasen, welche in der Lage sind, aus der proteinogenen Aminosäure L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) zu katalysieren. (Aktories et al. 2009)

1.3.3. Physiologische Bedeutung

Wie der Name schon sagt, ist die eNOS im Gefäßendothel lokalisiert. Dort induziert eNOS bei Bedarf die Ausschüttung von NO (auch als Endothelium-Derived Relaxing Factor EDRF bekannt), welcher einen der effektivsten vasodilatierenden Neurotransmitter darstellt. Somit hält eNOS eine essentielle Rolle in der Regulation des Blutdruckes inne (Alderton et al. 2001).

1.4. Stickstoffmonoxid (NO)

1.4.2. Struktur

NO ist ein giftiges Gas und gehört zu der Familie der Stickoxide. Stickstoffmonoxid ist ein Radikal.

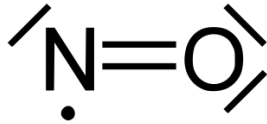


Abbildung 1.2: Strukturformel von Stickstoffmonoxid

1.4.3. Physiologische Bedeutung

NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, welche durch Bildung von cGMP die Erschlaffung der glatten Gefäßmuskulatur auslöst. Außerdem hemmt es die Bildung von Adhäsionsmolekülen, die Oxidation von LDL und die Thrombozytenaggregation (Naseem et al. 2005).

2. Methoden und Materialien

2.2. Testsubstanz

Die Testsubstanz, mit der die Experimente meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden, ist von Ao.Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der Universität Wien zur Verfügung gestellt und für die Experimente dem Department für Pharmakologie und Toxikologie übermittelt worden.

2.2.2. MAH61 HCl

Das Molekulargewicht von MAH61 HCl beträgt 295,84 g/mol und der chemische Name lautet O-[3-(dimethylamino)propyl]-Kohlensäureoctylester-hydrochlorid. MAH61 HCl ist löslich in Wasser.

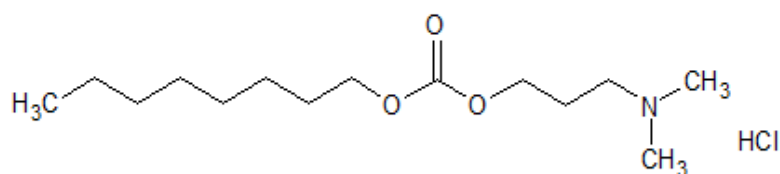


Abbildung 2.1: Strukturformel von MAH61 HCl

2.3. Nitro-L-Arginin

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Substanz wurde im zweiten Teil dieser Diplomarbeit mit Nitro-L-Arginin gearbeitet, welches ein Derivat der Aminosäure L-Arginin darstellt. Nitro-L-Arginin ist in der Lage, die eNOS zu inhibieren, wodurch festgestellt werden kann, ob eNOS für die Wirkung der Testsubstanz verantwortlich ist.

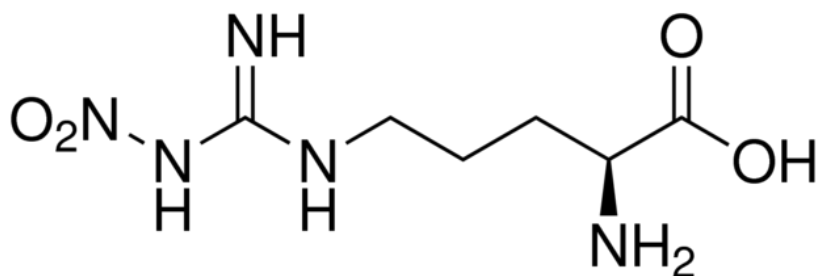


Abbildung 2.2: Strukturformel von Nitro-L-Arginin

2.4. Lösungsmittel und Pipettierschema

2.4.2. Bereitung der Stammlösung von MAH61 HCl

Die Substanz MAH61 HCl ist gut in Wasser löslich, darum wurde zum Lösen Aqua bidestillata herangezogen. Zur Sicherung der Haltbarkeit und Schutz vor einer möglichen Weiterreaktion der Substanz wurde MAH61 HCl im Kühlschrank auf 4-6°C gelagert und erst kurz vor Versuchsbeginn in 100µl Aqua bidestillata in einer kleinen Glasphiole gelöst.

Da die Organbäder zwei verschiedene Fassungsvermögen (8ml und 25ml) besitzen, musste man bei der Berechnung der Einwaage Rücksicht auf jene Volumina nehmen.

Tabelle 2.1: Berechnung für die Einwaage von MAH61 HCl

Testsubstanz	Molekulargewicht Testsubstanz (g/mol)	Volumen Organbad (ml)	Einwaage Testsubstanz (mg)
MAH61 HCl	295,84	8	0,24
		25	0,74

Nach einer Zeitspanne von mindestens 45 Minuten, welche erforderlich ist um eine möglichst konstante Plasmaspiegelkonzentration im menschlichen Körper zu simulieren (man bezeichnet dies auch als „Steady State“), erfolgte die Substanzzugabe nach kumulativem Schema, bis schlussendlich eine Substanzkonzentration von 100 µmol/l im Organbad erreicht wurde.

Es wurden jeweils 3, 7, 20 und 70 µl gelöste Substanz ins Organbad eingespritzt um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten.

Tabelle 2.2: Pipettiermuster der Substanzzugabe

Zugegebenes Volumen (µl)	Endkonzentration im Organbad (µmol/l)
3	3
7	10
20	30
70	100

2.4.3. Bereitung der Tyrodelösung

Zu Beginn jedes Versuchstages wurde eine frische Tyrodelösung in einem 2 Liter Messkolben hergestellt, welche eine leicht modifizierte Version der Krebs-Henseleit Lösung darstellt. Die Nährlösung war essentiell zur Erhaltung eines körperähnlichen

Elektrolytverhältnisses und neben einer physiologischen Körpertemperatur von 37°C und Versorgung mit Sauerstoff mit Hilfe einer Zufuhr von Oxymix (eine Gasmischung aus 95% O₂ und 5% CO₂) unverzichtbar, um die isolierten Organe am Leben zu halten.

Abgesehen von Glucose wurden die Komponenten der Lösung nicht als Reinsubstanz eingewogen, sondern einer bereits vorher eingestellten Stammlösung entnommen. Nach Zugabe von NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, KH₂PO₄ und Glucose in den 2 Liter Messkolben wurde jener zu 80% mit Aqua bidestillata aufgefüllt und sorgfältig umgeschüttelt. Im Anschluss wurde die Mischung für mindestens 20 Minuten mit Oxymix begast und daraufhin vorsichtig tropfenweise unter Begasung mit CaCl₂ versetzt. Die tropfenweise Zugabe von CaCl₂ war unabdingbar, um die Ausfällung von schwerlöslichen Calciumsalzen zu verhindern, welche sich durch eine Trübung der Lösung bemerkbar gemacht hätte und die Verwerfung der Lösung zur Folge gehabt hätte. Nach kompletter Zugabe von CaCl₂ wurde mit Aqua bidestillata bis zum Meniskus aufgefüllt und wiederholt sorgfältig umgeschüttelt.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Tyrodelösung

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Stammlösung	Menge Stammlösung/l Tyrode	Konzentration (mmol/l)
NaCl	58,442	1000,25g/5 l	33,60ml	115,01
KCl	75,550	50,33g/5 l	35,00ml	4,73
NaHCO ₃	84,010	125,00g/5 l	83,70ml	24,91
MgSO ₄	120,370	147,02g/5 l	1,18ml	0,29
KH ₂ PO ₄	136,090	62,00g/250 ml	1,18ml	2,15
CaCl ₂	110,980	34,00g/250 ml	3,20ml	3,92
Glucose	180,160	Reinsubstanz	1,98g	-

2.4.4. **Bereitung der Kaliumchloridlösung**

Für die Experimente an der Arteria pulmonalis, dem terminalen Ileum und der Aorta descendens musste man eine Vorkontraktion der Organe auslösen, um eine etwaige dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Substanz eruieren zu können.

Diese maximale Vorkontraktion konnte mit Hilfe von einer 90mmolaren Kaliumchloridlösung an Arteria pulmonalis und Aorta descendens und einer 60mmolaren Kaliumchloridlösung am terminalen Ileum erreicht werden. Die optimalen Kaliumchloridkonzentrationen wurden empirisch ermittelt.

Die verwendeten Kaliumchloridlösungen wurden täglich frisch zubereitet, um eine homogene Lösung gewährleisten zu können. Für eine 90mmolare Kaliumchloridlösung musste man 0,67g Kaliumchlorid in einen 100ml Messkolben mit Tyrodelösung auf 100ml auffüllen, für eine 60mmolare Lösung verwendet man nur 0,45g Kaliumchlorid auf 100ml Tyrodelösung.

Anschließend wurden die Kolben gut durchgeschüttelt, um eine gute Lösung des Salzes zu garantieren und eine homogene Substanzverteilung ermöglichen zu können.



Abbildung 2.3: Eppendorfpipetten zum Pipettieren der gelösten Substanz

2.5. Versuchstiere

Zur Ermittlung des pharmakologischen Profils der Substanz MAH61 HCl wurden die isolierten Organe von Meerschweinchen des Zuchtstammes TRIK verwendet. Vorteil der TRIK-Stämme ist die Vermeidung von Inzucht um ein minimales Risiko von zu nahen Verwandtschaftsverhältnissen zu ermöglichen. Die Meerschweinchen waren maximal 30 Tage alt und wogen zwischen 300-600g.

Die Versuchstiere wurden am Beginn jedes Versuchstages durch einen Genickschlag getötet. Dieses Verfahren stellt erfahrungsgemäß die humanste Tötungsmethode dar, weil das Tier keine Schmerzen empfindet und möglichst wenig Stress ausgesetzt wird.

Meerschweinchen wurden bei dem Versuch verwendet, weil die Ionenkanäle der Tiere den menschlichen am meisten ähneln und auf Grund der limitierten Größe der Versuchsaapparaturen Meerschweinchenorgane am effektivsten einsetzbar sind.



Abbildung 2.4: Meerschweinchen

2.6. Organisolierung und Präparation

2.6.2. Entnahme der Organe

Nach Genickbruch durch den Versuchsleiter wurde die Bauchdecke inklusive Thorax mit einer Schere geöffnet und zügig Herz, Aorta und Ileum entnommen und in ein mit Tyrodelösung befülltes Becherglas überführt. Aorta und Dünndarm wurden sofort mit Oxymix begast um das Absterben der Organe zu verhindern, das Herz wurde direkt nach Entnahme präpariert.



Abbildung 2.5: Sektionsbesteck zur Organisolierung

2.6.3. Präparation der Organe

Nach Entnahme der Organe wurden jene unter einem Auflichtmikroskop präpariert. In Glaspetrischalen mit Korkboden, befüllt mit Tyrodelösung, fixiert durch einen Gummischlauch am Rand, wurden die Organe mit Präpariernadeln befestigt.

Bei Musculus papillaris, terminalem Ileum und Atrium cordis dexter wurden am Organ mit Hilfe von Bindfäden und Silberdraht Häkchen befestigt, um die Organe in die Versuchsanordnung überhaupt einspannen zu können.

Mit Hilfe von Pinzetten und Federgriffscheren wurde an der Aorta überschüssiges Gewebe entfernt, sodass keine Signalfehler beim Versuch an der Aorta durch überschüssiges Fett- und Muskelgewebe zu Stande kommen konnten. Anschließend wurde die Aorta mit der Federgriffschere in 2mm dicke Ringe geschnitten. Weder Arteria pulmonalis, noch Aorta wurden mit Silberhäkchen versehen, da man die „Organringe“ an sich gut in die Versuchsanordnung einbringen konnte.

Ein großes Maß an Sorgfalt und Konzentration waren während des gesamten Präpariervorganges von Nöten, da eine Überdehnung oder eine Verletzung der Organe zu einer Verwerfung selbiger geführt hätte.



Abbildung 2.6: Präparationsutensilien und Auflichtmikroskop

2.6.3.1. Präparation des Rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter)

Nach Isolierung des Herzens konnte das mit Präpariernadeln fixierte Herz unter einem Auflichtmikroskop von überschüssigem Gewebe mit Hilfe einer Federgriffsschere befreit werden. Vorsichtig wurde der rechte Vorhof herauspräpariert und mit zwei Präpariernadeln fixiert.

Mit einem gewissen Maß an Fingerspitzengefühl befestigte man mit Hilfe von Bindfaden und zu kleinen Häkchen geformtem Silberdraht an beiden Enden des Organes Häkchen, die dazu dienen sollten, den Vorhof in der Versuchsanordnung befestigen zu können. Bis zum Beginn des Experimentes wurde das Organ in ein mit Tyrodelösung befülltes Becherglas überführt und mit Oxymin begast.

Um die Funktion des primären Schrittmachers nicht zu verlieren, wurde der Vorhof aber sehr zügig in die Versuchsanordnung eingespannt, da der Vorhof äußerst empfindlich auf fehlende physiologische Bedingungen reagiert hat.

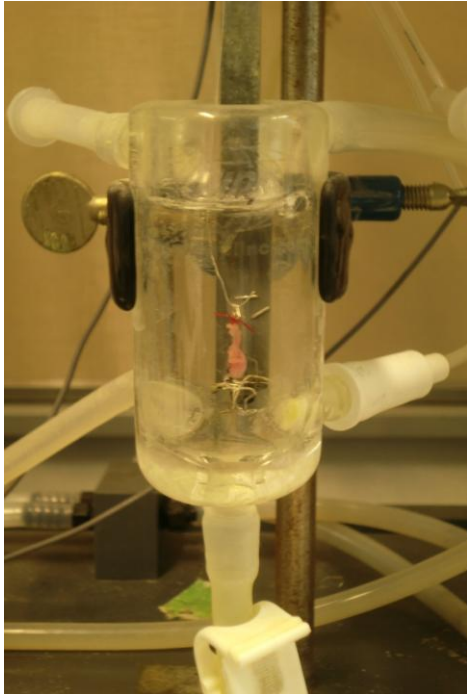


Abbildung 2.7: Atrium cordis dexter eingespannt im Organbad

2.6.3.2. Präparation des Papillarmuskels (*Musculus papillaris*)

Nach Isolierung von Vorhof und Lungenarterie konnte abschließend am Herz der Papillarmuskel isoliert werden. Um dies zu erreichen, wurde das Herz entlang des Septums bis zur Herzspitze hin aufgeschnitten, aufgeklappt und mit Präpariernadeln fixiert.

Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurden, ähnlich wie beim rechten Vorhof, mit Bindfaden und Silberdraht Häkchen befestigt und der Muskel aus der Herzwand herausgeschnitten. Dieser Vorgang wurde sowohl beim rechten, als auch beim linken Ventrikel durchgeführt.

Essentiell an dieser Stelle war die vollständige Entfernung von noch eventuell bestehenden Purkinje Fasern, da diese selbst eine Rolle in der Erregungsweiterleitung spielen und durch ihre autonome Schlagfähigkeit die Signale in der Versuchsanordnung verfälscht hätten. Nach der Isolierung wurde der Papillarmuskel wieder in die Tyrodelösung gebracht und bis zum Versuchsbeginn mit Oxymix begast.

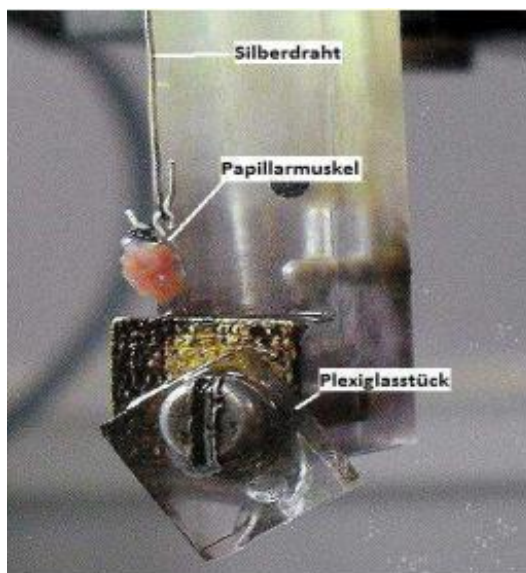


Abbildung 2.8: Präparierter Papillarmuskel

2.6.3.3. Präparation der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Nach Präparation des Vorhofes konnte die Lungenarterie isoliert werden. Isoliert wurde der so genannte Truncus pulmonalis, der aus der rechten Herzkammer hervorgeht. Nach Entfernung von überschüssigem Gewebe wurde die Arterie in ungefähr 3mm breite Ringe geschnitten und bis zum Beginn des Experimentes in Tyrodelösung überführt und mit Oxymix begast.

Auf Grund der ringförmigen Struktur der Arteria pulmonalis mussten keine Häkchen angebracht werden.

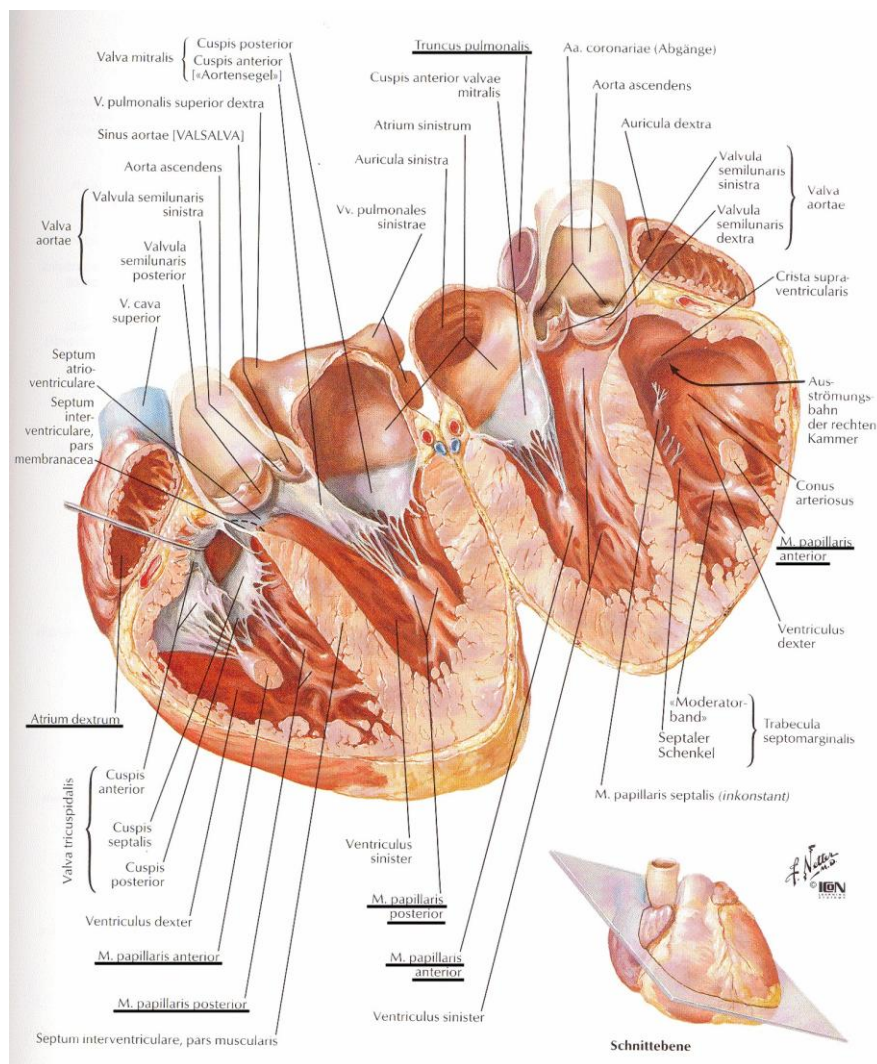


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Herzens

2.6.3.4. Präparation der Aorta (Aorta descendens)

Um die für die Versuche verwendete thorakale Aorta isolieren zu können, musste die Wirbelsäule des Versuchstieres nach vorne hin durchgedrückt werden. Nun konnte man die Aorta mit einer Pinzette fixieren und vorsichtig mit einer Schere entlang des Rückgrates abtrennen. Essentiell war es hier, die Aorta nicht zu sehr zu dehnen oder gar zu verletzen.

Anschließend konnte man die Aorta in der Petrischale am Korkboden mit Hilfe von Präpariernadeln fixieren und mittels Pinzette und Federgriffschere von überschüssigem Gewebe befreien. Die gereinigte Aorta wurde in 2mm dicke Ringe geschnitten und bis zum Versuchsbeginn in Tyrodelösung gelagert und mit Oxymin begast.

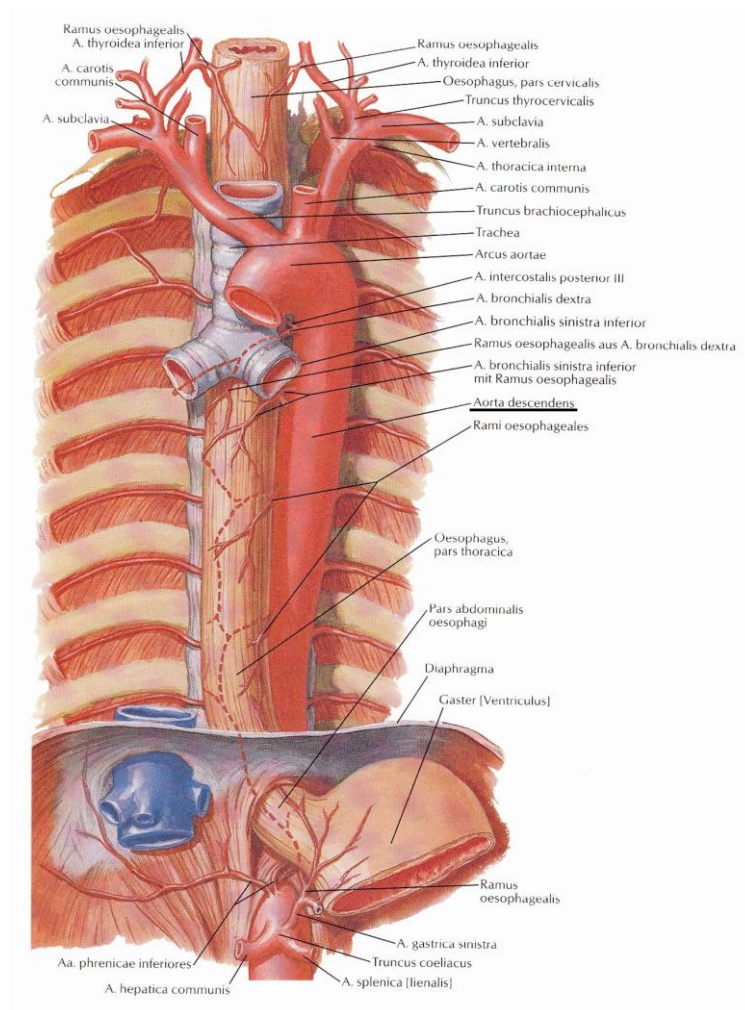


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Aortenverlaufes

2.6.3.5. Präparation des Dünndarms (Terminales Ileum)

Um das für die Versuche herangezogene terminale Ileum isolieren zu können, wurde der Darm in der Nähe des Caecums durchtrennt, unterhalb der Schnittstelle mit einem Bindfaden abgebunden und ein ungefähr 30cm langes Darmstück herausgeschnitten.

Zur Präparation wurde ein ungefähr 1cm langes Darmstück schräg abgeschnitten und in einer Petrischale mit Korkboden und Nährlösung mit Präpariernadeln an den schrägen Enden befestigt. Um eventuell noch bestehende Darminhalte zu entfernen wurde das Darmstück mit einer Pasteurpipette durchgespült. Die schrägen Enden sind deshalb essentiell, dass nach Anbringen der Silberhäkchen das Darmlumen noch in einem geöffneten Zustand vorliegen kann. Damit ist die Substanz befähigt, das Lumen durchzudringen und zu zirkulieren. Bis zum Beginn des Versuches wurden die Darmpräparate in Nährlösung gelagert und mit Oxymix begast.

2.7. Versuchsaufbau und Apparaturen

Um reproduzierbare Versuche durchführen zu können, war es unabdingbar, stets konstante, physiologische Verhältnisse zu erschaffen. Dazu zählten die Temperaturerhaltung auf Körperwärme, die durchgehende Versorgung mit Sauerstoff, ein physiologischer pH-Wert und die Versorgung mit Elektrolyten.

Die Experimente wurden an zwei verschiedenen Geräten vorgenommen. Für den Musculus papillaris wurde ausschließlich Apparatur A verwendet, für die anderen Organe Apparatur B.

Im Organbad wurden die Organe mittels eines Silberdrahtes eingespannt, welcher wiederum mit einem Kraftwandler verbunden war. Der Kraftwandler war in der Lage, über einen Amplifier, welcher mit einem Schreiber verbunden war, mechanische Veränderungen (in diesem Fall Kontraktion oder Spasmolyse) in elektrische Impulse umzuwandeln. Die Signale wurden von einem Schreiber auf Millimeterpapier in Form einer Kurve dokumentiert.



Gasversorgung



Organbad



Wasserbad



Amplifier



Schreiber

Abbildung 2.11: Versuchsaufbau

2.7.2. Apparatur A

Wie bereits in Kapitel 2.6. erläutert, wurde die Apparatur A ausschließlich für Experimente am Musculus papillaris herangezogen. Mit Hilfe dieser Apparatur konnte man etwaige Auswirkungen auf die Inotropie des Muskels messen.

Zu Beginn eines jeden Labortages wurde das Wasser im Wasserbad bis zur Markierung aufgefüllt und mittels einer Heizspirale, welche durch einen Thermostat auf 35°C aufgeheizt werden konnte, temperiert.

Das Organbad war in die obere Kunststoffplatte eingelassen, wurde von unten mit Oxymix begast und hatte ein Fassungsvermögen von 25ml Tyrodelösung. Nachdem der isolierte und präparierte Papillarmuskel wie in Abbildung 2.9 gut ersichtlich zwischen einer kleinen Plexiglasplatte und einer Platinelektrode eingeklemmt wurde und am oberen Ende mit einem Silberdraht fixiert und mittels Feintrieb vorgespannt wurde, konnte der Versuch beginnen.

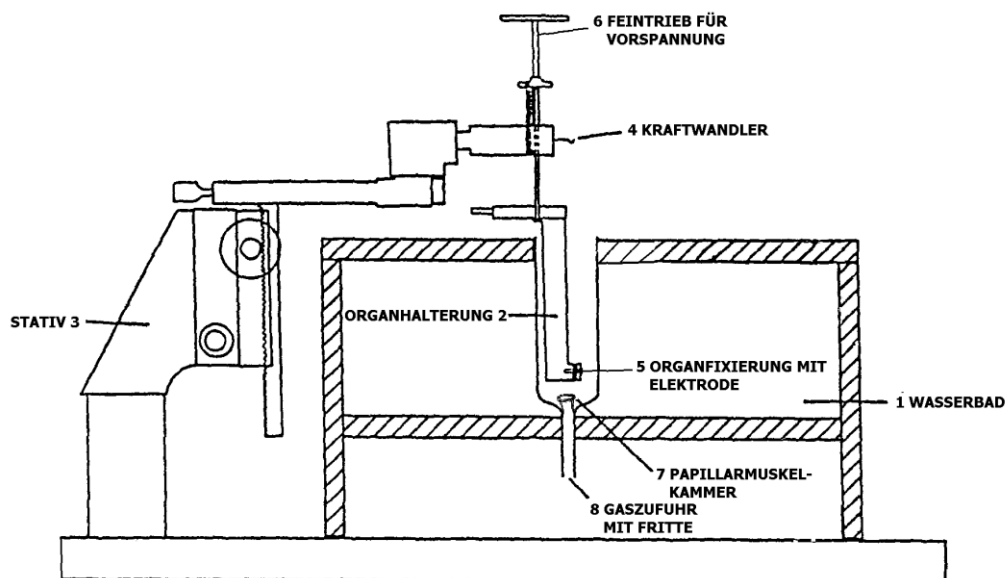


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Apparatur A

Im weiteren Verlauf führte der Silberdraht zu einem Kraftwandler, welcher mit Hilfe eines Kraftverstärkers und Schreibers die Inotropieänderung des Papillarmuskels dokumentierte.

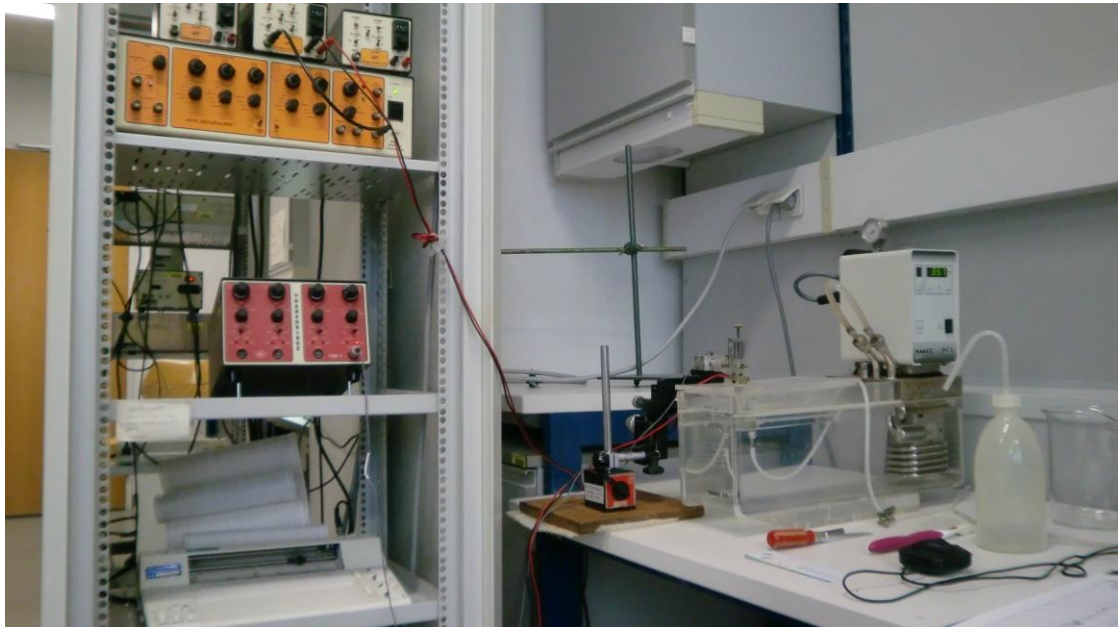


Abbildung 2.13: Originalabbildung der Versuchsapparatur A

2.7.3. Apparatur B

Mit Hilfe der Versuchsapparatur B wurden Versuche an der Aorta, dem terminaln Ileum, dem rechten Vorhof und der Arteria pulmonalis durchgeführt. Herzstück der Apparatur war ein doppelwandiger Glaszylinder, welcher als Organbad fungierte und in welchem das auf physiologischem Temperaturniveau erwärmte Wasser zirkulieren konnte. Die Fassungsvermögen der Zylinder waren entweder 8ml (hier konnten auf Grund des kleinen Volumens nur Versuche an Aorta und Lungenarterie durchgeführt werden) oder 25ml. Je nach Fassungsvermögen musste die Substanzeinwaage angepasst werden (siehe Tabelle 2.1).

Die Sauerstoffversorgung war durch eine Gaszufuhröffnung im unteren Drittel des Zylinders gesichert und die Nährlösung konnte einfach durch eine Ablauföffnung am unteren Ende des Zylinders entfernt werden.

Das obere Ende des Zylinders war offen und so konnte das Organ mittels Halterung von oben in das Organbad eingetaucht werden. Nach Vorspannung der Organe mittels Feintrieb konnten die Versuche beginnen.

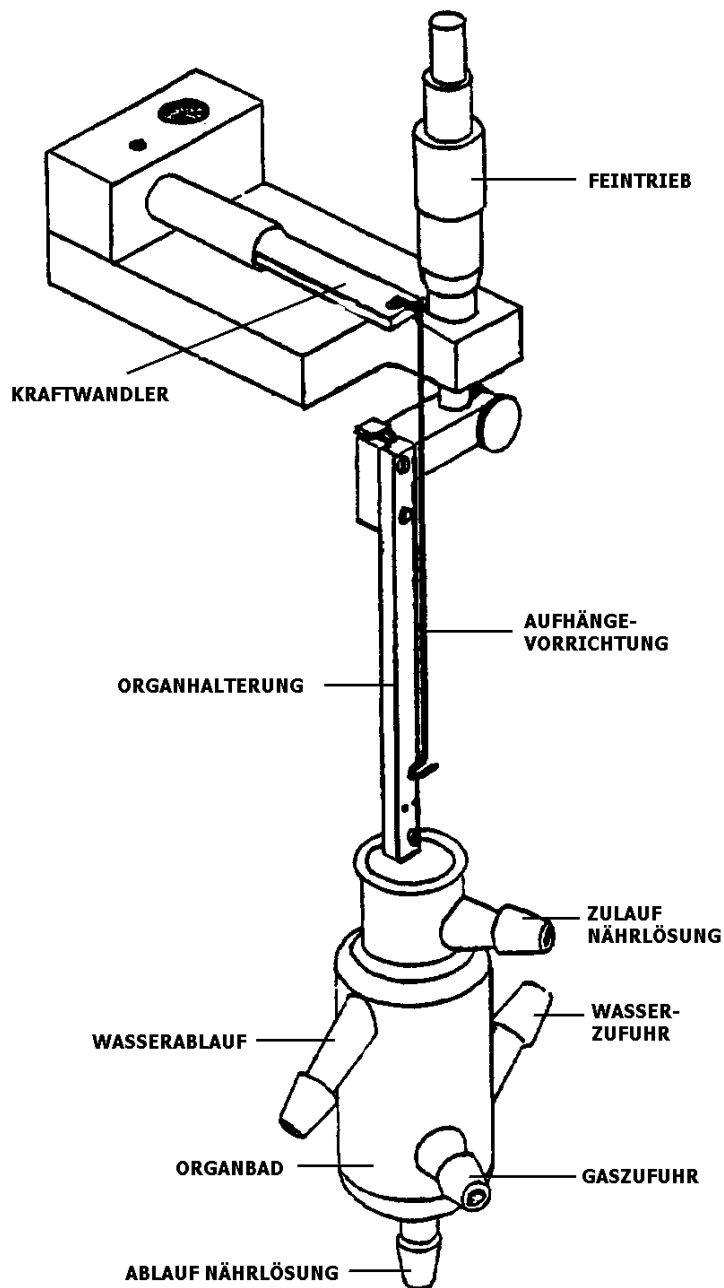


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der Apparatur B

Die Organe waren mittels Silberdraht an der unteren Seite der Organhalterung sowie einen Silberdraht, welcher mit dem Kraftwandler verbunden war, fixiert. Analog zur Apparatur A war auch hier der Kraftwandler mit einem Verstärker verbunden und selbiger mit einem Schreiber, der jegliche Veränderungen der Chronotropie beim rechten Vorhof sowie spasmolytische Effekte beim terminalen Ileum beziehungsweise vasodilatatorische Effekte bei Aorta und Arteria pulmonalis dokumentierte.

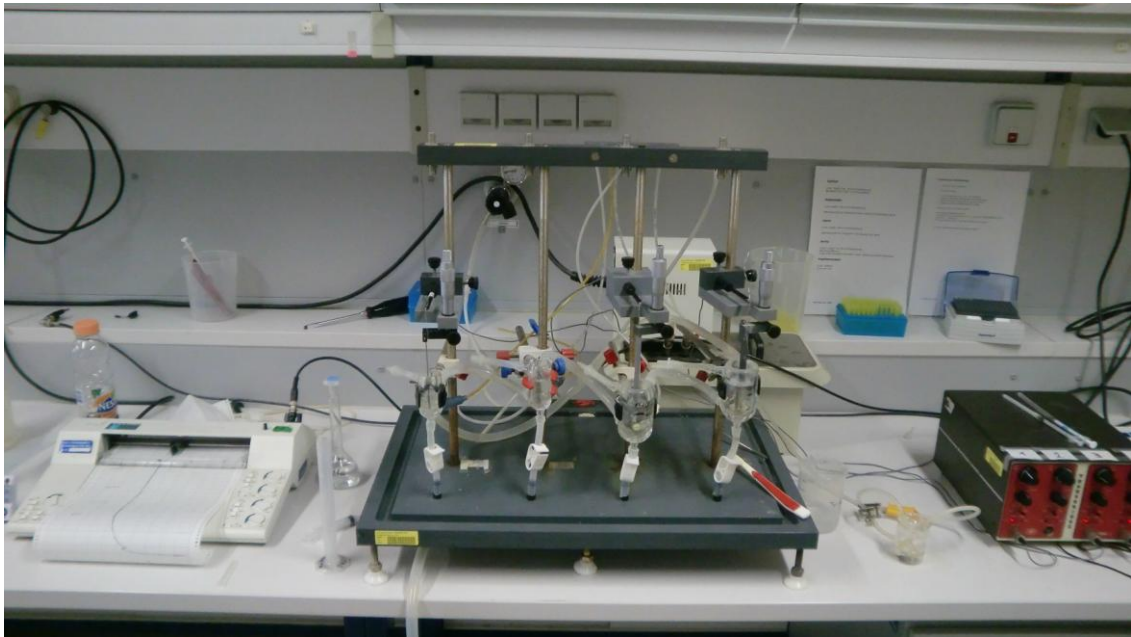


Abbildung 2.14: Originalabbildung von Apparatur inklusive Schreiber und Amplifier

2.7.4. Der Kraftwandler

Der Kraftwandler hatte eine tragende Rolle bei jeglichen Experimenten, da er die Veränderungen der Muskelkontraktionen in einen elektrischen Impuls transferieren konnte. Bei Kontraktionsänderungen veränderte sich ebenso der Stromfluss, welcher von einem Amplifier (4-Channel Transducer Amplifier, Firma WPI) intensiviert wurde. Dieser war mit einem Schreibgerät (Flatbed Recorder BD112, Firma Kipp & Zonen) verbunden, welcher die Impulse mit einem Filzschreiber auf Millimeterpapier dokumentierte.

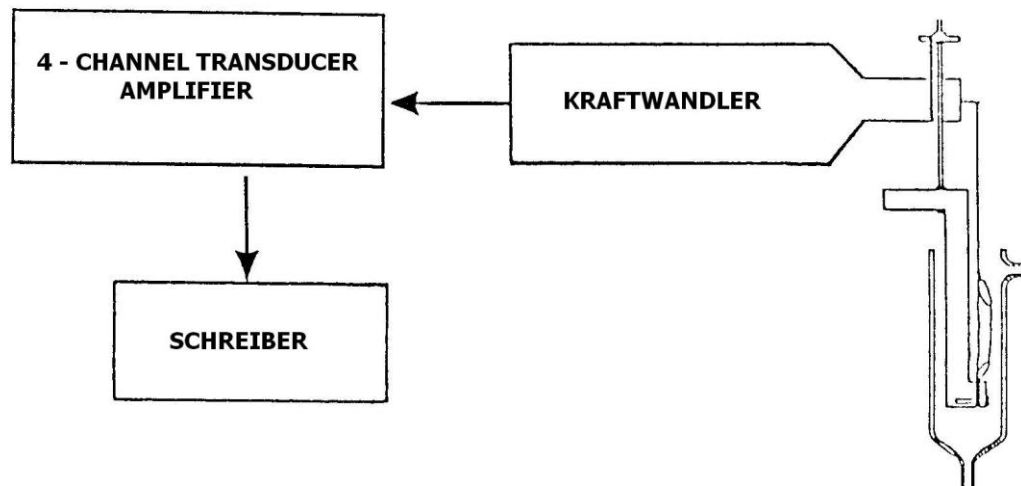


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung des Kraftwandlers

2.7.5. Die Gasversorgung

Für eine physiologische Versorgung der Organe war eine stetige Zufuhr von Sauerstoff essentiell. Diese wurde mit einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, auch als Oxymix oder Carbogen bekannt, durchgeführt. Die Schläuche, die mit einer zentralen Gasflasche verbunden waren, hatten am Einlassende des Organbades eine Fritte zur Gaszerstäubung. Diese garantierte eine homogene Verteilung des Gases und somit wurden die Organe immer ausreichend mit Oxymix versorgt.

Eine stetige Gasversorgung war essentiell zur Erhaltung der physiologischen Sauerstoffversorgung und des pH-Wertes des Körpers (7,2-7,4). Die homogene Gasverteilung war auch für eine homogene Testsubstanzverteilung in den Organen verantwortlich.

2.8. Die Versuchsdurchführung

Damit die Versuche stets unter reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden konnten und zur Minimierung von Verfälschungen und Störfaktoren im Messergebnis, war es unabdingbar, akribisch auf Sauberkeit zu achten. Es wurde mit frischen Organen gearbeitet, sodass jegliche Nachlässigkeit an Sorgfalt und „Good Laboratory Practice“ Auswirkungen auf die Messergebnisse gehabt hätte.

Um die Organe in den Bädern nicht mit eventuell auftretenden Kontaminationen in Berührung zu bringen, wurden die Organbäder vor Beginn jedes Versuches dreimal mit Aqua bidestillata und im Anschluss einmal mit Tyrodelösung durchgespült. Erst dann befüllte man die bereits temperierten Organbäder mit Nährlösung.

Am Ende jedes Versuchstages wurden die Organbäder mehrmals mit 2%iger HCl durchgespült, um eventuell auskristallisierte Rückstände der Tyrodelösung oder an den Wänden der Organbäder angehaftete Gewebsreste zu lösen. Nach der Reinigung mit Salzsäure spülte man noch mehrmals mit Aqua bidestillata nach bevor man den Arbeitsplatz verließ.

2.8.2. Versuchsablauf am Atrium cordis dexter

Nach Isolierung und Präparation des rechten Vorhofes (Kapitel 2.5.2.1.) wurde der Vorhof vorsichtig mittels der befestigten Silberhäkchen an die Versuchsanordnung eingehängt. Wichtig hierbei war es, das Organ nicht zu überdehnen oder zu verletzen, da es sonst unmöglich gewesen wäre, die Autonomie des Sinusknotens zu erhalten. Zügig wurde daraufhin das Organ in das bereits auf Körpertemperatur erwärmte und mit Oxymix begaste Organbad eingetaucht.

Daraufhin wurden der Amplifier und der Schreiber in Betrieb genommen, wobei auf eine Stromspannung von 5mV und ein Speed von 5mm/sec adjustiert wurde. Nach Einstellung des Schreibers auf den Nullpunkt des Millimeterpapiere wurde über den Feintrieb eine Vorspannung von 10,4mN eingestellt. Nun konnte man deutlich die Herzschläge des Vorhofes am Schreiber erkennen. Waren die erhaltenen Amplituden der Ausschläge

unauszählbar, konnte man gegebenenfalls die Stromspannung auf 2mV oder sogar auf 1mV hinunteradjustieren.

Nach einer 45 bis 60 minütigen Assimilierungsphase, welche von Nöten war, damit das Organ seine Schlagfrequenz einpendeln konnte, wurde mit der Kontrollmessung begonnen. Dazu senkte man den Schreiber alle 5 Minuten auf das Millimeterpapier und zeichnete die Schlagfrequenz über 12 Sekunden auf. Damit man mit den eigentlichen Versuchsaufzeichnungen beginnen konnte, war eine konstante Schlagfrequenz über 4 Messungen erforderlich.

War dieser Parameter erfüllt, konnte man die erste Konzentration der Testsubstanz vorsichtig einspritzen und analog zur Durchführung der Kontrollmessung alle 5 Minuten für jeweils 12 Sekunden die Schlagfrequenz des Vorhofes messen.

Nach jeweils 45 Minuten - oder 9 Messungen - wurde kumulativ nach Pipettierschema (Tabelle 2.2) die Substanzkonzentration solange erhöht, bis man entweder zur Maximalkonzentration von 100µmol/l gelangt ist oder der Vorhof nicht mehr in der Lage war, Schläge zu erzeugen.

2.8.3. Versuchsablauf am Musculus papillaris

Wie bereits im Kapitel 2.6.1. beschrieben, arbeitete man am Musculus papillaris stets an der Versuchsassaparatur A. Nach Isolierung und Präparierung des Organs (Kapitel 2.5.2.2.) spannte man den Muskel, wie in Abbildung 2.8 gut ersichtlich, zwischen einer kleinen Plexiglasplatte und einer Platinelektrode am unteren Ende, mit einem Silberdraht am oberen Ende des Muskels ein und tauchte ihn ins bereits temperierte und begaste Organbad ein.

Amplifier und Schreiber konnten daraufhin in Betrieb genommen werden und nach Nullstellung des Schreibers am Millimeterpapier wurde das Organ auf 3,92mN am Feintrieb vorgespannt. Bei diesem Versuch war es essentiell, die Spannung konstant zu halten, was eine regelmäßige Nachadjustierung notwendig machte. Die Stromspannung wurde auf 5mV angelegt, konnte aber bei zu geringer Schlagamplitude auf 2mV oder

gegebenenfalls auf 1mV hinunterreguliert werden und ein Speed von 5mm/sec wurde eingestellt.

Da der Papillarmuskel, im Gegensatz zum rechten Vorhof, keine autonome Schlagfähigkeit besitzt, war es während des gesamten Versuches nötig, eine Reizstimulation in Form eines elektrischen Impulses zu erzeugen. Dies geschah mit Hilfe des Reizgerätes Accupulser A310 von der Firma WPI, welcher dem Muskel alle 15 Sekunden einen Stromschlag verabreichte. Kam es bereits vor der Reizung zu Kontraktionen des Muskels, war dies ein Anzeichen dafür, dass noch Purkinje Fasern vorlagen, welche durch ihre Autonomie den Versuch störten.

Die Reizung des Papillarmuskels, welche in Form von Rechteckimpulsen mit einer Länge von 10ms^{-1} und einer Frequenz von 1Hz erzeugt wurde, wurde bis zur Reizschwelle und wiederholten Kontraktion des Musculus papillaris erhöht. Daraufhin erhöhte man die zugeführte Stromstärke um 10%, um eine konstante Schlagfrequenz zu sichern. Eine weitere Erhöhung der Reizung war nicht wünschenswert, da der Muskel unter zu hoher Stresseinwirkung seine Katecholaminspeicher entleert hätte und die Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin eine Verfälschung der Messergebnisse in Form einer Amplitudenabnahme zur Folge gehabt hätte.

Nach einer 45 minütigen Assimilierungsphase konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden, indem man alle 5 Minuten die Geschwindigkeit des Papiernachschubes auf 20mm/sec erhöhte, den Schreiber auf das Millimeterpapier aufsetzte und die Amplituden solange vermaß, bis sie konstant waren. Dies geschah im Normalfall nach 6 Kontrollmessungen.

Nach Erreichen der Amplitudenkonstanz wurde die erste Konzentration der Testlösung vorsichtig eingespritzt und analog zur Kontrollmessung alle 5 Minuten die Amplitude vermessen. Dies geschah ebenfalls bis zur Amplitudenkonstanz, welche für gewöhnlich nach 9 Messungen beziehungsweise 45 Minuten erreicht wurde.

Daraufhin wurde die Substanzkonzentration kumulativ nach Pipettierschema (Tabelle 2.2) alle 45 Minuten solange erhöht, bis die Maximalkonzentration von $100\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde oder die Amplituden zu klein waren, um vermessen zu werden.

2.8.4. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Damit die ringförmigen Präparate in die Versuchsanordnung eingespannt werden konnten, musste man das obere und das untere Silberdrähtchen L-förmig biegen und die Arterie vorsichtig einspannen, damit es nicht zu einer Überdehnung kommen konnte, welche das Präparat unbrauchbar gemacht hätte.

Nach Eintauchen des Organes in das temperierte und begaste Organbad konnte man den Amplifier und den Schreiber einschalten. Nachdem man eine Vorspannung von 5mV angelegt hat, konnte man den Schreiber am Millimeterpapier auf null stellen und am Feintrieb eine Spannung von 9,81mN einstellen.

Nun folgte eine halbstündige Anpassungsphase, nach welcher der Schreiber wieder an den Nullpunkt angepasst und auf das Millimeterpapier gedrückt wurde und mit Hilfe von einer vorher eingestellten 90mmolaren KCl Lösung (Kapitel 2.3.3.), welche nach Ablassen der Tyrodelösung zügig ins Organbad eingeführt wurde, eine maximale Kontraktion ausgelöst wurde.

Daraufhin konnte man die ansteigende Kontraktion anhand einer Kurve erkennen, welche ungefähr 45 Minuten zum Erreichen der Plateauphase benötigte. Nach Erreichen der Plateauphase konnte man die erste Konzentration der Testsubstanzlösung vorsichtig einspritzen. Analog zu dem vorigen Arbeitsschritt wartete man jeweils 45 Minuten bis zur Konstanz und pipettierte kumulativ nach Pipettierschema (Tabelle 2.2) solange Testsubstanz hinzu, bis entweder die Maximalkonzentration von 100µmol/l erreicht wurde oder an der Arteria pulmonalis keine Spannung mehr messbar war.

2.8.5. Versuchsablauf an der Aorta descendens

Der Versuchsablauf an der Aorta descendens entsprach zum Großteil dem der Arteria pulmonalis. Die einzigen Unterschiede lagen in der unterschiedlichen Vorspannung, welche bei der Aorta zuerst 10mV (entspricht 19,6mN) betrug und vor der Zugabe der KCl Lösung auf 5mV hinunteradjustiert wurde. Der Verlauf der Kurve und die Wirkstoffzugabe erfolgten analog dem Versuch an der Arteria pulmonalis

2.8.6. Versuchsablauf am terminalen Ileum

Nach Isolierung und Präparierung des terminalen Ileums (Kapitel 2.5.2.5.) wurde jener analog der Befestigung von Aorta und Arteria pulmonalis zwischen zwei Silberdrähtchen eingespannt und in das temperierte und mit Oxymix begaste Organbad eingetaucht.

Nun schaltete man Amplifier und Schreiber ein und stellte eine Vorspannung von 5mN ein. Die Assimilation des Darms dauerte ungefähr eine halbe Stunde und nach erneuten Nullstellen mittels Feintrieb, welches durch etwaige Darmperistaltik notwendig war, konnte man den Schreiber absenken, die Tyrodelösung ablassen und zügig durch eine vorher hergestellte 60mmolare KCl Lösung (Kapitel 2.3.3.) ersetzen.

Die ausgelöste Vorkontraktion konnte man gut am Schreiber erkennen. Charakteristisch am Kurvenverlauf der Darmpräparate war ein rasches Erreichen der Maximalkontraktion, welche sich unmittelbar bei der Hälfte der ausgelösten Maximalkontraktion einpendelte und nach ungefähr einer Stunde eine Plateauphase erreichte.

Nach Erreichen der Plateauphase konnte mit dem Einspritzen der ersten Konzentration der Testsubstanzlösung begonnen werden. Dieser Vorgang wurde alle 45 Minuten nach kumulativen Pipettierschema (Tabelle 2.2) solange wiederholt, bis die maximale Konzentration von 100 μ mol/l erreicht wurde oder am terminalen Ileum keine Spannung mehr messbar war.

2.9. Wirkung der Substanz MAH61 HCl in Kombination mit einem Antagonisten am terminalen Ileum

2.9.2. Versuchsablauf mit Nitro-L-Arginin

Der Versuchsablauf des Wirkmechanismus am Darm verlief anfangs analog zum Versuchsablauf am terminalen Ileum. (Kapitel 2.7.5.) Jedoch spritzte man nach Zugabe der 60mmolaren Kaliumchloridlösung und Erreichen der Plateauphase ins Organbad nicht die Testsubstanzlösung, sondern eine 100µM Lösung vom eNOS Antagonisten Nitro-L-Arginin ein.

Nach Abwarten einer Zeitspanne von 45 Minuten konnte man eine 50µM Lösung von MAH61 HCl einspritzen und nach weiteren 45 Minuten war der Versuch zu Ende.

2.10. Auswertung der Daten und Statistik

2.10.2. Atrium cordis dexter

Die Experimente am rechten Vorhof dienten der Untersuchung, inwiefern die Testsubstanz MAH61 HCl Einfluss auf die Chronotropie des Herzens hat. Alle 5 Minuten wurde mit einer Geschwindigkeit von 5mm/sec eine Messung von 6cm durchgeführt, welche eine Zeitspanne von 12 Sekunden entsprach. Die jeweiligen Schläge innerhalb dieser 6cm wurden addiert und mit dem Faktor 5 multipliziert, um eine Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten. Der letzte, konstante Kontrollwert wurde als Referenzwert (100%) gesetzt. Danach konnte man mit dem Einspritzen der Testsubstanzlösung nach kumulativem Schema beginnen. Die Zugabe der Testsubstanz konnte entweder in einem positiv chronotropen, einem negativ chronotropen oder einem neutralen Effekt resultieren.

2.10.3. Musculus papillaris

Die Versuche am Musculus papillaris dienten der Untersuchung der Inotropie. Um die

Daten auswerten zu können, musste man die Amplituden der Schläge mit einem Lineal vermessen und abhängig von der Stromstärke bei 5mV mit dem Faktor 0,98 beziehungsweise bei 2mV oder 1mV mit dem Faktor 0,2 multiplizieren. Nach Erreichen eines konstanten Zustandes wurde der letzte Kontrollwert als Referenzwert gesetzt und man konnte eine immer höhere Konzentration der Testsubstanzlösung beimengen. Die Zugabe der Testsubstanz konnte entweder in einem positiv inotropen, einem negativ inotropen oder einem neutralen Effekt resultieren.

2.10.4. Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

Die Versuchsreihen an der Aorta descendens und der Arteria pulmonalis dienten der Überprüfung einer möglichen vasodilatativen Wirkung der Testsubstanz, die Versuchsreihen am terminalen Ileum zur möglichen spasmolytischen Wirkung. Bei allen 3 Versuchen wurde durch die Zugabe einer KCl Lösung eine Kontraktionskurve erstellt.

Nach Erreichen der Plateauphase setzte man die Differenz jenes Punktes zur Nulllinie als Referenzwert. Unmittelbar vor jeder Substanzeinspritzung wurde der Punkt der Kurve markiert und später die Strecke jenes Punktes zur Nulllinie vermessen. Diese abgemessenen Strecken mussten mit einem Eichfaktor (bei 10mV mit dem Faktor 1,2, bei 5mV mit dem Faktor 0,98 und bei 2mV mit dem Faktor 0,2) multipliziert werden.

Die prozentuelle Vasodilatation konnte hiermit berechnet werden, welche in einer Dosis-Wirkkurve den EC_{50} Wert ersichtlich werden konnte.

2.10.5. Statistik

Für eine statistische Auswertung wurden der Mittelwert ($\bar{x}$), der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und mittels einer Dosis-Wirkkurve der EC_{50} Wert (Konzentration, bei der die Substanz ihre halbmaximale Wirkung ausübt) mit Hilfe des Programmes „Sigma Plot 9.0“ eruiert.

Außerdem wurde ein Signifikanztest („Student-t-Test“) durchgeführt, bei welchem die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($P < 0,05$) als signifikant und unter 1% ($P < 0,01$) als hochsignifikant bewertet wurden.

3. Ergebnisse

3.2. Ergebnisse der Testsubstanz MAH61 HCl

3.2.2. Ergebnisse am Atrium cordis dexter

Am Atrium dexter cordis wurde anhand von 4 Versuchen der chronotrope Einfluss der Testsubstanz MAH61 HCl ermittelt. Die Durchführung der Versuche wurde bereits im Kapitel 2.7.1. erörtert. Der Mittelwert wurde aus den am Papier abgezählten Schlägen errechnet und ein Kontrollwert bestimmt.

Wie im Folgenden ersichtlich, hatte die Testsubstanz eine negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof.

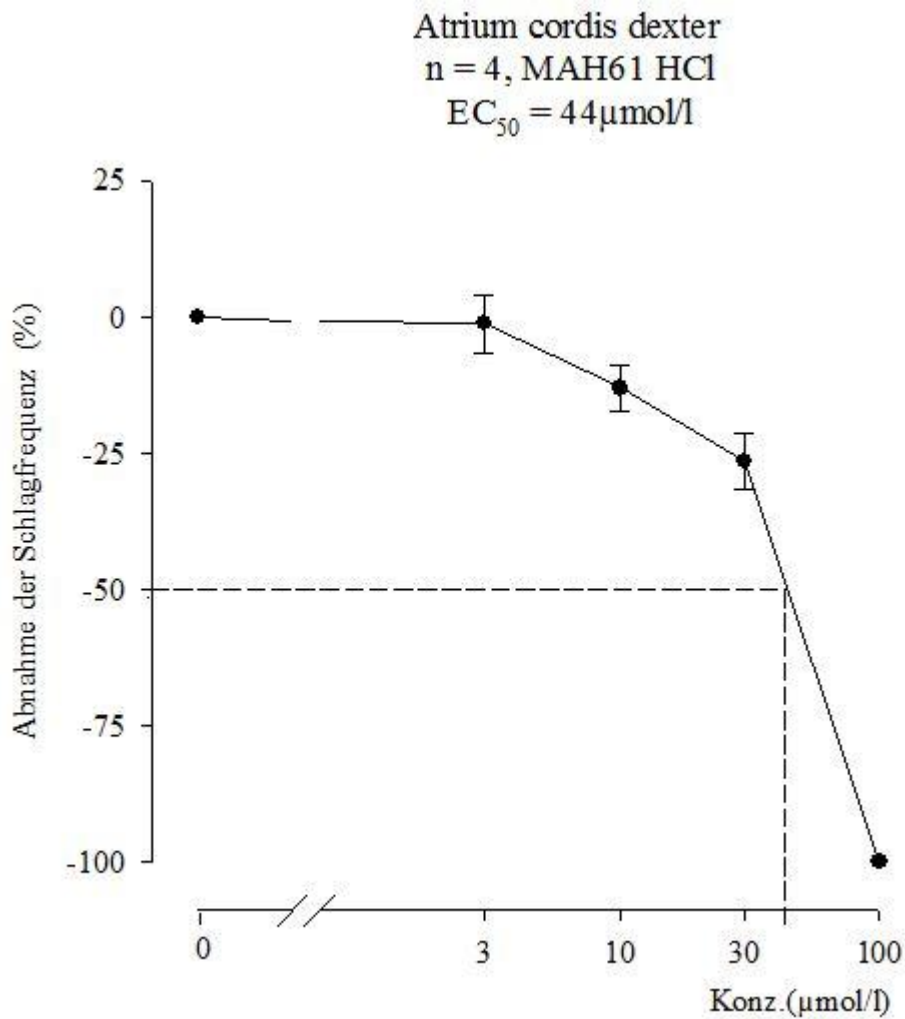
Tabelle 3.1: Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl auf das Atrium cordis dexter

MAH 61 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	212,8 $\pm$ 12,0	0 $\pm$ 0	4	-
3	208,8 $\pm$ 8,3	-1,1 $\pm$ 5,2	4	n.s.
10	186,3 $\pm$ 18,4	-12,9 $\pm$ 4,1	4	0,05
30	157,5 $\pm$ 17,4	-26,3 $\pm$ 5,2	4	0,05
100	0 $\pm$ 0	-100 $\pm$ 0	4	0,01

Legende zu Tabelle 3.1:

In der Tabelle scheinen die in 4 Versuchen errechneten arithmetischen Mittelwerte (f) des Schrittmachers in Anzahl der Schläge (x/min) und in Prozent (%), jeweils mit Standardfehler (SEM) auf. Außerdem wird die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angezeigt.

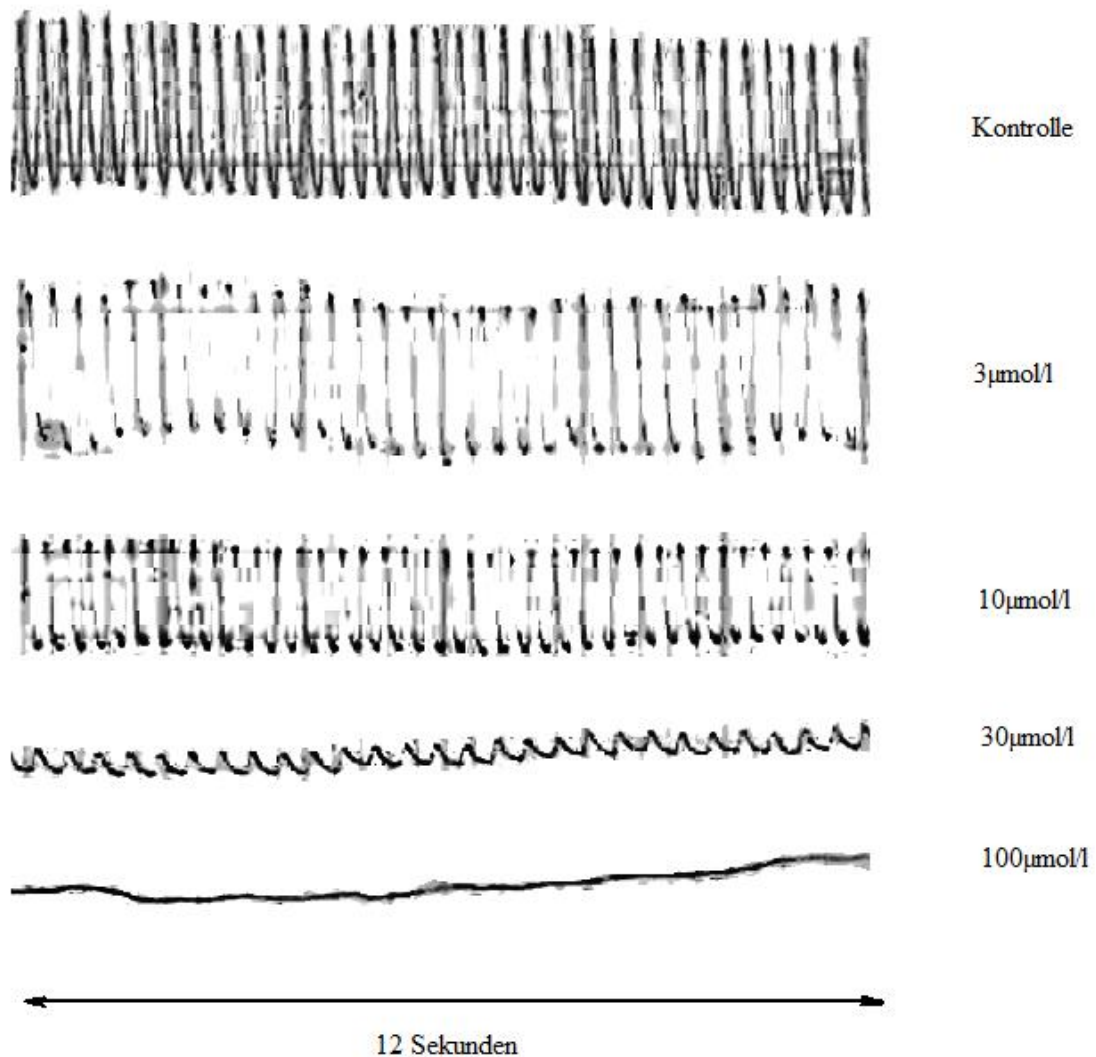
Abbildung 3.1: Konzentrations – Wirkungskurve von MAH61 HCl am rechten Vorhof



Legende zur Abbildung 3.1:

Anhand der Konzentrations – Wirkungskurve sieht man deutlich die negativ chronotrope Wirkung von MAH61 HCl bei höheren Substanzkonzentrationen. Auf der x-Achse sieht man die Konzentration in µmol/l, auf der y-Achse ist die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz pro Minute erkennbar. In der Graphik ist abzulesen, dass der EC₅₀ – Wert von MAH61 HCl am Atrium cordis dexter bei 44 µmol/l beträgt.

Abbildung 3.2: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH61 HCl am rechten Vorhof



Legende zur Abbildung 3.2:

Die Originalabbildung zeigt die Abnahme der Schlagfrequenz. Die kumulativ steigenden Substanzkonzentrationen wurden in einem Intervall von jeweils 45 Minuten zugefügt und der Schreiberverlauf 12 Sekunden lang dokumentiert.

3.2.3. Ergebnisse am Musculus papillaris

Am Musculus papillaris wurde anhand von 4 Versuchen der inotrope Einfluss der Testsubstanz MAH61 HCl. Die Durchführung der Versuche wurde bereits im Kapitel 2.7.2. erörtert. Der Mittelwert der Schlagamplituden wurde vermessen und als Kontrollwert gesetzt.

Wie im Folgenden ersichtlich hatte die Testsubstanz schon bei niedrigen Konzentrationsspiegeln eine negative inotrope Wirkung auf den Musculus papillaris.

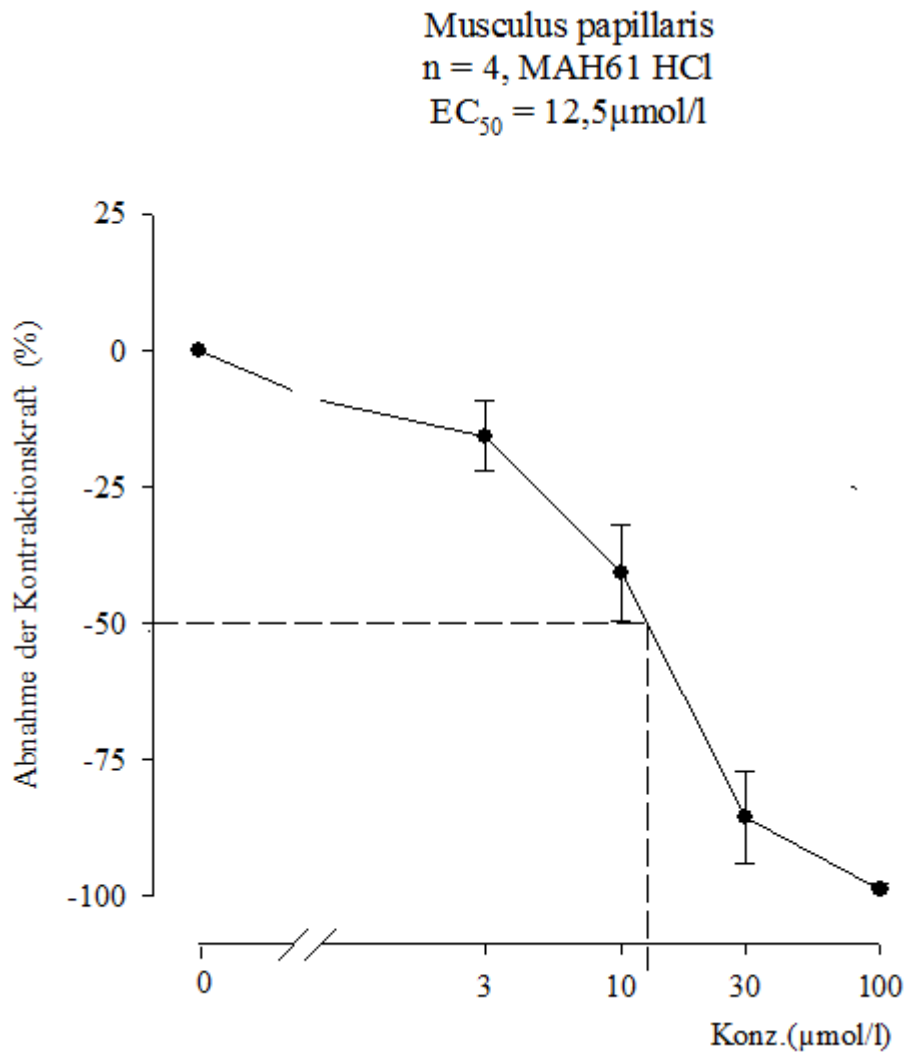
Tabelle 3.2: Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl auf den Musculus papillaris

MAH61 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (mN)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,75 $\pm$ 0,38	0 $\pm$ 0	4	-
3	1,52 $\pm$ 0,37	-15,6 $\pm$ 6,5	4	n.s.
10	1,0 $\pm$ 0,22	-40,7 $\pm$ 8,8	4	0,01
30	0,18 $\pm$ 0,11	-85,5 $\pm$ 8,4	4	0,01
100	0,02 $\pm$ 0,02	-98,8 $\pm$ 1,2	4	0,01

Legende zur Tabelle 3.2:

In der abgebildeten Tabelle steht f für die Kontraktionskraft des Papillarmuskels in mN. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist sowohl in mN, als auch in Prozent angegeben. Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit in P ersichtlich.

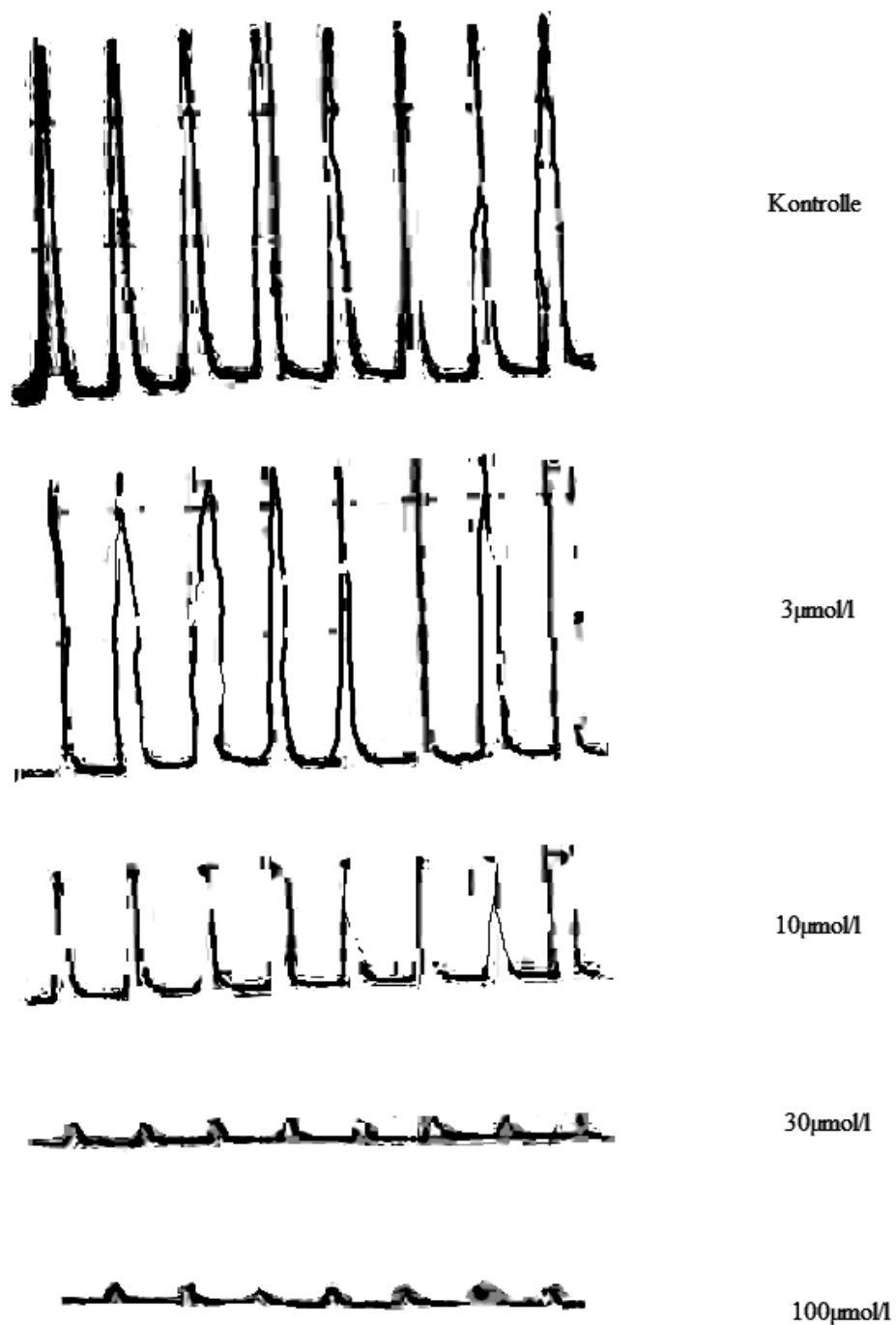
Abbildung 3.3: Konzentrations – Wirkungskurve von MAH61 HCl am Papillarmuskel



Legende zur Abbildung 3.3:

Anhand der Konzentrations – Wirkungskurve kann man gut die negativ inotrope Wirkung von MAH61 HCl am Musculus papillaris schon in geringen Konzentrationen erkennen. Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ abgebildet, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Gut zu sehen ist der EC_{50} – Wert von MAH61 HCl am Papillarmuskel bei $12,5 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 3.4: Originabbildung der Wirkung von MAH61 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zur Abbildung 3.4:

Die Originalabbildung der Wirkung von MAH61 HCl zeigt deutlich die negativ inotropen Eigenschaften der Substanz schon bei 10µmol/l

3.2.4. Ergebnisse an der Arteria pulmonalis

An der Arteria pulmonalis wurde anhand von 4 Versuchen eine mögliche vasodilatative Wirkung der Testsubstanz getestet. Die Durchführung der Versuche wurde bereits im Kapitel 2.7.3 erörtert.

Wie im Folgenden ersichtlich hatte die Testsubstanz nur eine geringe gefäßerweiternde Wirkung und der EC_{50} – Wert konnte nicht bestimmt werden.

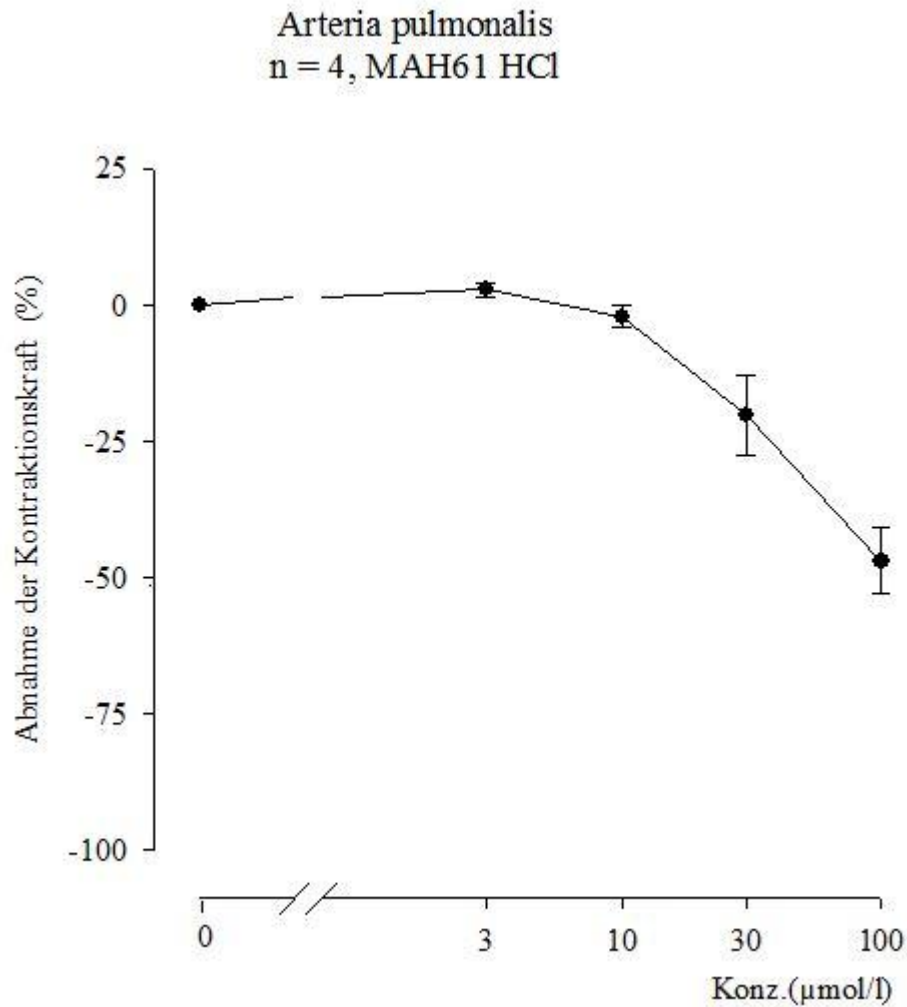
Tabelle 3.3: Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl auf die Arteria pulmonalis

MAH61 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (mN)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$12,3 \pm 1,4$	0 ± 0	4	-
3	$12,6 \pm 1,4$	$2,9 \pm 1,2$	4	n.s.
10	$12,1 \pm 1,6$	$-2,0 \pm 2,0$	4	n.s.
30	$10,1 \pm 2,1$	$-20,1 \pm 7,4$	4	0,05
100	$6,7 \pm 1,5$	$-46,8 \pm 6,2$	4	0,05

Legende zur Tabelle 3.3:

In der abgebildeten Tabelle steht f für die Kontraktionskraft der Pulmonararterie in mN. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist sowohl in mN, als auch in Prozent angegeben. Außerdem scheint die Irrtumswahrscheinlichkeit in P auf.

Abbildung 3.5: Konzentrations – Wirkkurve von MAH61 HCl auf die Pulmonararterie

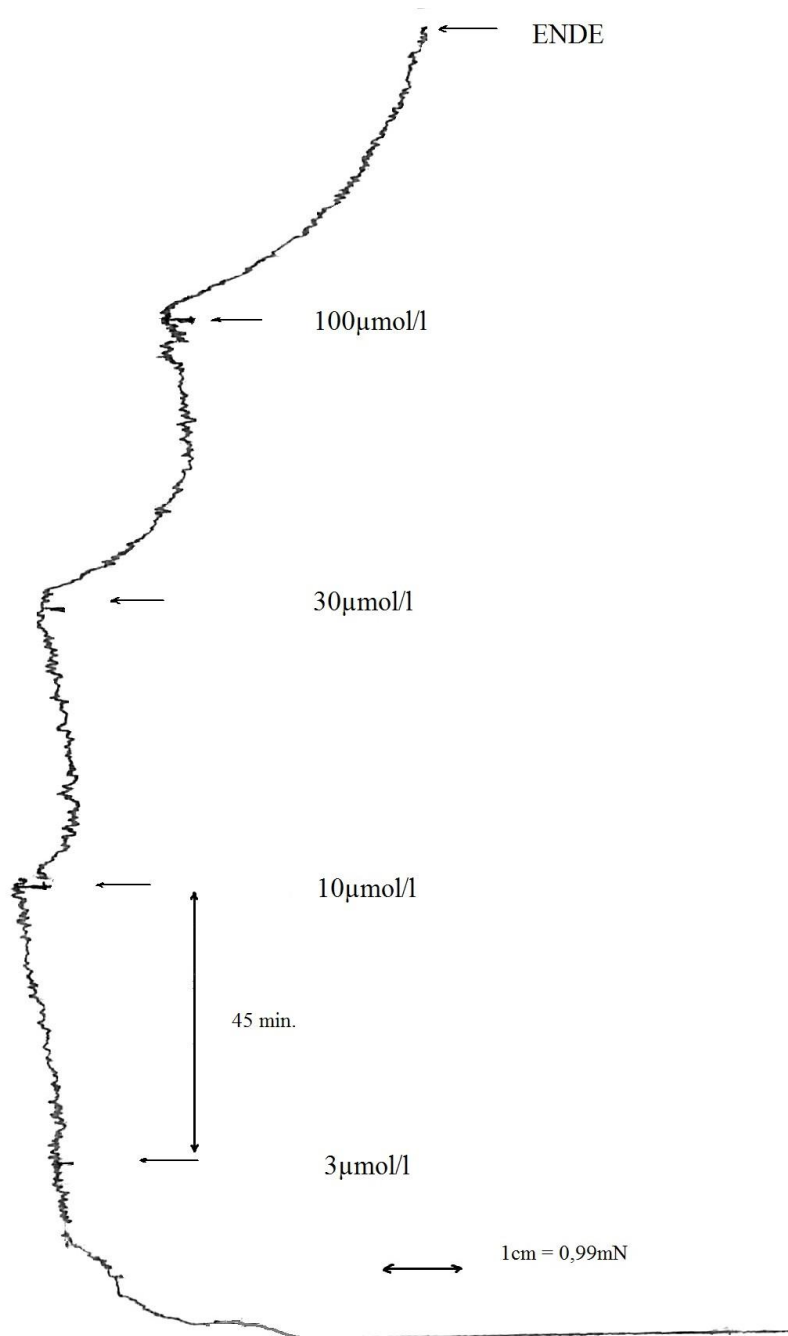


Legende zur Abbildung 3.5:

Anhand der Konzentrations – Wirkkurve kann man gut erkennen, dass MAH61 HCl nur einen geringen vasodilatativen Effekt auf die Arteria pulmonalis ausübt. Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration in µmol/l angegeben, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Da MAH61 HCl nur eine geringe Wirkung innehält, konnte kein EC₅₀ – Wert bestimmt werden.

Abbildung 3.6: Originalaufzeichnung des Versuches von MAH61 HCl an der Pulmonararterie



Legende zur Abbildung 3.6:

In Abbildung 3.6 ist die Abnahme der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis abgebildet. Die Pfeile symbolisieren die Substanzzugabe im Abstand von je 45 Minuten.

3.2.5. Ergebnisse an der Aorta descendens

Analog zu den Versuchen an der Arteria pulmonalis wurde an der Aorta descendens anhand von 5 Versuchen eine etwaige gefäßerweiternde Wirkung getestet. Die Durchführung der Versuche wurde bereits im Kapitel 2.7.4. besprochen.

Wie im Folgenden ersichtlich, hatte MAH61 nur eine schwach ausgeprägte vasodilatative Wirkung an der Aorta. Der EC_{50} – Wert konnte nicht bestimmt werden.

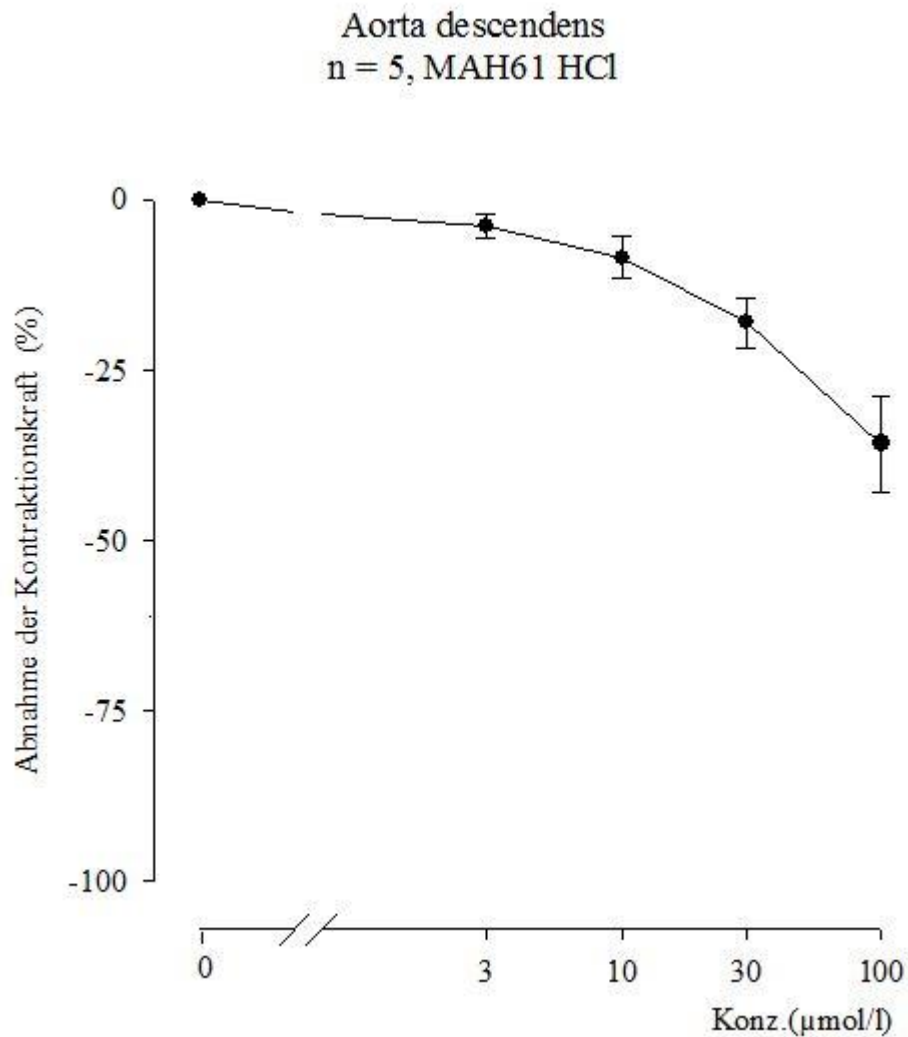
Tabelle 3.4: Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl auf die Aorta descendens

MAH61 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (mN)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,4 \pm 1,0$	0 ± 0	5	-
3	$8,1 \pm 1,0$	$-3,3 \pm 1,7$	5	n.s.
10	$7,7 \pm 1,0$	$-8,4 \pm 3,0$	5	n.s.
30	$6,8 \pm 0,8$	$-18,0 \pm 3,6$	5	0,05
100	$5,2 \pm 0,5$	$-35,7 \pm 7,1$	5	0,05

Legende zur Tabelle 3.4:

In der abgebildeten Tabelle steht f für die Kontraktionskraft der Aorta descendens in mN. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist sowohl in mN, als auch in Prozent angegeben. Außerdem scheint ist die Irrtumswahrscheinlichkeit in P zu erkennen.

Abbildung 3.7: Konzentrations – Wirkkurve von MAH61 HCl auf die Aorta

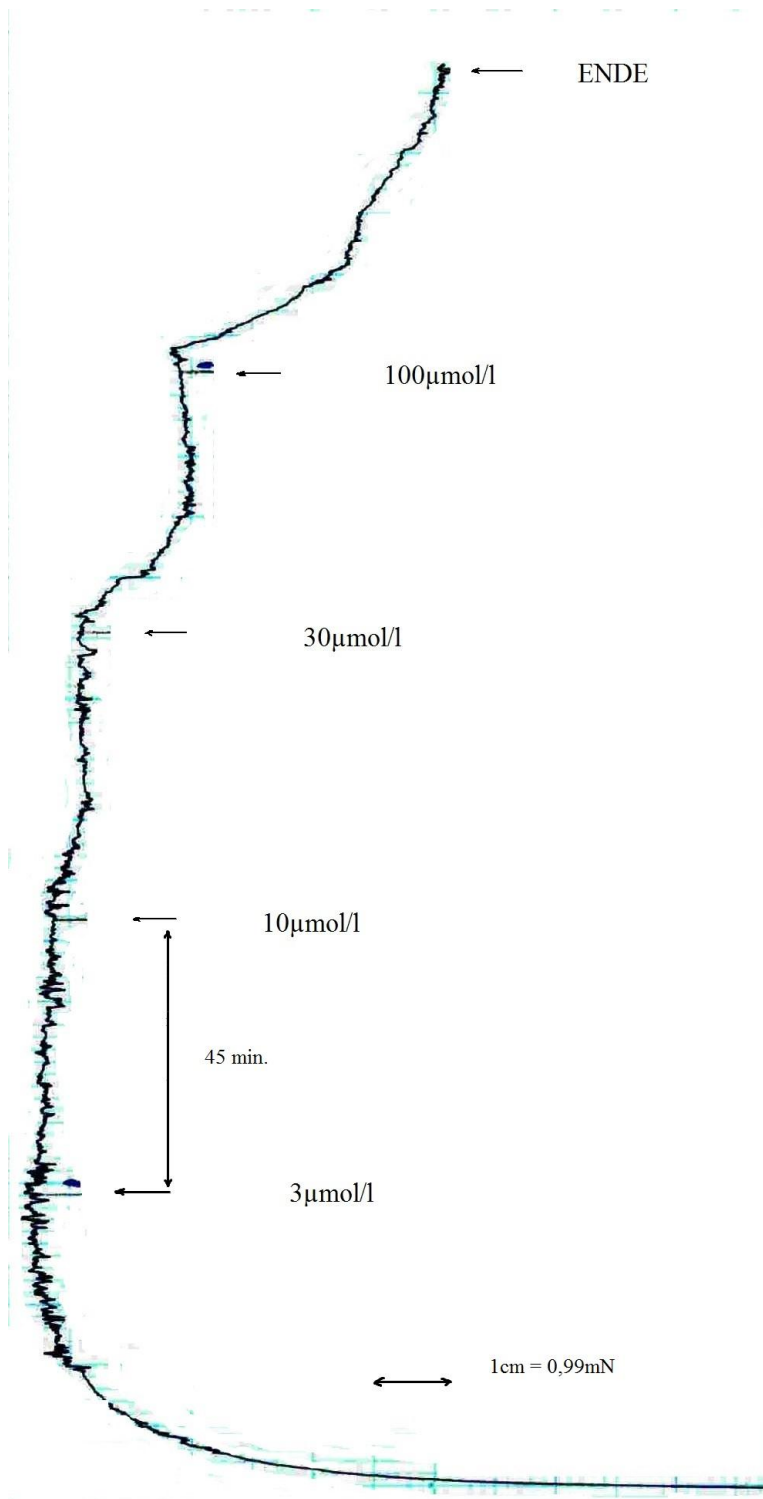


Legende zur Abbildung 3.7:

Wie in Abbildung 3.7 gut ersichtlich, hat MAH61 HCl nur eine minimal ausgeprägte vasodilatative Wirkung auf die Aorta descendens. Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Auf Grund der minimal gefäßerweiternden Wirkung der Testsubstanz konnte kein EC_{50} – Wert bestimmt werden.

Abbildung 3.8: Originalaufzeichnung des Versuches von MAH61 HCl an der Aorta



Legende zur Abbildung 3.8:

In Abbildung 3.6 ist die Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta descendens abgebildet. Die Pfeile symbolisieren die Substanzzugabe im Abstand von je 45 Minuten.

3.2.6. Ergebnisse am terminalen Ileum

Am terminalen Ileum wurde mittels 4 Versuchen eine mögliche spasmolytische Wirkung der Testsubstanz überprüft. Die Durchführung der Versuche wurde bereits im Kapitel 2.7.5 erklärt.

Wie im Folgenden ersichtlich hatte die Testsubstanz schon ab einer Konzentration von 10µmol/l eine spasmolytische Aktivität auf das terminale Ileum

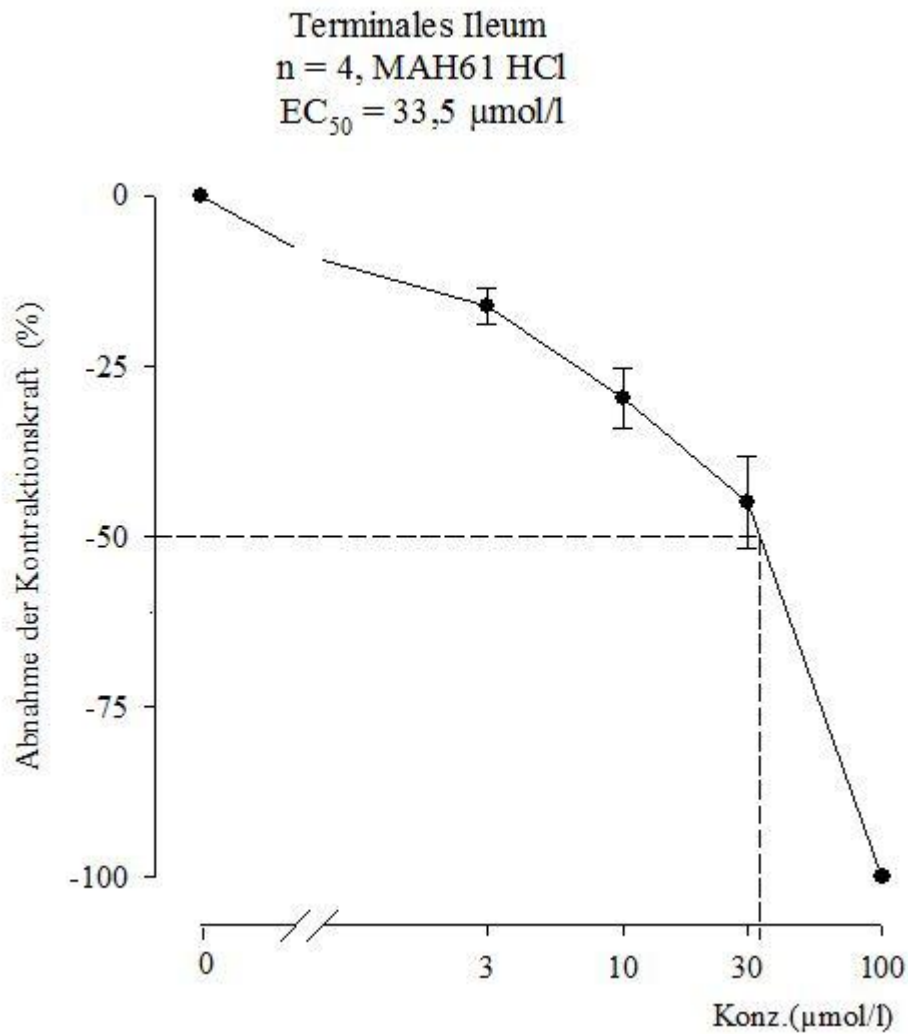
Tabelle 3.5: Wirkung der Testsubstanz MAH61 HCl auf das terminale Ileum

MAH61 HCl (µmol/l)	f ± SEM (mN)	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	8,7 ± 2,6	0 ± 0	4	-
3	7,4 ± 2,3	-16,1 ± 2,8	4	0,05
10	6,4 ± 2,2	-29,6 ± 4,5	4	0,05
30	5,2 ± 2,2	-44,9 ± 6,8	4	0,01
100	0 ± 0	-100 ± 0	4	0,01

Legende zur Tabelle 3.5:

In der abgebildeten Tabelle steht f für die Kontraktionskraft des terminalen Ileums in mN. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist sowohl in mN, als auch in Prozent angegeben. Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit in P abgebildet.

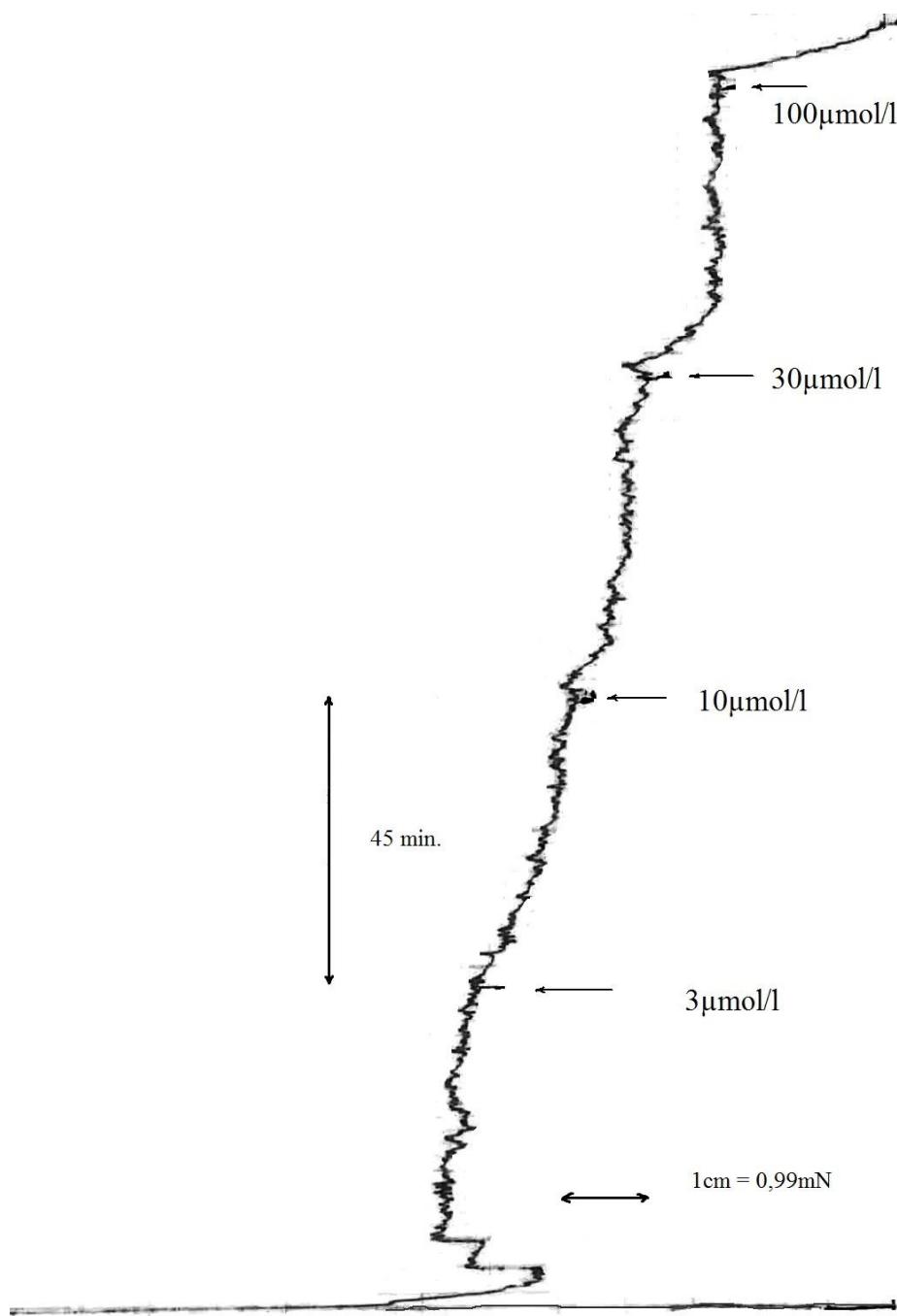
Abbildung 3.9: Konzentrations – Wirkkurve von MAH61 HCl auf den Darm



Legende zur Abbildung 3.9:

Anhand der Konzentrations – Wirkungskurve kann man gut die spasmolytische Aktivität von MAH61 HCl am terminalen Ileum schon bei Substanzkonzentrationen ab $10 \mu\text{mol/l}$ erkennen. Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ abgebildet, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Der EC_{50} – Wert von MAH61 HCl am terminalen Ileum liegt bei $33,5 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 3.10: Originalaufzeichnung des Versuches von MAH61 HCl am Darm



Legende zur Abbildung 3.10:

In der Originalaufzeichnung kann man deutlich die spasmolytische Wirkung von MAH61 HCl ab einer Substanzkonzentration von 30 µmol/l erkennen.

3.3. Ergebnisse zur Bestimmung des Wirkmechanismusses

Um den möglichen Wirkmechanismus von MAH61 HCl analysieren zu können, wurde mit 100µM der Substanz Nitro-L-Arginin, welche einen eNOS Antagonisten darstellt, gearbeitet. Die Versuche wurden am terminalen Ileum durchgeführt, da dieser sehr gut auf die Testsubstanz angesprochen hatte.

Die Ermittlung des Wirkmechanismusses wurde im Anschluss an die einzelnen Experimente der jeweiligen Organe durchgeführt und unterschied sich nur marginal von den anderen Experimenten an der glatten Muskulatur. Nach maximaler Erregung des Organes mit KCl und 45 minütiger Anpassungsphase wurden die 100µM von Nitro-L-Arginin eingespritzt um die endotheliale NO-Synthase zu antagonisieren. Nach weiteren 45 Minuten wurden 50µM von MAH61 HCl eingespritzt, um zu sehen, ob die spasmolytische Wirkung weiterhin zunimmt. In jenem Falle, wäre die eNOS nicht für die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz verantwortlich gewesen.

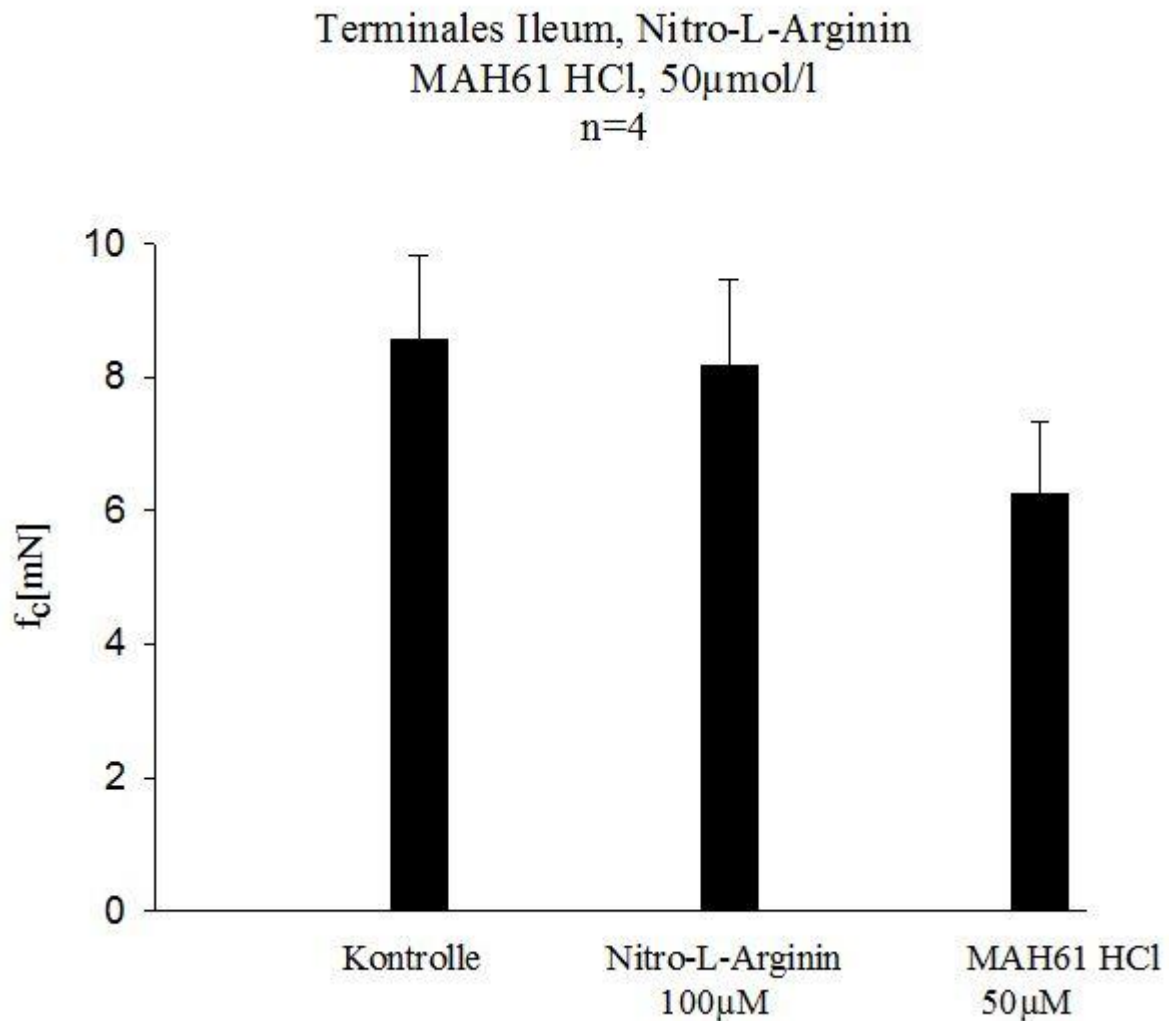
Tabelle 3.6: Ergebnisse der Bestimmung des Wirkmechanismusses am Darm

Konzentration (µmol/l)	f ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	8,6 ± 1,3	4	-
100µmol/l Nitro-L-Arginin	8,2 ± 1,3	4	-
+ 50µmol/l MAH61 HCl	6,3 ± 1,1	4	n.s.

Legende zur Tabelle 3.6:

In der Tabelle steht f für die Kontraktionskraft des Darms in mN. Der Standardfehler (SEM) ist in mN angegeben. Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit in P angegeben.

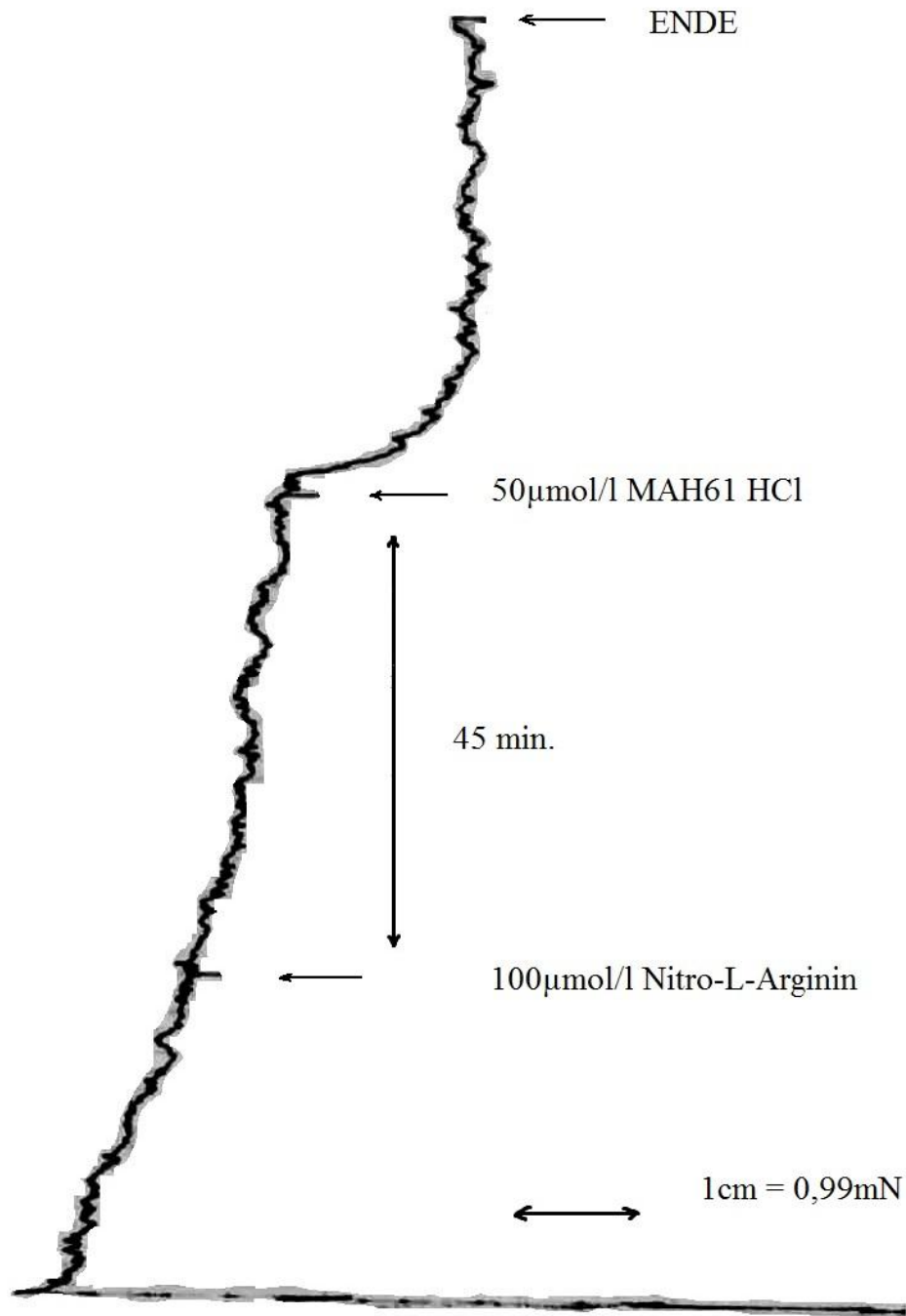
Abbildung 3.11: Balkendiagramm zur Darstellung der Versuche von MAH61 HCl und Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum



Legende zur Abbildung 3.11:

In diesem Balkendiagramm wird die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz MAH61 HCl am terminalen Ileum nach vorheriger Zugabe einer 100 μ M Nitro-L-Arginin Lösung dargestellt. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen der Substanzen in μ mol/l abgebildet, auf der y-Achse die Kontraktionskraft der Darmpräparate in mN.

Abbildung 3.12: Originalaufzeichnung der Untersuchung des Wirkmechanismus



Legende zur Abbildung 3.12:

In der Originalaufzeichnung ist deutlich zu erkennen, dass die spasmolytische Wirkung trotz Blockade der eNOS durch Nitro-L-Arginin weiterhin steigt. Damit war ersichtlich, dass die eNOS nicht oder nur zu einem kleinen Teil an der spasmolytischen Wirkung von MAH61 HCl beteiligt ist.

4. Diskussion

Im Verlauf dieser Diplomarbeit wurde anhand von 5 Organen versucht, ein pharmakologisches Profil für die neu synthetisierte Testsubstanz MAH61 HCl zu erstellen.

Die etwaige Wirkung auf die quergestreifte Herzmuskulatur wurde anhand von Präparaten von Atrium cordis dexter und Musculus papillaris erforscht. Der rechte Vorhof diente der Überprüfung, ob ein chronotropiebeeinflussendes Potential vorherrscht, der Papillarmuskel diente der Erforschung eines inotropiebeeinflussenden Potentials.

Die Untersuchungen zur Wirkung an glattmuskulären Organen wurden an Präparaten von Arteria pulmonalis, Aorta descendens und terminalen Ileum unternommen. Anhand der Aorta- und Pulmonararterienpräparate konnte man das vasodilatative Potential erforschen, anhand der Darmpräparate das spasmolytische.

In diesem Kapitel wird näher auf die im Kapitel 3 erlangten Ergebnisse eingegangen und die Ergebnisse der quergestreiften Muskulatur denen der glattmuskulären Organe verglichen.

4.2. Versuchsreihen an der quergestreiften Herzmuskulatur

Die Versuchsreihen zur Untersuchung einer etwaigen chronotropen- bzw. inotropen Auswirkung der Substanz MAH61 HCl wurde mit Hilfe von Präparaten vom Papillarmuskel bzw. vom rechten Vorhof erörtert.

Tabelle 4.1: Wirkung von MAH61 HCl auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Organpräparat	MAH 61 HCl f ± SEM (%) bei Endkonzentration	EC₅₀ MAH61 HCl (µmol/l)
Atrium cordis dexter	-100 ± 0	44
Musculus papillaris	-98,8 ± 1,2	12,5

Legende zur Tabelle 4.1:

Anhand der Tabelle 4.1 kann man sehr gut erkennen, dass die Testsubstanz MAH 61 HCl eine starke Wirkung sowohl auf den Papillarmuskel, als auch auf den rechten Vorhof ausübt. Bei der Endkonzentration von 100µmol/l waren beide Organe nahezu vollständig entspannt.

Außerdem kann man in der Tabelle sehr leicht ablesen, dass der EC₅₀ – Wert beim Musculus papillaris schon bei einem Drittel der Substanzkonzentration im Vergleich zum Atrium cordis dexter erreicht wurde.

Somit wirkt die Substanz MAH61 HCl deutlich stärker auf den Papillarmuskel als auf den rechten Vorhof. Leider ist schon ab diesem Zeitpunkt zu erkennen, dass die Testsubstanz keine Organselektivität aufweist, was sie für einen klinischen bzw. therapeutischen Einsatz obsolet machen wird.

4.3. Versuchsreihen an glattemuskulären Organen

Zur Untersuchung des Einflusses auf glattemuskuläre Organe wurden Präparate von Arteria pulmonalis und Aorta descendens zur Überprüfung eine eventuellen vasodilatativen Wirkung, Präparate vom terminalen Ileum zur Bestimmung einer spasmolytischen Aktivität, herangezogen.

Tabelle 4.2: Wirkung von MAH61 HCl auf glattemuskuläre Organe

Organpräparat	MAH61 HCl f ± SEM (%) bei Endkonzentration	EC₅₀ MAH61 HCl (µmol/l)
Aorta descendens	-35,7 ± 7,1	>100
Arteria pulmonalis	-46,8 ± 6,2	>100
Terminales Ileum	-100 ± 0	33,5

Legende zur Tabelle 4.2:

Anhand der Tabelle 4.2 kann man gut erkennen, dass die Testsubstanz sehr stark auf das terminale Ileum wirkt. Bei der Endkonzentration von $100\mu\text{mol/l}$ war die spasmolytische Wirkung bereits maximal ausgebildet. Der EC_{50} - Wert von $33,5\mu\text{mol/l}$ liegt zwischen jenen der Organe der quergestreiften Herzmuskulatur.

Die vasodilatative Wirkung von MAH61 HCl ist nur minimal, da bei der Endkonzentration von $100\mu\text{mol/l}$ bei beiden Organen nicht einmal 50% der vasodilatativen Wirkung zum Tragen gekommen ist.

Die starke Wirkung auf das terminale Ileum, welche auch Grundlage der Untersuchung des Wirkmechanismus auf diesem Organ darstellt, ist im Grunde ein weiterer negativer Effekt der Substanz MAH61 HCl, da jetzt eine Wirkung an 3 Organen vorliegt und die Organselektivität noch weniger vorliegt.

4.4. Versuchsreihen mit MAH61 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin

Wie bereits in Kapitel 2.8. erwähnt, wurde der Wirkmechanismus mittels Nitro-L- Arginin am terminalen untersucht. Nitro-L-Arginin besitzt ein stark antagonistisches Potential auf die eNOS und so konnte nach Blockierung dieses Enzyms überprüft werden, ob die eNOS für die spasmolytische Aktivität am terminalen Ileum verantwortlich ist.

Nach Vorkontraktion mit KCl wurden $100\mu\text{M}$ Nitro-L-Arginin eingespritzt, was eine spasmolytische Wirkung von $4,8 \pm 2,6\%$ zur Folge hatte. Nach 45 minütiger Wartezeit wurden $50\mu\text{M}$ MAH61 HCl eingespritzt. Die weitere spasmolytische Wirkung von zusätzlichen $23,3 \pm 4,5\%$ zeigte, dass die eNOS an der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz beteiligt sein könnte.

Mögliche andere vasodilatative Mechanismen wären z.B.: die Blockade des RAAS – Systems, die Blockade des sympathischen Nervensystems oder eine Ausschüttung von Prostacyclin.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das pharmakologische Profil einer neu synthetisierten Testsubstanz MAH61 HCl, welcher ein mögliches vasodilatatives Potential zugesprochen wird, anhand von Versuchsreihen, welche an 5 verschiedenen isolierten Organpräparaten vom Meerschweinchen, untersucht.

Zur Untersuchung an glattmuskulären Organen wurden Präparate von der Pulmonararterie (Arteria pulmonalis), der Aorta (Aorta descendens) und des Dünndarms (terminales Ileum) herangezogen. An der Pulmonararterie und an der Aorta wurden mögliche vasodilatative Effekte überprüft. Am terminalen Ileum wurde ein etwaiger spasmolytischer Effekt untersucht.

Zur Erforschung der Auswirkung der Testsubstanz auf den quergestreiften Herzmuskel wurden Präparate des rechten Vorhofs (Atrium cordis dexter) und des Papillarmuskels (Musculus papillaris) erforscht. Am rechten Vorhof wurde ein mögliches chronotropes Potential untersucht, am Papillarmuskel wurde ein etwaiges inotropes Potential untersucht.

Die Versuchsorgane wurden täglich frisch entnommen und nach zügiger, aber sorgfältiger Präparation der Organe wurden jene in dafür vorgesehene Organbäder, welche ein physiologisches Milieu durch Temperatureinstellung auf 37°C, der Versorgung mit ausreichend Sauerstoff und der Verorgung durch Elektrolyte, aufrecht erhielten, eingespannt. Daraufhin wurden die mechanischen Veränderungen der Organe in ein elektrisches Signal umgewandelt und von einem Schreiber dokumentiert.

Die Testsubstanz hatte eine Wirkung auf alle Organe, wobei die sehr stark negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel (EC_{50} – Wert von 12,5µmol/l), die stark spasmolytische Wirkung auf den Darm (EC_{50} – Wert von 33,5µmol/l) und die ausgeprägt negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof (EC_{50} – Wert von 44µmol/l) am bemerkenswertesten waren.

Im Anschluss an die Versuchsreihen wurde eine weitere Versuchsreihe zur Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus am terminalen Ileum gestartet. Hierbei wurde nach

Vorkontraktion der eNOS – Antagonist Nitro-L-Arginin eingespritzt und nach weiterem Warten die Testsubstanz eingespritzt. Dadurch konnte man erkennen, dass die eNOS am Wirkmechanismus beteiligt sein könnte, aber auch etwaige andere Wirkmechanismen für die Aktivität verantwortlich sein könnten.

6. Literaturverzeichnis

Aktories K, Foerstermann U, Hofmann F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer, 10.Auflage

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem Journal*, 357 (Pt 3): 593–615

Boron W, Boulpaep E (2011) Medical Physiology. Saunders, 2. Auflage

Irwin C, Roberts W, Naseem KM (2009) Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation. *Platelets* 20 (7): 478-286

Mueller-Esterl W (2004) Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Elsevier GmbH, 1.Auflage

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schaefer-Korting M (2008) Mutschler Arzneimittelwechselwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 9.Auflage

Naseem KM (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 26 (1–2): 33–65

Shiel WC (2008) Webster's New World Medical Dictionary. Webster's New World, 3. Auflage

Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. American Physiological Society

7. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name:	Georg Berenda
Geburtsdatum:	16.03.1988
Geburtsort:	Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung:

September 1994 - Juli 1998	Piaristenvolksschule Ziegelofengasse
September 1998 – Juni 2006	Joseph Haydn Gymnasium
Juni 2006	Reifeprüfung am Joseph Haydn Gymnasium
August 2006 – Februar 2007	Präsenzdienst im Heeresspital Wien Stammersdorf
Seit März 2007	Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Praktika:

Juli 2007 – August 2007	Praktikum bei Schwabe, Ley und Greiner
Februar 2008 – Dezember 2009	Opernapotheke Wien
Juli 2010	Praktikum bei Schwabe, Ley und Greiner
Juli 2011 – September 2011	Praktikum bei Schwabe, Ley und Greiner
Juli 2012 – August 2012	Praktikum bei Schwabe, Ley und Greiner