



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bioaktivität von zwei neu synthetisierten
Kohlensäurediesterderivaten (MAH 63 und MAH 105)
an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Stefano Kettmaier

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für die Realisierung dieser Diplomarbeit bedanken. Er wusste es stets eine familiäre Atmosphäre zu schaffen und stand mir mit freundlicher und kompetenter Hilfe zur Seite.

Ebenso möchte ich mich bei Mag. Michael Hintersteiniger und Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanzen, bedanken.

Ein Dank gebührt auch meinen Studienkollegen, die mir in lernintensiven Stunden beiseite standen und mir freudige Pausen beschert haben, an die ich mich stets erinnern möchte.

Abschließend danke ich auch meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich in schweren Zeiten moralisch unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1 Arterielle Hypertonie	2
1.2 Pulmonale Hypertonie.....	3
1.3 Koronare Herzkrankheit.....	3
1.4 Colon irritabile	4
2. MATERIAL UND METHODIK	5
2.1 Versuchstiere.....	5
2.2 Tyrode-Lösung	5
2.3 Organperfusion	7
2.4 Isolierung und Präparation.....	7
2.4.1 Verwendete Materialien	9
2.4.2 Präparation der einzelnen Organe	9
2.4.2.1 Aorta.....	9
2.4.2.2 Terminales Ileum.....	10
2.4.2.3 Rechter Vorhof	11
2.4.2.4 Papillarmuskel.....	13
2.4.2.5 Pulmonalarterie	13
2.5 Aufbau der Apparaturen	14
2.5.1 Organbäder.....	14
2.5.2 Wasserbad.....	15
2.5.3 Begasung.....	15
2.5.4 Apparatur I	16
2.5.5 Apparatur II	18
2.5.6 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber	19
2.6 Kaliumchloridlösung.....	20
2.7 Versuchsanordnung.....	21
2.7.1 Testsubstanzen	21
2.7.1.1 MAH 63.....	21
2.7.1.2 MAH 105	21
2.7.2 Pipettierschema	22
2.7.3 Vorkontraktion.....	23

2.7.4 Durchführung der Versuche	23
2.7.4.1 Aorta.....	25
2.7.4.2 Arteria pulmonalis.....	25
2.7.4.3 Terminales Ileum.....	25
2.7.4.4 Rechter Vorhof	26
2.7.4.5 Papillarmuskel	27
2.8 Auswertung.....	28
2.8.1 Aorta, Ileum und Pulmonalarterie.....	28
2.8.2 Rechter Vorhof.....	28
2.8.3 Papillarmuskel.....	29
2.8.4 Statistik	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Testsubstanz MAH 63.....	30
3.1.1 Aorta	30
3.1.2 Pulmonalarterie	33
3.1.3 Terminales Ileum.....	36
3.1.4 Vorhof	39
3.1.5 Papillarmuskel.....	42
3.2 Testsubstanz MAH 105.....	45
3.2.1 Aorta	45
3.2.2 Pulmonalarterie	48
3.2.3 Terminales Ileum.....	51
3.2.4 Rechter Vorhof.....	54
3.2.5 Papillarmuskel.....	57
4. DISKUSSION	60
4.1 Interpretation der Ergebnisse von MAH 63	60
4.2 Interpretation der Ergebnisse von MAH 105	61
4.3 Vergleich der beiden Testsubstanzen MAH 63 und MAH 105.....	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. LITERATURVERZEICHNIS	65
7. CURRICULUM VITAE.....	67

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Wirkung von Arzneistoffen beruht auf ihrer Wechselwirkung mit einzelnen biologischen Strukturen eines Organismus. Potentielle Arzneistoffe müssen daher in der Lage sein mit bestimmten Proteinen oder Enzymen, sogenannten Targets, in Wechselwirkung zu treten um einen Effekt auszulösen (Steinhilber et al. 2010). Während früher die Entdeckung neuer Arzneistoffe eher auf Zufall basierte, steht heutzutage die systematische, rationale Suche neuer Arzneistoffe auf Basis deren Target im Vordergrund. Ein gängiges Verfahren zur systematischen Untersuchung von Substanzen sind in-vitro Tests auf Basis von Zellkulturen. Mithilfe dieses sogenannten "Screenings" können aus dieser großen Anzahl an Stoffen rasch aktive Substanzen, die sogenannten Hits, ausgesiebt werden. Für die Charakterisierung der Wirkungen am lebenden Organismus haben solche in-vitro Tests jedoch kaum Aussagekraft. Dazu ist der Organismus viel zu komplex um die Wirkung allein auf zellulärer Basis beschreiben zu können. Aus diesem Grund werden Tierversuche oder wie im Rahmen dieser Diplomarbeit, Untersuchungen an isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt um die Wirkung besser charakterisieren zu können.

Die Testsubstanzen MAH 63 und MAH 105 wurden als Teil einer Reihe von Derivaten synthetisiert, an denen eine vasodilatatorische und spasmolytische Wirkung vermutet wurde. Mithilfe elektromechanischer Untersuchungen konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit ein organspezifisches Wirkprofil beider Substanzen erstellt werden. Dabei wurden Auswirkungen auf die Erweiterung der Blutgefäße, an der isolierten Aorta und der Arteria pulmonalis getestet. Die vermutete spasmolytische Wirkung wurde am terminalen Ileum gemessen. Mögliche kardiale Effekte wie Beeinflussung der Chronotropie oder Inotropie wurden am isolierten Vorhof und am Papillarmuskel nachgewiesen.

Die gewonnenen Erkenntnisse können im Laufe weiterer Untersuchungen zur Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden um die Leitstruktur weiter zu optimieren. Diese Diplomarbeit stellt somit einen ersten Schritt in Richtung einer Klasse neuer potentieller Arzneistoffe dar.

Wie bereits erwähnt, wurden die Testsubstanzen aufgrund zweier vermuteter Effekte ausgewählt. Zum einen wurde eine Auswirkung auf die Blutgefäße, speziell auf die Aorta und auf die Pulmonalarterie vermutet. Weiters wurde ein krampflösender (spasmolytischer) Effekt auf die Muskulatur des Darmes erwartet. Aufgrund der Wirkungen könnten diese Testsubstanzen Möglichkeiten zur Therapie einer Reihe von Erkrankungen darstellen, die in den folgenden Kapiteln kurz vorgestellt werden.

1.1 Arterielle Hypertonie

Die chronische arterielle Hypertonie stellt die häufigste kardiovaskuläre Erkrankung des Erwachsenen dar und gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Verdino 2014). Man spricht von Hypertonie wenn der systolische Druck den Wert von 140 mmHg und der diastolische Druck den Wert von 90 mmHg über mehrere Messungen im Abstand einiger Wochen konstant überschreitet. Pathophysiologisch unterscheidet man zwischen essentieller oder primärer Hypertonie und sekundärer, symptomatischer Hypertonie. Die erstgenannte Form stellt die häufigste (90–95%) dar, davon sind circa 25% der Erwachsenen der Industrienationen betroffen. Die Ursachen konnten bisher nicht genau festgestellt werden und können sowohl genetisch als auch umweltbedingt sein. Man geht jedoch bei 99% der Betroffenen von einer polygenen Ursache aus, bei der mehrere Gene zu einer Störung der Signaltransduktion und infolgedessen zu einem erhöhten Blutdruck führen. Interessanterweise reagieren 60% der Betroffenen bei einer Reduktion der Kochsalzkonsumation mit einer Senkung des Blutdruckes. Die sekundäre Hypertonie gilt als Folgeerscheinung einer anderen renalen oder endokrinen Erkrankung wie beispielsweise einer Nierenstenose, einem Phäochromozytom oder Morbus Cushing.

Die Folgen einer langjährigen Hypertonie sind weitreichend und führen durch reaktive Hypertrophie (sogenanntes Remodelling) der Blutgefäße unweigerlich zu Arteriosklerose, was die Hauptursache für Schlaganfall, koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt darstellt.

Die Behandlung erfolgt heute durch vier Wirkstoffklassen, nämlich die Diuretika, Betablocker, ACE Hemmer (einschließlich AT₁-Antagonisten) und

Calciumantagonisten. Meist werden sie initial als Monotherapie eingesetzt, im fortgeschrittenen Stadium können Kombinationen angewendet werden.

1.2 Pulmonale Hypertonie

Man spricht von einer pulmonalen Hypertonie wenn der mittlere Blutdruck der Arteria pulmonalis den Wert von 20 mmHg überschreitet (Mutschler et al. 2007). Damit verbunden ist eine chronische Belastung des rechten Herzens, die Folgen sind eine Hypertrophie sowie Dilatation des rechten Ventrikels. Meist wird die erhöhte Herzbelastung durch eine Lungenerkrankung hervorgerufen beispielsweise durch ein Lungenemphysem. Die idiopathische Form der pulmonalen Hypertonie ist eine äußerst seltene Erkrankung deren Ursache nicht genau bekannt ist. Bei diesen Patienten ist das Endothelin-1-System überaktiviert, während die Prostacyclinsynthese stark vermindert ist. Dieses Ungleichgewicht führt zu einer starken Verengung der Pulmonalarterien. Die Therapie beinhaltet Bosentan, einen ET-1-Rezeptor Antagonisten, und PDE-5-Hemmer wie Sildenafil (Aktories et al. 2009).

1.3 Koronare Herzkrankheit

So wie das gesamte Gefäßsystem sind auch die Herzkranzgefäße, die für die Blutversorgung des Herzens verantwortlich sind, dem Risiko einer Plaquebildung durch arteriosklerotische Veränderungen ausgesetzt. Diese Koronarsklerose ist die wichtigste Ursache für die koronare Herzkrankheit. Bei einer 75%igen Reduktion des Innendurchmessers der Koronargefäße kommt es in der Regel bei körperlichen Belastungen zu Myokardischämie und zu Sauerstoffmangel-Schmerzen (Mutschler et al. 2007). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffverbrauch, was durch einen starken Schmerz hinter dem Brustbein signalisiert wird. Die sogenannte „Angina Pectoris“ oder Brustenge genannt, ist eine spezielle Ausprägungsform und für die koronare Herzkrankheit charakteristisch.

Kommt es zu einem plötzlichen Totalverschluss eines Koronargefäßes, so führt dies zu einem irreversiblen Myokardschaden und zum Untergang von

Herzmuskelgewebe. Von einem Herzinfarkt sind in Österreich circa 3 von 1000 Einwohnern betroffen, davon verlaufen circa 30% tödlich (BMG 2012).

Die Therapie beinhaltet vorwiegend Präventivmaßnahmen zur Verminderung der Risikofaktoren. Dazu zählen Senkung des Bluthochdruckes, Gewichtsreduktion und Raucherentwöhnung.

Symptomatisch werden vor allem NO-Donatoren, Betablocker und Calciumantagonisten verwendet, um die Koronargefäße zu dilatieren.

1.4 Colon irritabile

Motilitätsstörungen des Darmes sind häufige Ursache für Diarrhö und Schmerzen im Bauchbereich. Das Reizdarmsyndrom oder Colon irritabile findet sich bei 30–50% aller Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden. Die Symptome sind unterschiedlich ausgeprägt. Etwa ein Drittel aller Patienten leidet vorwiegend an Obstipation, ein Drittel an Diarrhö, während beim Rest die Symptome abwechselnd vorkommen. Stuhlnunregelmäßigkeiten, Völlegefühl und abdominelle Schmerzen sind häufig. Da keine erkennbare organische Darmerkrankung zugrunde liegt, wird das Reizdarmsyndrom meist nach Ausschluss aller anderen Magen-Darm Erkrankungen diagnostiziert.

Bemerkenswert ist, dass die Symptome bei psychischen Belastungen verstärkt werden. Die Therapie richtet sich vor allem an die Reduktion der Darmmotilität durch Relaxation der glatten Darmmuskulatur. Studien haben gezeigt, dass Spasmolytika und Anticholinergika speziell bei der Obstipation zu einer allgemeinen Verbesserung der Symptome führen (Akehurst et al. 2001). Allerdings wurde nachgewiesen, dass bereits durch Placebo die subjektiven Symptome gelindert werden können (Kaptchuk et al. 2010). Der Placeboeffekt spielt demzufolge bei der Therapie des Reizdarmsyndroms eine wichtige Rolle.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Versuchstiere

Um eine möglichst pharmakologische Vorhersage über den potentiellen Arzneistoff zu treffen, ist ein Versuch an lebenden Organen unumgänglich. Jedoch wurden hier keine in-vivo Studien am lebenden Meerschweinchen durchgeführt, sondern lediglich an den isolierten Organen. Dies bringt den Vorteil, dass das Tier nicht unter möglichen Nebenwirkungen leiden musste. Für Untersuchungen des Wirkmechanismus eignen sich Meerschweinchen besonders, da die Kanäle in den Zellmembranen jenen des Menschen am ähnlichsten sind.

Für die Versuche wurden Meerschweinchen des TRIK Stammes verwendet, wobei die Meerschweinchen im Schnitt 250–600 g wogen.

2.2 Tyrode-Lösung

Um das Weiterleben der Organe zu sichern, mussten sie stets in einer isotonischen, gepufferten Lösung aufbewahrt werden. Dazu wurde die sogenannte Tyrode oder Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, welche bereits 1932 von H. Krebs und K. Henseleit entwickelt wurde (Krebs et al. 1932). Die chemische Zusammensetzung der Lösung orientiert sich dabei stark an den Ionenkonzentrationen im Blutplasma. Die Tyrode-Lösung enthält die Elektrolyte Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , Cl^- und Glucose als Substrat für die Zellatmung. HCO_3^- hat eine Pufferfunktion und verhindert die Alkalisierung der physiologischen Nährlösung. Trotzdem ist ein konstanter pCO_2 Druck durch die Gasperfusion wichtig, da das gelöste Bicarbonat schnell aufgebraucht ist.

Tabelle 1: Substanzeinwaagen zur Herstellung der Tyrode-Lösung

Substanz	Molare Masse	Stammlösung	ml der Stammlösung/l Tyrode	Konzentration (mmol/l)
NaCl	58,44 g/mol	1000,25 g /5 l	33,60	115,01
KCl	74,55 g/mol	50,33 g /5 l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01 g/mol	125,00 g /5 l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,37 g/mol	147,02 g /5 l	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,09 g/mol	62 g /250 ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,98 g/mol	34 g /250 ml	3,20	3,92
Glucose	180,16 g/mol	Reinsubstanz	1,98	-

Die Tyrode-Lösung wurde jeden Morgen vor dem Präparieren der Meerschweinchen frisch hergestellt. Je nach Bedarf wurden entweder 1 oder 2 Liter verwendet.

Zunächst wurden die Stammlösungen NaCl, KCl und NaHCO₃ in einem Messkolben vermengt, anschließend KH₂PO₄, MgSO₄ und zuletzt Glucose eingewogen, der Messkolben bis zu $\frac{3}{4}$ mit Aqua bidestillata befüllt und homogenisiert.

Die Lösung wurde nun 20 Minuten mit Oxymix/Carbogen begast bevor CaCl₂ zugegeben werden durfte. Die Begasung mit CO₂ stabilisiert den pH Wert auf 7,4 (siehe Kapitel 2.3). Ohne eine CO₂ Sättigung würde der pH-Wert steigen, und Calcium in Form von CaPO₄ ausfallen. Die Lösung würde dabei milchig weiß gefärbt und müsste verworfen werden. Aus diesem Grund war es wichtig, die Calcium-Lösung möglichst langsam, mit einer Pasteurpipette, zuzutropfen um das Löslichkeitsprodukt nicht zu überschreiten.

Zuletzt wurde der Messkolben bis zur Markierung mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und durchmischt. Die fertige Tyrode-Lösung wurde für sämtliche Organbäder, Petrischalen und Bechergläser in denen die Organe oder Teile davon enthalten waren, verwendet.

2.3 Organperfusion

Wie bereits besprochen, wurden die Organe stets mit sogenannten Oxymix oder Carbogen bestehend 95% O₂ und 5% CO₂ begast. Die Verwendung von 95%igem Sauerstoff statt den atmosphärischen 20% ist darauf zurückzuführen, dass in der Tyrode-Lösung keine Sauerstofftransporter wie Hämoglobin enthalten sind. Dieser Mangel muss daher durch eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes ausgeglichen werden (Radnoti, 2010).

Die 5% Kohlenstoffdioxid sind für das Bicarbonat-Puffer-System von Bedeutung um den physiologischen pH Wert von 7,4 aufrechtzuerhalten.

2.4 Isolierung und Präparation

An jedem Versuchstag wurde ein Meerschweinchen verwendet und die zu untersuchenden Organe entnommen und präpariert.

Für die Entnahme der Organe wurde das Tier mit einem Genickschlag an der Tischkante getötet. Starkes Nasenbluten war ein sicheres Zeichen für den Eintritt des Todes. Der Thorax wurde mithilfe einer Schere geöffnet, die Lunge entfernt und das gesamte Herz entnommen. Anschließend wurden circa 25 Zentimeter des terminalen Ileum entnommen und mit einem Faden am oberen Ende abgebunden. Das Mesenterium musste hierzu an mehreren Stellen eingeschnitten werden, um das Hängeband des Darmes von der hinteren Bauchwand zu trennen (Hunnius 2004). Die Aorta wurde entlang der Wirbelsäule mit einer chirurgischen Schere vorsichtig zusammen mit umliegendem Fett- und Bindegewebe abgetrennt. Alle entnommenen Organe wurden bis zur Analyse im Organbad in Tyrode-Lösung aufbewahrt. Unter dem Auflichtmikroskop wurden nun alle weiteren Präpariervorgänge vorgenommen. Obwohl die Tyrode sauerstoffgesättigt war, mussten die Organe möglichst rasch präpariert werden, um nekrotische Vorgänge, und somit das Absterben der Präparate, zu verhindern. Die Organe wurden daher bei Bedarf zwischen den einzelnen Präparierschritten oder vor dem eigentlichen Einspannen immer wieder für einige Minuten begast.

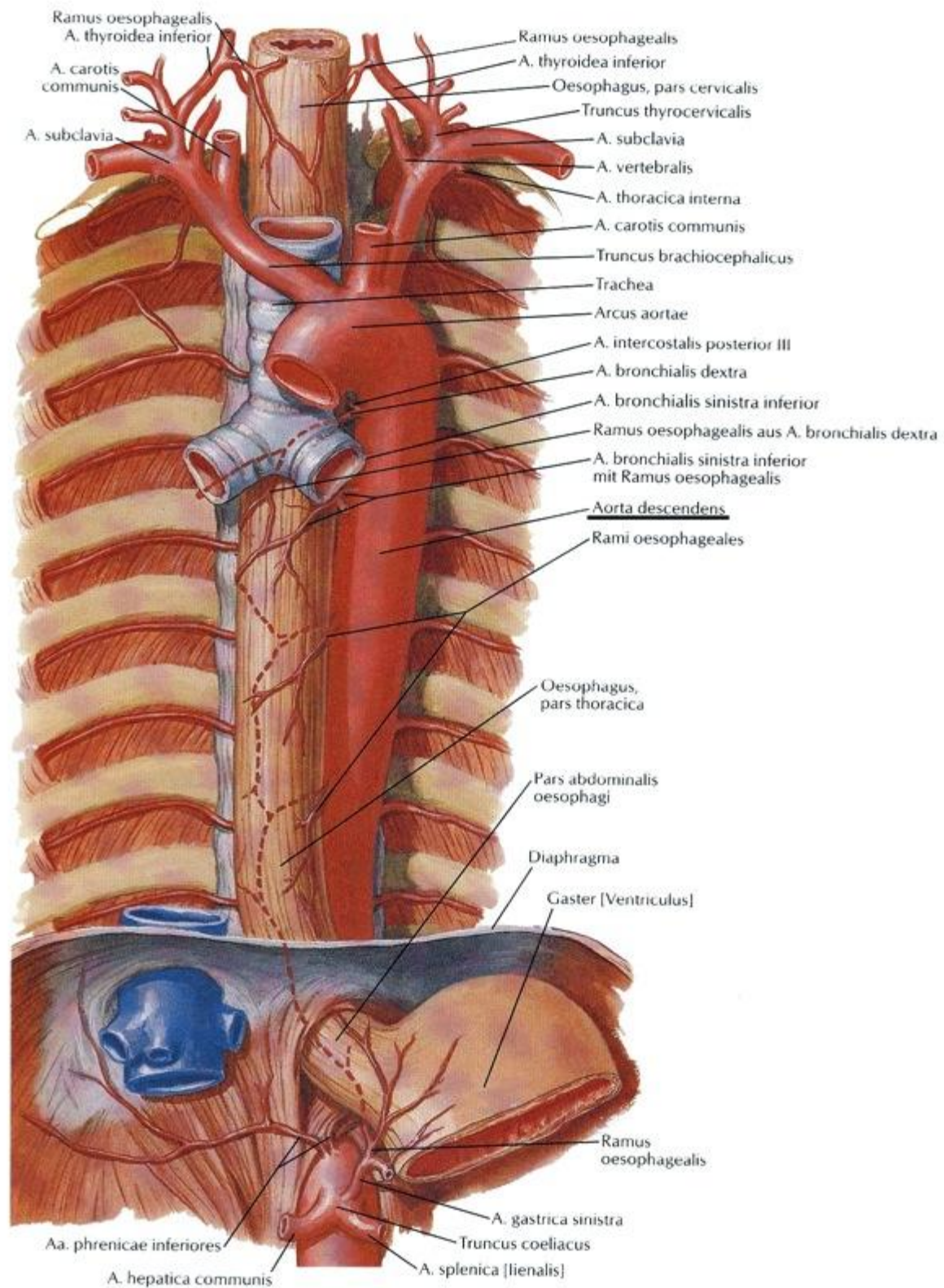


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)

2.4.1 Verwendete Materialien

Für die Präparation der Organe wurden Petrischalen mit Korkboden ausgelegt und einem Gummischlauch fixiert. Diese Präparierschalen wurden mit Tyrode gefüllt und das zu präparierende Organ mit zwei Nadeln fixiert. Für genaueres Arbeiten an den kleinen Organen wurde ein Auflichtmikroskop verwendet. Als Präparierbesteck dienten Präpariernadeln, Federgriffscheren, chirurgische Scheren und Pinzetten.



Abbildung 2: Arbeitstisch für die Präparation: Auflichtmikroskop, darunter eine Petrischale mit Korkboden und Gummiring sowie Präparierbesteck

2.4.2 Präparation der einzelnen Organe

2.4.2.1 Aorta

Nach Entnahme des Herzens konnte die sich dahinter befindende, entlang der Wirbelsäule verlaufende, absteigende Aorta (Aorta descendens) abgetrennt werden. Die Aorta liegt parallel zum Ösophagus auf der rechten Seite und ist in Binde- und Fettgewebe eingebettet. Um eine möglichst vollständige Abtrennung zu erreichen, wurde der Aortenbogen mit einer Pinzette festgehalten und parallel zum Ösophagus mit abwechselnden kleinen Schnitten die gesamte Aorta bis hin

zum Bauchfell abgetrennt. Durch das leichte Anziehen der Pinzette wurde das angebundene Gewebe so angehoben, dass man es leicht mit der chirurgischen Schere abtrennen konnte.

Mithilfe eines Auflichtmikroskops wurden nun Fett- und Bindegewebsreste an der isolierten Aorta entfernt. Dies war nötig um die Wirkung der Testsubstanz von außen über die Aortenaußenwand zu gewährleisten.

Die isolierte Aorta wurde in einer tyrodehaltigen Präparierschale (siehe Kapitel 2.4.1) mit zwei Nadeln fixiert und die Gewebereste mit einer Federgriffschere und einer dünnen Pinzette sorgfältig entfernt. Nach der Säuberung wurden circa 2 Millimeter große Ringe abgeschnitten, wobei je ein Ring für eine Messung verwendet wurde.

Abbildung 3: links die unpräparierte isolierte Aorta in einer Petrischale, recht die Aortenringe nach Entfernung von Binde- und Fettgewebe



2.4.2.2 *Terminales Ileum*

Für diese Versuche wurde der untere Teil des Dünndarmes, das Ileum oder Krummdarm, verwendet.

Die erste Abtrennung erfolgte an der Grenze zum Jejunum, worauf ein circa 20 Zentimeter langes Stück entnommen wurde. Der zweite Schnitt erfolgte oberhalb der Bauhin-Klappe (Valva ileocaecalis), welche die Grenze zwischen terminalen Ileum und Dickdarm darstellt. Der obere, zum Jejunum hingewandte Teil des Ileums, wurde zur Markierung und besseren Handhabung mit einem Faden zugeschnürt.

Das erhaltene Stück Darm wurde wie alle anderen Organe in Tyrode-Lösung aufbewahrt und ständig begast.

Zur Verwendung im Organbad musste nun ein kleiner Ausschnitt mit circa 1 Zentimeter Länge präpariert werden. Mithilfe einer chirurgischen Schere wurden zwei schräge v-förmige Schnitte durchgeführt. Etwaige Chymusreste wurden mithilfe einer Pipette ausgespült. Im Gegensatz zu Aorta und Arteria pulmonalis, die einfach eingespannt werden, besitzt der Darm auch glatte Längsmuskulatur, die durch die Testsubstanz relaxiert werden kann und gemessen werden muss. Aus diesem Grund wurde der oben genannte Ausschnitt an beiden Seiten mit Silberhäkchen versehen, um ein Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen. Dazu werden die beiden, möglichst schräg geschnittenen Enden, mit Nadeln in einer Präparierschale fixiert und die Silberhäkchen mit einem Faden, möglichst weit weg vom Lumen, angebunden. Diese Vorgangsweise garantiert eine ständige Darmöffnung und begünstigt somit die Durchströmung des Lumens mit der Testsubstanz.

2.4.2.3 Rechter Vorhof

Der eigentlich zu untersuchende Bestandteil ist der im rechten Vorhof gelegene Sinusknoten, der sogenannte Schrittmacher des Herzens. Da dieser jedoch schwer zu erkennen ist wurde stets der gesamte rechte Vorhof verwendet. Bei der Präparation am Herzen ist zu bemerken, dass es trotz niedriger Temperaturen der Tyrode-Lösung zu gelegentlichen Kontraktionen kommen kann. Es wurde daher besonders darauf geachtet, genau zu schneiden um den Sinusknoten nicht zu beschädigen.

Das entnommene Herz wurde in einer tyrodehaltigen Petrischale zunächst vertikal fixiert und vom Herzbeutel (Perikard) und Bindegeweberesten befreit. Die Entnahme des Vorhofes erfolgte durch einen Schnitt entlang der rechten Koronararterie, dem sogenannten Sulcus coronarius bis an die Vorhofhinterseite. Der nun erhaltene isolierte Vorhof wurde an der Spitze, und an der Vorhofbasis mit zwei Nadeln fixiert und mithilfe eines Fadens mit zwei Silberhäkchen versehen.

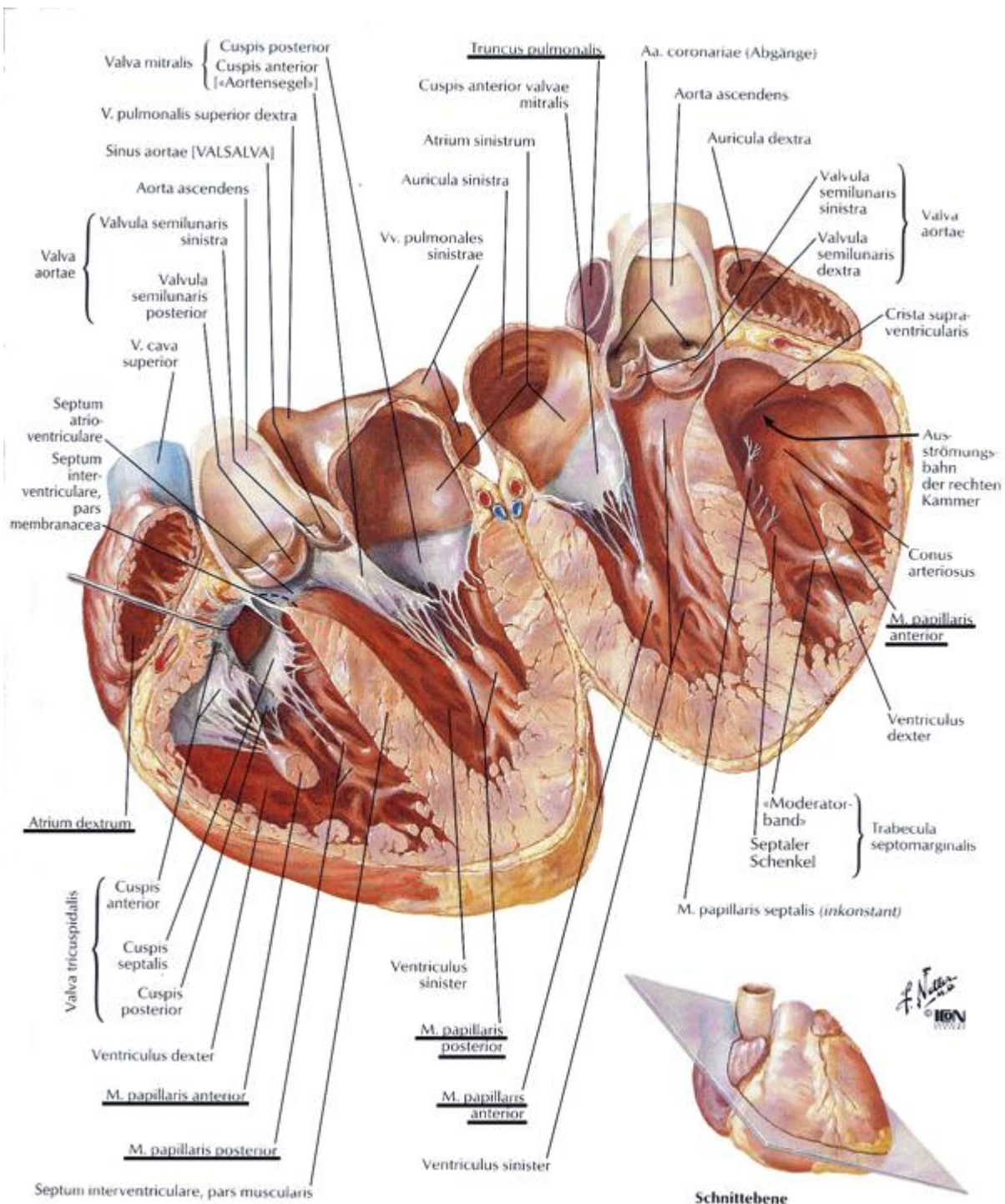


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)

2.4.2.4 Papillarmuskel

Um die Papillarmuskeln zu entnehmen wurde das Herz entlang des Septum interventriculare (Kammerscheidewand) aufgeschnitten, aufgeklappt und in einer tyrodehaltigen Petrischale fixiert. Die Papillarmuskeln sind kegelförmige Einstülpungen des Herzmuskels in das Lumen, welche über Sehnenfäden mit den Atrioventrikularklappen verbunden sind. Die Papillarmuskeln kontrahieren während der Auswurfphase und verhindern so ein Zurückschlagen der Klappen und demzufolge auch einen Blutrückfluss in den Vorhof. Insgesamt konnten maximal 5 Papillarmuskeln entnommen werden (3 der Trikuspidalklappe, und 2 der Mitralklappe).

Zunächst wurde ein Faden um die Sehnenfäden gebunden, ein Silberhäkchen fixiert, und der Sehnenfaden oberhalb durchtrennt. Der zweite Schnitt erfolgte an der Basis der Papillarmuskelausstülpung.



Abbildung 5: Fotografie eines präparierten Papillarmuskels, an den ein Häkchen mit einem Faden fixiert wurde

2.4.2.5 Pulmonalarterie

Die Aorta pulmonalis (Pulmonalarterie) entspringt aus dem rechten Ventrikel und teilt sich nach wenigen Zentimetern, auf der Höhe des Truncus pulmonalis in eine linke und eine rechte Lungenarterie. Für den Versuch wurde dieser proximale Teil, also vor der Verzweigung, verwendet. Für die Entnahme musste zunächst die Pulmonalarterie von Perikardresten und Fettgewebe befreit werden. Der Einschnitt erfolgte möglichst nahe am Herzen um einen genügend breiten Ring von ca. 4–5 Millimeter zu erhalten. Analog zur Aorta konnte die Pulmonalarterie direkt als Ring in die Apparatur eingespannt werden.

2.5 Aufbau der Apparaturen

2.5.1 Organbäder

Vorraussetzung für den Erfolg der Versuchsreihe war das Weiterleben der Organe außerhalb des Organismus. Zentrales Kompartiment für die ex-vivo Versuche waren die Organbäder. Sie hatten ein Füllvolumen von 25 ml oder 8 ml, Lösungsmittel war immer die Tyrode. Am Ende jedes Versuchs wurde die Tyrode über den Ablauf abgelassen und das Organbad mit Salzsäure gereinigt. Anschließend wurde mit bidestilliertem Wasser mehrmals ausgespült und das Organbad mit geöffnetem Ablauf getrocknet.

Während der Experimente musste in den Organbädern eine möglichst physiologische Umgebung nachgeahmt werden. Dies geschah durch konstant gehaltene erhöhte Temperatur der Tyrode und kontinuierliche steuerbare Begasung. Zur Vermessung der Gewebsveränderungen waren eine spezielle Aufhängevorrichtung und Messinstrumente angebracht. Im Folgenden wird auf die einzelnen Ausstattungen eingegangen.



Abbildung 6: Fotografisch festgehaltenes Organbad mit zugehörigem Steg und Schläuche, sowie einem eingespannten isolierten rechten Vorhof (Atrium dexter)

2.5.2 Wasserbad

Die Organbäder bestanden aus zweischichtigem Glas, wobei durch den Hohlraum dazwischen Wasser aus einem Wasserbad geleitet wurde. Das Wasserbad war mit einem Regelheizer ausgestattet. Über eine Pumpe und einen Gummischlauch wurde das erwärmte Wasser zu den benachbarten Organbädern geleitet und floss wieder zurück. Durch den ständigen Kreislauf konnten die Organbäder genau temperiert werden. Für den Papillarmuskel wurde auf $35 \pm 1^\circ\text{C}$ vorgewärmt, alle anderen Organe benötigten $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Wichtig war es, die Wasserbäder früh genug einzuschalten um das Wasser vorzuheizen.

2.5.3 Begasung

Das Carbogen-Gas wurde über Gummischläuche direkt in das Organbad geleitet. Die darauf angebrachten Glasfritten erhöhten durch die feine Zerstäubung der Luftbläschen die Löslichkeit der Gase im Lösungsmittel. Neben der zentralen Regulierung über den Gashahn konnte über Schraubklemmen die Gaszufuhr gesteuert werden. Die Gasbläschen sollten fein zerstäubt am Glas entlang perlen, ohne einen „siedenden“ Effekt zu geben.

Die Gaszufuhr musste außerdem bis zur kompletten Trocknung des Organbades aktiv bleiben um ein Zurückfließen von Flüssigkeiten in den Polyurethanschlauch zu verhindern.

2.5.4 Apparatur I

Die erste Apparatur wurde für alle Organe außer dem Papillarmuskel verwendet.

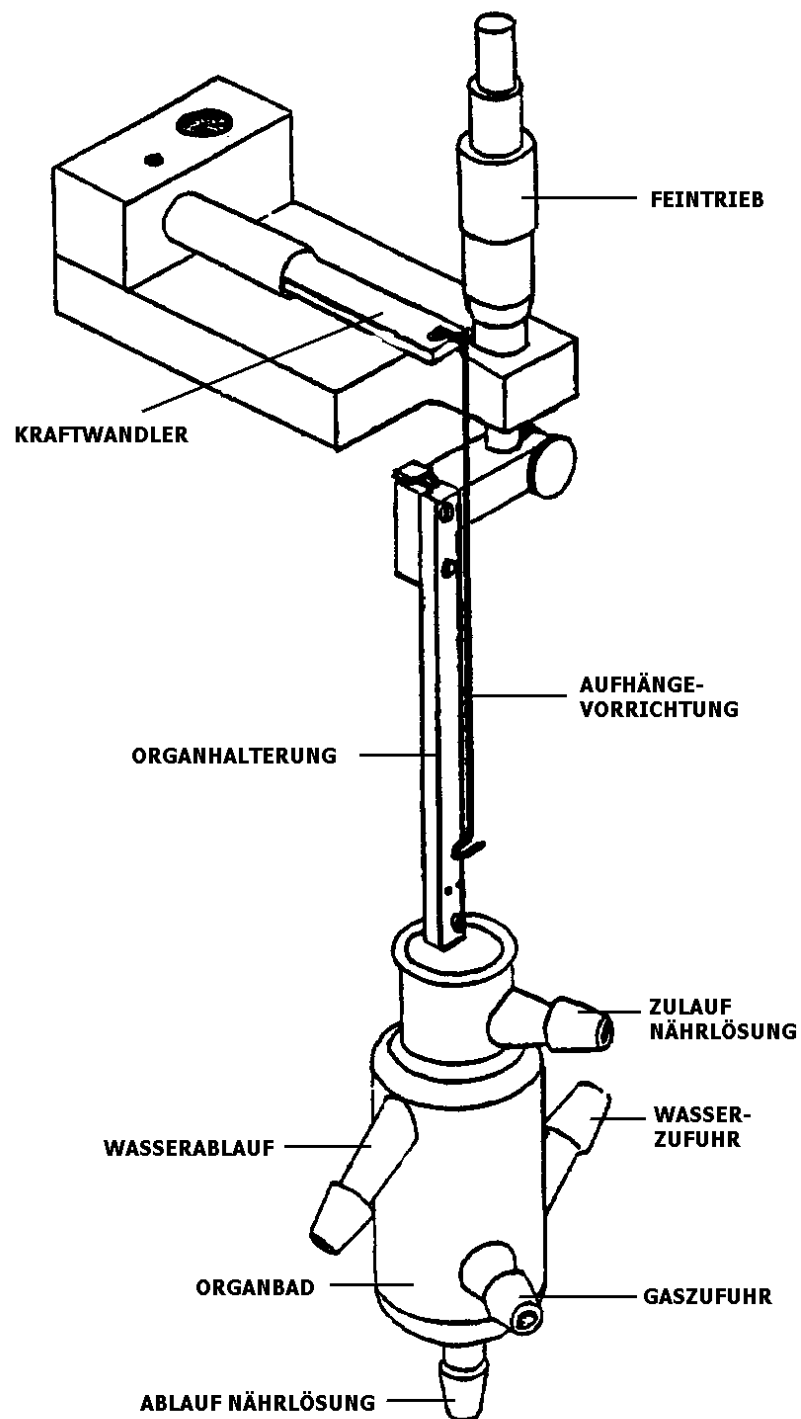
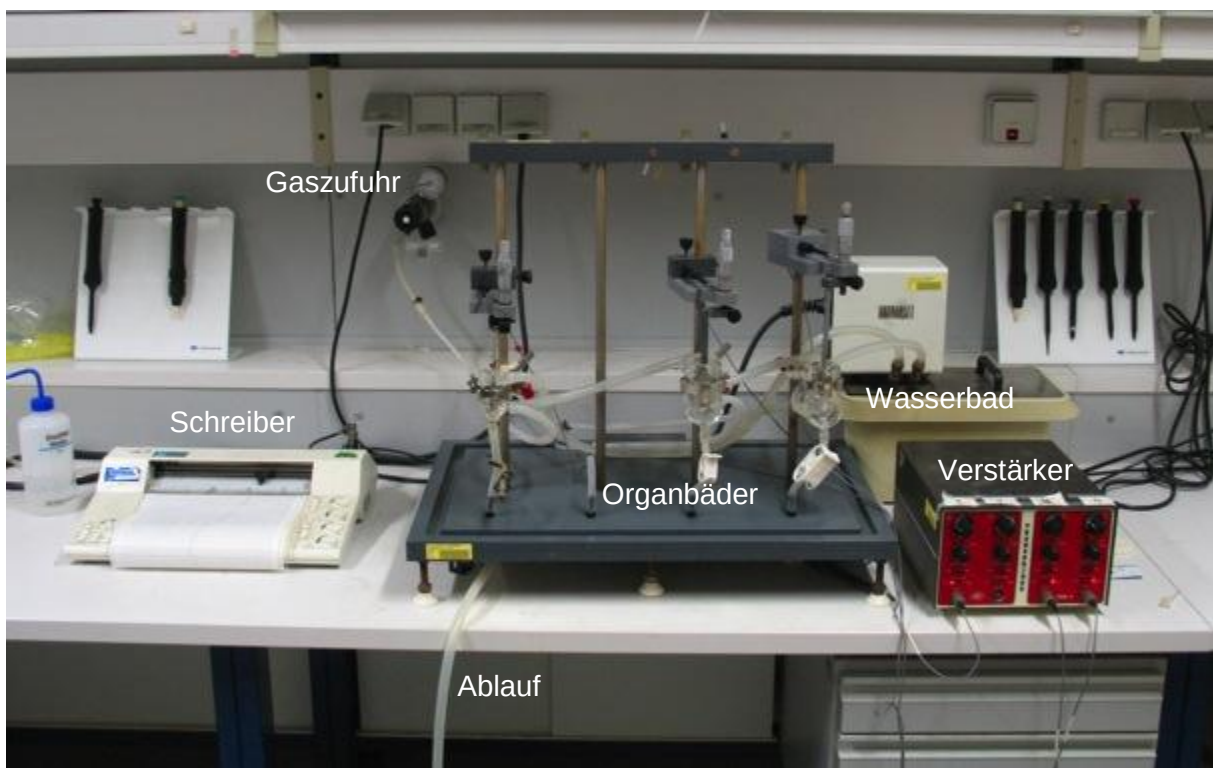


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Steges der Apparatur I

Die Abbildung 7 zeigt den Aufbau der Apparatur I im Detail. Wie bereits besprochen wurde das isolierte Organ im Organbad eingespannt. Dies geschah über eine bewegliche Aufhängevorrichtung aus Draht auf der Oberseite und eine fixe Organhalterung auf der Unterseite. Die Organhalterung konnte mit dem Fein- und Grobtrieb verstellt werden. Durch diese Vorrichtung konnte die Organhalterung nach unten bewegt und der Abstand zum Aufhängedraht vergrößert werden. Ein eingespanntes Organ wurde dabei auseinander gezogen, und dadurch mehr gespannt. Der gesamte Steg war auf einer Metallstange mit Schraubklemmen fixiert und konnte nach Einspannen der Organe in das Organbad getaucht werden. Die Organe mussten stets einheitlich vorgespannt werden um untereinander vergleichbare Werte zu erhalten (siehe Kapitel 2.7.3). Die Aufhängevorrichtung war mit dem Kraftwandler, dem eigentlichen Messinstrument, gekoppelt.

Abbildung 8: Fotografie mit Beschriftungen der Apparatur I, einschließlich der dazugehörigen Instrumenten.

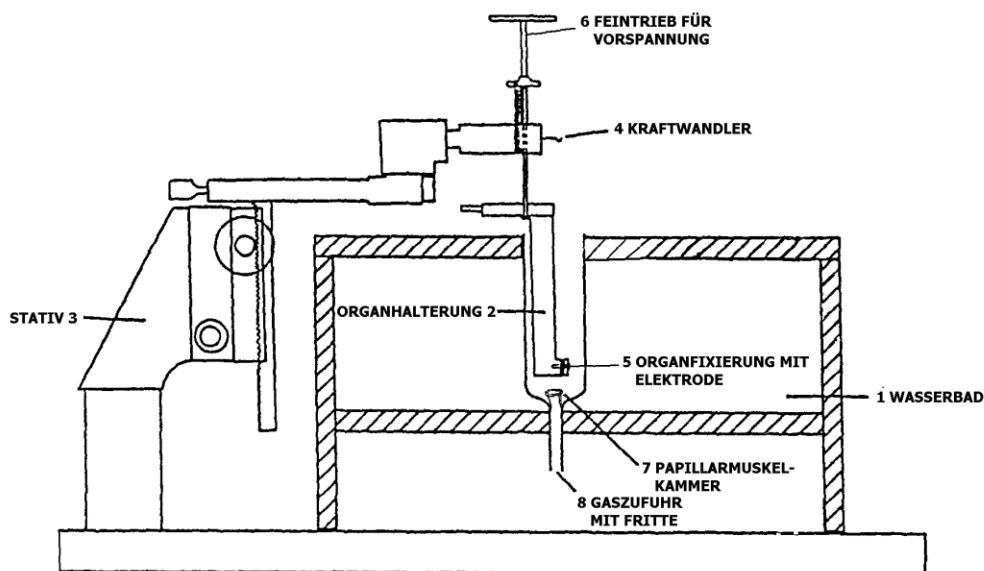


2.5.5 Apparatur II

Die Apparatur II wurde nur für den Papillarmuskel verwendet. Für die Messung der Inotropie (Kontraktionskraft) des Papillarmuskels ist eine Reizung notwendig. Im Herzen erfolgt die Reizung durch den Sinusknoten, da dieser jedoch abgetrennt wurde, mussten im Organbad Stromschläge zugeführt werden. Der obere Teil des Muskels wurde analog den anderen Organen mithilfe des angebrachten Silberhäkchens an die Aufhängevorrichtung gehängt. Der untere, freie Teil wurde zwischen ein Plastikplättchen und eine Platinelektrode geklemmt und mit einem Schraubenzieher fest fixiert. Über diese Platinelektrode wurden rhythmisch Stromschläge an den Papillarmuskel geleitet und führten dabei zur Kontraktion. Die Länge betrug 3 ms^{-1} , die Frequenz 60 Schläge pro Minute. Die Stromstärke war frei wählbar und konnte von 0–100% eingestellt werden. Als Stimulator wurde der Accupulser Stimulator, Modell Iosostim 301T, Firma WPI, verwendet.

Die Weiterleitung des Signals erfolgte analog der Apparatur I: über Kraftwandler, Verstärker und Schreiber wurden Signale auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Apparatur II



2.5.6 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Der Kraftwandler dient zur Umwandlung der Zugkraft der Aufhängevorrichtung auf ein elektrisch messbares Signal. Ein eingebauter Dehnungsmessstreifen wird durch die einwirkende Zugkraft leicht verformt, wodurch sich der elektrische Widerstand innerhalb des Streifens ändert. Der veränderte Stromfluss wird durch einen Verstärker geleitet und das Signal intensiviert (4-Channel Transducer Amplifier, Firma WPI). Durch einen gekoppelten Schreiber der Firma Kipp & Zonen (Modell BD 112) wurde die Veränderung zu Papier gebracht.

Durch den Schreiber wurde mithilfe eines Schreibstiftes der Messverlauf stets auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet. Je höher die Spannung desto größer war der Ausschlag des Schreibstiftes. Am Schreiber konnte außerdem die Messungsgeschwindigkeit und die Verstärkung (5, 2, 1 mV) ausgewählt werden. Für Aorta, Darm und Arteria pulmonalis wurde immer mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min gemessen, beim Vorhof 5 mm/sek und beim Papillarmuskel mit 20 mm/sek. Bei Vorhof und Papillarmuskel konnte außerdem die Verstärkung auf 2 oder 1 mV gesenkt werden um einen breiteren Ausschlag zu erreichen.

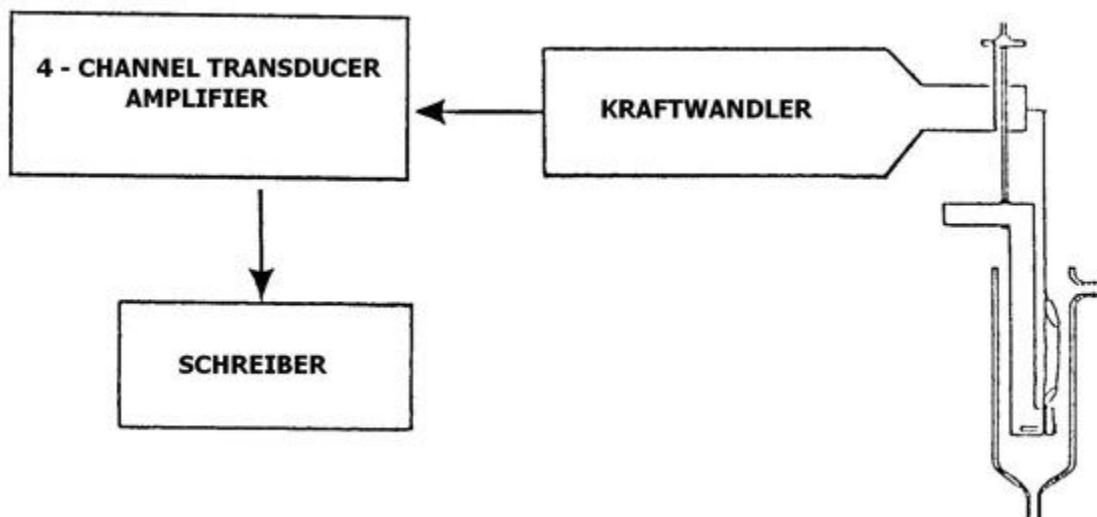


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Signalübertragung: Die gemessene Zugkraft am Steg wird über den Kraftwandler in ein elektrisches Signal übertragen und verstärkt. Am Schreiber wird das Ergebnis in Form eines Ausschlages des Stiftes dargestellt.

2.6 Kaliumchloridlösung

Um den relaxierenden Effekt der Testsubstanz auf Aorta, Arteria pulmonalis und Darm zu testen, müssen diese Organe vorkontrahiert werden.

Da die Zellpermeabilität für Kaliumionen sehr hoch ist, diffundieren diese entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle nach außen. Durch diesen Diffusionsvorgang wird die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials sichergestellt. Wird nun die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht, kommt es zu einem verringerten Auswärtsstrom. Das führt zu einer Depolarisation der Zelle und zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Der Ca^{2+} -Influx bewirkt nun über Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) eine Kontraktion der glatten Muskulatur (Müller-Esterl 2009). Für die Versuche wurden Konzentrationen von 60 mM KCl für Ileum und 90 mM für Aorta und Pulmonalarterie verwendet. Diese Werte sind empirisch ermittelt und führen zu einer maximalen, noch reversiblen Kontraktion.

Um diese Kontraktion zu erreichen wurde die Kaliumlösung laut Tabelle 2 eingewogen und in einem 100 ml Messkolben mit Tyrode aufgefüllt.

Tabelle 2: Benötigte KCl-Mengen zur Auslösung einer maximalen Vorkontraktion

Organpräparat	KCl-Einwaage	molare Masse
terminales Ileum	0,45 g / 100 ml	60 mM
Aorta descendens	0,67g / 100 ml	90 mM
Arteria pulmonalis	0,67g / 100 ml	90 mM

2.7 Versuchsanordnung

2.7.1 Testsubstanzen

Die Testsubstanzen MAH 63 und MAH 105 wurden von der Forschungsgruppe Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker des Department für pharmazeutische Chemie synthetisiert und für die Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt. Beide Substanzen sind Kohlensäurediester.

2.7.1.1 MAH 63

Bei MAH 63 handelt es sich um ein asymmetrisches Kohlensäurediester, wobei die beiden freien Sauerstoffatome mit einem Phenethylrest und einem Aminopropyl-Rest verknüpft sind. Am Amino-Rest wurden die Wasserstoffe durch Methylgruppen substituiert. Aufgrund der Basizität dieser funktionellen Gruppe lag die Substanz in Form des Hydrochlorids vor.

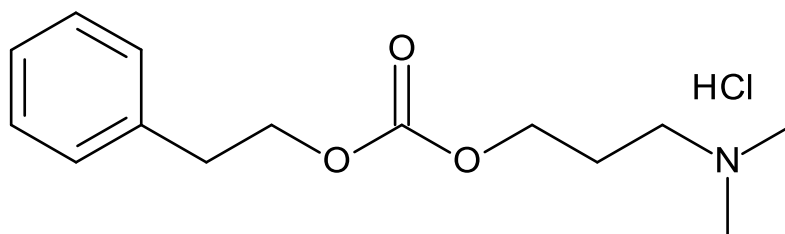


Abbildung 11: 3-(Dimethylamino-) propyl-phenethylcarbonat-Hydrochlorid (**MAH 63.HCl**)

2.7.1.2 MAH 105

An diesem Derivat wurden die beiden Sauerstoffatome durch längere Alkylketten substituiert. Die in MAH 63 vorhandenen Phenylethylreste wurden durch eine Octyl-Kette ersetzt. Am Dimethylaminorest wurde die Kette um 3 Kohlenstoffatome verlängert. Die Substanz weist eine Tensidgrundstruktur auf, was am amphiphilen Charakter der Substanz erkennbar ist. Die Carbonatgruppe bildet dabei den hydrophilen Teil, der Alkylrest ist lipophil. Diese Eigenschaft zeigte sich auch durch starkes Schäumen der Substanz in wässriger Lösung, was durch das Herabsetzen der Oberflächenspannung erklärt werden kann.

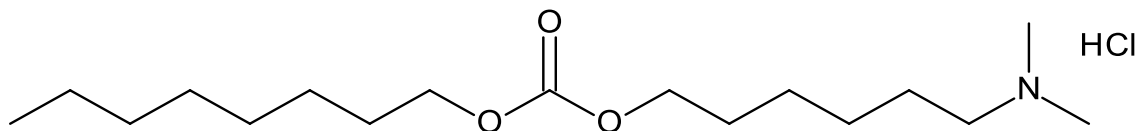


Abbildung 12: 6-(Dimethylamino) hexyl-octylcarbonat-Hydrochlorid (**MAH 105.HCl**)

Beide Substanzen waren farblos, und leicht wasserlöslich. Sie wurde trocken und im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

2.7.2 Pipettierschema

Vor Beginn der Versuche wurde 100 µmol Substanz in dafür vorgesehenen Phiole eingewogen und in 100 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Es wurden immer 4 Konzentrationen der Substanz zu 3 µmol, 10 µmol, 30 µmol und 100 µmol pro Versuchseinheit getestet. Je nach Füllmenge des Organbades musste unterschiedlich eingewogen werden, um eine gleiche Konzentration zu erreichen. Die gelöste Substanz wurde in einzelnen Schritten zu je 3, 7, 20, und 70 µl in das Organbad pipettiert (siehe Tabelle 3). Zwischen den einzelnen Schritten mussten 45 Minuten abgewartet werden, erst dann wurde die nächst höhere Konzentration zugeführt. Die Zeit war so gewählt, dass ein Steady-State sicher erreicht werden konnte.

Um die oben genannten Konzentrationen zu erlangen, musste das Molekulargewicht zur Berechnung der Einwaage herangezogen werden. Die Werte finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Berechnete Einwaagen der beiden Testsubstanzen MAH 63 und MAH 105

Substanz	Molekulargewicht	Volumen des Organbad	Einwaage der Substanz (entspricht 100 µmol)
MAH 63	287,7	8 ml	0,23 mg
		25 ml	0,72 mg
MAH 105	337,9	8 ml	0,27 mg
		25 ml	0,85 mg

Tabelle 4: Darstellung des Pipettierschemas

Zugegebene Menge von MAH 63 bzw. MAH 105	Endkonzentration im Organbad
3µl	3 µmol/l
+ 7µl	10 µmol/l
+ 20 µl	30 µmol/l
+ 70 µl	100 µmol/l

2.7.3 Vorkontraktion

Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, mussten Darm, Aorta und Pulmonalarterie vorkontrahiert werden, um eine mögliche relaxierende Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur zu messen. Dabei wurden die KCl-Konzentrationen so gewählt, dass sie zu einer maximalen, jedoch noch reversiblen Kontraktion führten. Die ermittelten Konzentrationen für die einzelnen Organe sind dem Kapitel 2.6 zu entnehmen.

2.7.4 Durchführung der Versuche

Die Isolierung und Präparation der Organe erfolgte wie in Kapitel 2.4 besprochen. Die Organbäder wurden entsprechend ihrem Volumen mit Tyrode gefüllt und vortemperiert (siehe Kapitel 2.5.2). Aorta und Pulmonalarterie wurden in Ringe geschnitten während an Ileum, Vorhof und Papillarmuskel Silberhäkchen angebracht wurden.

Alle Organe mit Ausnahme des Papillarmuskels wurden nun in die Apparatur I, zwischen Draht und Organhalterung, eingespannt. Vor dem Einspannen musste mithilfe des Feintriebes die Organhalterung ganz nach oben verstellt werden, um das Organ voll zu „entspannen“ (siehe auch Kapitel 2.5.4). Bei Bedarf konnte der Aufhängedraht auf eine dem Organ entsprechende Größe verkürzt oder verlängert werden. Der Steg wurde nun nach unten bewegt und das Organ in die Tyrode-Lösung getaucht.

Nach Einschalten des Verstärkers und Schreibers konnte mithilfe eines Reglers der Schreibstift auf die Nulllinie gestellt werden.



Abbildung 13: Nahaufnahmen der eingespannten Organe. Von links nach rechts: isolierter Darm (Ileum), Aorta und rechter Vorhof (Atrium dexter)

Um die Ergebnisse untereinander vergleichbar zu machen, mussten die Organe vorgespannt werden. Durch den Feintrieb wurde die Halterung so weit nach unten bewegt, dass über den Dehnungsmessstreifen, den Verstärker und schließlich dem Schreiber eine für das Organ geeignete Spannung angezeigt wurde.

Nach einer anfänglichen Kontrollphase, in der die Organe sich stabilisieren mussten, konnte mit der niedrigsten Konzentration der Substanz begonnen werden. Nach 45 Minuten konnte der dort gemessene Wert für die Auswertung verwendet und der Versuch mit der nächsthöheren Konzentration fortgeführt werden.

An den Organen erfolgten Untersuchungen über unterschiedliche Wirkungen der Testsubstanz: An Aorta, Pulmonalarterie und Darm wurde gemessen, ob die Substanzen eine Relaxation der vorkontrahierten, glatten Muskulatur hervorrufen können. Am Vorhof wurde die Wirkung auf die Chronotropie (Herzfrequenz), am Papillarmuskel auf die Inotropie (Herzkraft), analysiert.

In den folgenden Kapiteln wird auf die Versuchsanordnung der einzelnen Organe eingegangen.

2.7.4.1 Aorta

Der Aortenring wurde wie bereits besprochen in die Apparatur eingespannt und der Steg abgesenkt. Daraufhin wurde mit dem Feintrieb eine Vorspannung von 5 cm bei 10 mV angelegt. Nach 20 Minuten wurde der Feintrieb eventuell nachjustiert und auf 5 mV umgeschaltet. Am Schreiber wurde der Schreibstift auf dem Nullpunkt positioniert.

Über die Ablassvorrichtung am Organbad konnte nun die Tyrode abgelassen werden, um das Organbad sofort mit 25ml bzw. 8ml Kaliumchloridlösung zu befüllen (siehe Kapitel 2.6). Die Messung wurde unmittelbar danach mit dem Herabsetzen des Stiftes und mit dem Knopf „Record On“ begonnen.

Nun musste die Plateauphase abgewartet werden. Durch die zugefügte Kaliumchloridlösung kam es zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, die nach circa 45 Minuten erreicht wurde. Als stabil galt die Plateauphase, wenn der Schreibstift über 2 cm (entsprechend 20 Minuten) keine nennenswerten Kontraktionsveränderungen registrierte. Nach dieser Kontrollphase konnte mit der ersten Konzentration entsprechend dem Pipettierschema begonnen werden.

2.7.4.2 Arteria pulmonalis

Der Vorgang bei der Pulmonalarterie war analog der Aorta (siehe Kapitel 2.7.4.1). Einziger Unterschied war eine andere Vorspannung, die auf das geringere Dehnungsvermögen der Pulmonalarterie gegenüber der Aorta zurückzuführen ist (siehe Tabelle 5).

2.7.4.3 Terminales Ileum

Das terminale Ileum musste mithilfe der Silberhäkchen an Organhalterung und Aufhängedraht eingespannt werden. Auch hier galt es, den Darm möglichst locker einzuspannen. Mithilfe des Feintriebes wurde bei einer Verstärkung von 5mV auf 5 cm vorgespannt. Während der 20-minütigen Gewöhnungsphase kam es vor, dass der Schreibstift besonders stark ausschlug. Das galt als ein positives Zeichen, da es auf Kontraktion und somit auf die noch intakte Peristaltik hindeutete. Nach der Gewöhnungsphase wurde die Nullpunkteinstellung durchgeführt und die Tyrode abgelassen. Das Organbad wurde mit

Kaliumchloridlösung befüllt, und die Messung aktiviert. Die Plateauphase musste über 2 cm stabil sein, um die Testung mit der niedrigsten Konzentration zu beginnen (analog Kapitel 2.7.4.1)

Tabelle 5: Die Werte in Zentimeter geben die Strecke am Millimeterpapier an, die mit dem Feintrieb gefahren werden mussten um die gewünschte Spannung zu erhalten. Die Millivolt mussten korrekt eingestellt sein um die gewünschte Spannkraft zu erreichen.

Organ	Vorspannung in cm	Millivolt	Kraft (in mN)
Aorta	10 cm	10 mV	19,6 mN
Pulmonalarterie	10 cm	5 mV	9,81 mN
Darm	5 cm	5 mV	4,92 mN
Vorhof	10,4 cm	5 mV	10,2 mN
Papillarmuskel	4 cm	5 mV	3,92 mN

2.7.4.4 Rechter Vorhof

Der präparierte Vorhof wurde ebenso wie das terminale Ileum mithilfe der angebrachten Silberhäkchen in die Apparatur eingespannt (siehe auch Kapitel 2.7.3). Es war zu beachten, dass das weiße Fettgewebe oben, also der physiologischen Position nachahmend, angebracht wurde. Der Steg wurde in die Tyrode getaucht und die Vorspannung angelegt (siehe Tabelle 5). Im Vorhof ist der Sinusknoten enthalten, wodurch das Organ nach kurzer Aufwärmzeit beginnen sollte selbstständig rhythmisch zu schlagen.

Nach der 30-minütigen Gewöhnungszeit wurde mit der Kontrolle begonnen.

Für die Messungen des Vorhofs wurde die Schreibergeschwindigkeit auf 5 mm/sek umgestellt. Nun wurden auf 6 cm des Millimeterpapiers aufgezeichnet, was einer Messung von 12 Sekunden entsprach. Durch die Multiplikation mit 5 konnte die Herzfrequenz pro Minute (bpm) ermittelt werden.

Diese Kontrollmessungen wurden alle 5 Minuten durchgeführt. Die gezählten Schläge am Millimeterpapier durften dabei um maximal 1–2 Schläge abweichen. Außerdem mussten mindestens 120 bpm erreicht werden.

Nachdem die Schlagfrequenz stabilisiert war, jedoch nach mindestens 50 Minuten, konnte mit den Versuchen begonnen werden.

Ebenso wie bei den anderen Organen wurde im Abstand von 45 Minuten analog dem Pipettierschema jeweils die nächsthöhere Konzentration dem Organbad zugeführt.

Innerhalb dieser Zeit wurde jedoch nicht, wie bei den anderen Organen konstant gemessen, sondern im Abstand von 5–7 Minuten immer 6 cm aufgenommen. Daraus wurde dann die Herzfrequenz, analog der Kontrolle, berechnet.

2.7.4.5 Papillarmuskel

Für den Papillarmuskel wurde eine gesonderte Apparatur verwendet, die in Kapitel 2.5.5 ausführlich beschrieben wurde. Nach der Präparation wurde der Papillarmuskel am Silberhaken in die Apparatur eingespannt, der untere Teil mit einem Schraubenzieher eingeklemmt und in die Tyrode-Lösung eingetaucht. Nach der Vorspannung (siehe Tabelle 5) wurde der Schreiber auf den Nullpunkt gesetzt. Besonders beim Papillarmuskel war zu beachten, dass es im Laufe des Experimentes zum Spannungsverlust kommen konnte, was sich durch eine Verschiebung des Schreibkopfes in den negativen Bereich zeigte. In diesem Fall musste durch den Feintrieb eine Nachjustierung vorgenommen werden um eine Verringerung der Kontraktionskraft zu verhindern (Reiter 1967).

Die Reizung des Papillarmuskels erfolgte über den Stimulator. Hierbei wurde die Stromstärke bis zur minimalen Reizschwelle des Muskels herabgedreht. Sodann konnte die Stärke um maximal 10% erhöht werden. Eine weitere Erhöhung hätte eine rasche Entleerung des Katecholaminspeichers und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge gehabt (Furchgott et al. 1959).

Nach einer Eingewöhnungszeit von 30 Minuten konnte mit der Kontrollmessung begonnen werden. Es wurden immer 6 Schläge aufgezeichnet und die Länge der Ausschläge mithilfe eines Lineals gemessen. Die gemessene Amplitude konnte zwischen den Aufzeichnungen maximal 0,1 cm abweichen. Nach 45 Minuten und einer konstanten Amplitude galt der Muskel als stabilisiert. Die Messung zwischen den einzelnen Konzentrationen anhand des Pipettierschemas wurden alle 5–7 Minuten vorgenommen.

2.8 Auswertung

2.8.1 Aorta, Ileum und Pulmonalarterie

Nach der Vorkontraktion dieser Organe musste, wie bereits in Kapitel 2.7.3 besprochen, das Erreichen der Plateauphase abgewartet werden. Zeichnete der Schreiber eine Gerade über 2 cm auf, konnte mit dem Einspritzen der niedrigsten Konzentration begonnen werden. Die Gerade wurde als Kontrolle herangezogen und der Abstand zum Nullpunkt in cm gemessen. Sie galt für diesen Versuch als Referenzwert (100%). Dadurch konnte die prozentuelle Abnahme der Kontraktion in Bezug auf diesen Wert gemessen werden. Physiologische Unterschiede zwischen den jeweiligen Organen wurden durch dieses System bewusst vernachlässigt und garantierten so eine Reproduzierbarkeit der Versuche.

Für Aorta Ileum und Arteria pulmonalis waren folgende Messpunkte festgelegt. Nach 45 Minuten, vor dem Einspritzen der nächst höheren Konzentration, wurde die Stelle am Millimeterpapier markiert und der Abstand zum Nullpunkt mit einem Lineal gemessen. Die Reduktion der Kontraktion, im Bezug zur Referenz konnte so leicht in Prozent ermittelt werden.

Die Zugkraft, die der Kraftwandler an den Schreiber übermittelte, wurde in Millinewton (mN) gemessen. Eine Verschiebung des Schreibkopfes um 1 cm entsprach einer Kraft von 0,98 mN. Aus diesem Grund mussten die in Zentimeter gemessenen Werte mit dem Eichwert 0,98 multipliziert werden.

2.8.2 Rechter Vorhof

Am isolierten rechten Vorhof wurde die Auswirkung der Substanz auf die Herzfrequenz analysiert. Im Gegensatz zu Aorta, Ileum und Pulmonalarterie, welche nur eine Abnahme der Kontraktion registrierten, konnte beim Vorhof auch eine Zunahme der Herzfrequenz gemessen werden.

Wie in 2.7.3.4 besprochen, wurden stets 12 Sekunden (entsprechend 6 cm) mit einem Abstand von 5–7 Minuten aufgezeichnet.

War die Herzfrequenz nach 50 Minuten stabilisiert, und über 2–3 Messungen unverändert, so wurde diese Anzahl an Schlägen als Referenzwert (100%) festgelegt. Als Messpunkt nach der Substanzzugabe galt, wie bei den anderen Organen, die letzte Aufzeichnung nach 45 Minuten. Die am Messpunkt

gemessene Anzahl der Schläge wurde mit 5 multipliziert und für die Auswertung herangezogen (siehe Kapitel 2.7.4.4). Dabei konnte sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Herzfrequenz registriert werden.

2.8.3 Papillarmuskel

Am Papillarmuskel wurden die gemessenen Amplituden, also der Ausschlag des Schreibkopfes, aufgezeichnet (siehe Kapitel 2.7.4.5). Ziel der Messung war es, eine mögliche Auswirkung der Substanz auf die Kontraktionskraft zu erfassen. Nach der Stabilisierungsphase von mindestens 45 Minuten wurden die Ausschläge als Referenzwert (100%) für die Kontraktionskraft herangezogen. 45 Minuten nach Zugabe der Substanz wurden 6 Schläge aufgenommen und die Abweichung der Kontraktionskraft in Prozent ausgerechnet.

Bei einer zu kleinen Amplitude, welche die 2 cm Grenze unterschritt, konnte durch den Verstärkungsregler der Ausschlag vergrößert werden. Dazu konnte man den Verstärker zwischen 5, 2, und 1 mV umstellen. Für eine korrekte Darstellung der Ergebnisse bedurfte es jedoch einer Multiplikation der Messwerte mit dem Eichfaktor 0,98 bei 5 mV, oder 0,39 bei 2 oder 1 mV.

2.8.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Sigma Plot 9.0 verwendet. Für jedes Organ wurde eine Kartei angelegt, wobei jeweils 4 Versuche pro Organ durchgeführt wurden. Das arithmetische Mittel, Standardabweichung und Standardfehler wurden berechnet. Mithilfe des Programmes wurden Graphen für die Berechnung der EC_{50} -Werte erstellt. Allgemein formuliert gibt die EC_{50} jene Konzentration an, bei der es zu einer 50%igen Wirkung kommt.

Für diesen Zweck wurden Konzentration-Wirkungs-Kurven angelegt. Auf der Abszisse wurden die Konzentrationen der Testsubstanz logarithmisch aufgetragen, während auf der Ordinate die Wirkung in Prozent, im Bezug zur Referenz, aufgetragen wurde.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mithilfe des Student-t-Tests bestimmt. Werte $<5\%$ ($P=<0,05$) galten als signifikant, Werte $<1\%$ ($P=<0,01$) und $<0,1\%$ ($P=0,001$) als hochsignifikant.

3. ERGEBNISSE

3.1 Testsubstanz MAH 63

3.1.1 Aorta

An der Aorta wurde die Wirkung der Testsubstanz auf eine mögliche Relaxation, also auf das Weitstellen der Gefäße, gemessen.

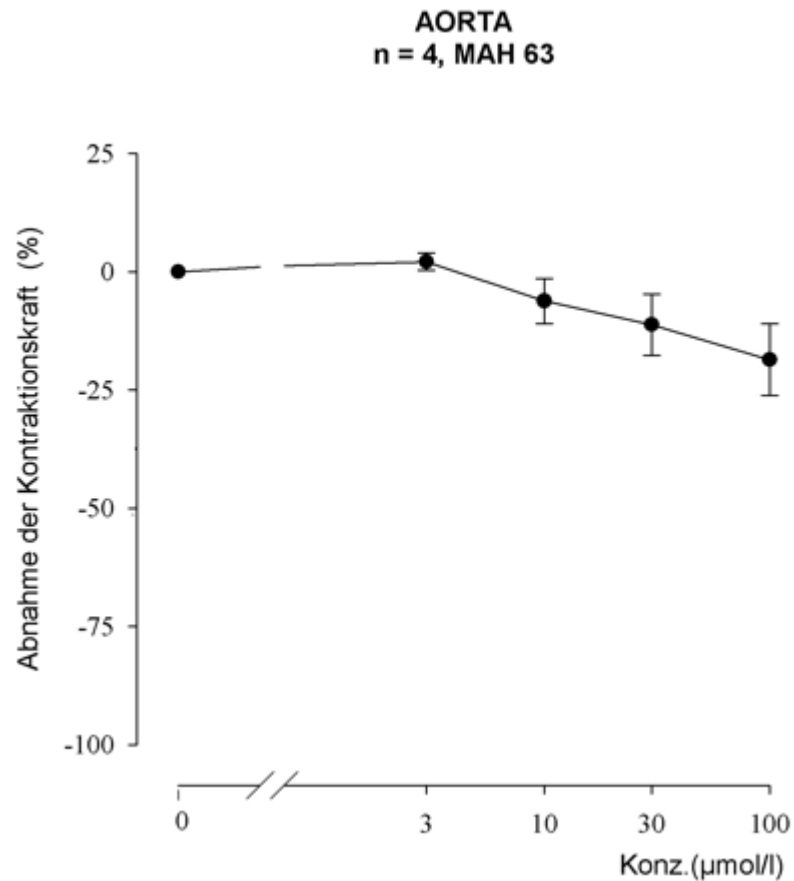
Nach der Vorkontraktion der Aorta mit KCl-Lösung wurde der Kontrollwert ermittelt der im Mittel bei $8,33 \pm 0,91$ mN lag. Es kam im Laufe des Versuches zu einer geringfügigen Abnahme der Kontraktion, die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) wurde jedoch nicht erreicht. Die Werte sind in der nachstehenden Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MAH 63 an der isolierten Aorta

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,33 \pm 0,91$	0 ± 0	4	–
3	$8,48 \pm 0,85$	$2,09 \pm 0,85$	4	n.s.
10	$7,89 \pm 1,11$	$-6,20 \pm 4,79$	4	n.s.
30	$7,50 \pm 1,18$	$-11,19 \pm 6,47$	4	0,05
100	$6,91 \pm 1,22$	$-18,58 \pm 7,58$	4	0,05

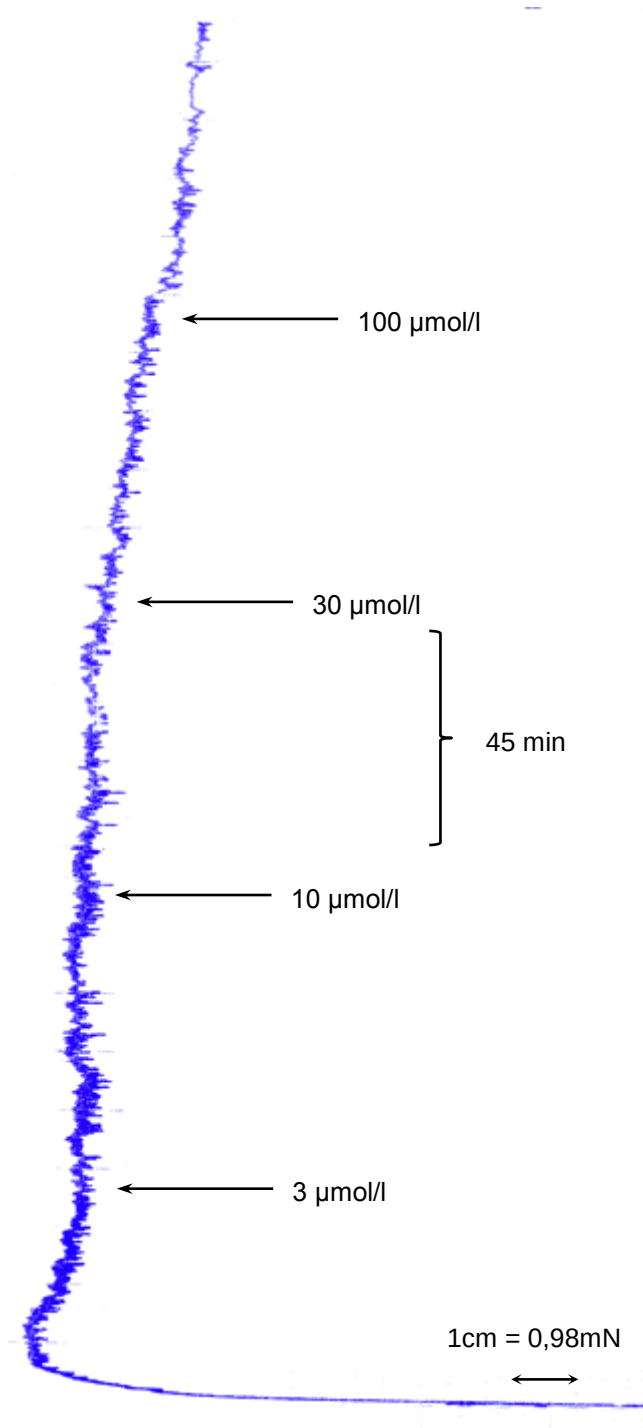
Aus der obenstehenden Tabelle ist die Kontraktionskraft (f_c) in Millinewton (mN) und in Prozent angegeben. Der Standardfehler (SEM) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) sind miteinander berechnet. Es wurden 4 Versuche mit MAH 63 an der isolierten Aorta durchgeführt.

Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 63.HCl an der isolierten Aorta



Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktion in Prozent und auf der x-Achse die 4 zugeführten Konzentrationen angegeben. Die Mittelwerte wurden als Punkte, der Standardfehler als Balken abgebildet. Die Konzentrationen sind logarithmisch aufgezeichnet um die Abstände überschaubar zu halten. Dies wird durch den doppelten Strich auf der Abszisse symbolisiert. Ab 10 µmol ist eine leichte vasodilatierende Wirkung zu erkennen, die jedoch auch bei 100 µmol nicht die EC_{50} erreicht.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung eines Versuches von MAH 63 an der isolierten Aorta



Anbei ist die Originalaufzeichnung des Schreibers dargestellt. Je weiter rechts sich die Kurve bewegt, desto geringer ist die Spannungsmessung am Kraftwandler. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Injektion. Die rapide Spannungsmessung an der Kurvenbasis ist auf die Wirkung der KCl-Lösung zurückzuführen. Nachdem die Kontraktion stabil wurde, wurde mit der ersten Injektion begonnen. Die Wirkung blieb jedoch weit unter den Erwartungen, eine signifikante Vasodilatation blieb aus.

3.1.2 Pulmonalarterie

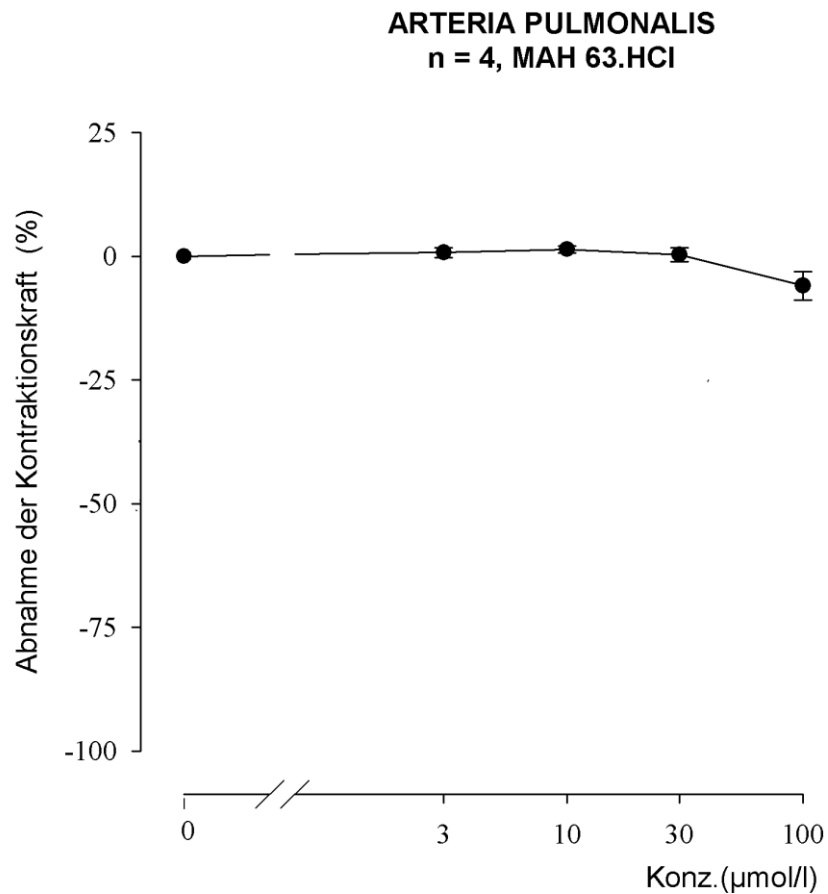
An der Pulmonalarterie wurde analog der Aorta die vasodilatatorische Wirkung untersucht. Die Vorkontraktion ergab einen Kontrollwert bei $10,9 \pm 1,18$ mN. Die Kontraktion löste sich bis zum Schluss nicht, eine mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) wurde nicht erreicht.

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MAH 63 an der isolierten Arteria pulmonalis

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,90 \pm 1,18$	0 ± 0	4	–
3 μmol	$11,00 \pm 1,24$	$0,75 \pm 1$	4	n.s.
10 μmol	$11,05 \pm 1,18$	$1,39 \pm 0,7$	4	n.s.
30 μmol	$10,93 \pm 1,14$	$0,35 \pm 1,42$	4	n.s.
100 μmol	$10,27 \pm 1,18$	$-5,97 \pm 2,89$	4	n.s.

In der Tabelle finden sich die gemessenen Werte zur Kontraktionskraft (f_c) der Pulmonalarterie in Millinewton (mN) und in Prozent mit zugehörigem Standardfehler (SEM) sowie Versuchsanzahl und Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

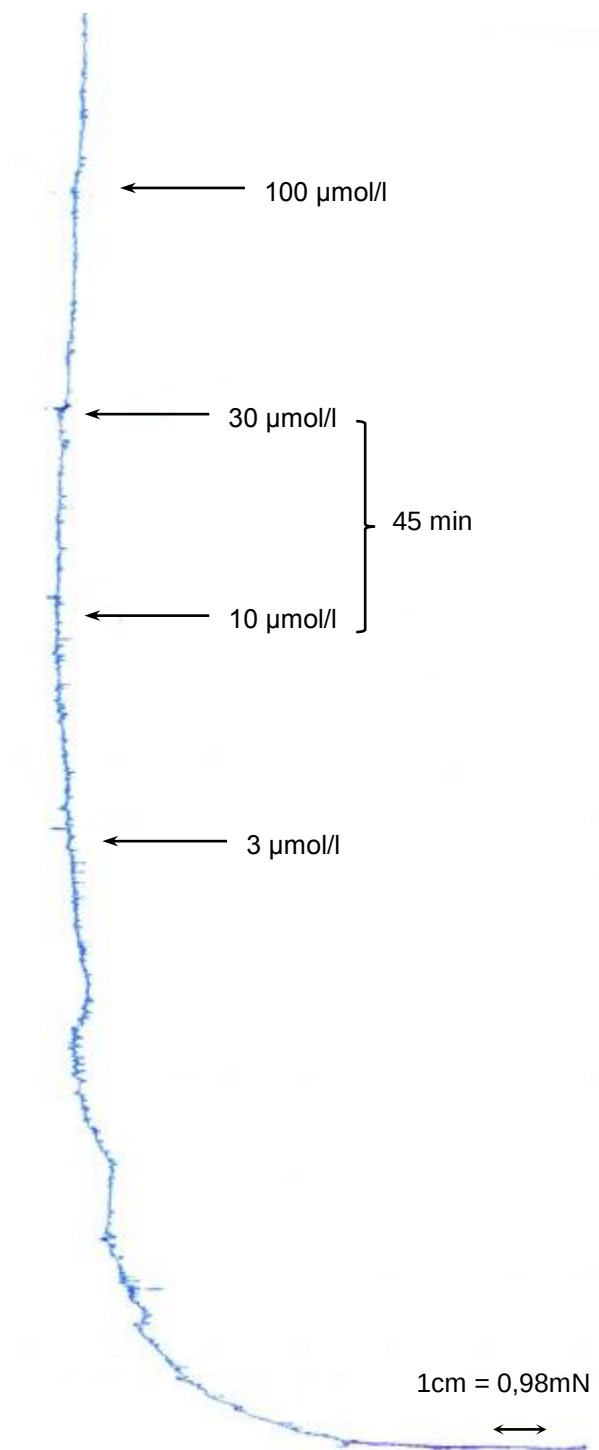
Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve an der Arteria pulmonalis



An der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden die Ergebnisse graphisch festgehalten. An der Abszisse sind logarithmisch die Konzentrationen, an der Ordinate der vasodilatatorische Effekt in Prozent aufgezeichnet. Die Punkte demonstrieren die Mittelwerte, die Striche beziehen sich auf den Standardfehler.

An der Arteria pulmonalis fiel eine gefäßerweiternde Wirkung aus. Die maximale Vasokonstriktion durch die Kalium-Lösung wurde demzufolge nicht vermindert.

Abbildung 17: Messergebnis eines Versuches an der Arteria pulmonalis



An der Originalabbildung (Abbildung 17) des Messgerätes ist die Unwirksamkeit deutlich zu erkennen. Es kam zunächst zu einer schnellen Kontraktion und zur Ausbildung einer Plateauphase. Die Zugabe von Testsubstanz erfolgte an den gekennzeichneten Stellen. Ein vasodilatatorischer Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur der Pulmonalarterie wurde in allen vier Konzentrationsstufen nicht erreicht.

3.1.3 Terminales Ileum

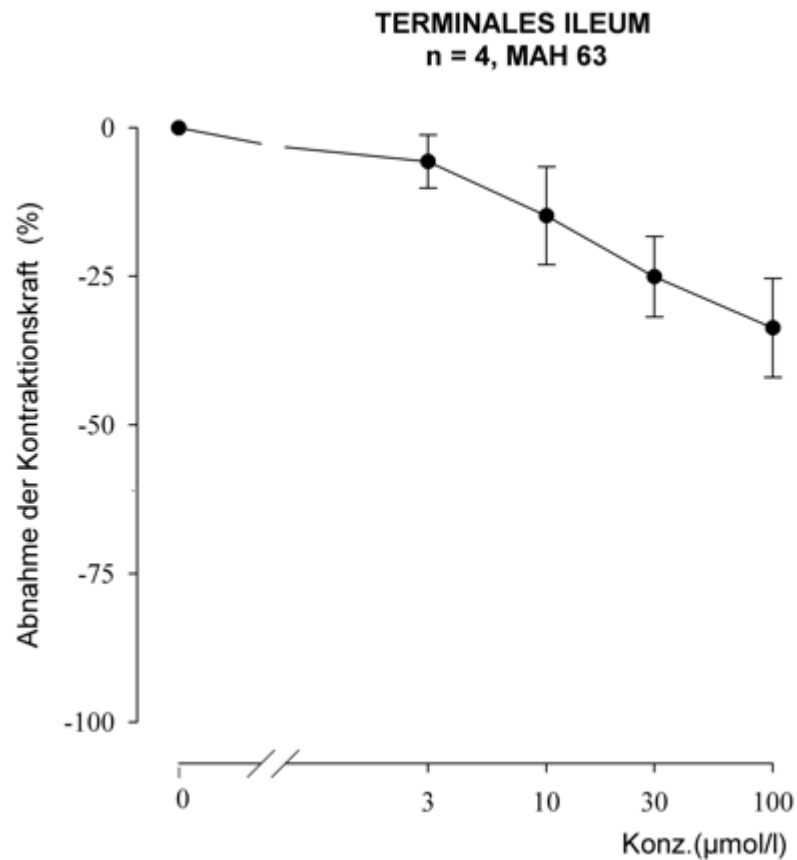
Am terminalen Ileum wurde eine mögliche spasmolytische, also eine krampflösende, Wirkung der Substanz auf die glatte Muskulatur des Darmes getestet. Am Darm wurde nach der Vorkontraktion ein Kontrollwert von $8,23 \pm 0,77$ mN gemessen. Es kam zu einer schwachen Abnahme der Kontraktion, ohne jedoch die EC_{50} zu erreichen.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MAH 63 am isolierten terminalen Ileum

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,23 \pm 0,77$	0 ± 0	4	–
3 μmol	$7,82 \pm 0,95$	$-5,7 \pm 4,46$	4	n.s.
10 μmol	$7,11 \pm 1,12$	$-14,81 \pm 8,24$	4	0,05
30 μmol	$6,20 \pm 0,88$	$-25,08 \pm 6,76$	4	0,05
100 μmol	$5,49 \pm 0,99$	$-33,67 \pm 8,31$	4	0,05

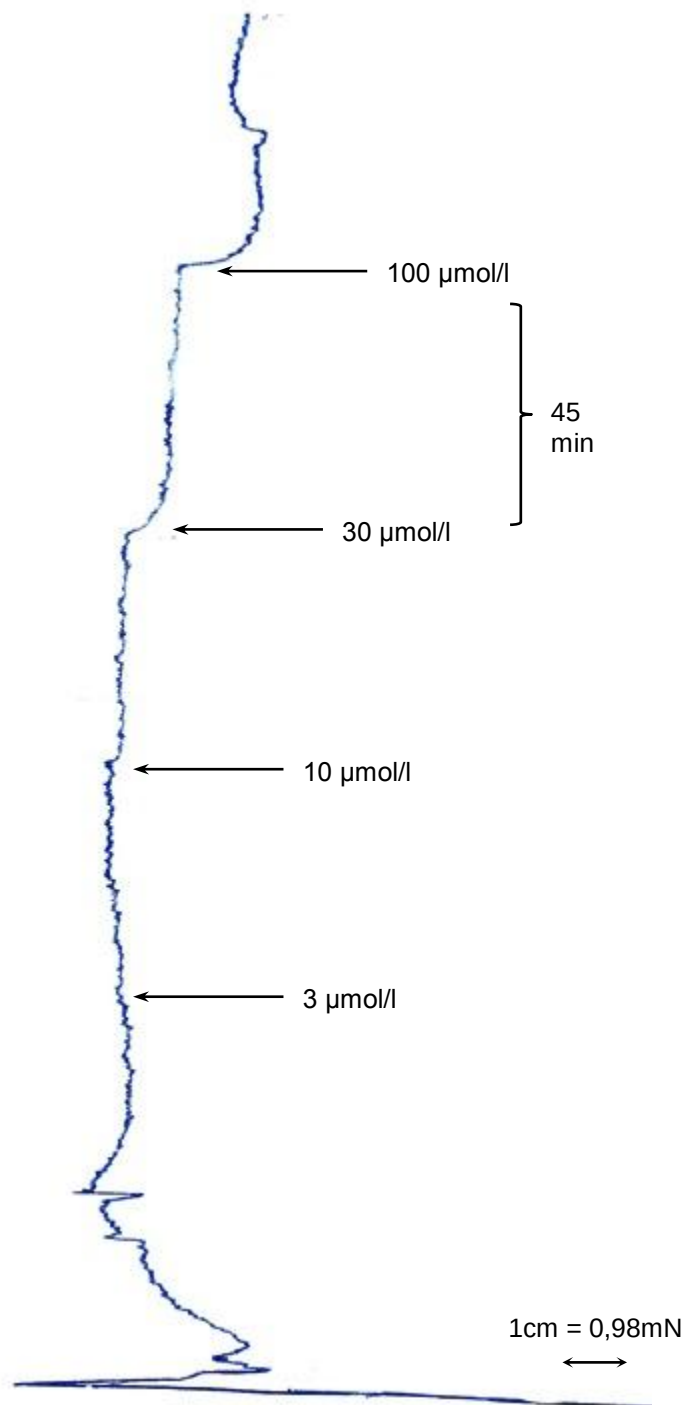
Die Tabelle gibt Auskunft über die Kontraktionskraft (f_c) des Darmes in Millinewton (mN) und in Prozent. Der Standardfehler (SEM) wurde miteinander berechnet. Ebenso ist die Irrtumswahrscheinlichkeit anhand des p-Wertes (P) angegeben.

Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 63 am terminalen Ileum



Wie an dieser Dosis-Wirkungs-Kurve illustriert, kam es zu einer nur schwachen spasmolytischen Aktivität des Darmes. An der x-Achse wurde die Konzentration, an der y-Achse die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur aufgezeichnet. Die Punkte symbolisieren die gemessenen Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler darstellen.

Abbildung 19: Aufzeichnungen eines Versuches von MAH 63 am isolierten Darm



An der Originalaufzeichnung des Schreibers ist die Wirkung auf das terminale Ileum festgehalten. Nach Zugabe der Kalium-Lösung kam es zu einer starken spitzförmigen Kontraktion die sich aber binnen weniger Minuten wieder löste. Nach Erreichen der Plateauphase wurde mit der Injektion begonnen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Eine leichte Spasmolyse zeigte sich erst ab einer Konzentration von 30 µmol. Trotz der leicht spasmolytischen Wirkung wurde die EC₅₀ nicht erreicht.

3.1.4 Vorhof

Am Vorhof wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Herzfrequenz untersucht. Der Kontrollwert für den Vorhof ergab sich aus den letzten Messungen nach der Stabilisationsphase. Es ergab sich ein Wert von $186,26 \pm 13,90$ bpm (Schläge pro Minute).

Im Falle des Vorhofes konnte der Standardfehler vernachlässigt werden, da der Kontrollwert durch unterschiedliche Präpariergeschwindigkeit, oder Zustand des Meerschweinchens stark variieren konnte.

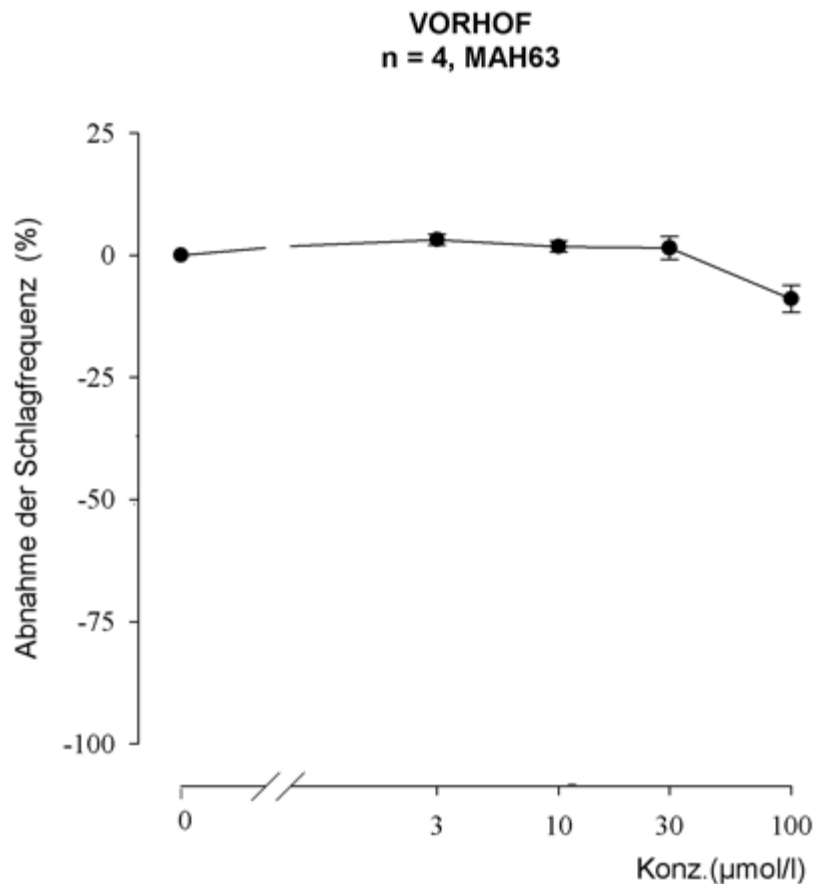
Die Substanz beeinflusste die Chronotropie des Vorhofes kaum, die Werte sind aus der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Die EC_{50} wurde nicht erreicht.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von MAH 63 am isolierten rechten Vorhof

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$186,25 \pm 13,90$	0 ± 0	4	–
3	$192,50 \pm 15,61$	$3,22 \pm 1,15$	4	n.s.
10	$190,00 \pm 16,20$	$1,78 \pm 1,10$	4	n.s.
30	$188,75 \pm 13,44$	$1,52 \pm 2,33$	4	n.s.
100	$168,75 \pm 9,44$	$-8,92 \pm 2,75$	4	n.s.

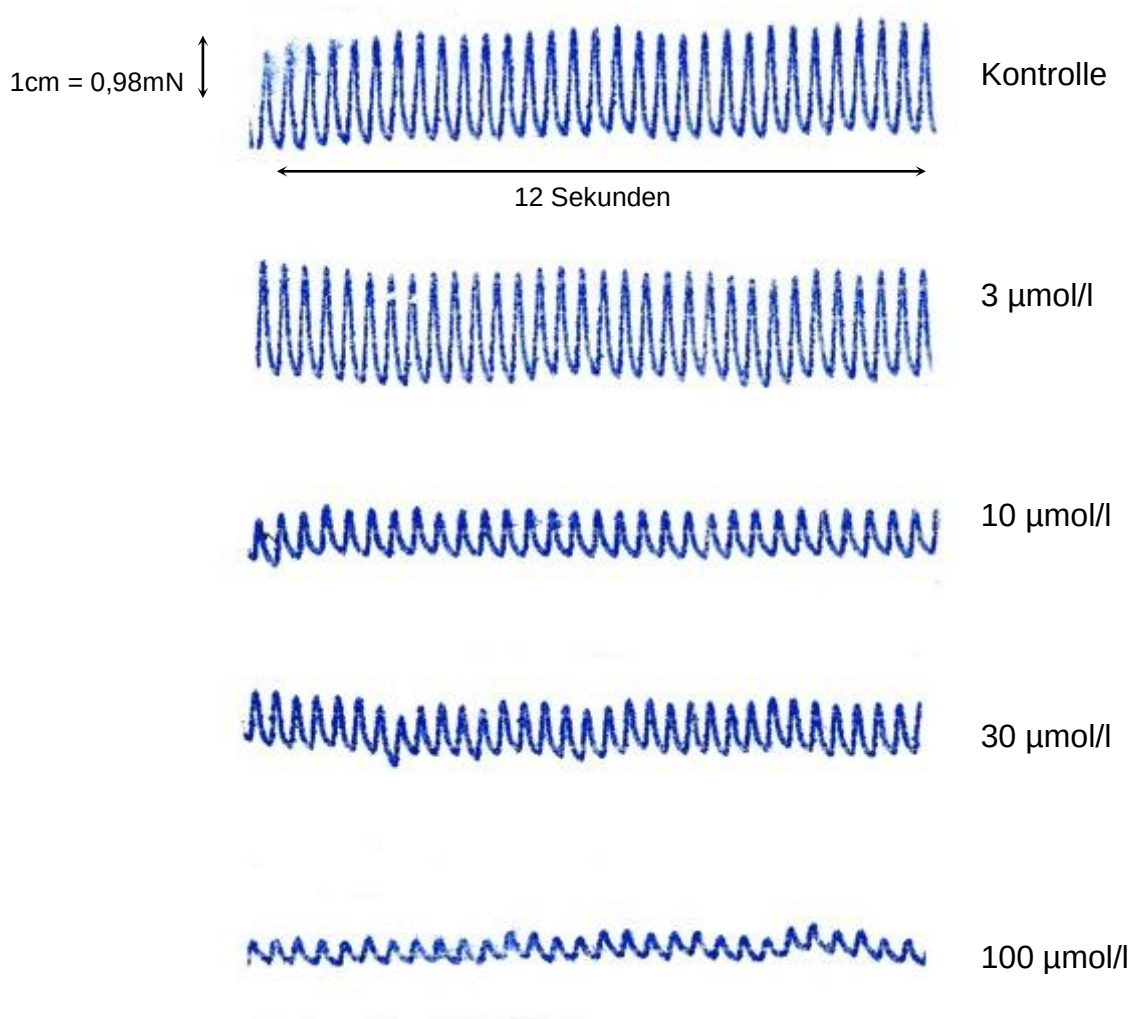
Die in der Tabelle angegebenen Messergebnisse enthalten die Schläge pro Minute (x/min), der Standardfehler - Standard error of measurement (SEM), sowie die Ab- oder Zunahme der Schlagfrequenz in Prozent.

Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Kurve von MAH 63 am isoliertem rechten Vorhof



An der X-Achse der Dosis-Wirkungs-Kurve ist die Konzentration logarithmisch festgehalten, auf der y-Achse die Ab- oder Zunahme der Schlagfrequenz in Prozent. Die Punkte geben die Mittelwerte der gemessenen Schläge an, die Balken symbolisieren den Standardfehler. Wie aus der Graphik ersichtlich blieb die Herzfrequenz bei den ersten drei Konzentrationen konstant und nahm nur bei der 100 µmol leicht ab.

Abbildung 21: Aufzeichnungen der Herzfrequenz bei der Zugabe von MAH 63.



Die digitalisierte Originalaufzeichnung illustriert die gemessenen Frequenzen 45 Minuten nach Zugabe der Testsubstanz. Es wurde 12 Sekunden aufgenommen und davon die Schläge pro Minute berechnet. Die Anzahl der Schläge blieb bis zur letzten Konzentration relativ konstant. Die leichte Abnahme der Amplitude ist physiologisch bedingt und wurde nicht durch die Testsubstanz verursacht.

3.1.5 Papillarmuskel

Am isolierten Papillarmuskel wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft, die Inotropie, gemessen.

Nach der Stabilisierungsphase wurde eine mittlere Amplitude von $1,83 \pm 0,55$ mN gemessen. Wie bereits in Kapitel 2.8.3 erläutert konnte bei zu geringer Amplitude die Verstärkung erhöht werden. Um die Ergebnisse vergleichbar zu gestalten, musste der Faktor miteinbezogen werden.

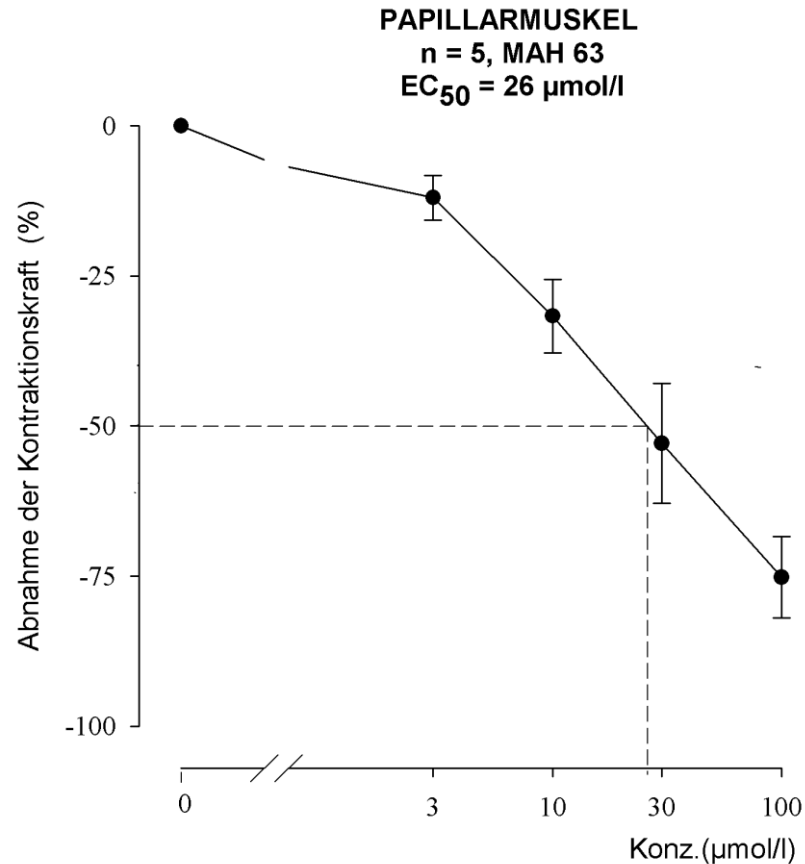
Im Laufe der Substanzzugabe kam es zu einer Reduktion der Amplitude um maximal 75% bei $100 \mu\text{mol}$. Die entsprechende EC_{50} wurde berechnet und entsprach $26 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse von MAH 63 am isolierten Papillarmuskel

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,83 \pm 0,24$	0 ± 0	5	–
3	$1,60 \pm 0,21$	$- 11,99 \pm 3,70$	5	n.s.
10	$1,20 \pm 0,12$	$- 31,69 \pm 6,12$	5	0,01
30	$0,77 \pm 0,03$	$- 52,88 \pm 9,96$	5	0,01
100	$0,39 \pm 0,05$	$- 75,19 \pm 6,77$	5	0,001

Die Tabelle gibt Auskunft über die Kontraktionskraft (f_c) in Millinewton (mN) und in Prozent, mit Einberechnung des Standardfehlers (SEM - standard error of measurement).

Abbildung 22: Dosis-Wirkungs-Kurve von der Testsubstanz MAH 63 an isolierten Papillarmuskelpräparaten

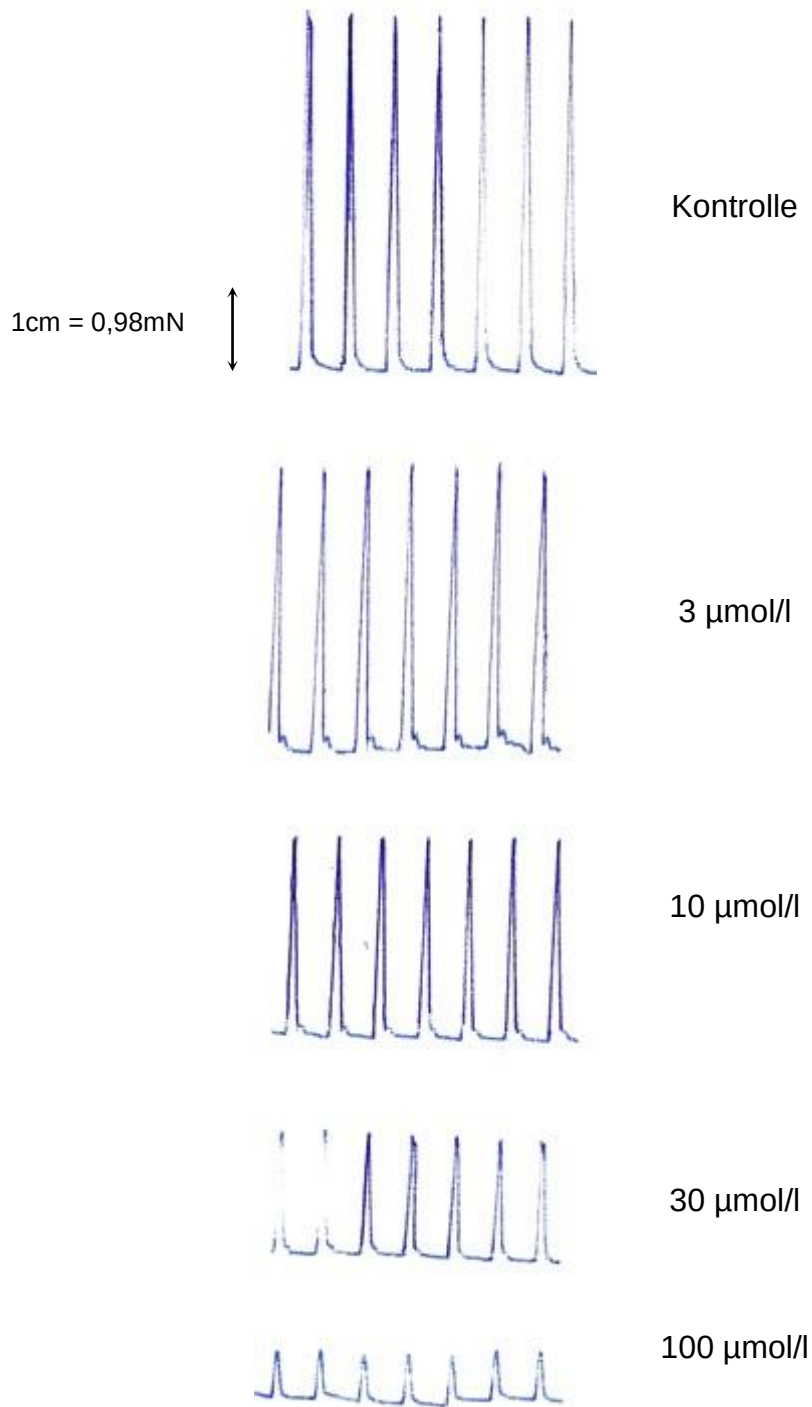


Die x-Achse zeigt die Konzentrationen der zugeführten Substanz, die y-Achse die Abnahme der Amplitude in Prozent. Die Punkte stehen für den gemessenen Mittelwert der Amplitude, die Balken sind der Standardfehler.

Wie aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ersichtlich kam es zunächst zu einer leichten, ab 10 µmol dann zu einer konstanten Abnahme der Kontraktionskraft, die proportional zur zugeführten Substanz erfolgte.

In der nachstehenden Abbildung sind die digitalisierten Messergebnisse dargelegt.

Abbildung 23: Aufzeichnungen des Papillarmuskels



Es wurden alle 5-7 Minuten eine Messung gemacht, in der Abbildung sind jedoch nur jene nach 45 Minuten abgebildet. Es wurde immer 6 Schläge aufgenommen und die Amplituden mit einem Lineal gemessen. Die Grafik verdeutlicht die Abnahme der Amplitude, was einer Abnahme der Kontraktionskraft entspricht.

3.2 Testsubstanz MAH 105

3.2.1 Aorta

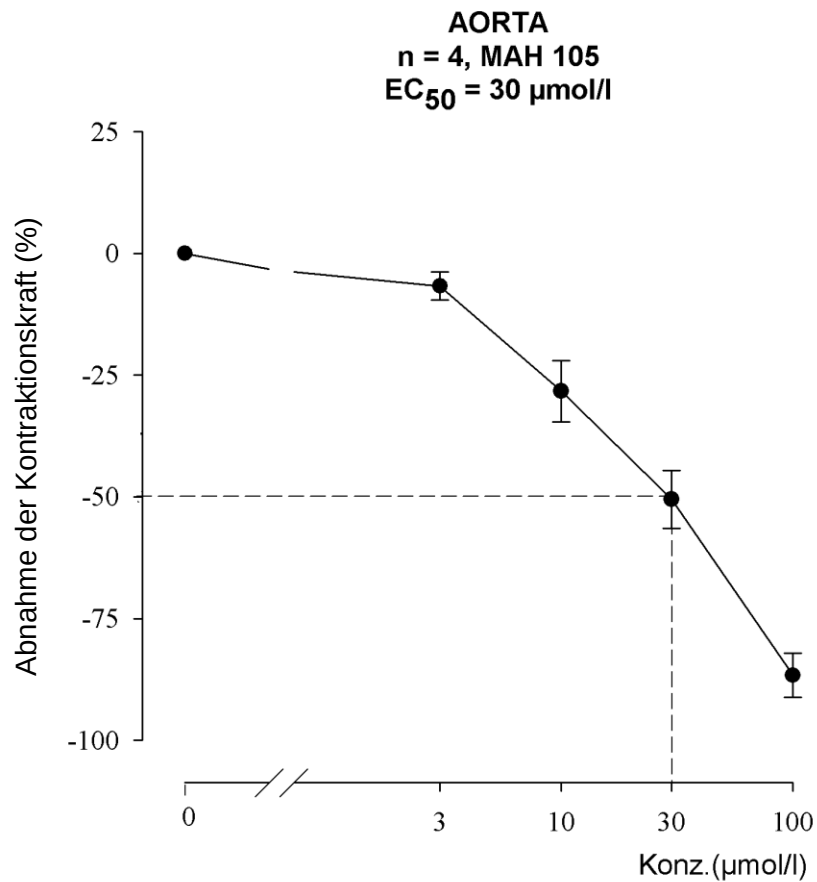
An der Aorta wurde, wie auch bei MAH 63, die Wirkung auf die Vasodilatation getestet. Der Kontrollwert wurde bei $10,21 \pm 0,8$ mN ermittelt. Es kam im Laufe der Versuche zu einer Relaxation der Gefäße. Die Vasodilatation begann schon bei der geringsten Konzentration und steigerte sich kontinuierlich. Die EC_{50} wurde bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Tabelle 11: Versuchsergebnisse von MAH 105 an der isolierten Aorta

MAH 105 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,21 \pm 0,8$	0 ± 0	5	–
3	$9,55 \pm 0,86$	$-6,68 \pm 2,9$	5	n.s.
10	$7,45 \pm 1,04$	$-28,26 \pm 6,29$	5	n.s.
30	$5,19 \pm 0,84$	$-50,52 \pm 5,92$	5	0,01
100	$1,39 \pm 0,5$	$-86,64 \pm 4,55$	5	0,01

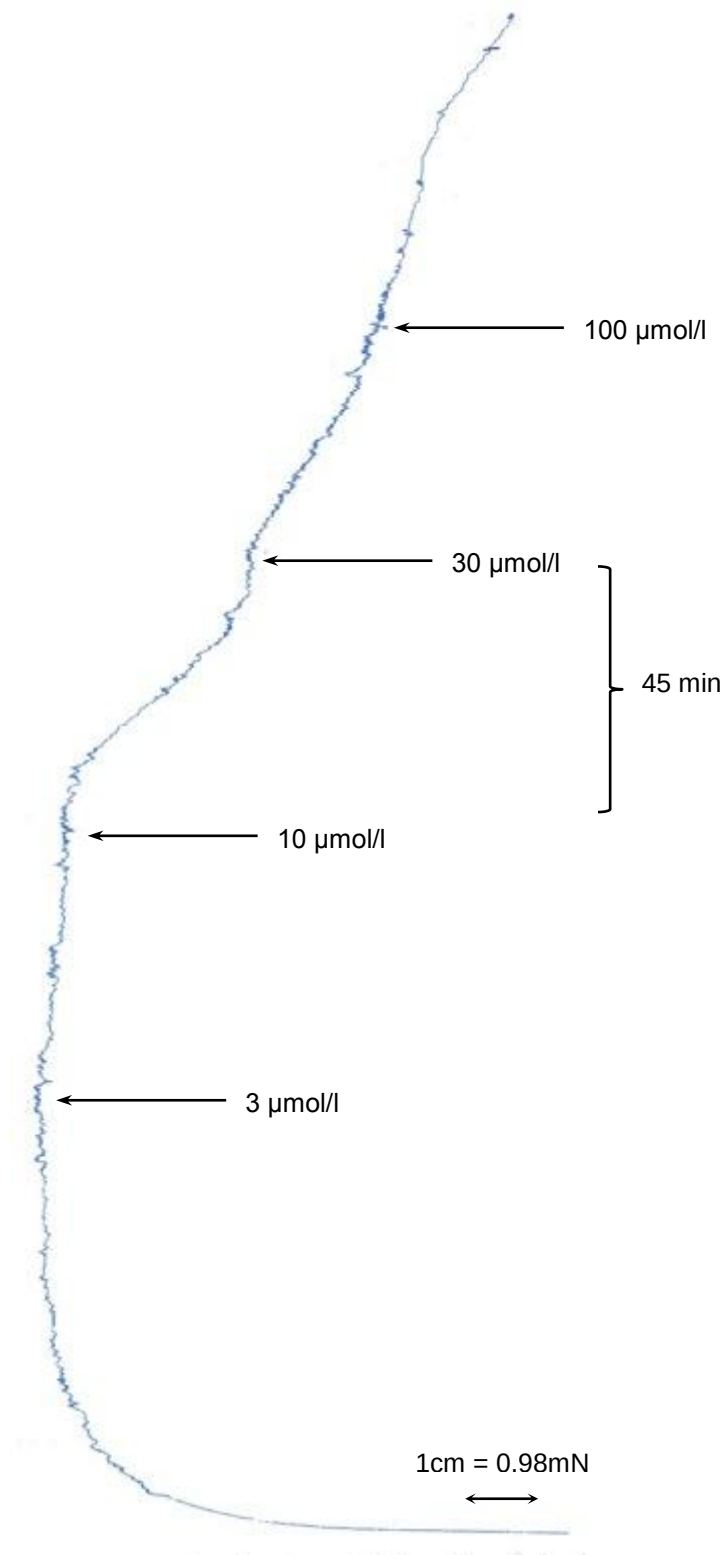
In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es wurde die Kontraktionskraft (f_c) in Millinewton (mN) sowie in Prozent, mit Einberechnung des Standardfehlers (SEM), und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P) gemessen.

Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Kurve von MAH 105 an der isolierten Aorta



Die Dosis-Wirkungs-Kurve demonstriert den relaxierenden Effekt der Testsubstanz MAH 105 auf die isolierte Aorta. An der x-Achse können die zugeführten Substanzkonzentrationen abgelesen werden, an der y-Achse ist der gefäßerweiternde Effekt in Prozent angegeben. Die Abnahme der Kontraktion erfolgte kontinuierlich und proportional zur Substanzzugabe. Bei der höchsten Konzentration wurde eine fast maximale Konzentration erreicht ($86,64 \pm 4,55 \%$).

Abbildung 25: Originalaufzeichnung eines Versuches von MAH 105 an der isolierten Aorta.



Die Grafik zeigt eine vom Schreiber aufgezeichnete Messung. Die Pfeile halten den Zeitpunkt der Substanzzugabe fest. Man erkennt eine, durch MAH 105 hervorgerufene, Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kurz nach Zugabe der zweiten Konzentration, die bis zum Schluss anhält.

3.2.2 Pulmonalarterie

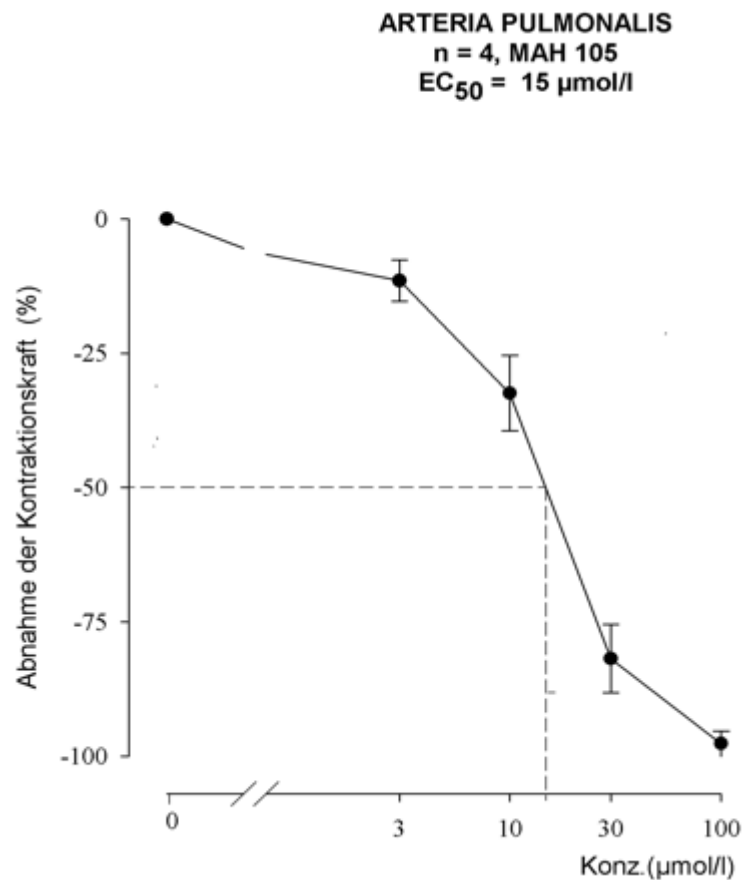
An der Pulmonalarterie wurde der Einfluss der Substanz auf die Vasodilatation überprüft. Nach der ersten Konzentrationszugabe von 3 μmol , kam es bereits zu einer 10% Erschlaffung der glatten Muskulatur. Die Relaxation stieg kontinuierlich an, die EC_{50} wurde bei 15 μmol erreicht. Den Ergebnissen zufolge kann von einer starken vasodilatatorische Wirkung ausgegangen werden.

Tabelle 12: Versuchsergebnisse von MAH 105 an der isolierten Pulmonalarterie

MAH 63 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,98 \pm 1,41$	0 ± 0	4	–
3	$10,76 \pm 1,70$	$-11,49 \pm 3,88$	4	n.s.
10	$8,33 \pm 1,77$	$-32,42 \pm 6,98$	4	0,01
30	$2,30 \pm 0,99$	$-81,85 \pm 6,35$	4	0,001
100	$0,20 \pm 0,20$	$-97,45 \pm 2,35$	4	0,001

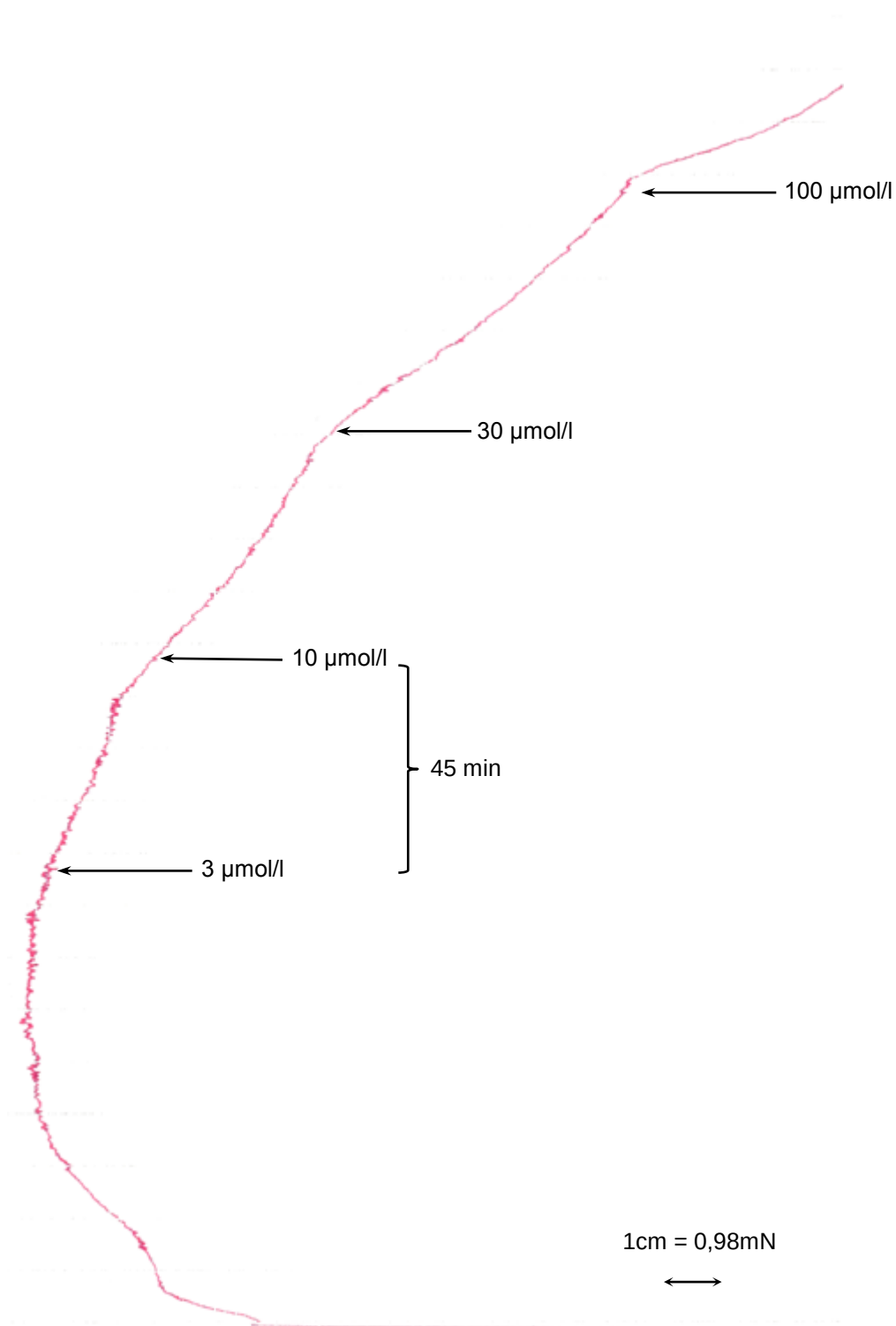
Tabelle 12 demonstriert die Versuchsergebnisse von MAH 105 an der isolierten Pulmonalarterie. Es sind die im Mittel gemessenen Kontraktionskraft (f_c) in Millinewton (mN) und in Prozent angegeben, sowie der Standardfehler (SEM) und die Versuchsanzahl.

Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Kurve der MAH 105 Testsubstanz an der isolierten Arteria pulmonalis.



Wie aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ersichtlich führt die Testsubstanz MAH 105 zu einer starken Relaxation der Pulmonalarterie. Von der x-Achse können die zugeführten Konzentrationen, von der y-Achse die ausgelöste Relaxation abgelesen werden. Die Punkte stehen für den Mittelwert der Ergebnisse, die Balken für den Standardfehler. Bereits bei der niedrigsten Konzentration kam es zu einer 10%igen Abnahme der Kontraktion. Bei der letzten Konzentration war die Arterie so weitgestellt, dass sie unter der, durch die Vorspannung hervorgerufene Kontraktion lag, und somit nicht mehr vom Schreiber messbar war.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Messung von MAH 105 an einer isolierten Pulmonalarterie



Die Originalaufzeichnung illustriert die durchgeführte Messung. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Substanzzugabe, dazwischen liegt eine 45-minütige Messung. Es wurde eine besonders starke vasodilatierende Wirkung registriert.

3.2.3 Terminales Ileum

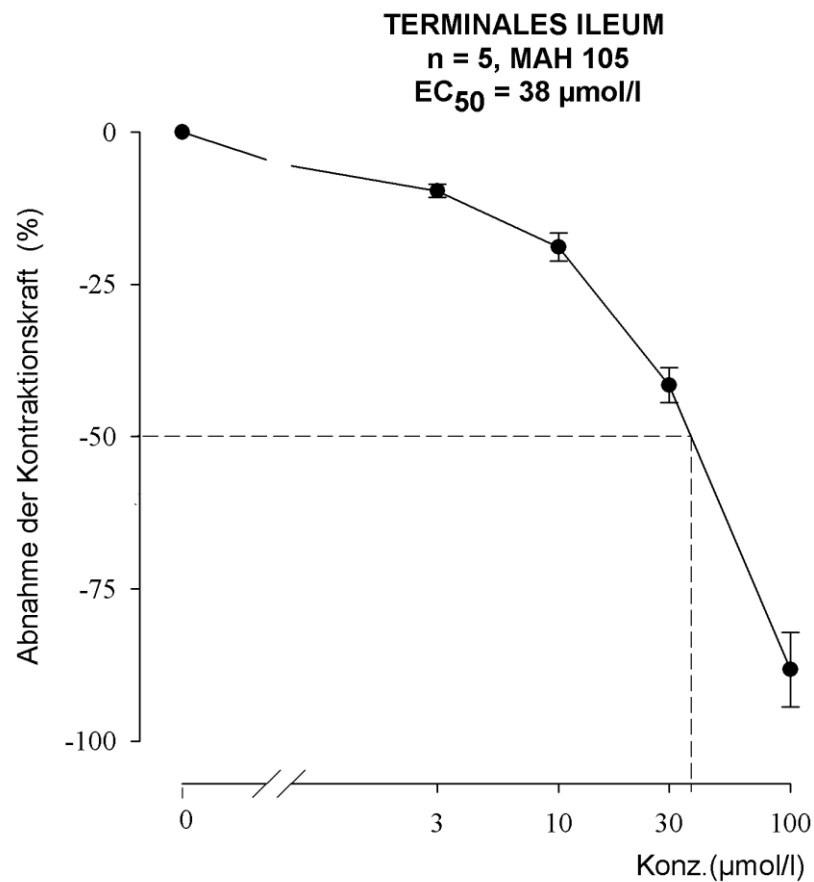
Am terminalen Ileum wurde die Auswirkung der Substanz auf die Spasmolyse, also auf die Entspannung der Darmmuskulatur analysiert. Die Vorspannung ergab im Mittel eine Krafteinwirkung von $11,21 \pm 1,60$ mN. Die untenstehenden Ergebnisse zeigen eine stark spasmolytische Wirkung, die bereits nach der niedrigsten Konzentration beginnt. Bei der zweiten, 3fach höheren Konzentration, konnte nur noch eine 9%ige Verminderung gemessen werden. Die EC_{50} wurde bei einer relativ hohen Konzentration von $38 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Tabelle 13: Versuchsergebnisse von MAH 105 am isolierten terminalen Ileum

MAH 105 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,21 \pm 1,60$	0 ± 0	5	–
3	$10,13 \pm 1,44$	$-9,65 \pm 1,05$	5	n.s.
10	$9,00 \pm 1,18$	$-18,88 \pm 2,34$	5	0,05
30	$6,68 \pm 1,14$	$-41,56 \pm 2,89$	5	0,01
100	$1,39 \pm 0,66$	$-88,24 \pm 6,12$	5	0,001

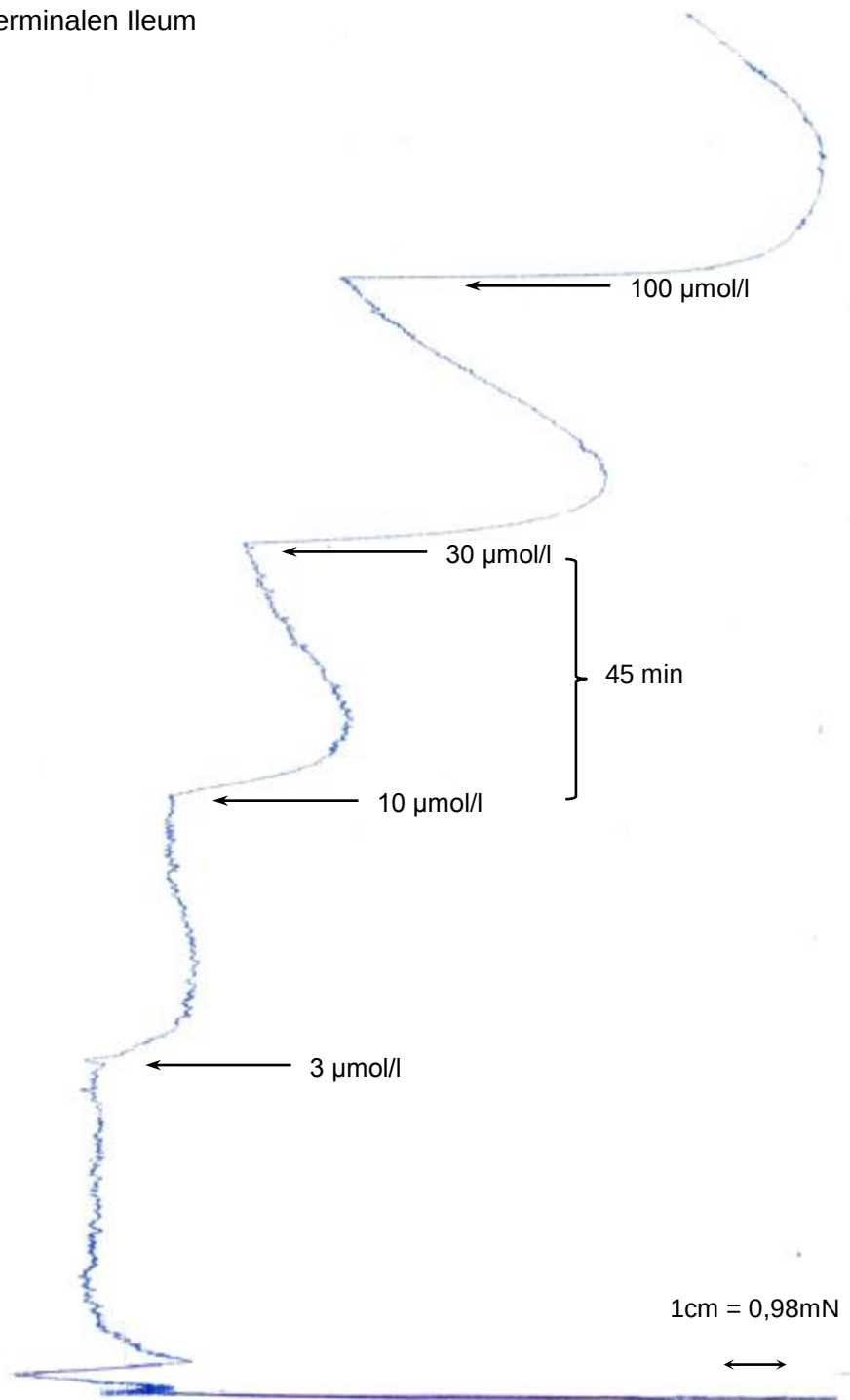
In der obenstehenden Tabelle ist die gemessene Kontraktionskraft des isolierten Darmes mit Einbezug des Standardfehlers (SEM) in Millinewton (mN) und in Prozent angegeben.

Abbildung 28: Konzentration-Wirkungs-Kurve der Testsubstanz MAH 105 am isolierten terminalen Ileum



Wie aus der Konzentration-Wirkungs-Kurve ersichtlich kam es unter Einfluss von MAH 105 zu einer spasmolytischen Aktivität des Darmes. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Konzentrationen, die y-Achse die gemessene Spasmolyse in Prozent.

Abbildung 29: Digitalisierte Originalaufzeichnung eines Versuches von MAH 105 am isolierten terminalen Ileum



In der digitalisierten Aufnahme ist das Ergebnis der Messung dargestellt. Man erkennt eine rapide Abnahme der Kontraktionskraft kurz nach der mit den Pfeilen dargestellten Injektion der Substanz. Die Kontraktion wurde jedoch bis zum Erreichen des Steady States teilweise wiederhergestellt. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den Konzentrationen 30 und 100 μmol .

3.2.4 Rechter Vorhof

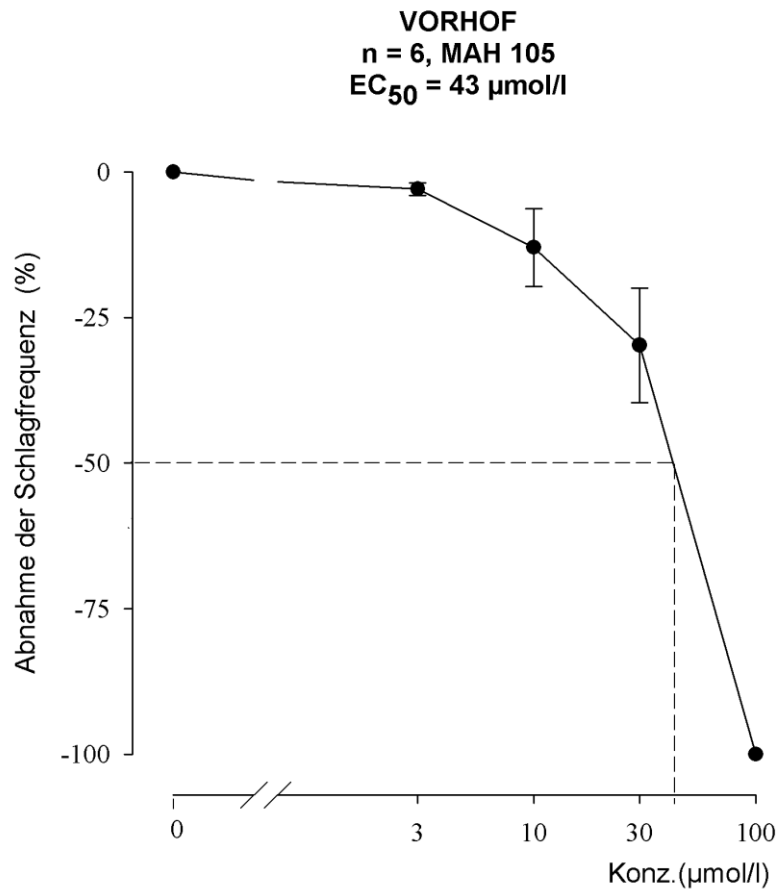
Am rechten Vorhof konnten die Wirkungen von MAH 105 auf die Chronotropie, also auf die Herzfrequenz, gemessen werden. Die Herzfrequenz nach der Stabilisationsphase war stets unterschiedlich, weswegen man den Standardfehler vernachlässigen konnte. Die Substanz wirkte negativ chronotrop, es kam also zu einer Verminderung der Schlagfrequenz. Bei der höchsten Konzentration kam es zu einem plötzlichen Stillstand des rechten Vorhofes.

Tabelle 14: Versuchsergebnisse von MAH 105 am isolierten rechten Vorhof

MAH 105 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	202,50 $\pm$ 13,15	0 $\pm$ 0	6	–
3	196,67 $\pm$ 13,40	-2,95 $\pm$ 1,12	6	n.s.
10	175,00 $\pm$ 16,23	-12,96 $\pm$ 6,69	6	0,05
30	139,17 $\pm$ 18,14	-29,75 $\pm$ 9,82	6	0,005
100	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6	0,001

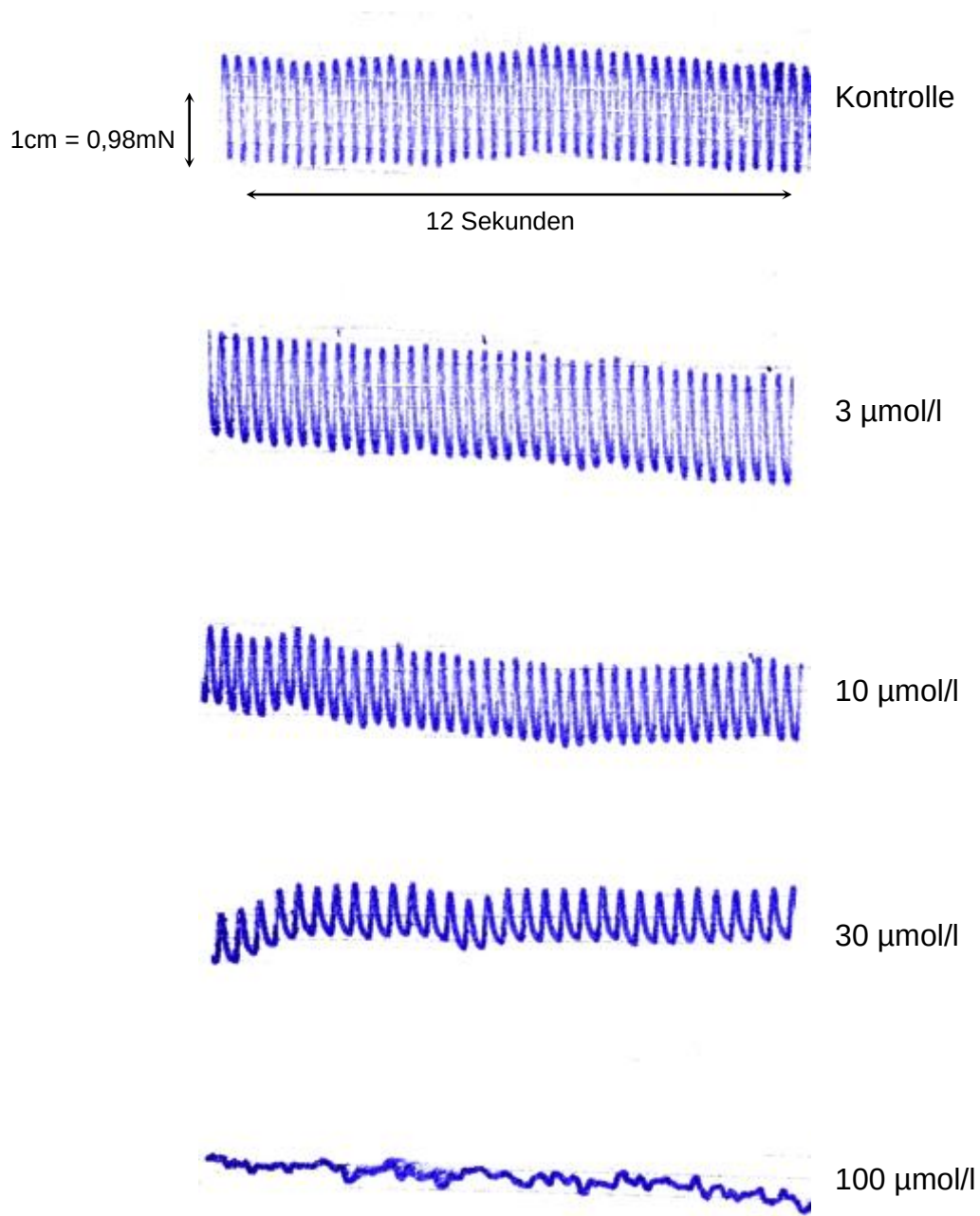
Die Tabelle gibt Auskunft über die gemessenen Schläge pro Minute (x/min) und den Standardfehler (SEM), sowie die Veränderung der Herzfrequenz in Prozent.

Abbildung 30: Konzentration-Wirkungs-Kurve der Testsubstanz MAH 105 am isolierten rechten Vorhof



An der Dosis-Wirkungs-Kurve ist der Effekt der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz graphisch festgehalten. Die Abszisse zeigt die unterschiedlichen zugeführten Konzentrationen, die Ordinate die Abnahme der Schlagfrequenz. Man erkennt eine leichte Abnahme der Schlagfrequenz bei den Konzentrationen 3, 10 und 30. Wenige Minuten nach Zugabe der höchsten Konzentration kam es zunächst zu Arrhythmien, gefolgt von Vorhofflimmern. Nach weiteren 5 Minuten kam es schließlich zur totalen Inhibition der Erregungsbildung am Sinusknoten.

Abbildung 31: Original aufgenommene und digitalisierte Aufzeichnung der Messungen am isolierten Vorhof.



Die Messzeit betrug immer 12 Sekunden, worauf die bpm (beats per minute) berechnet wurden. 1 Zentimeter des Schreiberausschlages entsprach stets 0,98 gemessene Millinewton. Die unregelmäßigen Striche bei der höchsten Konzentration wurden als Absterben des Vorhofes unter Verlust seiner Pacemakeraktivität gewertet.

3.2.5 Papillarmuskel

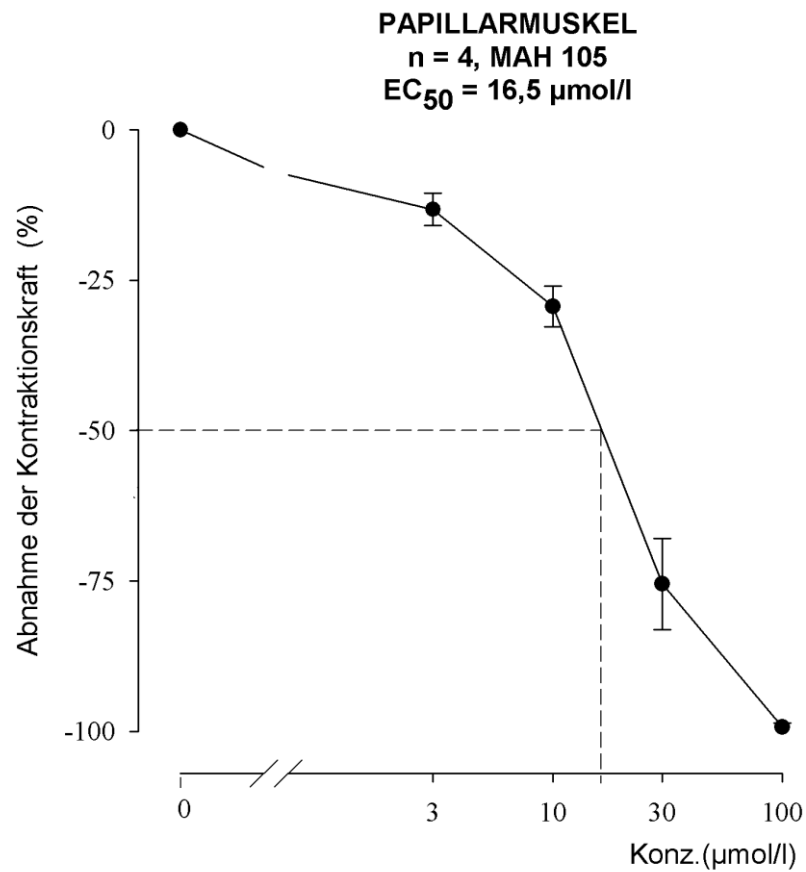
Am Papillarmuskel konnte der Einfluss von MAH 105 auf die Herzkraft gemessen werden. Nach der Stabilisationsphase wurde die Kontrollmessung durchgeführt. Es wurde eine mittlere Amplitude von $1,16 \pm 0,16$ mN gemessen. Nach Zugabe von MAH 105 kam es im Laufe des Experimentes zu einer relativ konstanten Abnahme der Kontraktionskraft, die bei $100 \mu\text{mol/l}$ ihr Maximum erreichte. Eine EC_{50} wurde bei einer Konzentration von $26 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Tabelle 15: Versuchsergebnisse von MAH 105 am isolierten Papillarmuskel

MAH 105 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchs- anzahl (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,16 \pm 0,16$	0 ± 0	4	–
3	$1,01 \pm 0,16$	$-13,21 \pm 2,67$	4	0,05
10	$0,82 \pm 0,13$	$-29,37 \pm 3,42$	4	0,01
30	$0,27 \pm 0,09$	$-75,50 \pm 7,58$	4	0,001
100	$0,01 \pm 0,01$	$-99,29 \pm 0,71$	4	0,001

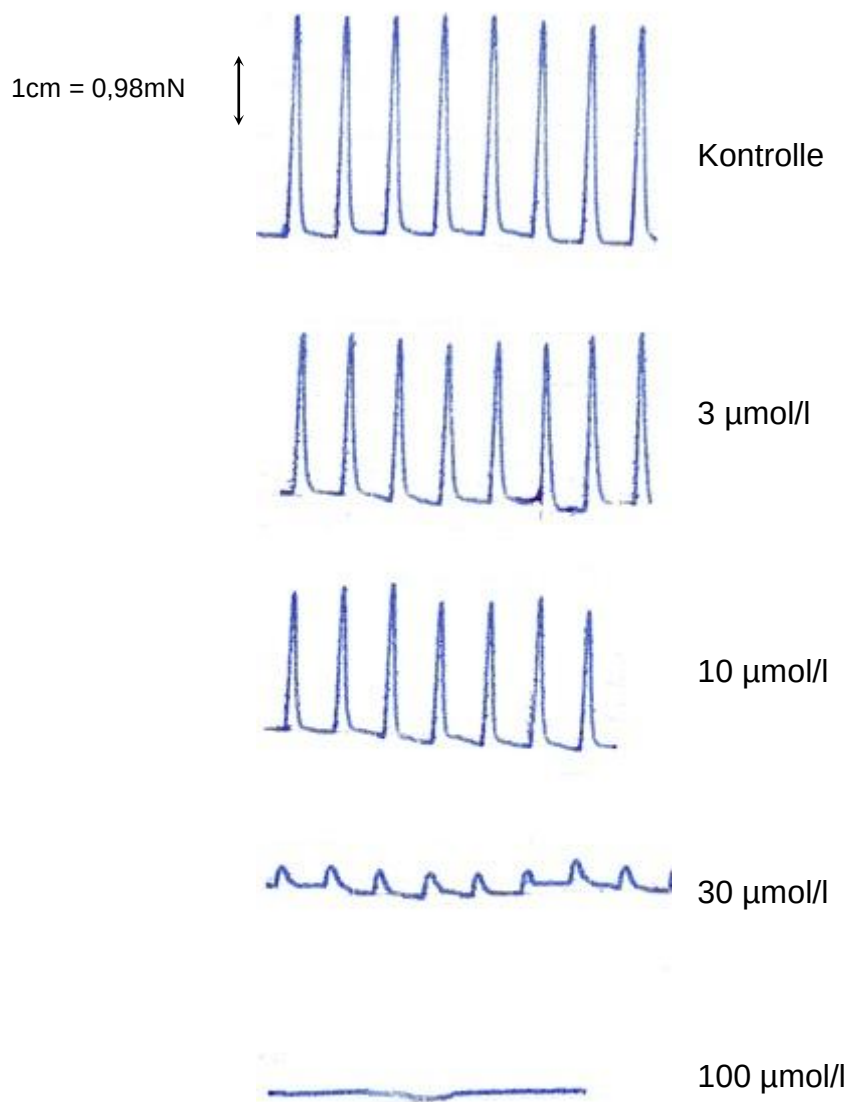
In der obenstehenden Tabelle sind die Mittelwerte der gemessenen Amplituden in Millinewton (mN), inklusive Standardfehler (SEM), aufgelistet. Die Abnahme der Kontraktionskraft ist in Prozent angegeben.

Abbildung 32: Konzentration-Wirkungs-Kurve der MAH 105 Testsubstanz am isolierten Papillarmuskel



An der Dosis-Wirkungs-Kurve des Papillarmuskels ist der Einfluss von MAH 105 auf die Kontraktionskraft graphisch dargestellt. Auf der Abszisse finden sich logarithmisch die zugeführten Konzentrationen in µmol/l, an der Ordinate ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt. Die Abnahme der Inotropie erfolgte zunächst leicht, nach der Zugabe von 10 µmol jedoch stark. Die halbmaximale Abnahme (EC₅₀) wurde bei 16,5 µmol/l erreicht.

Abbildung 33: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH 105 auf den isolierten Papillarmuskeln



An der Abbildung 33 wird die Originalaufzeichnung eines Versuches digitalisiert dargestellt. Die Aufzeichnungen erfolgten nach Erreichen des Steady-States nach jeweils 45 Minuten. Man erkennt einen zunächst leichten Verlust der Kontraktionskraft, der jedoch bei $30\text{ }\mu\text{mol/l}$ stark zunimmt. Die negativ inotrope Wirkung erreicht bei $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ das Maximum. Circa 20 Minuten nach Substanzzugabe kam es zu einem Stillstand des Papillarmuskels, worauf die Versuche abgebrochen wurden.

4. DISKUSSION

4.1 Interpretation der Ergebnisse von MAH 63

Ziel der Versuche war es, eine vermutete gefäßerweiternde und spasmolytische Wirkung zu bestätigen um ein mögliches Einsatzgebiet im Rahmen einer arteriellen oder pulmonalen Hypertonie, Herz-Kreislauf-Erkrankung und als Spasmolytikum nachzuweisen. Die Messungen an den isolierten Organen von Meerschweinchen zeigen eine selektive negativ inotrope Wirkung von MAH 63 am Papillarmuskel. Sowohl an der Aorta, als auch an der Pulmonalarterie wurde keine mittlere effektive Konzentration gemessen (EC_{50}). Am isolierten Darm wurde ebenfalls eine nur sehr schwache spasmolytische Aktivität registriert, auch hier wurde die EC_{50} nicht erreicht. Am Herzen allerdings wurde eine Reduktion der Herzkraft, bei gleichbleibender Chronotropie festgestellt. Die EC_{50} wurde am isolierten Papillarmuskel bei 26 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Aufgrund der organspezifischen Wirkung am Papillarmuskel besteht für die Substanz ein Anwendungspotential im Bereich der koronaren Herzkrankheit und der arteriellen Hypertonie. Speziell bei erhöhtem Sympathikustonus kommt es zur Steigerung der Herzkraft, was sich an den Blutgefäßen durch eine Blutdruckerhöhung äußert. Eine negativ inotrop wirkende Substanz könnte - analog den heute eingesetzten β -Adrenorezeptorblockern - durch Abschirmung des Herzens den Blutdruck senken. Ebenso könnte die Substanz im Rahmen einer Angina pectoris, bei Minderdurchblutung der Koronararterien eingesetzt werden. Durch die verminderte Kontraktilität würde der O_2 -Verbrauch gesenkt werden und die Angina-Symptome würden sich verbessern. Die Substanz wäre demzufolge für eine Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen von Interesse, bei denen eine negativ inotrope Wirkung erwünscht ist. Die Untersuchung des Wirkungsmechanismus wäre von besonderer Bedeutung um die Kenntnisse dieser potentiellen neuen Arzneistoffklasse zu vervollständigen, und um weitere Derivate mit analoger Wirkung zu entwickeln.

4.2 Interpretation der Ergebnisse von MAH 105

Die Auswirkungen von MAH 105 an den fünf isolierten Organen zeigten sich, im Gegensatz zu MAH 63 als besonders ausgeprägt. An allen Organen wurde eine mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) erreicht. Besonders ausgeprägt war die Gefäßrelaxation an der Pulmonalarterie gefolgt von der Aorta. Die EC_{50} Werte an der Pulmonalarterie betrug 15 μmol , an der Aorta 30 μmol . Auch eine spasmolytische Aktivität konnte nachgewiesen werden. Die negativ inotrope Wirkung ist bei MAH 105 stärker ausgeprägt, als bei MAH 63. Die Herzfrequenz am Vorhof wurde zwar wenig beeinflusst, jedoch kam es bei der höchsten Konzentration zu einem Stillstand des Sinusknotens.

Um die Ergebnisse korrekt zu beurteilen bedarf es folgender Erklärung. Das Erreichen einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) deutet zwar auf eine prinzipielle Wirkung hin, kann aber nicht zur Beurteilung der Wirksamkeit der Substanz auf den Organismus herangezogen werden. Je weniger Substanz für das Erreichen der EC_{50} benötigt wird, desto besser die Wirksamkeit. Dazu müsste die EC_{50} bereits bei möglichst Konzentrationen bis maximal 30 μmol erreicht werden. Für eine Blutkonzentration von 30 μmol müssten beispielsweise einige Gramm Substanz zugeführt werden, was sich sowohl auf die Compliance, als auf die Eliminationskapazität von Niere und Leber negativ auswirken würde.

Angesichts dessen, könnte MAH 105 als mögliches Therapeutikum im Rahmen einer pulmonalen oder arteriellen Hypertonie Anwendung finden. Besonders die Tatsache, dass an der Pulmonalarterie die EC_{50} bereits bei der halben Konzentration der Aorta erreicht, zeigt, wie stark die Wirkung hier ausgeprägt ist. Ebenfalls wurde eine stärkere negativ inotrope Wirkung festgestellt, was auch bei der Behandlung von koronarer Herzkrankheit und arterieller Hypertonie von Interesse sein könnte.

Am terminalen Ileum wurde ebenfalls eine spasmolytische Aktivität festgestellt, die jedoch weit unter der an den Blutgefäßen gemessenen Wirkung liegt.

Eine Anwendung im Bereich von gastrointestinalen Erkrankungen wäre folgedessen wenig sinnvoll, da es dabei zu, in dem Fall unerwünschten, Effekten auf die Blutgefäße käme. Andererseits könnten die bei pulmonaler Hypertonie angewandten Konzentrationen so gering gewählt werden, dass es nur zu einer mäßigen Auswirkung auf den Darm kommen würde. Im Rahmen dieser

Überlegungen sollten dennoch die Nebenwirkungen auf das Herz nicht außer Acht gelassen werden. Was besonders kritisch angesehen werden sollte, ist die Inhibition der Pacemaker-Funktion am Vorhof. Diese Nebenwirkung wurde zwar erst ab 100 μmol gemessen, zeigt aber dennoch unvermeidlich, dass eine hohe Substanzzufuhr einen Herzstillstand hervorrufen kann. Es müssten folglich im Rahmen einer Therapie ein ständiges Drug-Monitoring erfolgen und eine konstante Blutspiegelkontrolle – um das therapeutische Fenster nicht zu überschreiten. Untersuchungen an MAH 105 zeigen somit, dass ein Einsatz für diese Substanz trotz der starken Wirkung an der Pulmonalarterie, aufgrund der kardialen Nebenwirkungen nicht in Frage käme. Durch die Gegenüberstellung beider Substanzen im folgenden Kapitel soll dieser Aspekt verdeutlicht werden.

4.3 Vergleich der beiden Testsubstanzen MAH 63 und MAH 105

Obwohl beide Substanzen Carbonatderivate darstellen, zeigen sie dennoch verschiedene Wirkungen an den unterschiedlichen Organen. Während MAH 63 eine Organselektivität erreicht wurde, konnte bei MAH 105 eine Wirkung an mehreren Organen festgestellt werden. Der Grund dafür könnte die Verlängerung der hydrophoben Alkylketten bei MAH 105, oder der Phenylrest am MAH 63 sein. Über die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung kann in diesem Stadium jedoch nur gemutmaßt werden.

Tabelle 16: Zusammengefasste mittlere effektive Konzentrationen (EC_{50}) beider Substanzen an den 5 untersuchten Organen

Organpräparat	MAH 63 EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	MAH 105 EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
rechter Vorhof	>100	43
Papillarmuskel	26	16,5
Aorta pulmonalis	>100	15
Aorta	>100	30
terminales Ileum	>100	38

Wie aus der Tabelle 16 ersichtlich zeigt MAH 105 eine wesentlich stärkere Wirkung am Papillarmuskel. Eine Anwendung im Rahmen einer Blutdrucktherapie wäre dennoch abzulehnen da für die Substanz keine Organspezifität gegeben ist.

Die zusätzlichen Nebenwirkungen auf den anderen Organen wären zu stark ausgeprägt um einen Einsatz in der Therapie zu ermöglichen.

MAH 63 erreicht die EC_{50} bei etwas über der Hälfte von MAH 105, demzufolge wäre für das Erreichen der EC_{50} etwa die doppelte Dosis nötig. Durch die rein selektive Wirkung der Substanz auf den Papillarmuskel jedoch besteht therapeutisch ein großes Interesse in der Weiterentwicklung dieser Substanz.

Ein Ansatz für künftige Untersuchungen wäre, weitere Derivate zu synthetisieren deren strukturelles Vorbild MAH 105 darstellt. Abwandlungen der funktionellen Gruppen könnten eine kardiale Wirkung auf den Vorhof unterbinden und somit eine rein pulmonale Wirksamkeit erzielen. Weitere Studien müssten außerdem auf den Wirkungsmechanismus eingehen, der im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht erforscht wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht ein pharmakologisches Profil der Substanzen MAH 63 und MAH 105 anhand von Versuchen an isolierten Organen von Meerschweinchen zu erstellen.

Für die Untersuchungen wurden aus dem Meerschweinchen terminales Ileum, Aorta, Pulmonalarterie, rechter Vorhof und Papillarmuskel entnommen und in eine für die Apparatur geeignete Form übergeführt. Mit Silberhäkchen versehen, wurden die Organe in eine Organbad-Apparatur eingespannt und mithilfe der Zugkraftmessung eines Drahtes die Veränderungen in der Kontraktion festgehalten. An Aorta und Pulmonalarterie wurde die Vasodilatation, am terminalen Ileum die Spasmolyse, am Vorhof und Papillarmuskel Veränderungen der Chronotropie beziehungsweise Inotropie gemessen. Es wurden jeweils 4 Versuche für jedes Organ durchgeführt, um die Wirkung möglichst genau zu charakterisieren. Die Versuche wurden so gestaltet dass die Konzentration zunehmend erhöht wurde, um eine konzentrationsabhängige Wirkung festzuhalten. Mithilfe der gewonnenen Daten wurde eine Konzentration-Wirkungs-Kurve erstellt und die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) berechnet.

MAH 63 zeigte eine rein organspezifische Wirkung am Papillarmuskel, wo es zu einer Abnahme der Schlagamplitude kam. An allen anderen Organen zeigte sich keine oder geringe Wirkung, bei der die EC_{50} nicht erreicht wurde.

MAH 105 zeigte die stärkste Wirkung an Pulmonalarterie, gefolgt von Aorta und terminalen Ileum. Am Papillarmuskel zeigte sich wie bei MAH 63 eine Reduktion der Herzkraft. Am rechten Vorhof kam es bei der höchsten Konzentration zu einem Stillstand des Sinusknotens.

Anhand dieser Ergebnisse käme nur MAH 63 als negativ inotrop wirkende Substanz für einen potentiellen Arzneistoff in Frage, da bei dieser Substanz eine Organspezifität erzielt wurde. MAH 105 weist zwar eine stärkere Wirkung auf, zeigt aber vielseitige Wirkungen an allen untersuchten Organen. Eine weitere Untersuchung des Wirkungsmechanismus könnte für die Optimierung der Substanz von Interesse sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Akehurst R, Kaltenthaler E (2001) Treatment of irritable bowel syndrome: a review of randomised controlled trials. *Gut* 48(2):272–282

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

Ammon P (2009) Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch. 9. erweiterte Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin

Furchgott Rf, De Gubareff T, Grossman A (1959) Release of autonomic mediators in cardiac tissues by suprathreshold stimulation. *Science* 129:328–289

Gaginella T (1998) Handbook of Methods in gastrointestinal pharmacology. CRC Press Florida:190–193

Gesundheit Österreich GmbH (2012), Herzinfarkt. Bundesministerium für Gesundheit (BMG), Wien

Kaptchuk T, Friedlander E, Sanchez M, Kokkotou E, Kowalczykowski M, Lembo A (2010) Placebos without Deception: A Randomized Controlled Trial in Irritable Bowel Syndrome. *PLoS One*, Dec 22;5(12)

Krebs H and Henseleit K (1932) Hoppe-Seylers Z. *Physiol. Chem.* 210:33–66

Leslie E, Seok D (1987) Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *Journal of Pharmacological Methods* 01/1978 1(2):171–175

Müller-Esterl W (2009) Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 1. korrigierte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Mutschler E, Schaible HG, Vaupel P (2007) Anatomie Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. 6. erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Netter FH (2003) Atlas of Human Anatomy. 2. Auflage, Teterboro, New Jersey

Radnoti LLC (2010) Tissue Organ Bath Principles. www.radnoti.com/userfiles/File/Database/Tissue_Organ_Bath_Principles.pdf. Monrovia, USA

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. Arzneimittelforschung 17:1249–1253

Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Roth HF (2010) Medizinische Chemie. 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Frankfurt

Verdino B (2014) Neue Leitlinien: Arterielle Hypertonie. Österreichische Apothekerzeitung (ÖAZ) 9:26–27

7. CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name: Stefano Kettmaier
Geburtsdatum: 18.12.1988
Geburtsort: Bozen, Italien

Ausbildung

November 2013: Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien
Juli – Dezember 2010: Teilnahme am *Student Exchange Program* an der University of Sydney in Australien
Oktober 2007: Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität Wien
2002-2007: Humanistisches Gymnasium "Walther von der Vogelweide", Bozen
1999-2002: Mittelschule "Albert Schweitzer", Bozen
1994-1999: Grundschule "J.H. Pestalozzi", Bozen