



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Profil eines neu synthetisierten Triazol-Derivats (MGtr1) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Lisa-Maria Jirasko

Angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Es ist wohl an der Zeit mich endlich bei jenen Personen zu bedanken, die mich während meines Studiums begleitet und unterstützt haben.

Bei meiner Familie, die mich immer wieder motiviert hat und mir auch finanziell unter die Arme gegriffen hat. Ich möchte mich auch bei meiner Oma bedanken, die stets an mich geglaubt hat.

Ein besonderer Dank gilt dem besten Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik. Er hat mich seit Beginn meiner Diplomarbeit unterstützt und wurde nicht müde meine zahlreichen Fragen zu beantworten.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden, die während des Studiums für mich da waren, mich aufgebaut und mir den Rücken gestärkt haben und mir einen Schubs gaben, wenn ich ihn gebraucht habe. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen und sie haben meine Studienzeit unvergesslich gemacht.

Ich möchte mich auch bei Herrn. Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe am Department für Pharmazeutische Chemie für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Ziel der Diplomarbeit.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Hypertonie.....	2
2.2	Medikamentöse Behandlung der Hypertonie	2
3	Material und Methodik	5
3.1	Versuchstiere.....	5
3.2	Tyrode.....	5
3.3	Isolierung und Präparation der Organe.....	7
3.3.1	Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)	9
3.3.2	Musculus papillaris (Papillarmuskel).....	11
3.3.3	Arteria pulmonalis (Pulmonalarterie).....	12
3.3.4	Terminales Ileum (Darm).....	12
3.3.5	Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta).....	13
3.4	Versuchsanordnung und Apparaturen	15
3.4.1	Allgemein	15
3.4.2	Versuchsapparatur I.....	15
3.4.4	Kraftwandler, Verstärker, Schreiber.....	19
3.4.5	Gaszufuhr	19
3.4.6	Wasserbad	20
3.4.7	Testsubstanz	20
3.4.8	Lösungsmittel	21
3.4.9	Kaliumchloridlösungen zur Vorkontraktion.....	23
3.5	Versuchsablauf.....	23
3.5.1	Versuchsorgan Atrium cordis dexter.....	23

3.5.2	Versuchsorgan Aorta descendens.....	24
3.5.3	Versuchsorgan Arteria pulmonalis	25
3.5.4	Versuchsorgan Musculus papillaris	25
3.5.5	Versuchsorgan Terminales Ileum	26
3.5.6	Testung des Wirkungsmechanismus der Substanz MGtr1 am terminalen Ileum unter dem Einfluss von Glibenclamid	27
3.5.7	Glibenclamid	27
3.6	Auswertung.....	28
3.6.1	Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum	28
3.6.2	Artrium cordis dextrum	29
3.6.3	Musculus papillaris	29
3.7	Statistik	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Wirkung von MGtr1 auf das terminale Ileum.....	31
4.2	Wirkung von MGtr1 auf die Arteria pulmonalis.....	34
4.3	Wirkung von MGtr1 auf die Aorta descendens	37
4.4	Wirkung von MGtr1 auf den Musculus papillaris	40
4.5	Wirkung von MGtr1 auf das Atrium cordis dextrum.....	43
4.6	Untersuchung des Wirkmechanismus von MGtr1 am terminalen Ileum	46
4.6.1	Wirkung von MGtr1 unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 µmol	46
4.6.2	Wirkung von MGtr1 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol	49
5	Diskussion	52
5.1	Wirkung von MGtr1 auf die Herzmuskulatur	52
5.1.1	Wirkung auf den rechten Vorhof	53
5.1.2	Wirkung auf den Papillarmuskel	53
5.2	Wirkung von MGtr1 auf glattmuskuläre Organe	53
5.2.1	Wirkung auf die Aorta descendens.....	54

5.2.2	Wirkung auf die Pulmonalarterie.....	54
5.2.3	Wirkung auf das terminale Ileum	54
5.3	Wirkung von MGtr1 in Kombination mit Glibenclamid.....	54
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Curriculum vitae	58

1 Ziel der Diplomarbeit

Im praktischen Teil dieser Arbeit sollte die Wirkung der neu synthetisierten, potentiell schwefelwasserstofffreisetzenden Substanz MGtr1 des Departements für Pharmazeutische Chemie an isolierten und anschließend präparierten Organen von Meerschweinchen getestet werden. Dafür wurden Organe der quergestreiften Muskulatur, wie Vorhof und Papillarmuskel, als auch glatt-muskuläre Organe, wie Arteria pulmonalis, Aorta descendens und das terminale Ileum verwendet. Eine eventuelle spasmolytische Wirkung wurde am Darm ausgetestet, an der Pulmonalarterie und der Aorta die vasodilatierende Wirkung. Versuche am Vorhof wurden durchgeführt, um einen Einfluss auf die Chronotropie zu untersuchen. Beim Papillarmuskel wurde die Wirkung auf die Inotropie getestet.

Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, mussten zu Beginn der Versuche die Präpariertechnik, sowie die Einstellung der Messgeräte erlernt werden.

Mit Hilfe einer Dosis-Wirkungskurve konnte man den EC_{50} -Wert ermitteln. Bei Erreichen einer EC_{50} , jener Konzentration, bei der die Hälfte des Maximaleffektes erzielt wird, wurden weitere Versuche gemacht, um eventuell zugrunde liegende Wirkungsmechanismen zu eruieren. Dazu wurden Versuche mit dem Antagonisten Glibenclamid durchgeführt.

2 Einleitung

2.1 Hypertonie

Als Hypertonie wird eine Steigerung des arteriellen Blutdrucks über die Normwerte bezeichnet. Optimale Werte wurden mit 120/80 mm Hg festgelegt, milde Hypertonie beginnt bei > 140/90 mm Hg.

Es wird zwischen primärer (auch essentielle Hypertonie genannt) und sekundärer Hypertonie unterschieden, wobei die Ursachen für primäre Hypertonie noch weitgehend unbekannt sind. Sekundäre Hypertonie ist eine Folge pathologischer Organveränderungen (Aktories et al.2009).

Vor allem bei der essentiellen Hypertonie ist oft nur eine medikamentöse Therapie möglich. Diese symptomatische medikamentöse Therapie ist sehr wichtig, da ungefähr ein Viertel aller Todesfälle direkt oder indirekt auf einen erhöhten Blutdruck zurückzuführen sind. Des weiteren ist eine Umstellung des Lebensstils von großer Bedeutung. Dazu zählen der Verzicht auf Rauchen, Senkung des Alkoholkonsums, verminderte Kochsalzzufuhr, Bewegung und Reduktion des Übergewichts und Vermeidung von Stressfaktoren (Mutschler et al.2008).

Das Hauptziel der medikamentösen Therapie von Hypertonie ist das Vermeiden von Folgeerkrankungen. Durch eine Senkung des Blutdrucks kommt es auch zu einer Senkung des kardiovaskulären Risikos, wie dem Erleiden eines Schlaganfalls oder eines Herzinfarkts (Collins et al.1990, Turnbull et al.2008).

2.2 Medikamentöse Behandlung der Hypertonie

Die Antihypertensiva kann man in 5 Gruppen unterteilen:

- ACE-Hemmer
- AT₁-Antagonisten
- Betablocker
- Ca-Antagonisten
- Diuretika

Zu den Antihypertensiva erster Wahl gehören die Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, wie die ACE-Hemmer, die AT₁-Antagonisten („Sartane“) und die Renin-Inhibitoren (Aliskiren). Sie greifen an unterschiedlichen Punkten im RAA-System an.

Die ACE-Hemmer inhibieren die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II durch Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms. Somit werden die AT₁-Rezeptor vermittelten Effekte, wie Vasotonus, Na⁺-und Wasserrückresorption, Freisetzung von Aldosteron, Renin und Noradrenalin, vermindert und somit je nach Stärke der Hemmung der Blutdruck gesenkt. Zu den ACE-Hemmern zählen beispielsweise Captopril, Enalapril, Lisinopril und Ramipril.

Die Sartane, wie z.B. Losartan, Candesartan, Valsartan, Telmisartan oder Irbesartan blockieren den AT₁-Rezeptor, wodurch Vasokonstriktion und erhöhte Freisetzung von Aldosteron vermieden werden.

Durch den Renin-Inhibitor Aliskiren wird die Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen gehemmt.

Eine weitere Gruppe von Arzneistoffen zur Behandlung des Bluthochdrucks ist die Gruppe der β -Adrenozeptor-Antagonisten (Betablocker). Hier ist vor allem die Hemmung von β_1 -Rezeptoren erforderlich, was einen negativ inotropen und negativ chronotropen Effekt zur Folge hat. Auch ein reduziertes Herzzeitvolumen und eine verminderte Renin- und Noradrenalinsekretion sind beteiligt an der blutdrucksenkenden Wirkung (Hoffmann et al.2004).

Zu den β_1 -Rezeptorenblocker gehören unter anderem Atenolol, Bisoprolol, Metoprolol und Nebivolol.

Calcium-Antagonisten binden an die α_1 -Untereinheit spannungsabhängiger L-Typ-Calcium-Kanäle und blockieren sie, wodurch der Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle gehemmt wird. Durch eine geringere Menge an freiem Calcium in der Zelle kann diese auch nicht so stark kontrahieren, was einen vasodilatierenden Effekt und in weiterer Folge eine Senkung des Blutdrucks durch einen verminderten Gefäßwiderstand bewirkt.

Vor allem Calciumkanalblocker aus der Gruppe der Dihydropyridine werden zur Blutdrucksenkung eingesetzt. Zu diesen zählen z.B. Nifedipin und Amlodipin.

Weiters gibt es noch die Möglichkeit Diuretika zur Senkung der Hypertonie einzusetzen. Durch deren Einsatz wird vermehrt Natrium und Wasser ausgeschieden, was eine Verringerung des Extrazellulärvolumens zur Folge hat. Es gibt hier wieder unterschiedliche Wirkstoffgruppen. Die Thiaziddiuretika (Hydrochlorothiazid, Xipamid und Indapamid) hemmen den Natrium-Chlorid-Symporter im frühdistalen Tubulus. Die Schleifendiuretika (Furosemid und Torasemid) blockieren den Natrium-Kalium-Chlorid-Symporter im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Die Kalium-sparenden Diuretika wie Spironolacton und Eplerenon hemmen die Wirkung von Aldosteron. Amilorid und Triamteren blockieren Natrium-Kanäle in der Niere.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Für die Ausführung der Versuche wurde an jedem Versuchstag ein Meerschweinchen verwendet und die Organe isoliert. Die Tiere waren von der Gattung TRIK, einem Auszuchtstamm. Es wurden sowohl männliche, als auch weibliche Meerschweinchen für die Versuche herangezogen. Sie waren alle wenige Wochen alt und wogen im Durchschnitt 400 g. Die Tötung erfolgte durch Genickbruch, der einen schnellen und quallosen Tod der Tiere gewährleistete. Anschließend wurde die Bauchdecke geöffnet und das noch schlagende Herz entnommen, danach wurden Darm und Aorta herausgeschnitten. Aus dem Herz wurden die Pulmonalarterie, der Vorhof und der Papillarmuskel herauspräpariert. Die Organe wurden sofort nach der Entnahme in eine begaste Nährlösung (Tyrode), siehe Kapitel 3.2, übergeführt, um sie künstlich am Leben zu erhalten.

3.2 Tyrode

Die physiologische Nährstofflösung Tyrode war Voraussetzung für das Funktionieren der Versuche. Sie versorgte die Organe mit lebensnotwendigen Elektrolyten und musste jeden Tag frisch zubereitet werden. Außerdem erfolgte eine ständige Begasung mit einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂. Dieses Gasgemisch nennt man auch Oxy mix oder Carbogen. Die Gaszufuhr musste während des gesamten Versuches gewährleistet sein. Die optimale Temperatur von 37°C war für die Schaffung physiologischer Bedingungen ebenfalls von Bedeutung.

Die Tyrode ist eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, die nach den Vorschriften von Reiter (1967) zusammengestellt wurde. Benannt ist die Lösung nach dem Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode.

Die Zusammensetzung und genaue Einwaage der Substanzen ist wegen der engen Bereiche der Elektrolytkonzentrationen im Körper entscheidend.

Die Tyrode wurde verwendet zur:

- Herstellung der KCl - Lösung, die zur Kontraktion von Darm, Aorta und Pulmonalarterie diente
- Spülung der Organbäder vor und nach den Versuchen
- Befüllung der Organbäder
- Aufbewahrung der Organe in Bechergläsern
- Präparation der Organe als Elektrolytlösung

Vor der Herstellung der Nährstofflösung mussten Stocklösungen in größeren Mengen bereitete werden, die bis zum Aufbrauchen verwendet werden konnten. Die Tyrode wurde im Gegensatz dazu täglich frisch hergestellt.

Dazu wurden der Reihe nach die benötigten Volumina an NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und KH₂PO₄ von den Stocklösungen abgemessen und in einen 2 Liter Messkolben eingebracht. Danach wurde die genau gewogene Menge an Glucose dazugegeben und das Gefäß zu 2/3 mit destilliertem Wasser befüllt. Anschließend wurde diese Lösung 20 Minuten mit Oxymix (Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) begast. Dann wurde die CaCl₂-Lösung tropfenweise hinzugefügt, um das Ausfällen von schwerlöslichen Calciumsalzen und einer dadurch bedingten Trübung der Lösung zu verhindern. Im Anschluss wurde mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösung gut durchgemischt.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	ml Stocklösung/ Liter Tyrode	mmol/l
NaCl	58,44	100,25 g/5 l	33,60	115,01
KCl	74,55	50,33 g/5 l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01	125,00 g/5 l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,37	147,02 g/5 l	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,09	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,98	34,00 g/250 ml	3,2	3,92
Glucose	180,16	Reinsubstanz	1,98	10,99

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode

Dadurch ergaben sich folgende Mengen für die Herstellung von 2 Liter Tyrode.

Substanz	Menge (ml)
NaCl	67,20
KCl	70,00
NaHCO ₃	167,40
MgSO ₄	2,36
KH ₂ PO ₄	2,36
CaCl ₂	6,40
Glucose	3,96 g

Tabelle 2: Mengenangaben für 2 l Tyrode

3.3 Isolierung und Präparation der Organe

Nach der Entnahme der Organe, die wie bereits im Kapitel 3.1 beschrieben wurde erfolgte, wurden das Herz, die Aorta und der Darm in drei verschiedene Gefäße, die Tyrode enthielten, gegeben und mit Oxymix begast. Bevor die Organe in die entsprechenden Apparaturen eingespannt werden konnten, mussten sie erst präpariert werden. Die Organe wurden dazu in einer mit Kork ausgelegten Petrischale mit Präpariernadeln fixiert. Um eine weitere Nährstoffversorgung gewährleisten zu können, wurde auch diese Schale mit Tyrode befüllt.

Die Präparation erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe, Pinzetten, Scheren, Federschere und Pasteurpipetten.



Abbildung 1: Stereolupe und Präparierbesteck

Das Herz wurde unter dem Mikroskop präpariert, wobei das Fettgewebe, Bindegewebe und Teile der Lunge zuerst entfernt wurden. Im Anschluss daran konnte der Vorhof, die Pulmonalarterie und die Papillarmuskeln herauspräpariert werden.

3.3.1 Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)

Das Herz gliedert sich in das rechte und das linke Herz, wobei jeder Teil wieder aus einem kleineren Vorhof und einer größeren Kammer besteht. Im rechten Vorhof befindet sich der Sinusknoten, der für die Entstehung von rhythmischen Aktionen, die durch elektrische Erregung ausgelöst werden, verantwortlich ist. Daher wurde für die Versuche der rechte Vorhof ausgewählt.

Während der Präparation des Herzens wurde es an der Spitze und an der Basis mit Präpariernadeln am Kork in der Petrischale befestigt. Erst mussten umgebendes Fettgewebe und anhaftendes Lungengewebe entfernt werden, dann wurde der rechte Vorhof entlang des Sulcus Coronarius vom Ventrikel getrennt. Anschließend wurde der Vorhof an der Ober- und an der Unterseite mit zwei Silberdrahthäkchen versehen. Bis zur Einbringung in die Apparatur wurde der Vorhof in einem mit Nährstofflösung befüllten Becherglas, das zusätzlich begast wurde, aufbewahrt.

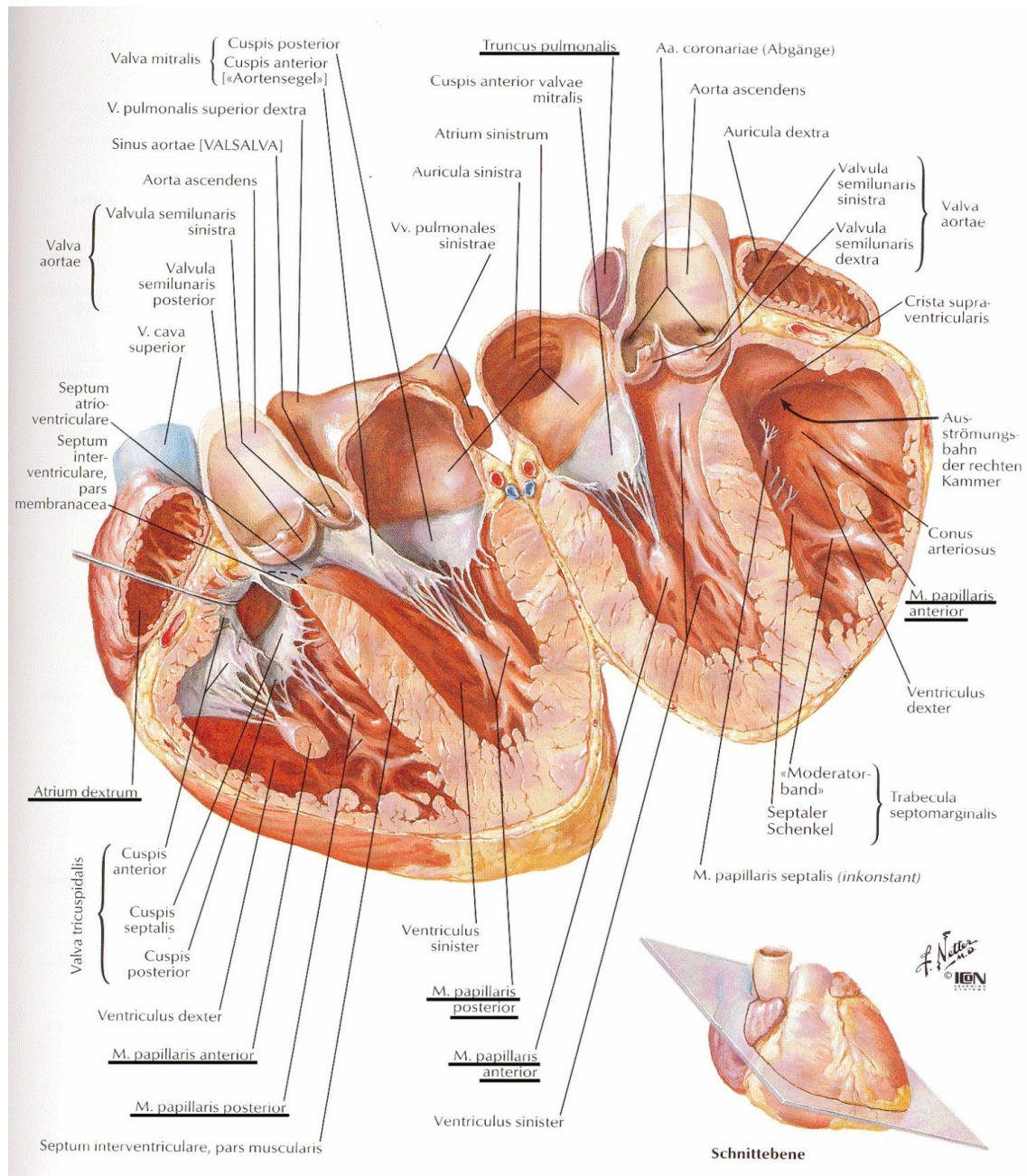


Abbildung 2: Ein Querschnitt durch das Herz (Netter FH 2003)

3.3.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Um den Einfluss der Testsubstanz auf die Inotropie des Herzens zu untersuchen, wurde der Papillarmuskel verwendet. Die rechte Herzkammer enthält drei, die linke nur zwei Papillarmuskeln. Die rechte Herzkammer wurde von der Pulmonalarterie entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet und damit die Papillarmuskeln freigelegt. An den einzelnen Muskeln wurde unter dem Mikroskop je ein Silberhäkchen mit einem Bindfaden am Ansatz der Papillarmuskelsehne befestigt und anschließend durch vorsichtiges Herausschneiden aus der Herzwand entnommen. Man benötigte nur ein Häkchen, da der Muskel an der anderen Seite in die Apparatur eingeklemmt wurde. Da Purkinje-Fasern Teil des Erregungsleitungssystems sind, mussten diese, falls am Papillarmuskel vorhanden, entfernt werden. Bis zum Einbringen des Muskels in die Apparatur, wurden auch diese in einem mit Tyrode gefüllten und mit Carbogen begasten Becherglas aufbewahrt.

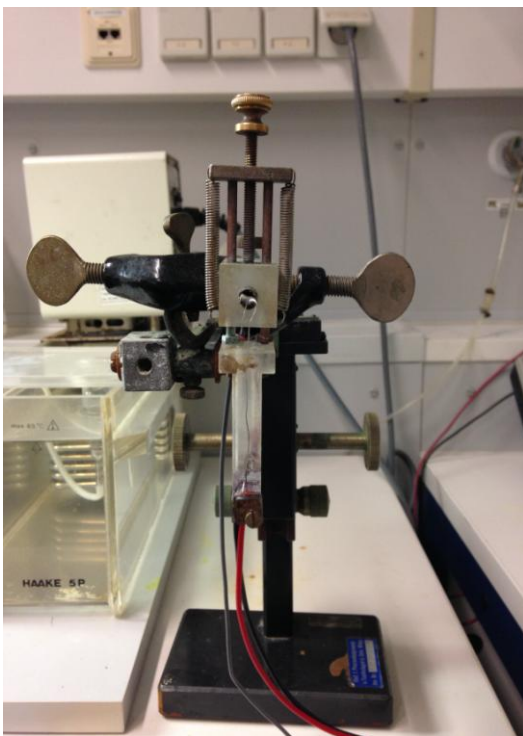


Abbildung 3: Präparierter Papillarmuskel in Apparatur I

3.3.3 Arteria pulmonalis (Pulmonalarterie)

Neben dem rechten Vorhof und den Papillarmuskeln wurde auch die Pulmonalarterie, auch Lungenarterie genannt, aus dem Herzen isoliert. Von der herznahen Arterie Truncus pulmonalis konnte ein circa 1 cm langer Abschnitt entnommen werden, der wiederum in Ringe geteilt wurde, meist waren das 1-2 Stück. Die Pulmonalarterie wurde bis zur Verwendung in einem mit Nährstofflösung befülltem Becherglas, das begast wurde, aufbewahrt.

3.3.4 Terminales Ileum (Darm)

Es wurde ein Stück des Dünndarmes entnommen. Dieser erstreckt sich vom Pylorus des Magens bis zum Dickdarm und gliedert sich in drei Abschnitte: Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm). Für die Versuche wurde das terminale Ileum verwendet.

Für die Entnahme wurde der Bauchraum des Tieres so weit geöffnet, dass man mit den Fingern den Darm herausziehen konnte. Es war darauf zu achten den Darm nicht zu dehnen, da sonst durch eine eventuelle Verletzung der Muskulatur seine Funktionsfähigkeit hätte beeinträchtigt werden können. Erst wurde er der Stelle, die in den Dickdarm übergeht, abgeschnitten. Anschließend wurde der Darm an der jejunalen Seite mit einem Bindfaden markiert, um die Enden nicht zu verwechseln und dann auch abgetrennt. Das Ileum wurde in ein Becherglas mit Tyrode überführt und bis zur Verwendung mit Carbogen begast.

Um den Darm bzw. Teilstücke des terminalen Ileums für die Versuche verwenden zu können, musste diese entsprechend präpariert werden. Dazu verwendete man 0,5 - 1 cm lange Stücke, die mit einer Schere vom Darm geschnitten wurden. Die Schnitte wurden schräg ausgeführt. Diese Teilstücke wurden in eine mit Kork ausgelegte Petrischale gelegt und auch wieder mit Nährlösung bedeckt. Unter der Stereolupe wurden nun an den beiden Enden je ein Silberdrahthäkchen mit Hilfe eines Bindfadens angebracht.

Wichtig war, dass man den Darm nicht zuband, sondern das Lumen offen ließ. So konnte die Nährlösung und in weiterer Folge die zu untersuchende Substanz zirkulieren und auch die Darminnenseite erreichen. Mit einer Pasteurpipette und Tyrode wurde der Darm gespült und dadurch von Chymusresten gereinigt. Außerdem wurde dadurch seine Durchlässigkeit überprüft.

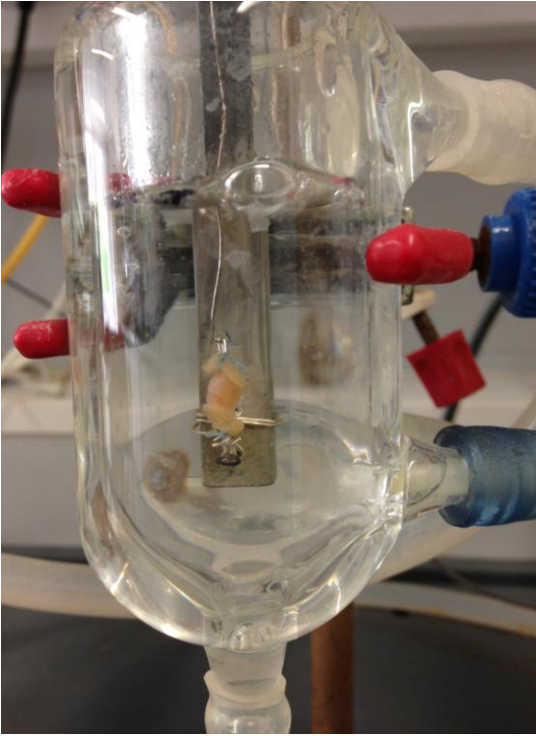


Abbildung 4: präpariertes Darmstück

3.3.5 Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)

Als letztes Organ wurde die Aorta descendens entnommen. Die Aorta (Hauptschlagader) entspringt aus dem linken Teil des Herzens und befördert sauerstoffreiches Blut in den großen Kreislauf. Sie führt entlang des Rückgrats bis in den Beckenraum. Um sie aus dem Meerschweinchen präparieren zu können, war es notwendig erst Lunge und Zwerchfell zu entfernen. Dann wurde vorsichtig entlang des Rückgrats ein ca. 5 cm langes Stück der Aorta heraus geschnitten. Bei der Präparation wurde dieser Teil wieder in eine mit Nährlösung gefüllte Petrischale am Korkboden mittels Präpariernadeln befestigt. Unter der Stereolupe konnte nun mit Hilfe von Pinzette und Federschere umliegendes Fett und Muskelgewebe entfernt werden.

Des weiteren wurde die Aorta in 2-3 mm breite Ringe geschnitten und bis zu ihrer Verwendung wieder in einem Becherglas mit Tyrode aufbewahrt und mit Oxymix begast.

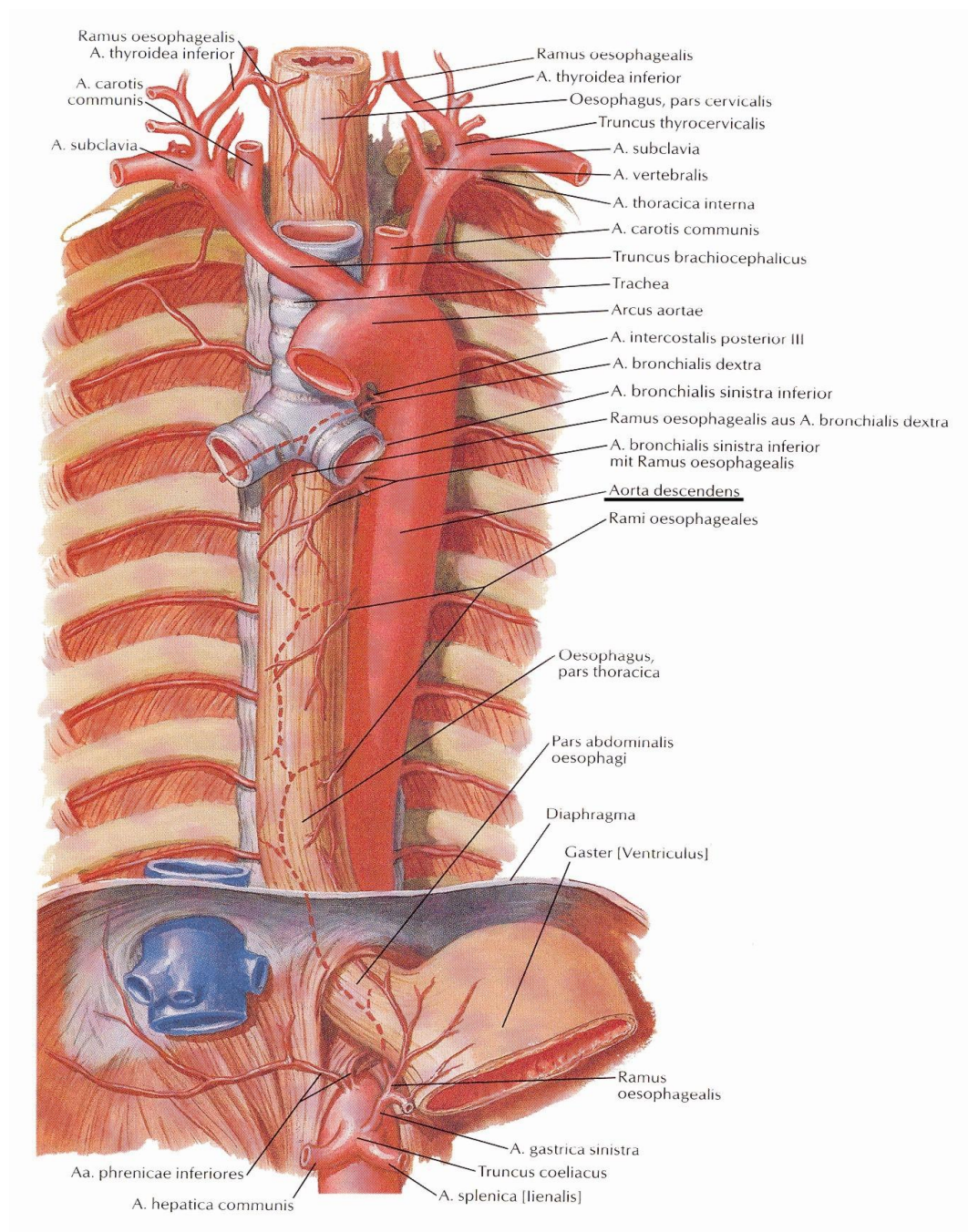


Abbildung 5: Aorta descendens – Verlauf (Netter FH 2003)

3.4 Versuchsanordnung und Apparaturen

3.4.1 Allgemein

Die isolierten und präparierten Organe wurden in zwei verschiedene Testapparaturen (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.4.3) den vorgeschriebenen Untersuchungen unterzogen. Die Apparatur I war zur Testung der Aorta descendens, des Atrium cordis dextrum, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums vorgesehen. Mit der Apparatur II war es nur möglich den Musculus papillaris zu untersuchen, da dieser zusätzlich elektrisch gereizt werden musste. Das Funktionsprinzip der beiden Apparaturen war gleich, sie unterschieden sich aber in Aufbau- und Befestigungsmechanismen.

Beide Testapparaturen verfügten über ein Wasserbad, ein Organbad, einen Kraftwandler, der Veränderungen am Organ in elektrische Impulse umwandelte und einen Amplifier, der diese Signale verstärkte und mittels Flachbettschreiber auf ein Millimeterpapier übertrug. Diese Aufzeichnungen ermöglichten eine genaue Auswertung der Versuchsergebnisse.

3.4.2 Versuchsassparatur I

Die Apparatur I diente der Erfassung und Aufzeichnung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Die Organhalterung wurde in ein Organbad getaucht, das direkt in das auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ erwärmte Wasserbad eingelassen war. Vor Versuchsbeginn wurde das Organbad einmal mit destilliertem Wasser gespült und einmal mit Elektrolytlösung. Um die Flüssigkeit wieder aus dem Gefäß zu entfernen, wurde sie mit Hilfe einer Spritze abgesaugt. Danach wurden 25 ml Tyrode in einer Mensur abgemessen und in das Organbad überführt, an deren Ende eine Glasfritte plazierte war, durch die die Kammer ständig mit Oxymix versorgt wurde. Dadurch versuchte man möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Die Zugabe der Nährlösung sollte mindestens zehn Minuten vor Einbringen des Papillarmuskels stattfinden, um die angestrebte Temperatur im Organbad zu erreichen.

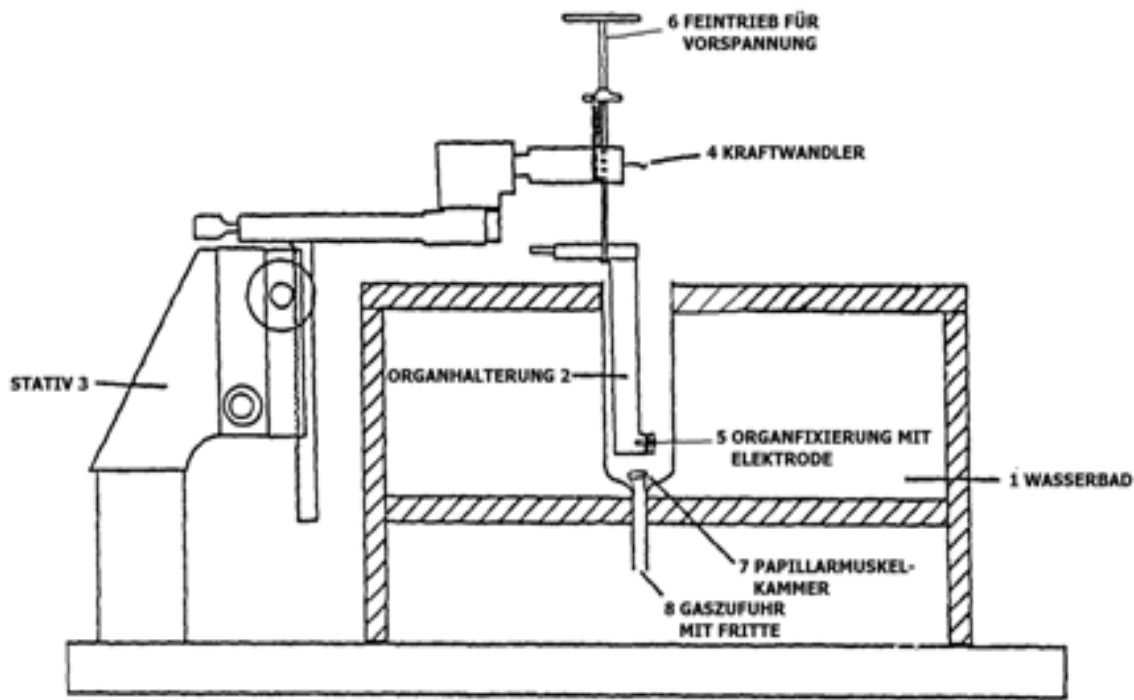


Abbildung 6: Apparatur I - Skizze

Die Präparation des Musculus papillaris erfolgte, wie schon in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Wenn die Apparatur fertig vorbereitet war, wurde der Papillarmuskel mit dem Haken an einem Silberdraht befestigt, der Teil der Organhalterung war. Diese war mit dem Kraftwandler verbunden, der notwendig war, um die Muskelkontraktionen in elektrische Impulse umzuwandeln. Der freie Teil des Muskels wurde danach zwischen eine Platin-Kathode und einer Plexiglasplatte eingeklemmt und mit einem Schraubenzieher festgezogen werden. Die Kathode bestand aus Silberchlorid und war in der Lage mit Hilfe eines Accupulser A310-Stimulus Isolator (World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) den Papillarmuskel zu reizen, da dieser keine Eigenerregung aufweist.

Nach Anbringen des Muskels wurde die Organhalterung mittels Stativschlitten in das Organbad abgesenkt bis der Musculus papillaris vollständig mit Tyrode bedeckt war. Anschließend konnte die nötige Vorspannung mittels Feintrieb eingestellt werden.

3.4.3 Versuchsapparatur II

Diese Apparatur wurde für Versuche an den Organen Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Artrium cordis dextrum und terminales Ileum verwendet. Bei diesem Gerät war das Organbad doppelwandig und musste somit nicht in ein Wasserbad eingetaucht werden. Das durch einen Temperaturregler auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ erwärmte Wasser wurde direkt durch das Gefäß geleitet. Auch hier wurde das Organbad vor Versuchsbeginn mit destilliertem Wasser und anschließend mit Tyrode gespült, welche über einen Schlauch am unteren Ende des Gefäßes abgelassen werden konnte. Anschließend füllte man wieder 25 ml in das Organbad bzw. 8 ml in das kleinere Organbad und wartete bis es die vorgesehene Temperatur erreicht hatte. Auch hier war es wichtig während der gesamten Versuchsdauer mit Oxymix zu begasen.

Also Organhalterung waren zwei Silberdrähte vorhanden, wobei der obere mit einem Kraftwandler verbunden war und der untere zur Fixierung des Organs diente. Die Aorta und die Pulmonalarterie wurden direkt zwischen den Drähten eingebracht, der Vorhof und der Darm wurden über Silberdrahthäkchen an den Drähten befestigt. Nachdem das Organ in der Apparatur eingespannt war, wurde die richtige Vorspannung eingestellt, die auf das jeweilige Präparat abgestimmt war. Durch die Transformation der Kontraktionen in Stromimpulse konnte ein Schreiber diese genau auf ein Millimeterpapier übertragen.

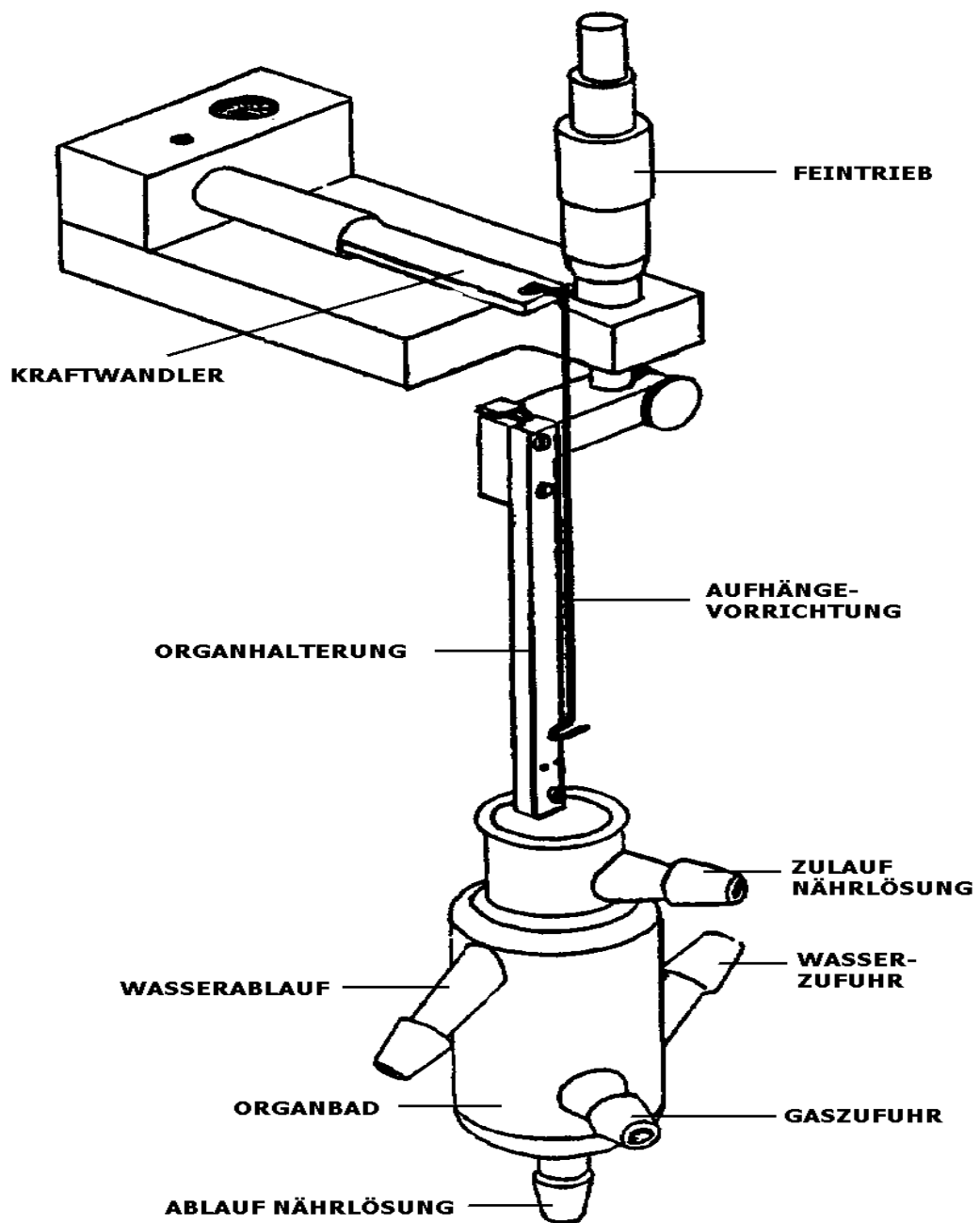
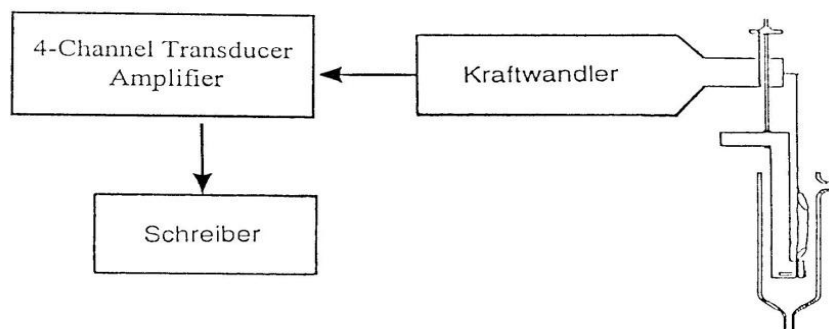


Abbildung 7: Apparatur II – Skizze

3.4.4 Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Ein essentieller Bestandteil der Apparatur war der Kraftwandler, der notwendig war, um mechanische Bewegung über einen Dehnungsmessstreifen in elektrische Impulse umzuwandeln. Durch Dehnungsänderungen der Organe, wie Kontraktion oder Spasmolyse, änderte sich der elektrische Widerstand und somit der Stromfluss. Diese Änderung wurde mit Hilfe eines Verstärkers oder Amplifiers verstärkt und über einen Flachbettschreiber auf Millimeterpapier übertragen. Diese Aufzeichnungen wurden danach ausgewertet.



3.4.5 Gaszufuhr

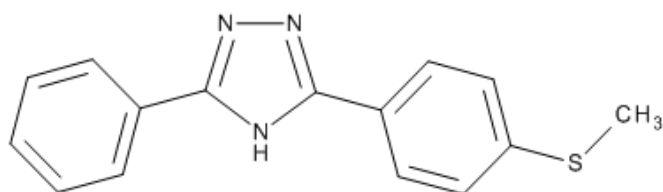
Die kontinuierliche Versorgung der Präparate mit einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid war für die Aufrechterhaltung der Organfunktionen äußerst wichtig und musste von der Entnahme der Organe bis zur Beendigung der Versuche ohne Unterbrechung gewährleistet werden. Des weiteren diente die Begasung zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes von 7,2 – 7,4. Um die Gasmenge regulieren zu können, waren an den Gummischläuchen Schraubklemmen fixiert, die man je nach Bedarf verstellen konnte. Außerdem wurde das ins Organbad eingeleitete Gas nochmals durch eine Glasfritte fein zerstäubt.

3.4.6 Wasserbad

Um eine möglichst konstante Temperatur in den Wasserbädern und in der Folge auch in den Organbädern zu erhalten, wurden Wasserbäder mit eingebautem Thermostat verwendet. Für die Versuche an Aorta, Pulmonalarterie, Darm und Vorhof waren Temperaturen von $37 \pm 1^\circ\text{C}$ notwendig. Die Wassertemperatur für den Papillarmuskel wurde auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt. Damit die entsprechenden Wassertemperaturen schon zu Beginn der Versuche gegeben waren, mussten die Wasserbäder mindestens eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn eingeschaltet werden.

3.4.7 Testsubstanz

Die zu prüfende Substanz MGtr1 wurde an der Fakultät für Lebenswissenschaften, am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie von der Arbeitsgruppe rund um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und zur Verfügung gestellt.



Nomenklatur: 3-(4-Methylthiophenyl)-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol

Molekulargewicht = 267,35 g/mol

Abbildung 8: Struktur der Testsubstanz MGtr1

3.4.8 Lösungsmittel

Die Substanz MGtr1 war nicht wasserlöslich und wurde daher in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dessen Eigenwirkung musste bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

DMSO ist eine farb- und geruchlose, hygroskopische Flüssigkeit. Es ist sehr lipophil und kann auch über die Haut gut in den Organismus eindringen. Konzentriertes Dimethylsulfoxid hat zytotoxische Eigenschaften und kann als Zellgift gesehen werden.

Bei Applikation von reinem DMSO an Aorta und Pulmonalarterie kommt es zu einer Kontraktion der Organe. Diese Wirkung musste am Ende der Versuche von den ausgewerteten Ergebnissen wieder abgezogen werden, um die unverfälschte Wirkung von MGtr1 zu erhalten. Auf den Papillarmuskel hat DMSO eine negativ inotrope und auf den Darm eine spasmolytische Wirkung, was bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden musste, um die reine MGtr1 Wirkung zu sehen.

Zur Herstellung der Stammlösung für die zu untersuchende Substanz waren folgende Einwaagen notwendig.

Stammlösung	Organbadvolumen in ml	Einwaage in mg für eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ pro Organbad
MGtr1	25	0,61
MGtr1	8	0,21

Tabelle 3: Einwaage für Stammlösung

Die Substanz MGtr1 wurde in 100 μl DMSO gelöst, um in Abhängigkeit des Volumens des Organbades (25 ml oder 8 ml) nach vollständiger Zugabe der Stammlösung der zu untersuchenden Substanz eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad zu erhalten. Zur Berechnung der Einwaage wurde die molare Masse ($M_G = 267,35$) der Substanz herangezogen.

Diese Stammlösungen mussten täglich frisch zubereitet werden und mussten bereits am nächsten Tag entsorgt werden.

Mit der Applikation der Substanzlösung konnte erst begonnen werden, wenn sich die jeweiligen Präparate an das umgebende Medium gewöhnt hatten. Das heißt im Falle des Papillarmuskels und des Vorhofs die Kontraktionskraft und die Herzfrequenz konstant waren bzw. bei Darm, Aorta und Pulmonalarterie, diese maximal kontrahiert waren.

Zugegebene Menge	Konzentration im Organbad
3 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

Tabelle 4: Pipettierschema der Substanzlösung

Zu Beginn wurde 3 µl der Substanzlösung mit Hilfe einer manuellen Mikroliterpipette in das Organbad eingebracht, wobei darauf zu achten war mit der Pipettenspitze nichts zu berühren, um den Versuch nicht zu stören. Nach Zugabe der zu testenden Lösung wurde am Millimeterpapier diese Stelle markiert, um die Versuche nach deren Beendigung möglichst genau auswerten zu können. Das war nur bei Aorta, Darm und Pulmonalarterie erforderlich, da die Untersuchungen an diesen Organen ohne Unterbrechung aufgezeichnet wurden. Bei den Tests an Papillarmuskel und Vorhof wurde der Schreiber nur alle 5 Minuten aktiviert.

Nach Zugabe der Testsubstanz wurde exakt 45 Minuten gewartet, während denen sich die Präparate wieder den veränderten Gegebenheiten anpassen konnten. Dann wurde alle 45 Minuten die nächstgrößere Menge an Testlösung (siehe Tabelle 4: Pipettierschema der Substanzlösung) in das Organbad eingespritzt, bis das Organbad eine Endkonzentration von 100 µmol/l erreichte. Die jeweiligen Stellen wurden wieder am Millimeterpapier markiert.

3.4.9 Kaliumchloridlösungen zur Vorkontraktion

Die Präparate von Darm, Aorta und Pulmonalarterie mussten vorkontrahiert werden, bevor die Testlösung ins Organbad zugegeben werden konnte. So konnte genau untersucht werden, ob die zu untersuchende Substanz eine dilatierende oder relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur hat. Diese Vorkontraktion erfolgte mit 2 verschiedenen Kaliumchloridlösungen, die täglich frisch aus der Tyrode zubereitet wurden.

Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion des terminalen Ileums

In einen 100 ml Messkolben wurden 0,45 g KCl eingewogen und mit physiologischer Nährlösung bis zur Eichmarke aufgefüllt. Bei dieser Mischung handelt es sich um eine 60 mmolare Lösung.

Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion von Aorta und Arteria pulmonalis

Es wurden 0,67 g KCl eingewogen und mit Tyrode bis zur Markierung des 100 ml Messkolben aufgefüllt, um eine 90 mmolare Lösung herzustellen.

3.5 Versuchsablauf

Nach jedem Versuchstag wurden die Organbäder mit 2%iger HCl und einer Bürste gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült, um Verunreinigungen und dadurch bedingte Verfälschungen bei folgenden Versuchen zu vermeiden.

Vor Beginn der Versuche wurden die Organbäder nochmals mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mit Tyrode gespült. Nach diesem Schritt konnten die Organbäder mit der entsprechenden Menge Nährlösung (25 ml oder 8 ml) befüllt und das dazugehörige Wasserbad eingeschaltet werden.

3.5.1 Versuchsorgan Atrium cordis dexter

Nachdem der rechte Vorhof gemäß Beschreibung Kapitel 3.3.1 entnommen und präpariert war, musste er möglichst rasch in die Apparatur II eingehängt werden. Dazu wurde der Teil, an dem man noch Fettgewebe erkennen konnte, am oberen Teil der

Aufhängevorrichtung befestigt und der untere Haken wurde unten eingehängt. Es war darauf zu achten, dass der Vorhof nicht zu stark gedehnt wird, um dessen Funktionsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Auch war es wichtig möglichst rasch zu arbeiten und den Vorhof in das begaste Organbad mit Elektrolytlösung zu tauchen, damit dessen Eigenerregung nicht verloren ging. Als nächstes wurde der Flachbettschreiber eingeschaltet und auf 5 mV eingestellt, die Schreibgeschwindigkeit war mit 5 mm/sec festgelegt.

Der Schreiber wurde mit Hilfe eines Drehrades auf die Nulllinie gebracht und danach eine Vorspannung von 10,4 mN mittels Verstärker eingestellt. Die gleiche Vorspannung war wichtig, um die Versuche untereinander vergleichbar zu machen.

Damit sich der Vorhof an diese Bedingungen anpassen konnte und eine konstante Schlagfrequenz erreicht wurde, wartete man mindestens 30 Minuten. Danach wurde alle 5 Minuten eine Kontrollmessung durchgeführt, die über eine Dauer von 12 Sekunden bzw. über eine Strecke von 6 cm am Millimeterpapier zu erfolgen hatte.

So wurde gesehen, wann die Herzfrequenz konstant war und mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden konnte. Man ging von Konstanz aus, wenn 3 Messungen hintereinander die gleiche Anzahl von Schlägen aufwies. Berechnet wurden die Kontraktionen pro Minute, indem man die Schläge mit 5 multiplizierte.

Waren die Schläge konstant, wurde die erste Substanzkonzentration in das Organbad eingespritzt, wobei darauf zu achten war den Versuch nicht zu stören. Danach wurde wieder alle 5 Minuten eine Messung, die wie oben beschrieben erfolgte, gemacht. Alle 45 Minuten sollte wieder Konstanz in der Anzahl der Schläge erreicht werden und die nächste Substanzmenge zugefügt werden, bis eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht war.

3.5.2 Versuchsorgan *Aorta descendens*

Der komplett isolierte Aortenteil musste, nachdem anhaftendes Lungen- und Fettgewebe unter der Stereolupe entfernt wurden, in kleinere ringförmige Teilstücke von ca. 2-3 mm geschnitten werden. Diese wurden ohne Anbringen von Haken zwischen den oberen und unteren Silberdraht der Aufhängevorrichtung von Apparatur II eingehängt, wobei wieder darauf zu achten war das Präparat nicht zu dehnen, aber auch nicht zu locker anzubringen, damit es sich während des Versuchs nicht lösen konnte. Anschließend

wurde es wieder in das zuvor schon mit Tyrode befüllte und auf 37°C erwärmte Organbad eingelassen und begast. Jetzt konnte man wieder den Schreiber aktivieren und die Vorspannung wurde auf 19,6 mN bei 10 mV eingestellt. In den folgenden 20 Minuten konnte sich das Aortenstück an die Bedingungen anpassen. Danach wurde auf 5 mV umgestellt, der Schreiber wieder mittels Feintrieb auf 0 gebracht, die Nährlösung aus dem Organbad abgelassen und je nach Größe des Gefäßes durch 25 ml bzw. 8 ml eine 90 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Durch diese kam es zu einer maximalen Kontraktion der Aorta descendens. Bei diesem Präparat wurde eine durchgehende Kurve aufgezeichnet. Mit der Zugabe der Substanzkonzentrationen konnte erst begonnen werden, wenn die Kurve in eine Gerade überging und somit konstant war. Dieser Vorgang dauerte durchschnittlich 45 Minuten. Nachdem die einzelnen Konzentrationen dem Organbad zugegeben wurden, musste man immer 45 Minuten bis zur nächsten Zugabe warten bis die Endkonzentration im Gefäß 100 mmol betrug.

3.5.3 Versuchsorgan *Arteria pulmonalis*

Der Versuchsablauf der Arteria pulmonalis funktionierte wie bei dem Präparat der Aorta. Das ringförmige Teilstück wurde wieder in die Aufhängevorrichtung der Apparatur II zwischen den oberen und unteren Silberdraht eingehängt. Der Unterschied lag darin, dass eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5 mV angelegt wurde. Die Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion war hier auch wieder 90 mmolar. Bei Erreichen der Plateauphase konnte mit dem Versuch begonnen werden. Die Substanzzugabe und Dokumentation erfolgte wie, zuvor beschrieben, bei der Aorta descendens.

3.5.4 Versuchsorgan *Musculus papillaris*

Der Papillarmuskel war das einzige Organ, das ausschließlich in der Apparatur I getestet werden konnte. Dazu wurde das Silberhäkchen am oberen Draht befestigt und der untere Teil des Muskels zwischen Plexiglasplättchen und Kathode eingeklemmt indem die daran befestigte Schraube festgezogen wurde. Danach wurde das Präparat in das Organbad, das 25 ml Nährlösung enthielt und auf 35°C aufgewärmt war mittels Stativschlitten abgesenkt. Es folgte die Einstellung der Vorspannung auf 3,92 mN, die während der gesamten Versuchsdauer konstant gehalten werden musste, da sich bei einem Spannungsabfall die Inotropie des Muskels verringert hätte (Reiter 1967).

Im Gegensatz zum Vorhof besitzt der Papillarmuskel keine Eigenregung, sondern musste mit Hilfe eines Accupulsers A310 (World Precision Instrument, Hamden, FL, USA) gereizt werden. Die Stimulation erfolgte durch Rechteckimpulse mit einer Dauer von 3 ms bei einer Frequenz von 1 Hertz. Begonnen wurden die Versuche mit einer Stromstärke von 2 mV, konnte aber noch gesteigert werden, falls die Kontraktion des Muskels zu schwach war. Die Stromstärke sollte 10 % über der Schwellenstromstärke liegen, bei der es zur ersten Kontraktion kam. Wenn man die Stromstärke zu hoch gewählt hatte, kam es zu einer Entleerung der Katecholaminspeicher, was eine selbstständige Abnahme der Kontraktionsamplitude zur Folge hatte (Furchgott et al. 1959).

Nachdem sich der Musculus papillaris an die neuen Bedingungen angepasst hatte, begann die Kontrollzeit, in der man alle 5 Minuten Messungen vornahm, bei denen auf dem Millimeterpapier des Flachbettschreibers 6 Impulse aufgezeichnet wurden. Mit dem Lineal wurde die Länge der Amplituden abgemessen. Sobald diese über 3 Aufzeichnungen konstant waren, konnte mit der Zugabe der Substanzkonzentrationen begonnen werden. Wie auch bei den anderen Versuchen wurde alle 45 Minuten die nächstgrößere Konzentration der Testsubstanz dem Organbad zugefügt. Alle 5 Minuten wurde eine Messung vorgenommen.

3.5.5 Versuchsorgan *Terminales Ileum*

Die präparierten Darmteilstücke hatten an den beiden Enden jeweils ein Silberdrahtkännchen befestigt, an denen sie in die Aufhängung der Apparatur II eingehängt wurden. Es war auch hier wieder darauf zu achten den Darm nicht zu stark zu dehnen. Das fixierte Präparat wurde in das auf 37°C aufgewärmte Organbad eingelassen und begast. Die Vorspannung betrug bei diesem Organ 4,92 mN bei einer Stromstärke von 5 mV. Dann wurde der Schreiber wieder auf die Nulllinie gebracht und 20 Minuten gewartet, damit sich der Darm an die neuen Bedingungen gewöhnen konnte. Nach dieser Zeit wurde die Tyrode aus dem Organbad abgelassen und durch 25 ml einer 60 mmolaren KCl-Lösung ersetzt. Durch diese wurde der Darm maximal kontrahiert, was dadurch zu erkennen war, dass der Schreiber auf dem Millimeterpapier stark nach links ausschlug. Nach frühestens 45 Minuten pendelte er sich ca. bei der Hälfte der Maximalkonzentration ein und ging in eine Gerade über. Erst wenn diese Konstanz erreicht wurde, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz laut Pipettierschema begonnen werden. Bei diesem Versuch wurde wieder eine durchgehende Kurve aufgezeichnet und alle 45 Minuten eine neue Substanzkonzentration zugegeben.

3.5.6 Testung des Wirkungsmechanismus der Substanz MGtr1 am terminalen Ileum unter dem Einfluss von Glibenclamid

Um den Wirkungsmechanismus von MGtr1 genauer untersuchen zu können, wurde wieder ein Darmstück, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, in die Apparatur II eingehängt und eine Vorspannung von 4,92 mN bei 5 mV eingestellt. Es wurde 20 Minuten gewartet bevor die 60 mmolare Kaliumchloridlösung zugegeben wurde, um maximale Kontraktion zu erreichen. Sobald Konstanz erreicht war, konnte mit der Untersuchung des Wirkungsmechanismus begonnen werden. Dazu wurde der Antagonist Glibenclamid in 2 getrennten Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Bei den entsprechenden Versuchen wurde bei Testbeginn erst Glibenclamid in der Konzentration von 30 µmol/l zugesetzt und nach 45 Minuten 30 µmol/l der zu untersuchenden Substanz MGtr1 zugegeben. Das entsprach der Konzentration des EC₅₀-Wertes auf das terminale Ileum, die zuvor berechnet wurde. Nach weiteren 45 Minuten war diese Untersuchung beendet. Beim zweiten Versuch lag der Unterschied darin zu Beginn 100 µmol/l Glibenclamid zuzufügen und nach 45 Minuten wieder 30 µmol/l der Testsubstanz. Kam es während des Versuchs zu einer Entspannung des Organs, so musste von einem anderen Wirkmechanismus ausgegangen werden.

3.5.7 Glibenclamid

Die Substanz Glibenclamid gehört zu den Sulfonylharnstoffen und wird als orales Antidiabetikum bei Typ-2-Diabetikern angewendet. Die Wirksamkeit dieser Substanzen ist nur gegeben, wenn kein vollständiger Insulinmangel vorhanden ist. Bei der Bindung von Glibenclamid an die SUR-1-Untereinheit der β-Zellen kommt es zu einer Blockade der K⁺-abhängigen ATP-Kanäle, was eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle, wodurch Kalzium in die β-Zellen einströmt und die Insulinfreisetzung stimuliert (Aktories et al. 2005).

Um auch mit Glibenclamid eine Endkonzentration von 100 µmol im Organbad zu erreichen, wurde dazu 1,24 mg Glibenclamid (Molare Masse: 494,00 g/mol) in 100 µl destilliertem Wasser gelöst .

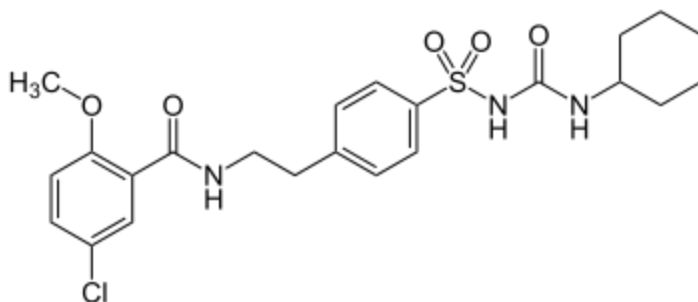


Abbildung 9: Strukturformel von Glibenclamid

3.6 Auswertung

Bei der Auswertung der Versuchsreihen musste die Eigenwirkung von DMSO (=Dimethylsulfoxid) als Lösungsmittel berücksichtigt werden und die Testergebnisse nach oben bzw. nach unten korrigiert werden.

3.6.1 *Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum*

Die bei dem Versuch erhaltene Kurve diente der Interpretation der Wirkung der Testsubstanz auf die einzelnen Organe. Die mögliche Wirkung der Substanz MGtr1 zeigte sich bei der Aorta, der Pulmonalarterie und dem terminalen Ileum durch eine Dilatation. Diese Präparate wurden mit der entsprechenden Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert. Wenn die Kurve in die Plateauphase überging, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden, wobei jede weitere Wirkstoffeinspritzung am Millimeterpapier markiert wurde. Die Entfernung von der Nulllinie zur Plateauphase, gemessen in cm, wurde als Kontrollwert gewertet und stellte eine Kontraktion von 100 % dar. Die weiteren Werte wurden immer kurz vor Ablauf der 45 Minuten nach dem Einspritzen abgemessen. Das heißt kurz vor der Markierung, bei der eine erneute Substanzzugabe erfolgte wurde wieder der Abstand zur Nulllinie genommen. Verringerte sich der Wert, kam es während der Substanzzugabe zu einer Dilatation des Organs und lag somit unter 100 %, was in Bezug auf die maximale Kontraktion berechnet wurde. War der Wert gleich dem Ausgangswert, führte die Testsubstanz zu keiner Dilatation.

Die einzelnen Werte, die abgemessen wurden, mussten mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert werden, um die Ergebnisse in mN zu erhalten.

Spannung in mV	Eichfaktor
2	0,39
5	0,98
10	1,96

Tabelle 5: Eichfaktoren

3.6.2 *Artrium cordis dextrum*

Beim rechten Vorhof machte man Messungen in Bezug auf die Chronotropie, der Schlagfrequenz des Herzens. Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben wurde hier alle 5 Minuten die Schläge aufgezeichnet, die der Vorhof in 12 Sekunden tätigt, was 6 cm auf dem Millimeterpapier entsprach. Um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten wurden die Schläge innerhalb von 6 cm am Papier gezählt und mit 5 multipliziert. Nahm die Zahl der Schläge innerhalb des Versuchs zu oder ab, konnten Rückschlüsse auf positive oder negative Chronotropie durch die Testsubstanz gezogen werden.

3.6.3 *Musculus papillaris*

Am Papillarmuskel wurde die Wirkung von MGtr1 auf die Inotropie untersucht. Auch hier wurde alle 5 Minuten eine Messung gemacht. Dabei wurden jeweils 6 Amplituden aufgezeichnet. Um diese Aufzeichnung auswerten zu können, wurde die Höhe der Amplituden abgemessen und ihr Mittelwert berechnet. Nachdem beim Papillarmuskel die Spannung 2 mV verwendet wurde, musste man hier mit dem Eichfaktor 0,39 multiplizieren. Der Kontrollwert, also die letzte Messung bevor die Testsubstanz zugegeben wurde, entsprach wieder 100 %. Änderungen in der Amplitudenhöhe zeigten direkt eine Änderung der Inotropie, also der Schlagkraft des Muskels.

3.7 Statistik

Die zu untersuchende Substanz MGtr1 wurde, wie bereits erwähnt, in DMSO gelöst. Somit musste bei der Auswertung die Eigenwirkung von DMSO berücksichtigt werden. Abhängig von den jeweiligen Organen musste DMSO entweder addiert oder subtrahiert werden.

Die Ergebnisse der Messungen wurden zunächst in mN angegeben und dann in Prozent umgerechnet. Es war jeweils der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler zu ermitteln, aus denen eine Dosis-Wirkungskurve erstellt wurde. Auf der y-Achse wurde die Änderung der Schlagfrequenz bzw. der Kontraktionskraft aufgetragen. Auf der x-Achse waren die Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ semilogarithmisch aufgezeigt. Ein Programm namens „Sigma Plot 9.0“ ermöglichte eine grafische Darstellung, aus der der EC_{50} -Wert abgelesen werden konnte, sofern er vorhanden war. Dieser Wert gab jene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ an, bei der die Chronotropie bzw. die Inotropie auf die Hälfte des Kontrollwertes gesunken war.

Mit dem Student-t-Test wurde die Signifikanz der Messergebnisse beurteilt. Signifikant waren Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($P < 0,05$) bzw. weniger als 1 % ($P < 0,01$). Messergebnisse, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1 % ($P < 0,001$) hatten, wurden als hochsignifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von MGtr1 auf das terminale Ileum

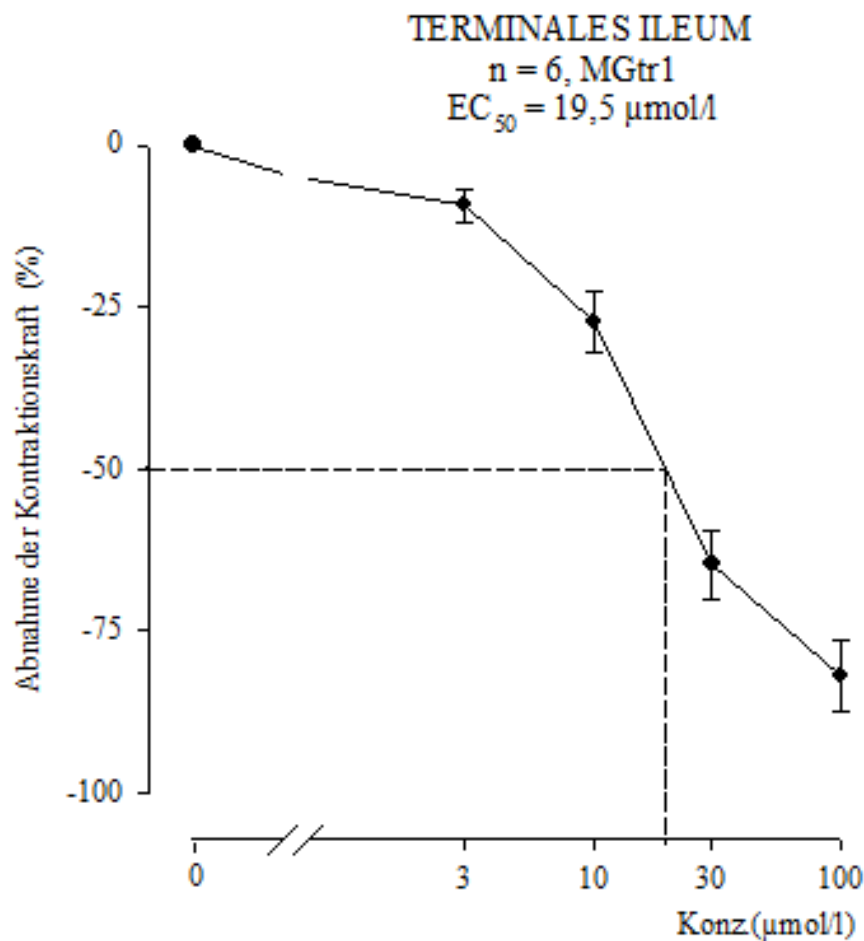
Bei den Versuchen am Darm wurde die Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktion des Darms untersucht. Dazu wurden 5 Versuche durchgeführt. Der Versuchsablauf erfolgte wie bereits in Kapitel 3.5.5 beschrieben. Das präparierte Darmstück wurde in die Apparatur II eingespannt und mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung vorkontrahiert. Die Kontraktionen wurden auf einen Schreiber übertragen, der eine Kurve auf das Millimeterpapier übertrug. Die unterschiedlichen Abstände von der Nulllinie zur Kurve bei Substanzzugabe wurden in Relation zum Kontrollwert gesetzt und in Prozent umgerechnet. Die Plateauphase zu Beginn des Versuches wurde als Kontrollwert gewertet und betrug somit 100 %. Kam es nun während des Versuches zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, war dies im kurvenförmigen Verlauf der Grafik ersichtlich. Der Abstand der Kurve zur Nulllinie wurde geringer. Des weiteren wurden auch Mittelwert und Standardfehler berechnet und alle Testergebnisse in nachfolgender Tabelle dargestellt.

MGtr1 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlic h-keit (P)
Kontrolle	9,18 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	8,33 $\pm$ 0,74	-9,42 $\pm$ 2,57	6	0,05
10	6,7 $\pm$ 0,72	-27,37 $\pm$ 4,73	6	0,01
30	3,35 $\pm$ 0,66	-64,77 $\pm$ 5,36	6	0,01
100	1,69 $\pm$ 0,51	-81,92 $\pm$ 5,45	6	0,001

Tabelle 6: Wirkung von MGtr1 auf das terminale Ileum

In dieser Tabelle wurden der arithmetische Mittelwert (fc) und der Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Ergebnisse wurden in mN und in % angeführt.

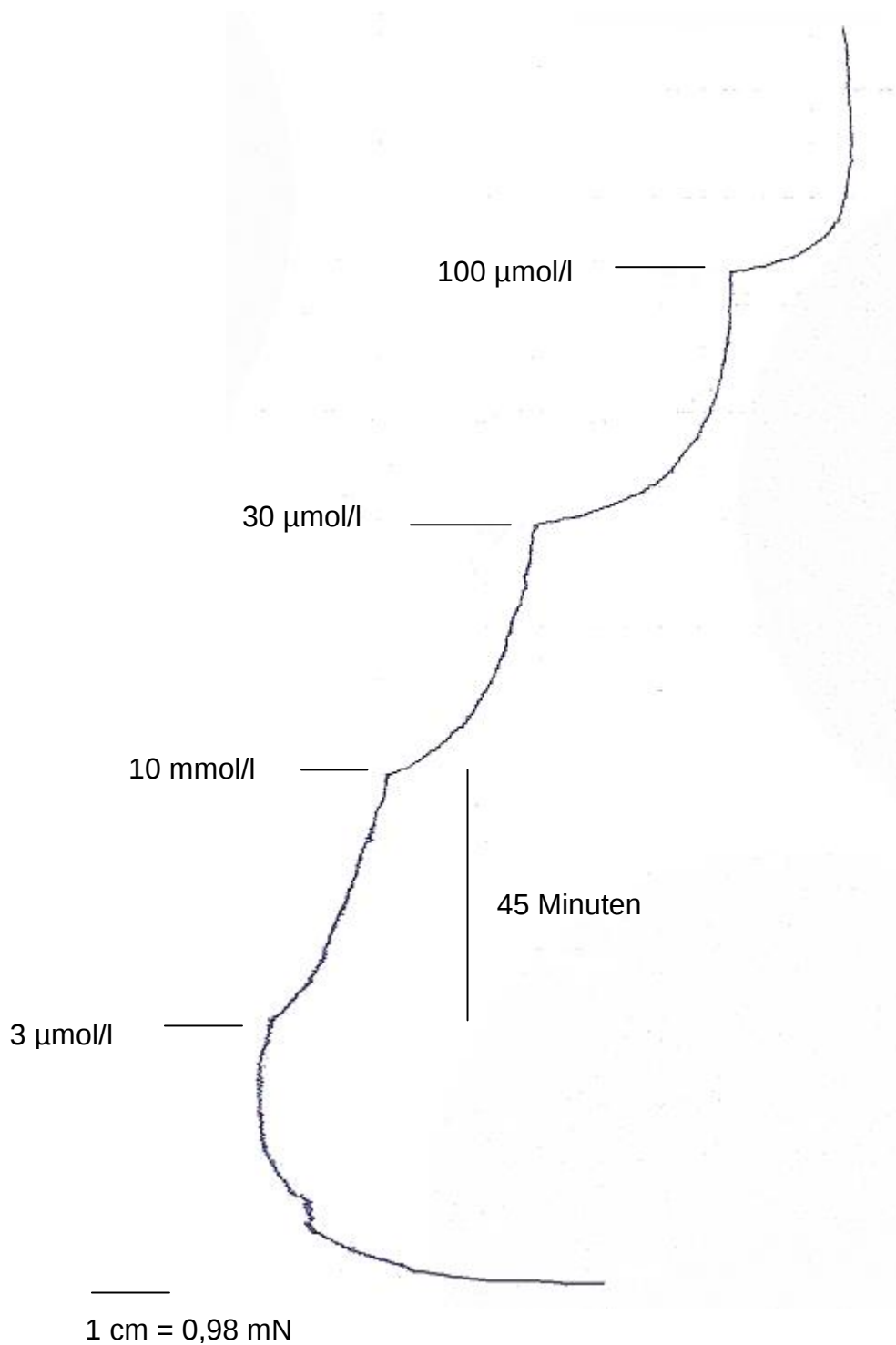
Abbildung 7 Konzentrations- Wirkungskurve von MGtr1 am terminalen Ileum



Dieser Graph zeigt die Wirkung von MGtr1 auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums. Auf der Abszisse wurde die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen die Mittelwerte dar und die senkrechten Striche durch die Punkte zeigen die Standardfehler.

Wie man an dieser Kurve erkennen kann, zeigt sich eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft des Darms. Es konnte auch ein EC₅₀-Wert erreicht werden. Er liegt bei 19,5 µmol/l, das bedeutet, dass es bei dieser Konzentration zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um die Hälfte kam.

Abbildung 8 Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr1 auf das terminale Ileum



Zwischen den einzelnen Substanzzugaben lagen jeweils 45 Minuten. Der relaxierende Effekt ist anhand der Kurve deutlich erkennbar. Der spasmolytische Effekt wird mit zunehmender Substanzkonzentration im Organbad immer stärker.

4.2 Wirkung von MGtr1 auf die Arteria pulmonalis

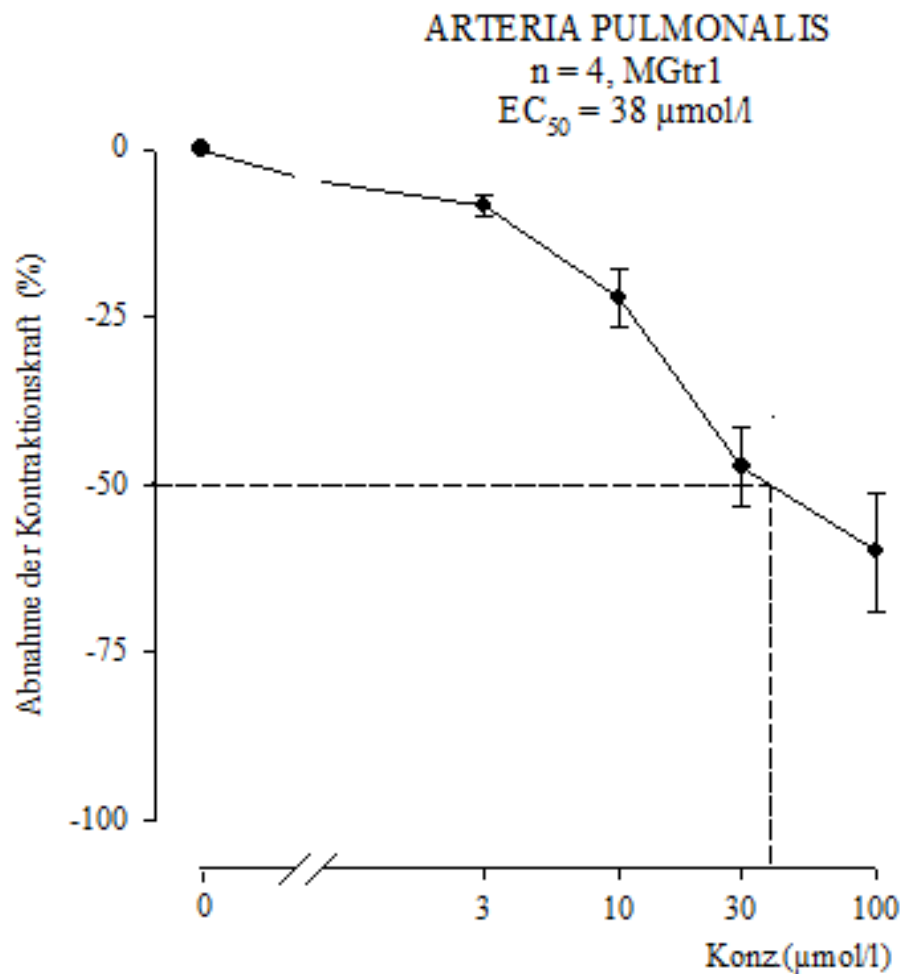
An der Pulmonalarterie wurde die Substanz MGtr1 auf einen dilatierenden Effekt untersucht. Die Versuche wurden wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden 4 Versuche durchgeführt. Es wurde die ringförmige Pulmonalarterie in die Apparatur II eingespannt und mittels 90 mmolarer KCl-Lösung eine maximale Kontraktion ausgelöst, die als Kontrollwert diente und bei der Dokumentation wieder als 100 % angegeben wurde. Die restlichen Messungen wurden zu diesem Wert in Verhältnis gesetzt. Bei diesem Versuch entstand durch die Aufzeichnung des Schreibers auch wieder eine durchgehende Kurve, die den dilatierenden Effekt zeigt.

Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte (fc) und die jeweiligen Standardfehler (SEM) in mN und %, die aus den 4 Versuchen hervorgehen.

MGtr1 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlic h-keit (P)
Kontrolle	12,37 $\pm$ 1,17	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
3	11,31 $\pm$ 1,01	-8,37 $\pm$ 1,48	4	0,05
10	9,67 $\pm$ 0,78	-22,12 $\pm$ 4,24	4	0,05
30	6,57 $\pm$ 0,75	-47,26 $\pm$ 5,75	4	0,01
100	3,98 $\pm$ 0,65	-59,92 $\pm$ 8,82	4	0,01

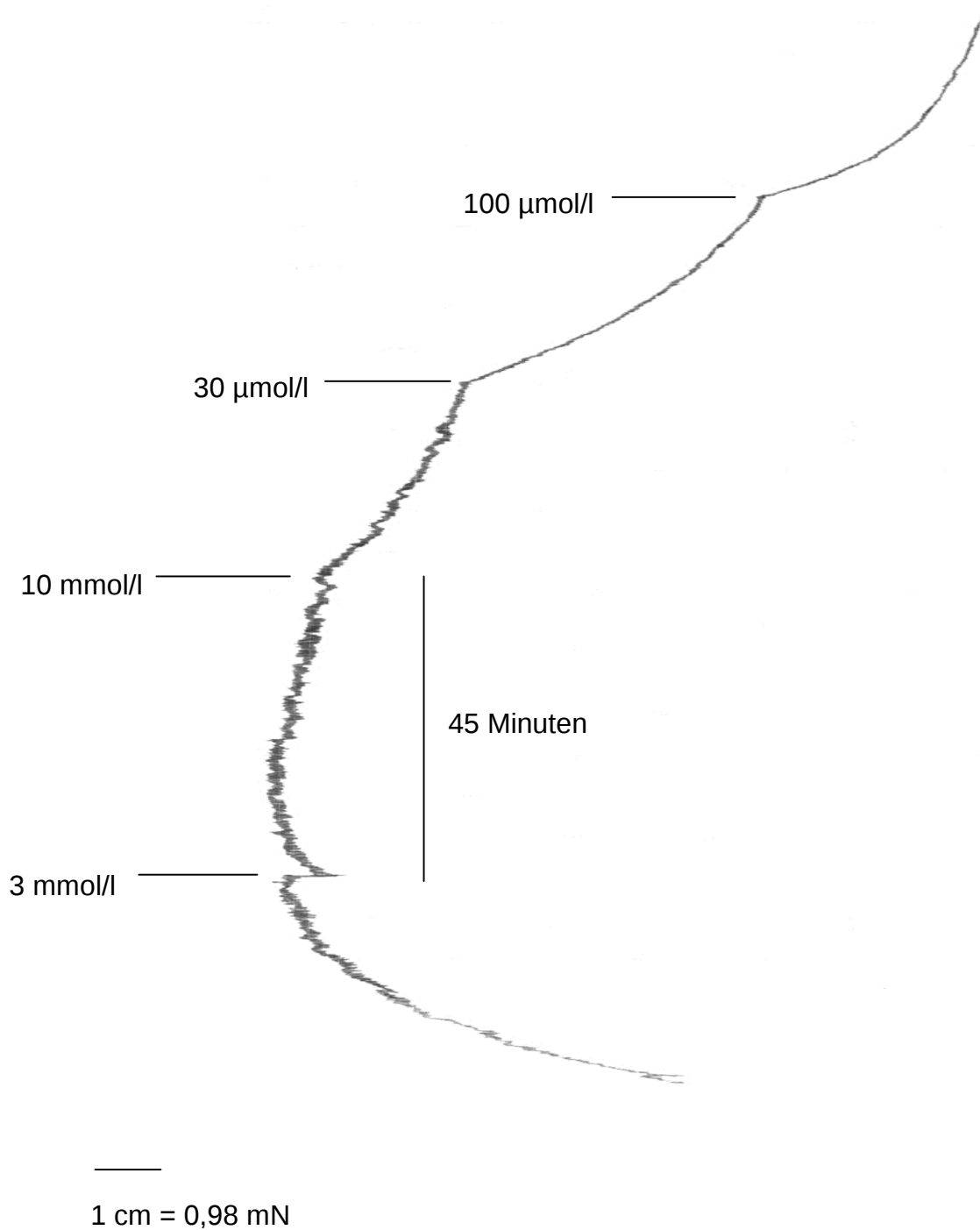
Tabelle 10: Wirkung von MGtr1 auf die Arteria pulmonalis

Abbildung 9 Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr1 an der Arteria pulmonalis



Auf der x-Achse wurde halblogarithmisch die Konzentration in µmol/l eingetragen, die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen wieder die Mittelwerte der Versuchsergebnisse dar und die senkrechten Striche die Standardfehler. Bei dieser Kurve ist wieder eine deutliche Abnahme der Kontraktion zu erkennen. Der EC₅₀-Wert liegt hier bei 38 µmol/l.

Abbildung 10 Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr1 auf die Pulmonalarterie



Die Kurve zeigt eindeutig eine Abnahme der Kontraktionskraft der Pulmonalarterie nach Zugabe von MGtr1. Vor allem ab einer Konzentration von 10 µmol/l sieht man eine deutliche Änderung der Kurve.

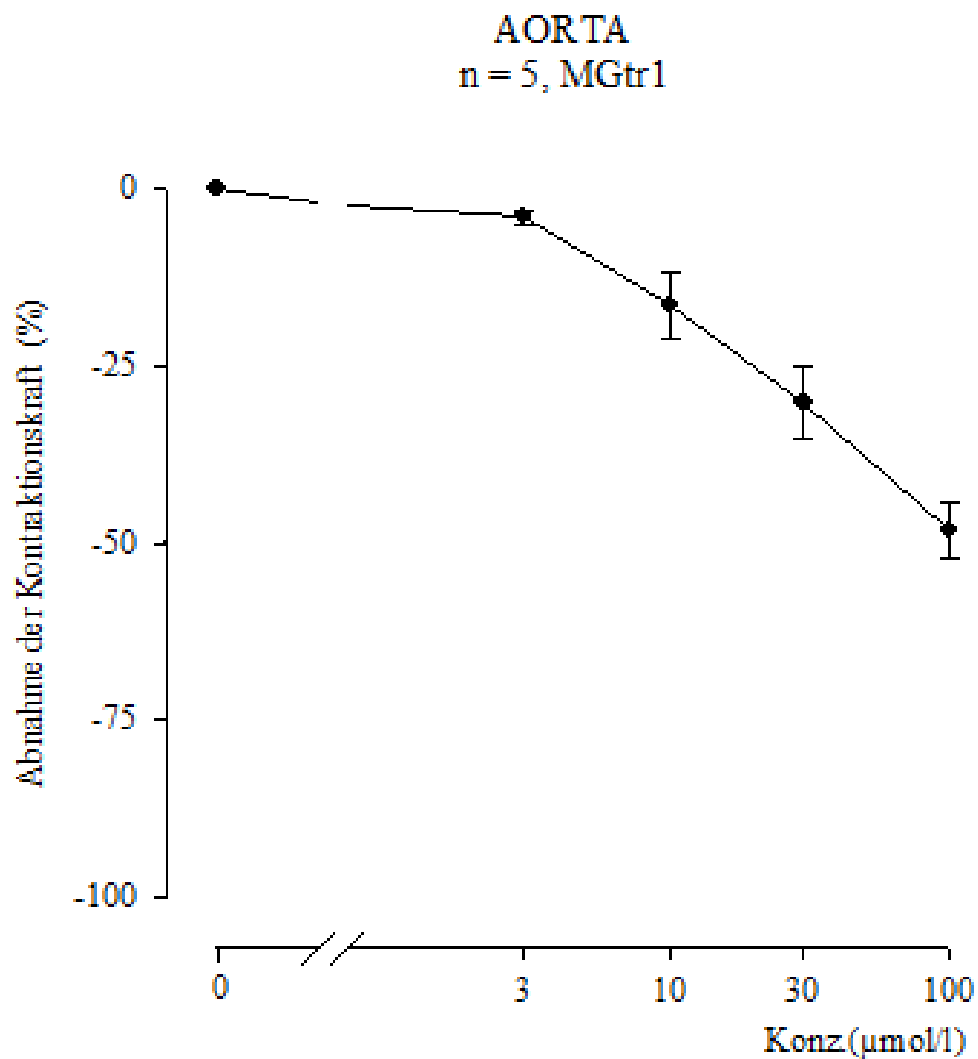
4.3 Wirkung von MGtr1 auf die Aorta descendens

Es waren 5 Versuche notwendig, um die Wirkung von MGtr1 auf die Aorta genau zu untersuchen. Dazu wurde, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, das ringförmige Aortenstück in die Apparatur II eingespannt und nach der Eingewöhnungszeit mit 90 mmolaren KCl-Lösung maximal kontrahiert, was wieder als Kontrollwert genommen wurde und 100 % entsprach. Es wurde im Laufe des Versuches eine durchgehende Kurve aufgezeichnet. Die jeweiligen Abstände von der Nulllinie zu den Punkten, die nach der Substanzzugabe markiert wurden, wurden wieder in Relation zum Referenzwert gesetzt. Es wurden von den einzelnen Messergebnissen die arithmetischen Mittelwerte (fc) und Standardfehler (SEM) berechnet. Die Kontraktionskraft wird sowohl in % als auch in mN angegeben. Nachfolgende Tabelle enthält sämtliche Werte.

MGtr1 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlic h-keit (P)
Kontrolle	10,88 $\pm$ 0,77	0,00 $\pm$ 0,00	5	-
3	10,46 $\pm$ 0,74	-3,87 $\pm$ 0,88	5	n.s.
10	9,08 $\pm$ 0,77	-16,27 $\pm$ 4,74	5	0,05
30	7,56 $\pm$ 0,71	-30,13 $\pm$ 5,03	5	0,01
100	5,61 $\pm$ 0,53	-48,18 $\pm$ 3,81	5	0,01

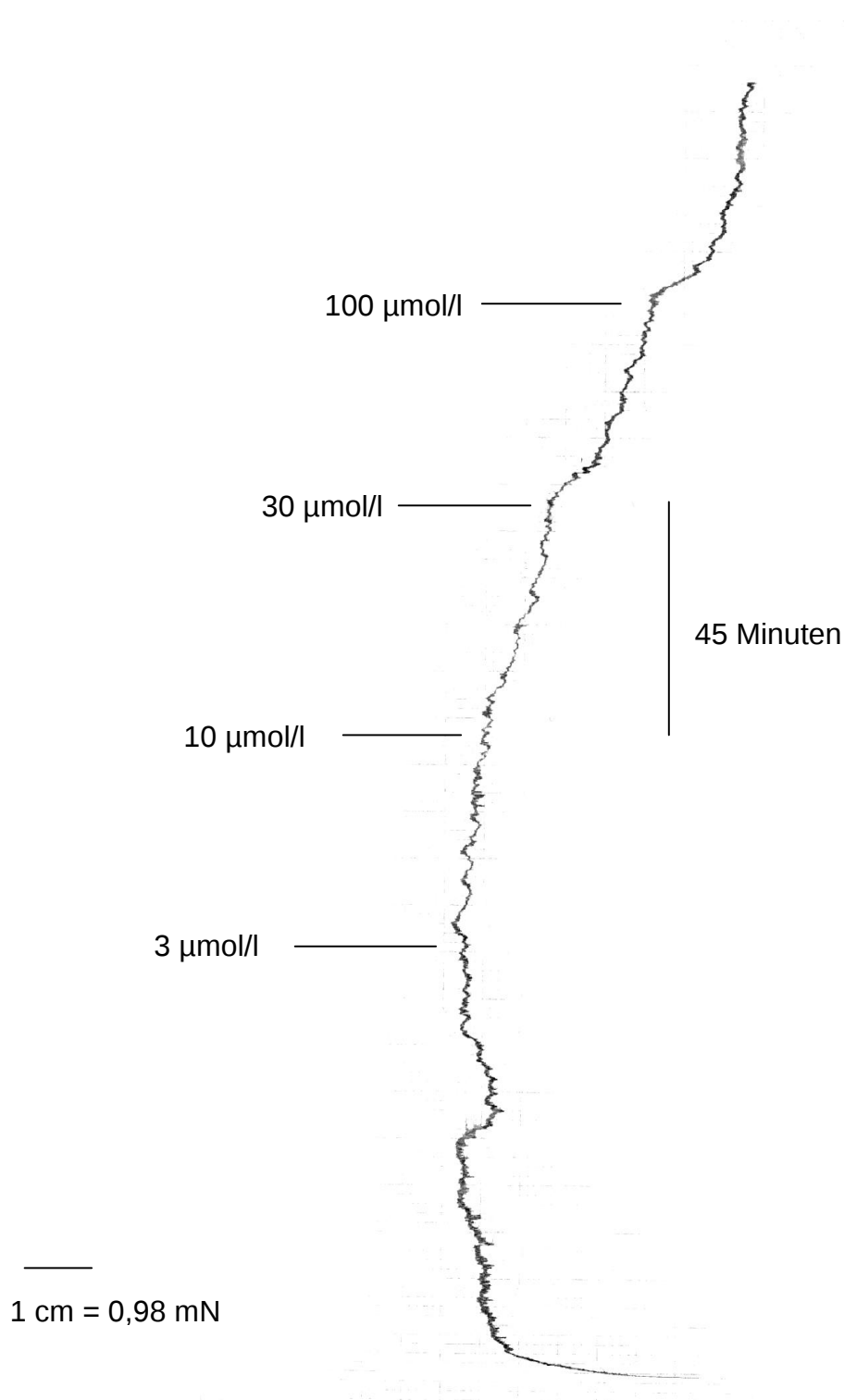
Tabelle 11: Wirkung von MGtr1 auf die Aorta descendens

Abbildung 11 Konzentration-Wirkungskurve von MGtr1 an der Aorta



Die Abszisse zeigt die halblogarithmisch aufgetragenen Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$, auf der Ordinate ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent angegeben. Der Graph zeigt auch hier eine Abnahme der Kontraktionskraft infolge der Substanzzugabe. Ein EC_{50} -Wert wurde bis zur Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ nicht erreicht.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr1 auf die Aorta descendens



Der dilatierende Effekt von MGtr1 auf die Aorta ist anhand dieser Originalabbildung zu sehen, wenn er auch weniger dilatierend ausfällt, als auf Darm und Pulmonalarterie. Auch hier wurde kein EC_{50} -Wert erreicht.

4.4 Wirkung von MGtr1 auf den Musculus papillaris

Mit den Versuchen am Papillarmuskel wurde untersucht, ob die Substanz MGtr1 positiv oder negativ inotrop wirkt. Für diese Untersuchung waren 4 Versuche notwendig. Dazu wurde der Musculus papillaris, wie schon in Kapitel x erörtert, in die Apparatur I eingespannt und wenn sich der Muskel an das Milieu angepasst hatte, konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden. Waren diese konstant, wurden sie als Referenzmessungen für die spätere Auswertung herangezogen und man begann mit der Substanzzugabe. Alle 45 Minuten erfolgte eine weitere Applikation der Testsubstanz. Um die Aufzeichnungen auszuwerten wurden die Amplituden mit einem Lineal abgemessen und mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert und dann meistens noch mit 0,4 multipliziert, da diese Versuche bei 2 mV durchgeführt wurden.

Es wurde bei den Versuchen am Papillarmuskel kein EC_{50} -Wert erreicht.

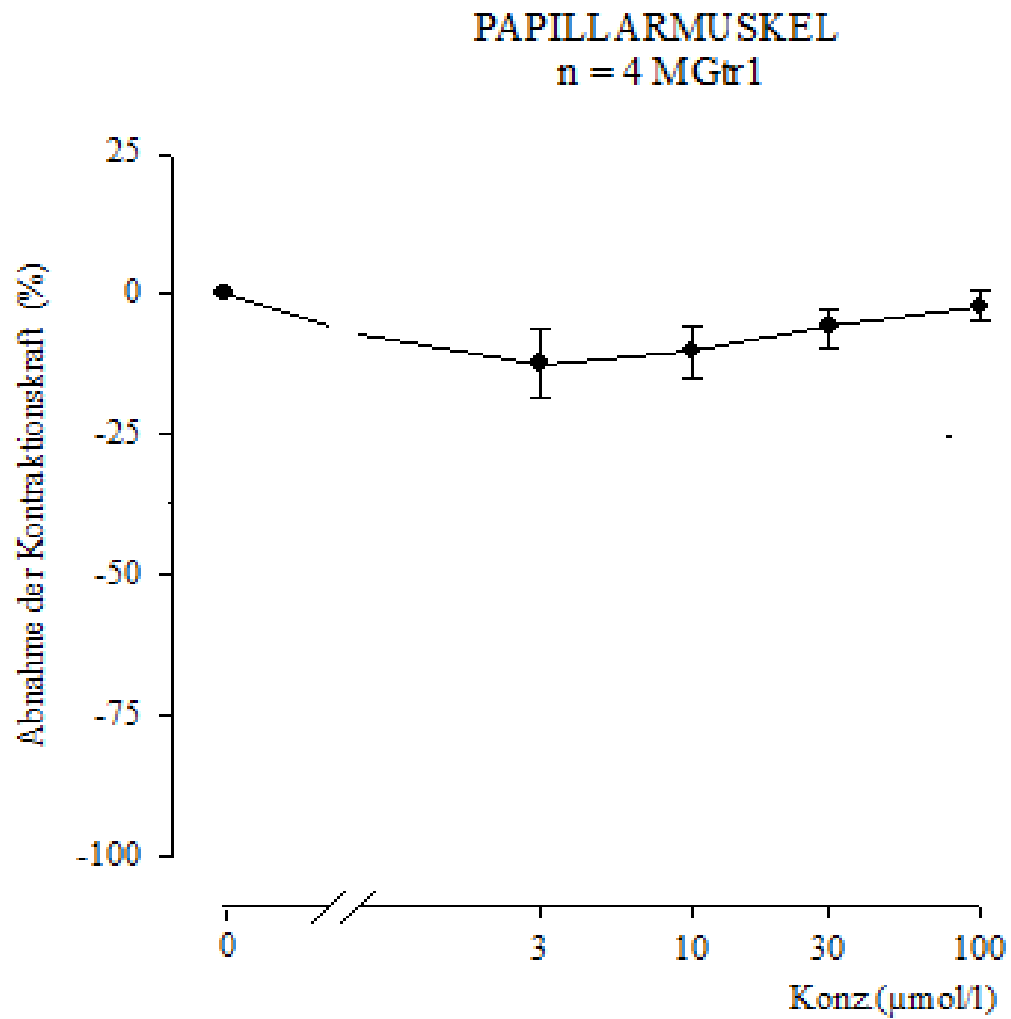
Die ermittelten arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) werden durch folgender Tabelle veranschaulicht.

MGtr1 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlic h-keit (P)
Kontrolle	$1,38 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$1,21 \pm 0,17$	$-12,36 \pm 6,04$	4	n.s.
10	$1,24 \pm 0,15$	$-10,30 \pm 4,59$	4	n.s.
30	$1,30 \pm 0,16$	$-5,94 \pm 3,44$	4	n.s.
100	$1,34 \pm 0,10$	$-2,18 \pm 2,68$	4	n.s.

Tabelle 12: Wirkung von MGtr1 auf den Musculus papillaris

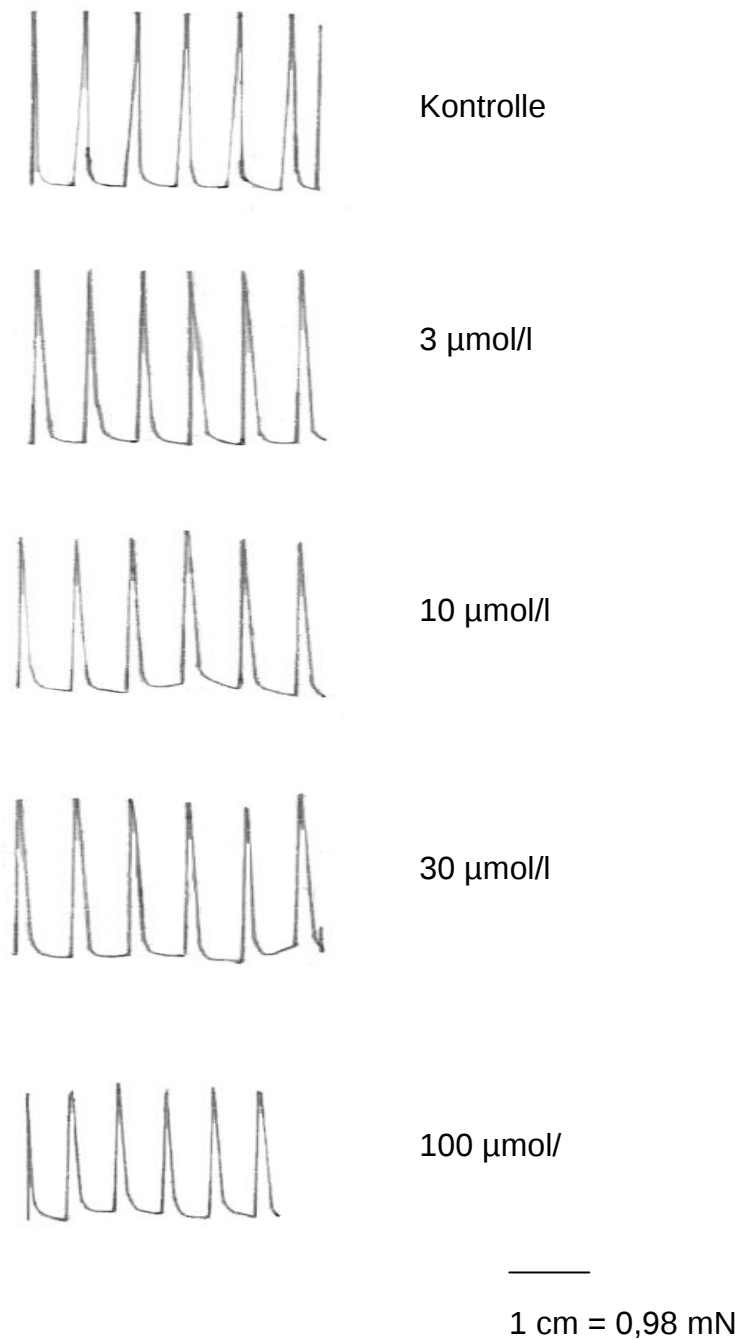
Anhand dieser Tabelle kann man erkennen, dass sich wenig in den Werten ändert. Der Graph wird das noch verdeutlichen.

Abbildung 13 Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr1 am Papillarmuskel



Auf der Abszisse kann die halblogarithmisch aufgetragene Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ entnommen werden, die Ordinate zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent.

Abbildung 14 Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr1 auf den Musculus papillaris



Der Unterschied in der Amplitudenhöhe zwischen den einzelnen Messungen ist nicht signifikant, das heißt es war durch MGtr1 kaum eine Änderung der Inotropie zu verzeichnen.

4.5 Wirkung von MGtr1 auf das Atrium cordis dextrum

Bei den Untersuchungen am Vorhof wurde getestet, welchen Einfluss die Testsubstanz MGtr1 auf die Chronotropie hat. Dazu wurden 5 Versuche, wie schon in Kapitel x erläutert, durchgeführt. Der fertig präparierte Vorhof wurde in die Apparatur I eingehängt und bis zur Konstanz Kontrollmessungen gemacht. Dann wurde mit dem Einbringen der Testsubstanz begonnen und alle 5 Minuten wieder eine Messung genommen. Nach Ablauf von 45 Minuten wurde wieder eingespritzt. Am Ende des Versuchs zählte man die Schläge und multiplizierte mit 5, um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten. Die Kontrollmessung wurde gleich 100 % gesetzt und die Folgemessungen dazu in Verhältnis gesetzt.

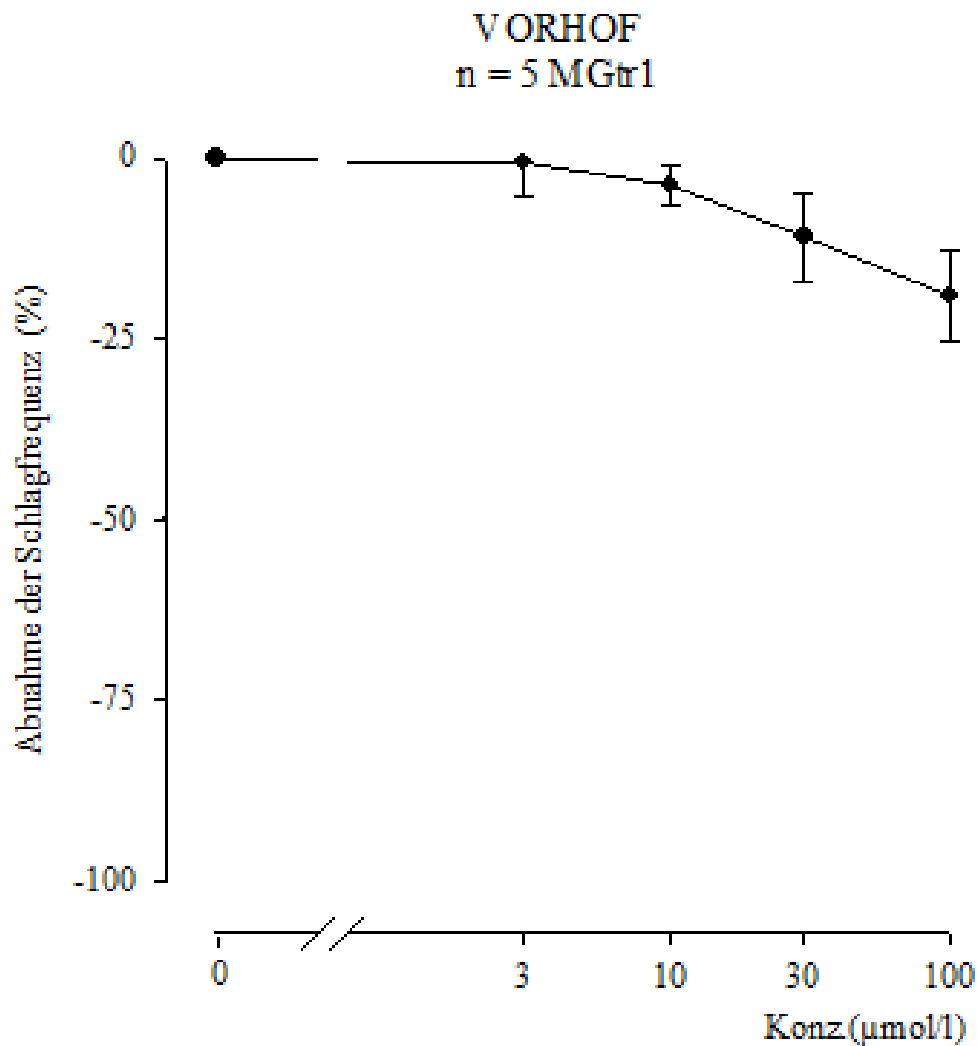
In nachfolgender Tabelle sind die erhaltenen Mittelwerte und deren Standardfehler aufgelistet. Die Schlagfrequenz wurde in Schläge pro Minute und in % aufgezählt.

MGtr1 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlic h-keit (P)
Kontrolle	187 $\pm$ 10,32	0,00 $\pm$ 0,00	5	-
3	184 $\pm$ 5,57	-0,77 $\pm$ 4,56	5	n.s.
10	179 $\pm$ 6,78	-3,8 $\pm$ 2,68	5	n.s.
30	166 $\pm$ 11,98	-10,96 $\pm$ 6,00	5	0,05
100	150 $\pm$ 10,12	-19,15 $\pm$ 6,31	5	0,05

Tabelle 13: Wirkung auf den rechten Vorhof von MGtr1

Wie schon aus den Werten hervorgeht, ändert sich die Schlagfrequenz gering. Eine leichte Abnahme der Chronotropie infolge von vermehrter Substanzzugabe ist ersichtlich. Der Graph über die Dosis-Wirkungskurve soll das noch verdeutlichen.

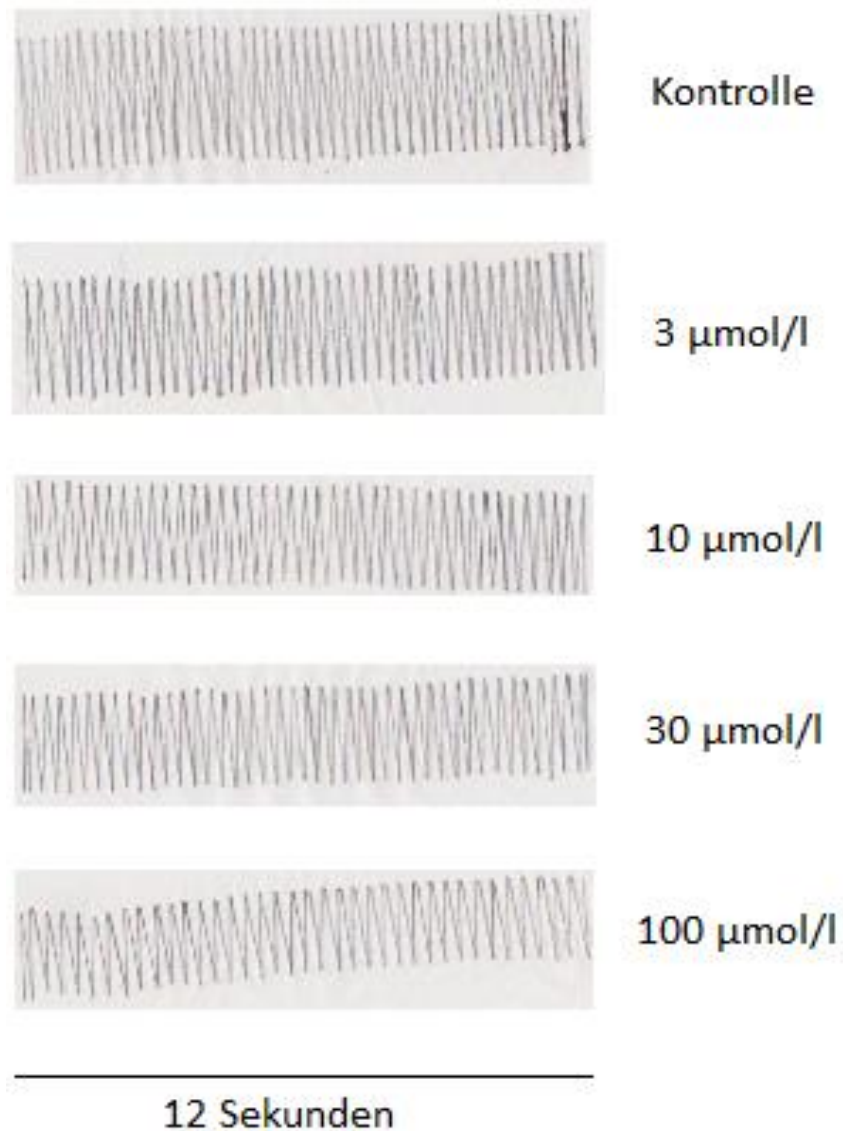
Abbildung 15 Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr1 am rechten Vorhof



Die Grafik zeigt, dass die Testsubstanz MGtr1 eine leichte Senkung der Herzfrequenz verursacht, also negativ chronotrop wirkt.

Die x-Achse zeigt die Konzentration in µmol/l und auf der y-Achse ist die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent dargestellt. Die Punkte dienen der Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und die senkrechten Balken durch diese symbolisieren die Standardfehler. Es konnte bei diesem Versuch kein EC₅₀-Wert erreicht werden.

Abbildung 16 Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr1 auf den rechten Vorhof



Der Unterschied in der Schlagfrequenz zwischen den einzelnen Messungen ist nicht signifikant, das heißt es war durch MGtr1 kaum eine Änderung der Chronotropie zu verzeichnen.

4.6 Untersuchung des Wirkmechanismus von MGtr1 am terminalen Ileum

Die zu untersuchende Substanz MGtr1 zeigte am Darm einen stark dilatierenden Effekt. Um den zugrundeliegenden Wirkmechanismus genauer untersuchen zu können, wurden weitere Versuchsreihen mit dem Antagonisten Glibenclamid durchgeführt. Dazu wurde Glibenclamid in 2 voneinander unabhängigen Versuchen in 2 verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

4.6.1 Wirkung von MGtr1 unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 μmol

Glibenclamid ist, wie bereits in Kapitel 3.5.7 beschrieben, ein ATP-abhängiger Kaliumkanal-blocker, der bei diesem Versuch verwendet wird, um eventuell erkennen zu können, ob die dilatierende Wirkung der Substanz MGtr1 auf einer Öffnung der K_{ATP} -Kanäle des Darms beruht.

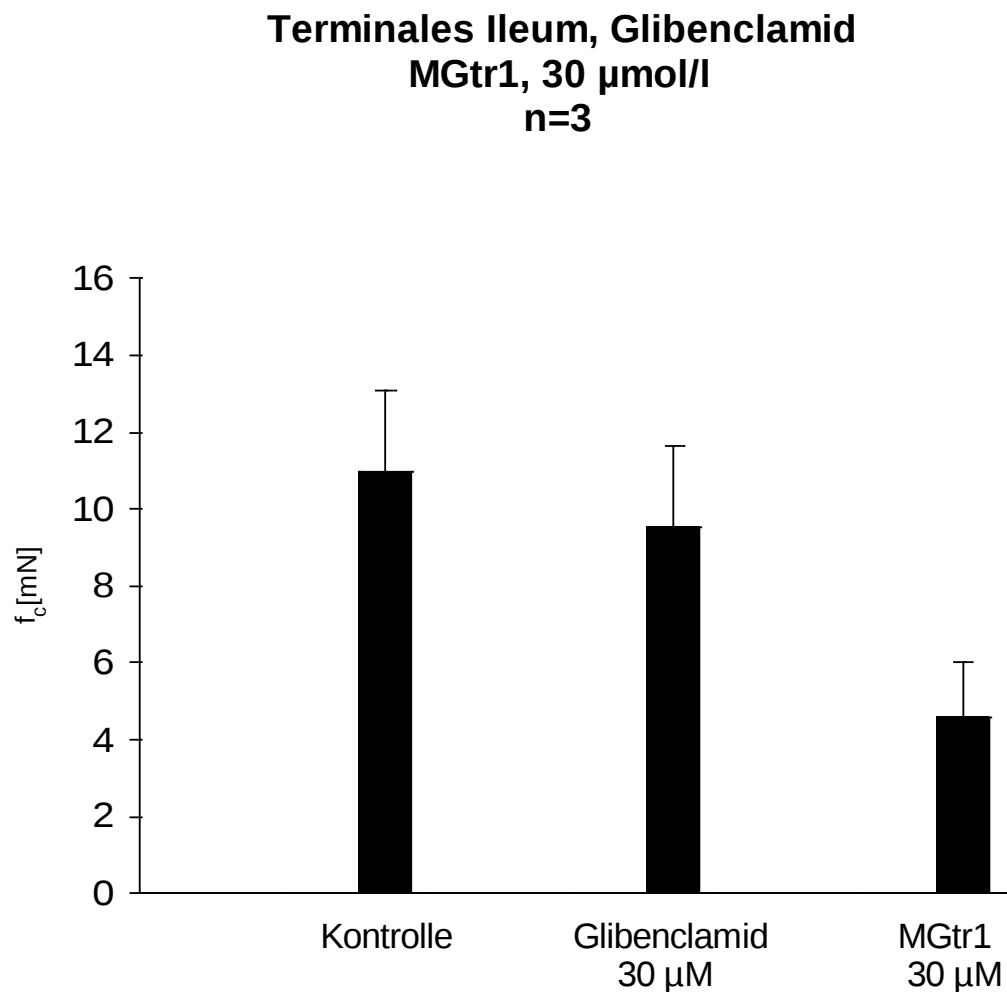
Nachdem der Darm eingespannt und maximal kontrahiert hatte, wurden 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid dem Organbad zugefügt. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten wurden 30 $\mu\text{mol/l}$ von der zu untersuchenden Substanz MGtr1 zugegeben. Nach weiteren 45 Minuten wurde der Versuch beendet.

Es wurden drei Versuche durchgeführt. Die arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) sind in mN in nachfolgender Tabelle angeführt.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit t (P)
Kontrolle	$10,97 \pm 2,10$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$9,52 \pm 2,11$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1	$4,57 \pm 1,43$	3	0,05

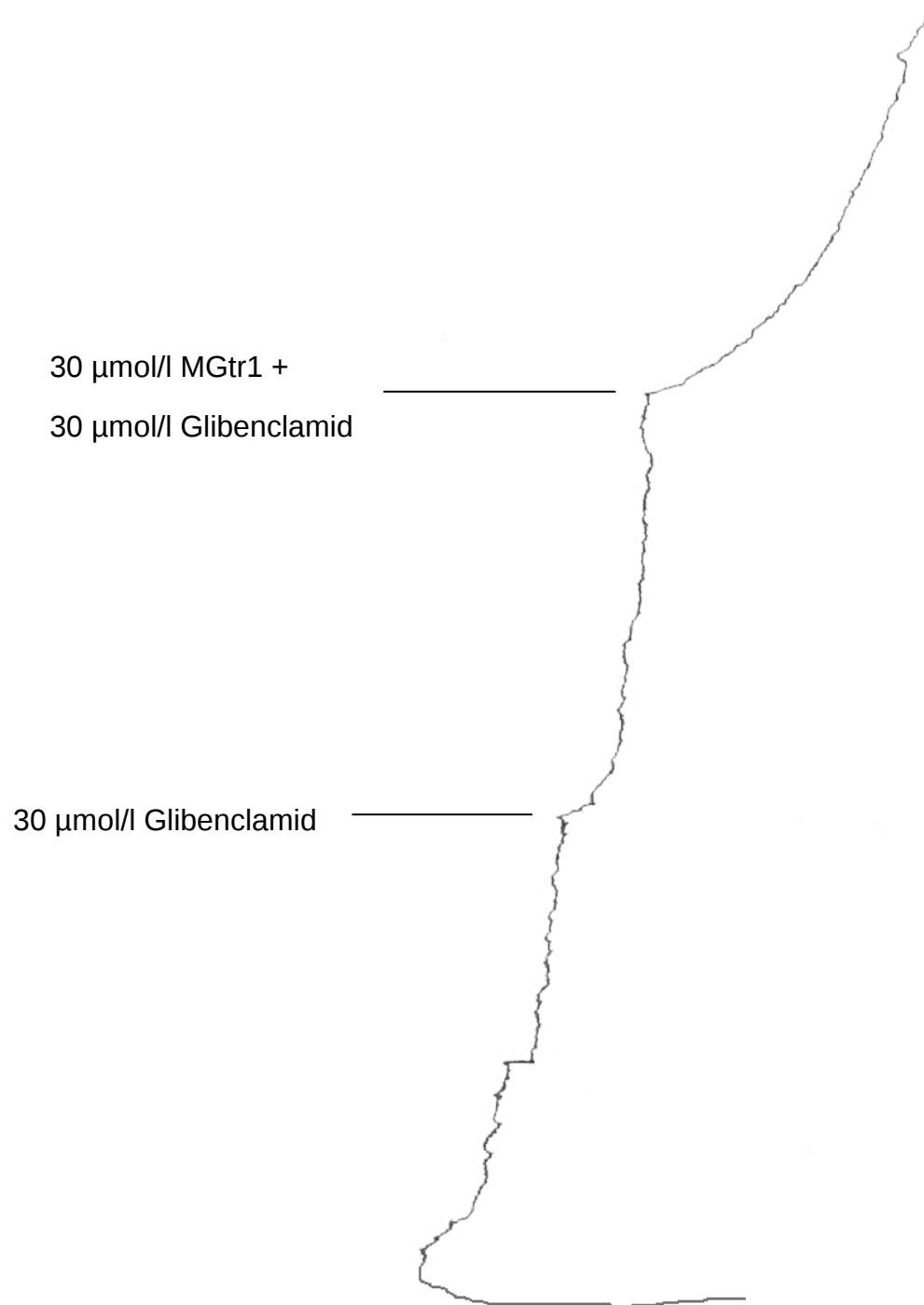
Tabelle 14: Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid auf das terminale Ileum unter Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1

Abbildung 17 Graphische Darstellung der Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid unter Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1



Auf der Abszisse wurden die Mittelwerte der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN. Der erste Balken zeigt die Kontrolle, der mittlere Balken stellt die Kontraktionskraftänderung am terminalen Ileum durch 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid dar und der letzte Balken gibt die Kombination von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1 an. Die Balken wurden aus den Mittelwerten der drei Versuche gebildet, die Standardabweichungen werden durch die dünnen senkrechten Striche darüber dargestellt.

Abbildung 18 Originalaufzeichnung der Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid unter Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1



Die Originalabbildung zeigt deutlich, dass es bei der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Durch Applikation von MGtr1 konnte das terminale Ileum sogar noch weiter dilatiert werden. Der Zeitpunkt der Substanzzugabe wurde durch die waagrechten Linien markiert.

4.6.2 Wirkung von MGtr1 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol

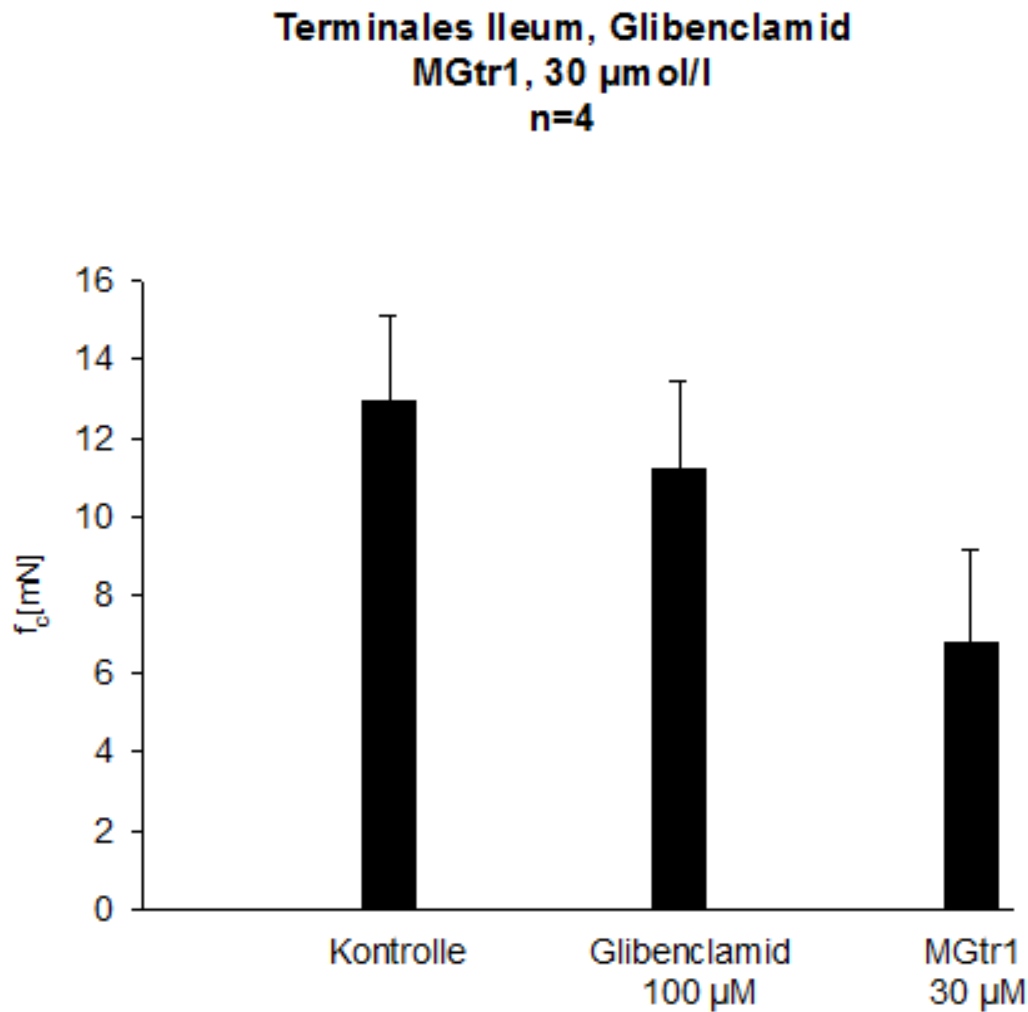
Bei diesem Versuch wurde nach maximaler Kontraktion des terminalen Ileums 100 µmol/l Glibenclamid zugesetzt und nach 45 Minuten wieder 30 µmol/l MGtr1. Dazu wurden vier Versuche durchgeführt.

Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkei t (P)
Kontrolle	8,03 ± 0,95	4	-
100 µmol Glibenclamid	4,06 ± 1,02	4	-
30 µmol/l MGtr1	0,75 ± 0,40	4	0,05

Tabelle 15: Wirkung von MGtr1 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol

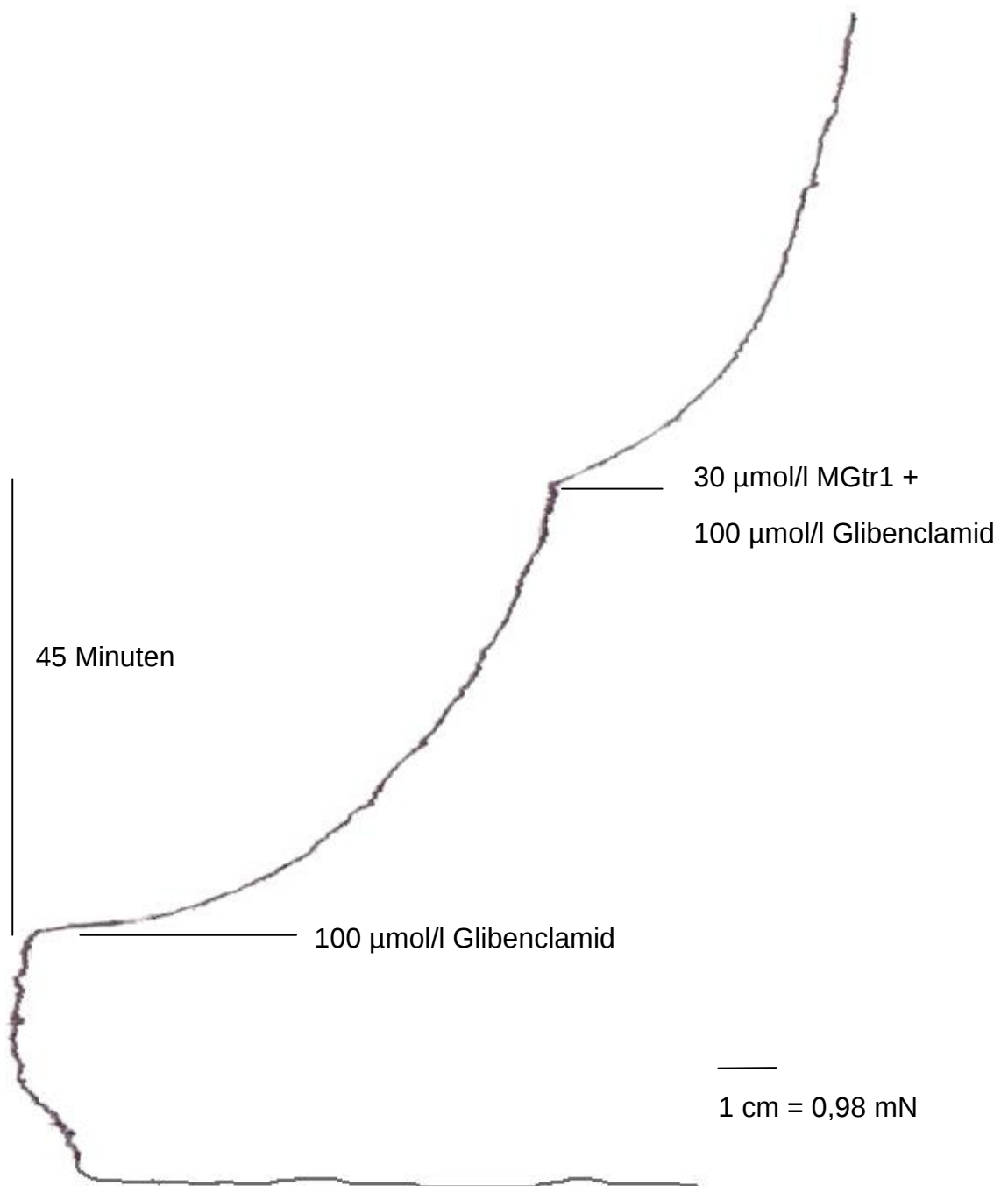
Die Tabelle gibt wieder die ermittelten arithmetischen Mittelwerte (f_c) und die jeweiligen Standardabweichungen (SEM) in mN an.

Abbildung 19 Graphische Darstellung der Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid unter Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1



Auf der x-Achse wurden die Mittelwerte der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Die Balken zeigen die Kontrolle, die Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und die Kontraktionskraftänderung durch zusätzliche Gabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1. Die Mittelwerte der vier Versuche bildeten die Balken, die senkrechten Striche darüber markierten die Standardabweichungen.

Abbildung 20 Originalabbildung der Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid unter Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1



Durch die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums, durch eine zusätzliche Gabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MGtr1 konnte diese Dilatation sogar verstärkt werden. Die Zugabe der einzelnen Substanzen wurde durch waagrechte Linien markiert.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die neu synthetisierte Substanz MGtr1 eine Wirkung an isolierten Meerschweinchenorganen hervorruft. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Versuchsabläufe und ihre Ergebnisse erörtert, im folgenden Kapitel wird auf die Bewertung dieser Daten eingegangen.

5.1 Wirkung von MGtr1 auf die Herzmuskulatur

Vom Herzmuskel wurden der rechte Vorhof und der Papillarmuskel verwendet. Es wurde beim Vorhof auf eine eventuelle Änderung der Schlagfrequenz untersucht und beim Papillarmuskel auf eine Ab- oder Zunahme der Kontraktionskraft. Bei keinem der beiden Untersuchungen wurde ein EC_{50} -Wert erreicht.

In folgender Tabelle wird die Wirkung auf die Herzmuskelpräparate verglichen.

Organpräparat	MGtr1 f bzw. fc (%) ± SEM bei 100 µmol/l
Rechter Vorhof	-19,15 ± 6,31
Papillarmuskel	-2,18 ± 2,68

Tabelle 16: Vergleich Papillarmuskel und rechter Vorhof

Man kann erkennen, dass MGtr1 eigentlich keine Wirkung auf den Musculus papillaris hat. Bei 100 µmol/l liegt die Abnahme der Kontraktionskraft bei $2,18 \pm 2,68$ %. Am rechten Vorhof kommt es zu einer leichten Verringerung der Schlagfrequenz, also wirkt die Testsubstanz hier gering negativ chronotrop. In Prozent kam es zu einer Abnahme von $19,15 \pm 6,31$ % verglichen mit dem Kontrollwert.

5.1.1 Wirkung auf den rechten Vorhof

Anhand der 5 Versuche am rechten Vorhof wurde für die Kontrolle ein Mittelwert von $187 \pm 10,32$ Schläge pro Minute ermittelt. Durch Zugabe der zu untersuchenden Substanz MGtr1 kam es zu einer geringen Abnahme der Schlagfrequenz. Bei einer Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ lag diese bei $150 \pm 10,12$ Schlägen pro Minute. Das entspricht einer Abnahme von $19,15 \pm 6,31 \%$.

5.1.2 Wirkung auf den Papillarmuskel

Die Wirkung auf den Papillarmuskel wurde in 4 Versuchen untersucht. Dabei erhielt man den durchschnittlichen Kontrollwert von $1,38 \pm 0,14$ mN. Nach Applikation der Testsubstanz änderte sich dieser Wert kaum. Bei einer Endkonzentration im Organbad von $100 \mu\text{mol/l}$ wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft von $2,18 \pm 2,68 \%$ verzeichnet.

5.2 Wirkung von MGtr1 auf glattmuskuläre Organe

Die verwendeten glattmuskulären Organe waren Aorta, Pulmonalarterie und das terminale Ileum. Die jeweiligen Präparate wurden zu Beginn der Versuche maximal kontrahiert um dann die dilatierende Wirkung von MGtr1 zu testen.

Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle.

Organpräparat	MGtr1 fc (%) $\pm$ SEM bei $100 \mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta descendens	$-48,18 \pm 3,81$	$> 100 \mu\text{mol/l}$
Arteria pulmonalis	$-59,92 \pm 8,82$	$38,0 \mu\text{mol/l}$
Terminales Ileum	$-81,92 \pm 5,45$	$19,5 \mu\text{mol/l}$

Tabelle 17: Vergleich der glattmuskulären Organe

Anhand dieser Tabelle ist zu erkennen, dass die Wirkung von MGtr1 auf die glatte Muskulatur stärker ausfällt als auf die glatte Muskulatur. Es wurde bei der Pulmonalarterie und beim terminalen Ileum eine EC₅₀ erreicht, bei der Aorta gerade noch nicht. Es wurde

bei den glattmuskulären Organen eine starke Dilatation durch Zugabe der Testsubstanz erreicht, im Gegensatz dazu kam es bei den Herzmuskelpräparaten zu kaum einer Änderung.

5.2.1 Wirkung auf die Aorta descendens

An der Aorta wurden 5 Versuche durchgeführt und dabei ein Kontrollwert von $10,88 \pm 0,77$ mN ermittelt. Bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Reduktion der Kontraktionskraft von $48,18 \pm 3,81 \%$. Es war eine deutliche Dilatation der Aorta zu erkennen, aber ein EC_{50} -Wert wurde bei $100 \mu\text{mol/l}$ knapp nicht erreicht.

5.2.2 Wirkung auf die Pulmonalarterie

Für vergleichbare Ergebnisse an der Pulmonalarterie waren 4 Versuche notwendig. Nach maximaler Kontraktion wurde ein durchschnittlicher Kontrollwert von $12,37 \pm 1,17$ mN ermittelt. Nach Zugabe der letzten Substanzmenge wurde bei einer Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ eine Dilatation von $59,92 \pm 8,82 \%$ verzeichnet. Es wurde an diesem Organ ein EC_{50} -Wert bei $38 \mu\text{mol/l}$ erreicht. Anhand der Originalabbildung (siehe Abbildung **x**) kann man die Abnahme der Kontraktionskraft der Pulmonalarterie im Laufe des Versuches gut erkennen.

5.2.3 Wirkung auf das terminale Ileum

Während der 6 Versuche am Darm wurde ein durchschnittlicher Kontrollwert von $9,18 \pm 0,72$ mN errechnet. Die Substanz MGtr1 löste eine Dilatation am Darm aus und führte bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ zu einer Abnahme der Kontraktion um $81,92 \pm 5,45\%$. Der Endwert betrug $1,69 \pm 0,51$ mN. Es wurde auch ein EC_{50} -Wert erreicht, der bei $19,5 \mu\text{mol/l}$ lag. Nachdem die Substanz am Darm am stärksten dilatierend wirkt, wurde der Wirkmechanismus am Darm durchgeführt.

5.3 Wirkung von MGtr1 in Kombination mit Glibenclamid

Um den Wirkmechanismus von MGtr1 genauer zu untersuchen, wurde der Antagonist Glibenclamid zugesetzt. Dabei wurden zwei voneinander unabhängige Versuche gemacht. Bei einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid wurden 4 Versuche durchgeführt, bei

100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid wurden 3 Versuche gemacht. Es galt die Frage zu klären, ob die dilatierende Wirkung von MGtr1 auf den Darm auf eine Öffnung von ATP-abhängigen K^+ -Kanäle zurückzuführen ist. Dabei wurde die Testsubstanz in einer Konzentration von 30 mmol/l zugesetzt.

Bei den Versuchen mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid war ersichtlich, dass es zu einer leichten Dilatation des Darms durch MGtr1 kam, was durch eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid noch stärker zu erkennen war. Somit kann eine alleinige Dilatation durch Beteiligung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle ausgeschlossen werden. Die Abnahme der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz geht wahrscheinlich auf einen anderen Wirkmechanismus zurück.

6 Zusammenfassung

Während dieser Diplomarbeit wurde die biologische Wirkung der Testsubstanz MGtr1 an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Für die Versuche wurden sowohl glatt-muskuläre Organe (Arteria pulmonalis, Aorta descendens, terminales Ileum) als auch Teile der Herzmuskulatur (Artrium dextrum, Musculus papillaris) verwendet.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden von jedem Organ mindestens 4 vergleichbare Werte ermittelt. Die zu untersuchende Substanz wurde nach Erreichen des Steady-State in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben. Nach dem jeweiligen Verstreichen von 45 Minuten wurde erneut Substanz zugefügt um die jeweiligen Konzentrationen von 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad zu erhalten. Nach Zugabe der letzten Substanzmenge wurde der Versuch nach Ablauf von weiteren 45 Minuten beendet und die Ergebnisse ausgewertet.

Am rechten Vorhof wurde der Einfluss von MGtr1 auf die Chronotropie untersucht. Versuche am Papillarmuskel waren notwendig um die Wirkung auf die Inotropie zu ermitteln. An der Aorta, der Pulmonalarterie und dem Darm wurde eine Änderung der Kontraktionskraft untersucht.

Die Substanz MGtr1 führte bei allen glatt-muskulären Organen zu einer Dilatation. Am stärksten war die Abnahme der Kontraktionskraft am terminalen Ileum ausgeprägt. Es wurde hier ein EC_{50} -Wert von 19,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Auch durch die dilatierende Wirkung auf die Pulmonalarterie wurde ein EC_{50} -Wert von 38 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Die Dilatation der Aorta betrug am Ende der Versuche einen mittleren Wert von $-48,18 \pm 3,81\%$.

Auf die Herzmuskelpräparate hatte MGtr1 kaum eine Wirkung. Es wurde eine Abnahme der Schlagfrequenz von $19,15 \pm 6,31\%$ beim Vorhof und eine Abnahme der Kontraktionskraft um $2,18 \pm 2,68\%$ beim Papillarmuskel beobachtet.

Um den möglichen Wirkmechanismus von MGtr1 genauer zu untersuchen wurden weitere Versuche am Darm gemacht. Dabei wurde der Antagonist Glibenclamid eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die ATP-abhängigen Kaliumkanäle nur zum Teil am Zustandekommen der Wirkung der Testsubstanz MGtr1 beteiligt sind und wahrscheinlich auch noch andere Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

7 Literaturverzeichnis

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

Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiehbach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Teylor JO, Hennekens CH (1990) Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. Lancet 335:827-838

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

Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN (2004) Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369:151-159

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Kortnig M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

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

Turnbull F, Neal B, Ninomiya T, Algert C, Arima H, Barzi F, Bulpitt C, Chalmers J, Fagard R, Gleason A, Heritier S, Li N, Perkovic V, Woodward M, McMahon S (2008) Effects of different regimens to lower blood pressure on major cardiovascular events in older and younger adults: meta-analysis of randomised trials. Br Med J 336:1121-1123

8 Curriculum vitae

Zu meiner Person

Name	Lisa-Maria Jirasko
Geburtsdatum	4. Oktober 1985
Staatsbürgerschaft	Österreich

Schul Ausbildung

1992 bis 1996	Volksschule in Katzelsdorf
1996 bis 2004	Klemens - Maria Hofbauer Gymnasium in Katzelsdorf
Juni 2004	Matura
seit Oktober 2004	Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung

Sommer 2006	3-wöchiges Feriapraktikum in der Heiland Apotheke, Wiener Neustadt
seit Oktober 2009	geringfügig beschäftigt in der Alten Leopoldsapotheke, 1010 Wien
seit Oktober 2012	Tutorin im Praktikum „Erste Hilfe“ an der Universität Wien, Department für Pharmakologie und Toxikologie

Auslandsaufenthalt

September 2009	TCM - Summerschool in Chengdu (China)
----------------	---------------------------------------