



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Screening eines neu synthetisierten
Thiokohlensäurediesters (MAH100.HCl) an isolierten
Organen von Meerschweinchen“

verfasst von

Andrea Obermayer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei dem Betreuer meiner Diplomarbeit Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik bedanken. Er hat in mir das Interesse für wissenschaftliches Arbeiten geweckt, war während dieser Zeit überaus hilfsbereit und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen.

Weiters gilt mein Dank Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker, Mag. pharm. Michael Hintersteininger und der Arbeitsgruppe vom Department für medizinische und pharmazeutische Chemie der Universität Wien für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz MAH100.HCl.

Ein riesengroßer Dank gebührt meinen Eltern, die mich nicht nur finanziell unterstützt, sondern auch mental immer wieder aufgebaut und motiviert haben. Danke, dass ihr immer hinter mir steht.

Meinem Freund Philipp möchte ich besonders für die „starke Schulter zum Anlehnen“ danken. Danke, dass du in stressigen Zeiten immer für mich da warst.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Studienkollegin und Freundin Michaela, mit der ich nicht nur stundenlang gelernt, sondern auch stundenlang gelacht habe.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	SCHWEFELWASSERSTOFF.....	1
1.1.1	Chemische Eigenschaften.....	1
1.1.2	Physiologie.....	1
1.1.3	Pharmakokinetik.....	2
1.1.4	Pathophysiologie	2
1.1.5	Toxikologie	3
1.2	SPASMOLYTIKA	3
1.2.1	Neurotrope Spasmolytika	3
1.2.1.1	Atropin und Scopolamin.....	4
1.2.1.2	Quartäre neurotrope Spasmolytika	4
1.2.1.3	Tertiäre neurotrope Spasmolytika.....	4
1.2.2	Muskulotrope Spasmolytika	5
1.2.3	Neurotrop-muskulotrope Spasmolytika.....	5
2	ZIELSETZUNG	6
3	MATERIAL UND METHODIK.....	8
3.1	MAH100.HCL	8
3.2	NÄHRLÖSUNG.....	9
3.3	KALIUMCHLORIDLÖSUNGEN (KCL-LÖSUNGEN).....	11
3.3.1	KCl-Lösung für Gefäßpräparate.....	11
3.3.2	KCl-Lösung für terminales Ileum	11
3.4	GAS	11
3.5	VERSUCHSTIERE	12
3.6	ORGANE	13
3.7	PRÄPARATION DER ORGANE.....	13
3.7.1	Präparierutensilien.....	14
3.7.1.1	Präparierset.....	14
3.7.1.2	Präparierinstrumente.....	15
3.7.2	Herzpräparation.....	16
3.7.3	Vorhofpräparation	17
3.7.4	Papillarmuskelpräparation.....	17
3.7.5	Truncus pulmonalis Präparation.....	18
3.7.6	Aortenpräparation.....	19
3.7.7	Präparation des terminalen Ileums	19
3.8	GERÄTE UND APPARATUREN	20
3.8.1	Apparaturen.....	20
3.8.1.1	Apparatur 1.....	21
3.8.1.2	Apparatur 2.....	22

3.8.2	Organbad	22
3.8.3	Aufhängevorrichtung	23
3.8.4	Feintrieb	23
3.8.5	Reizgerät	24
3.8.6	Kraftwandler	24
3.8.7	Amplifier	24
3.8.8	Schreiber	25
3.9	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....	25
3.9.1	MAH100.HCl-Stammlösung.....	26
3.9.2	Pipettierschema der allgemeinen Versuche	27
3.9.3	Versuchsdurchführung Gefäße (Aorta und Truncus pulmonalis).....	27
3.9.4	Versuchsdurchführung terminales Ileum	30
3.9.5	Versuchsdurchführung Vorhof.....	31
3.9.6	Versuchsdurchführung Papillarmuskel	32
3.10	WIRKMECHANISMUS.....	34
3.10.1	Herstellung der Wirkstofflösungen.....	35
3.10.2	Versuchsdurchführung des Wirkmechanismus	35
3.11	AUSWERTUNG, STATISTIK UND GRAFISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHE	37
3.11.1	Manuelle Auswertung	37
3.11.1.1	Auswertung Truncus pulmonalis, Aorta und terminales Ileum	37
3.11.1.2	Auswertung Vorhof.....	38
3.11.1.3	Auswertung Papillarmuskel.....	38
3.11.1.4	Auswertung Wirkmechanismus.....	38
3.11.2	Auswertung am Computer.....	39
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	ERGEBNISSE DER ALLGEMEINEN VERSUCHSREIHEN	40
4.1.1	Ergebnisse des Truncus pulmonalis	40
4.1.2	Ergebnisse der Aorta thoracalis.....	44
4.1.3	Ergebnisse des terminalen Ileums	47
4.1.4	Ergebnisse der Atrium dextrum Präparate.....	50
4.1.5	Ergebnisse des Papillarmuskels.....	53
4.2	ERGEBNISSE DES WIRKMECHANISMUS AM TERMINALEN ILEUM.....	56
4.2.1	Ergebnisse des Wirkmechanismus von 30 µM Glibenclamid und 30 µM MAH100.HCl	56
4.2.2	Ergebnisse des Wirkmechanismus von 100 µM Glibenclamid und 30 µM MAH100.HCl	59
5	DISKUSSION	62
5.1	WIRKUNG VON MAH100.HCl AUF DIE GLATTE MUSKULATUR.....	62
5.1.1	Wirkung von MAH100.HCl auf den Truncus pulmonalis	62
5.1.2	Wirkung von MAH100.HCl auf die Aorta thoracalis	62
5.1.3	Vergleich der Wirkung auf Truncus pulmonalis und Aorta thoracalis.....	62
5.1.4	Wirkung von MAH100.HCl auf die Dünndarmpräparate	63

5.1.5	Vergleich der Wirkung von MAH100.HCl auf das terminale Ileum und die Gefäßpräparate	63
5.2	WIRKUNG VON MAH100.HCL AUF DIE HERZMUSKULATUR	64
5.2.1	Wirkung von MAH100.HCl auf den rechten Vorhof	64
5.2.2	Wirkung von MAH100.HCl auf den Papillarmuskel	64
5.2.3	Vergleich der Wirkung von MAH100.HCl auf den Vorhof und den Papillarmuskel	65
5.3	VERGLEICH DER EC ₅₀ -KONZENTRATIONEN	65
5.4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES WIRKMECHANISMUS	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69
8	CURRICULUM VITAE	71

1 Einleitung

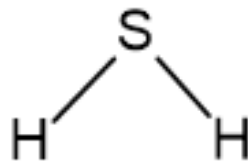
In dieser pharmakologischen Diplomarbeit wird die Wirkung einer schwefelhaltigen, spasmolytischen Testsubstanz (MAH100.HCl) auf isolierte Organe von Meerschweinchen getestet. Der eingebaute Schwefel könnte möglicherweise in der Verbindung in Form von Schwefelwasserstoff freigesetzt werden.

1.1 Schwefelwasserstoff

1.1.1 Chemische Eigenschaften

Schwefelwasserstoff, auch Hydrogensulfid genannt, abgekürzt H_2S (Abbildung 1), ist ein farbloses, übel riechendes, toxisches Gas. In der Natur kommt dieses Gas unter anderem bei Fäulnisprozessen von organischen Stoffen sowie in Mineralquellen vor (Ammon 2004).

Abbildung 1: Struktur von Schwefelwasserstoff



Bei der reduktiven Zersetzung von Eiweiß sowie bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide entsteht Hydrogensulfid (Aktories 2009).

1.1.2 Physiologie

Schwefelwasserstoff wird in Säugetieren endogen von zwei Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzymen, nämlich Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CSE) produziert (Stipanuk et al. 1982).

Laut einer Studie von Hosoki et al. (1997) wird H_2S in den glatten Muskelzellen von Ileum, Pfortader und thorakaler Aorta gebildet. Schwefelwasserstoff führt zu einer Relaxierung der glatten Muskelzellen der erwähnten Organe.

Niedrigere Konzentrationen von H_2S verstärken die Relaxation der glatten Muskulatur, hervorgerufen durch Stickstoffmonoxid (NO) in der thorakalen Aorta (Hosoki et al. 1997).

Eine weitere Studie zeigt, dass NaHS (ein H_2S -Donor) signifikant die Kontraktion der glatten Muskulatur an Luftröhrenpräparaten von Ratten reduziert (Gharib-Naseri et al. 2012).

Der mögliche Wirkmechanismus der Vasodilatation von H_2S wird von Zhao et al. (2001) untersucht. Dabei kann die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen (K_{ATP} -Kanäle) und eine Hyperpolarisation der Membran von glatten Muskelzellen der Gefäße festgestellt werden (Zhao et al. 2001).

1.1.3 Pharmakokinetik

Im Organismus wird Schwefelwasserstoff zu Sulfat und Thiosulfat oxidiert (Estler et al. 2007).

1.1.4 Pathophysiologie

Yan et al. (2003) zeigen die Entwicklung von Bluthochdruck in Zusammenhang mit dem endogenen H_2S -System. An hypertensiven Ratten ist die Genexpression und die Aktivität der Cystathionin- γ -Lyase in der Aorta thoracalis unterdrückt. Außerdem ist der Plasmaspiegel von H_2S vermindert. Die exogene Gabe von H_2S steigert den Plasmaspiegel von H_2S und die CSE-Aktivität in der Aorta, dadurch kann der Blutdruck gesenkt und das Remodeling der Aorta vermindert werden (Yan et al. 2003).

In der Studie von Li et al. (2005) wird der Zusammenhang von H_2S und Entzündungen untersucht. An Mäusen wird ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg von Plasmahydrogensulfid nach Injektion von E-coli Lipopolysaccharide (LPS) festgestellt. Nach der direkten Applikation von NaHS finden sich histologisch Zeichen von Lungenentzündung, erhöhte Aktivität von Myeloperoxidase (MPO) in Lunge und Leber und erhöhte Plasma-Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) - Konzentrationen. Auch bei Menschen mit septischem Schock finden sich signifikant höhere Plasma- H_2S -Spiegel in der Blutprobe (Li et al. 2005).

1.1.5 Toxikologie

Bei einer Vergiftung mit Schwefelwasserstoff werden Enzyme durch Sulfid- oder Disulfidbildung blockiert. Im Stoffwechsel entsteht durch Deprotonierung von Schwefelwasserstoff ein Hydrogensulfidion. Dieses Ion hemmt das dreiwertige Eisen der Cytochromoxidase und blockiert die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler et al. 2007).

Bei Exposition mit Hydrogensulfid kommt es zu toxischen Erscheinungen wie Schleimhautreizungen, Kopfschmerzen und Durchfall. Hohe Konzentrationen (1400 ppm) führen zum sofortigen Tod durch zentrale Atemlähmung (Ammon 2004).

Heimtückisch ist, dass die Geruchsrezeptoren der Nase nur geringe Konzentrationen wahrnehmen. Bei höheren Konzentrationen tritt rasch ein Gewöhnungseffekt durch Blockade der Geruchsrezeptoren ein. Bei Vergiftungen ist nur eine symptomatische Behandlung (Erhaltung der Atmung, Schmerzlinderung) möglich (Aktories 2009).

1.2 Spasmolytika

Spasmolytika, auch Antispasmodika genannt, verringern den Tonus der glatten Muskulatur der Bronchien, der Gefäße und des Gastrointestinaltraktes und wirken somit krampflösend. Unterschieden wird zwischen neurotrophen, muskulotropen und neurotrop-muskulotropen Spasmolytika (Ammon 2010).

1.2.1 Neurotrope Spasmolytika

Neurotrope Spasmolytika blockieren kompetitiv m-Acetylcholinrezeptoren und werden deshalb auch Parasympatholytika genannt. Durch die parasympatholytische Wirkung erschlafft die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, der Gallenwege, der Bronchien, der Ureteren und der Harnblase.

Als unerwünschte parasympatholytische Wirkungen können unter anderem Mydriasis, verminderte Drüsensekretproduktion (Tränen-, Speichel-, Verdauungsflüssigkeit) und Tachykardie auftreten. Kontraindiziert ist die Gabe von neurotrophen Spasmolytika bei Glaukom und benigner Prostatahyperplasie (Mutschler et al. 2013).

1.2.1.1 Atropin und Scopolamin

In der Natur kommen diese Alkaloide in der Tollkirsche, im Bilsenkraut und im Stechapfel vor (Aktories, 2009). Durch ihre ungeladene tertiäre Aminogruppe können sie die Blut-Hirn-Schranke passieren und zentral wirken. Bei Spasmen im Gastrointestinaltrakt und der ableitenden Gallenwege werden sie kaum mehr verabreicht, da hohe Dosen notwendig sind, welche zu den typischen parasympatholytischen Nebenwirkungen führen (Oberdisse et al. 2002).

1.2.1.2 Quartäre neurotrope Spasmolytika

Quartäre Parasympatholytika können durch den positiv geladenen Stickstoff nach peroraler Gabe nur schlecht vom Körper resorbiert werden. Vorteilhaft ist jedoch, dass sie keine zentralen Nebenwirkungen verursachen, da sie aufgrund ihrer Struktur nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Mutschler et al. 2013).

Ein bekannter Vertreter der quartären Parasympatholytika ist Butylscopolaminiumbromid. Eingesetzt wird es bei Spasmen der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, der Ureteren oder der Gallenwege. Peroral eingenommen ist es kaum wirksam, weshalb die parenterale oder rektale Applikation empfohlen wird (Karow et al. 2012).

Tropiumchlorid und Methantheliniumbromid sind bei Reizblasen indiziert, letzteres auch bei Spasmen im Magen-Darm-Kanal. Ipratropiumbromid und Tiotropiumbromid wirken spasmolytisch an den Bronchien und werden bei COPD eingesetzt (Mutschler et al. 2013).

1.2.1.3 Tertiäre neurotrope Spasmolytika

Tertiäre Spasmolytika werden nach peroraler Applikation, im Gegensatz zu quartären Verbindungen, gut resorbiert. Allerdings passieren sie die Blut-Hirn-Schranke und können dadurch zentrale Nebenwirkungen erzeugen. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise Darifenacin, Fesoterodin, Solifenacin und Tolterodin. Diese Wirkstoffe sind vor allem bei Blasenentleerstörungen indiziert (Mutschler et al. 2013).

1.2.2 Muskulotrope Spasmolytika

Muskulotrope Spasmolytika greifen direkt an der glatten Muskulatur an und führen dort zur Relaxation (Mutschler et al. 2013).

In der Natur vorkommend ist Papaverin zu erwähnen. Papaverin hemmt Phosphodiesterasen, wodurch es zu einer Erhöhung der cAMP und cGMP – Konzentration kommt. Eingesetzt wurde es bei Spasmen des Gastrointestinaltraktes, des Bronchialsystems und der Gallen- und Harnwege. Heute ist Papaverin als Spasmolytikum obsolet (Oberdisse et al. 2002).

Flavoxat und Hymecromon werden heute bei Oberbauchbeschwerden sowie Blasenentleerstörungen verwendet (Mutschler et al. 2013).

1.2.3 Neurotrop-muskulotrope Spasmolytika

Verbindungen, welche sowohl parasympatholytisch als auch direkt an der glatten Muskulatur relaxierend wirken, werden als neurotrop-muskulotrope Spasmolytika bezeichnet (Mutschler et al. 2013).

Mebeverin ist vor allem zur Krampflösung bei irritablen Kolon indiziert. Oxybutynin und Tolterodin werden bei Harninkontinenz (Hyperaktivität des Blasenmuskels) eingesetzt (Kojda et al. 2002).

2 Zielsetzung

Ziel des praktischen Teils dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, die Substanz MAH100.HCl einerseits an isolierten Organen des Meerschweinchens zu testen und andererseits den in Frage kommenden Wirkmechanismus eines Kalium-Kanalöffners zu prüfen.

Die verwendeten Gewebe umfassen Papillarmuskel, Vorhof, Aorta, Truncus pulmonalis und terminales Ileum. Die Organe werden nach erfolgter Präparation in einer Apparatur fixiert und anschließend in ein Organbad mit Nährlösung gebettet. Eine MAH100.HCl-Stammlösung wird in zunehmenden Mengen in die Nährlösung pipettiert, um die Wirkung der Substanz auf die verschiedenen Organe zu beobachten und zu dokumentieren.

Beim Papillarmuskel wird die Kontraktionskraft (Inotropie) untersucht, während beim Vorhof die Schläge pro Minute (Chronotropie) gezählt werden.

Bei den Gefäßen (Aorta und Truncus pulmonalis) werden mögliche vasodilatative Wirkungen untersucht und zuletzt am terminalen Ileum eine eventuelle spasmolytische Wirkung analysiert.

An jedem Organ wird eine Versuchsreihe durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Zur genauen Dokumentation der Ergebnisse wird eine Grafik in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt und die EC_{50} (jene Konzentration bei der 50 % der Wirkung eintritt) ermittelt. Ergebnisse mit einem geringen EC_{50} -Wert sind besser als jene mit hohen EC_{50} -Werten, da weniger Substanz benötigt wird, um den Effekt zu erzielen. Dies ist bei einem zu entwickelnden Wirkstoff vorteilhaft, da geringere Dosen mit weniger potentiellen Nebenwirkungen eingenommen werden können.

Zur genaueren Untersuchung wird ein Organ ausgewählt, welches einen niedrigen EC_{50} -Wert aufweist – in dieser Arbeit das terminale Ileum. An diesem Organ wird der Wirkmechanismus einer möglichen Öffnung von K_{ATP} -Kanälen geprüft. Zum terminalen Ileum wird vorerst ein Kalium-Kanalblocker (Glibenclamid) pipettiert und anschließend MAH100.HCl. Durch Veränderungen in der Dosis-Wirkungs-Kurve kann schließlich festgestellt werden, ob es sich bei MAH100.HCl um einen potentiellen Kalium-Kanalöffner handelt oder nicht.

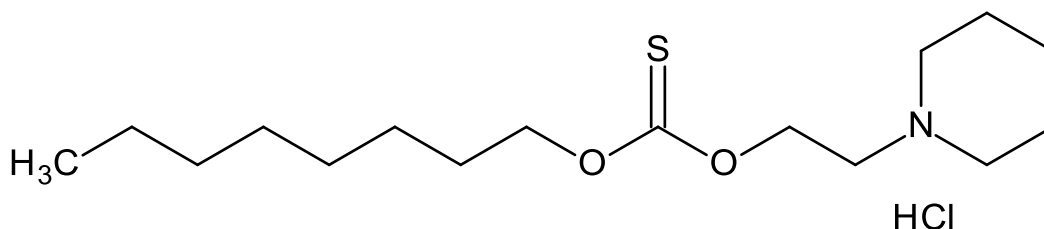
Im schriftlichen Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit werden die verwendeten Materialien und Methoden genau erklärt, Ergebnisse präsentiert und diskutiert

3 Material und Methodik

3.1 MAH100.HCl

Als Testsubstanz für die Versuchsreihe wird MAH100.HCl (Abbildung 2, Abbildung 3) verwendet, welche an isolierten Organen vom Meerschweinchen getestet wird. Diese Substanz wurde von ao. Univ. Prof. Dr. Mag. pharm. Thomas Erker und seinem Team zur Verfügung gestellt.

Abbildung 2: Strukturformel von MAH100.HCl



Die Nomenklatur der Testsubstanz lautet [2-(1-piperidyl)ethoxy]-octyloxy-methanthioat Hydrochlorid. Das Molekulargewicht beträgt 338 g/mol.

Abbildung 3: Phiole mit MAH100.HCl



MAH100.HCl ist gut wasserlöslich, da es als Hydrochlorid vorliegt. Um ein optimales Messergebnis zu erhalten, wird die Substanz kurz vor Versuchsdurchführung in destilliertem Wasser gelöst.

3.2 Nährlösung

Damit die Organe mit ausreichend Nährstoffen versorgt und somit zum Testen geeignet sind, muss die Nährlösung gleich zu Beginn jedes Tages frisch zubereitet werden.

Als Nährlösung wird eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung (auch Tyrode genannt) verwendet (Reiter 1967).

Die in Tabelle 1 angegebenen Reagenzien sind zur Herstellung der Tyrode notwendig. Es werden von allen Reagenzien Stocklösungen hergestellt, bis auf Glucose, welche als Reinsubstanz direkt eingewogen wird.

Tabelle 1: Reagenzien der Tyrodelösung

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Stocklösung (g/l)	ml Stocklösung / Liter Tyrode	mmol/l
NaCl	58,44	200,05	33,60	115,02
KCl	74,55	10,07	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01	25,00	83,70	24,91
MgSO ₄	120,37	29,40	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,09	248,00	1,18	2,15
CaCl	110,98	136,00	3,20	3,92
Glucose	180,16	direkte Einwaage	1,98	10,99

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien und (Reiter 1967)

Für die Herstellung von zwei Liter Nährlösung werden die in Tabelle 2 aufgelisteten Reagenzien benötigt (Abbildung 4).

Tabelle 2: Reagenzien für die Herstellung von 2 Liter Tyrode

Reagens	Menge
NaCl-Lösung	67,2 ml
KCl-Lösung	70,0 ml
NaHCO ₃ -Lösung	167,4 ml
MgSO ₄ -Lösung	2,36 ml
KH ₂ PO ₄ -Lösung	2,36 ml
CaCl ₂ -Lösung	6,4 ml
Glucose	3,96 g
Destilliertes Wasser	ad 2000 ml

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien

Für die Zubereitung wird ein 2 Liter Messkolben verwendet. Zunächst werden chronologisch die NaCl-Lösung und die KCl-Lösung mittels Bürette, die NaHCO₃-Lösung via Messzylinder und die MgSO₄- sowie die KH₂PO₄-Lösung mittels Eppendorf-Pipette in den Messkolben gefüllt. Danach wird etwas destilliertes Wasser hinzugefügt, um die anschließend beigemengte Glucose gut lösen zu können.

In weiterer Folge wird ein Becherglas mit pipettierten 6,4 ml CaCl₂ – Lösung und ein großes Becherglas mit destilliertem Wasser vorbereitet.

Abbildung 4: Reagenzien für die Tyrodenherstellung



Nun wird an die fast fertige Krebs-Henseleit Lösung Gas (Oxymix) angelegt und tropfenweise die vorbereitete CaCl₂-Lösung zugegeben. Dieser Vorgang muss langsam und nur portionsweise erfolgen, um eine gute Verteilung der CaCl₂-Lösung gewährleisten zu können. Wenn der Vorgang zu schnell erfolgt, kann es zu einer Trübung der Tyrode kommen. Eine getrübbte Nährlösung darf nicht verwendet werden und muss verworfen werden.

Die erhaltene klare Lösung wird danach mit dem vorbereiteten destillierten Wasser genau auf 2000,0 ml aufgefüllt und gut durchgeschüttelt. Zuletzt wird die Nährlösung noch für ungefähr 30 Minuten mit einem sauerstoffreichen Gasgemisch begast, damit diese mit Sauerstoff gesättigt ist. Durch diesen Vorgang wird sichergestellt, dass die Organe direkt nach der Entnahme mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden.

3.3 Kaliumchloridlösungen (KCl-Lösungen)

Für die Versuche relevant ist außer der Krebs-Henseleit Lösung noch die Herstellung von Kaliumchloridlösungen, welche ebenso jeden Tag frisch zubereitet werden. Durch die KCl-Lösung kommt es zu einer Kontraktion der vitalen Organe. Nach Zugabe der Testsubstanz wird auf eine mögliche eintretende Dilatation bzw. Spasmolyse geachtet.

Für die Konzentrationen der KCl-Lösungen werden empirisch ermittelten Daten der Universität Wien genutzt, bei denen es in den Gefäßen bzw. am Ileum zu einer maximalen Kontraktion (nahe 100 %) kommt.

Während Papillarmuskel und Vorhof die ganze Versuchsdauer über in der Nährstofflösung verweilen, wird beim terminalen Ileum und bei den Gefäßen (Aorta und Truncus pulmonalis) die Tyrode gegen KCl-Lösung ausgetauscht.

3.3.1 KCl-Lösung für Gefäßpräparate

Eine ca. 90 mM KCl-Lösung wird für Truncus pulmonalis und Aorta benötigt. Dazu werden 0,67 g KCl in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit Tyrode ad 100,0 ml ergänzt und der Messkolben bis zur vollständigen Lösung des KCl geschwenkt.

3.3.2 KCl-Lösung für terminales Ileum

Die KCl-Lösung für das terminale Ileum beinhaltet 0,45 g KCl, eingewogen in einen 100 ml Messkolben und wird mit Tyrode auf 100,0 ml aufgefüllt und durchgeschüttelt. Somit handelt es sich um eine ca. 60 mM KCl – Lösung.

3.4 Gas

Die Zellen der isolierten Gewebe benötigen Sauerstoff, der durch Diffusion aus der Nährlösung aufgenommen wird. Um die Präparate über die gesamte Versuchsdauer vital zu erhalten, wird die Nährlösung mit dem Gasgemisch „Oxymix“ (auch Carbogen genannt) begast. Dieses Gemisch besteht aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid.

Die Versuchsaapparaturen haben einen eigenen Gasanschluss (Abbildung 5), damit in der Nährlösung kontinuierlich ein hoher Sauerstoffpartialdruck für die eingespannten Präparate während des ganzen Tages sichergestellt ist.

Abbildung 5: Gasanschluss



Präparation und Transport der Organteile erfolgen in der Krebs-Henseleit Lösung, welche direkt nach der Herstellung für 30 Minuten begast wird, um eine maximale Sauerstoffsättigung zu erzielen. Dies ist notwendig, um die Vitalität der Gewebe auch ohne direkte Sauerstoffbegasung zu erhalten.

Nach erfolgter Entnahme und während jedes Labortages werden Dünndarm, Papillarmuskeln und Aorta jeweils in mit Tyrode befüllten Bechergläsern via einem Schlauch begast.

3.5 Versuchstiere

Isolierte Organe von Meerschweinchen finden Verwendung, um die Verbindung MAH100.HCl auf pharmakodynamischer Ebene prüfen zu können. Dazu wird für jeden Tag ein Meerschweinchen benötigt. Es werden speziell gezüchtete Meerschweinchen (zwischen 8 und 12 Wochen alte, männliche und weibliche Tiere der Zuchtlinie TRIK) genutzt. Getötet werden die Tiere durch Genickbruch. Dies ist eine schonende Methode, um diese Nagetiere zu töten, denn sie erfolgt schnell und ist für das Tier weniger belastend als zum Beispiel der Tod durch eine Giftspritze. Auch könnte nicht ausgeschlossen werden, dass die prä mortal verwendeten Pharmaka mit der Testsubstanz interferieren und die Ergebnisse verfälschen. Das getötete Tier wird auf dem Rücken liegend in eine Nierentasse gelegt, um die Entnahme der Organe vorzubereiten.

3.6 Organe

Sofort nach dem Tod des Tieres wird mit einer Präparierschere die Bauch- und Brusthöhle median über die gesamte Länge eröffnet. Sodann werden der Reihe nach das Herz, der Dünndarm und die Aorta entnommen. Am Dünndarm wird zur besseren anatomischen Orientierung eine blaue Schnur festgemacht, um das terminale Ende des Ileums zu markieren (Abbildung 6). Der thorakale Teil der Aorta (Abbildung 6) wird durch präzise Schnitte in das Fettgewebe entlang der Wirbelsäule herausgelöst. Unmittelbar nach Entnahme werden die Organe in jeweils mit Tyrode befüllte Bechergläser gelegt, um die Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen.

Abbildung 6: Terminales Ileum und Aorta nach Entnahme



3.7 Präparation der Organe

Um die Organe versuchstauglich zu machen, werden sie entsprechend präpariert. Hierzu werden rechter Vorhof (Atrium dextrum), Papillarmuskel (Musculus papillaris), abgehende Pulmonalarterie (Truncus pulmonalis), Hauptschlagader (thorakaler Teil der Aorta) und Teil des Dünndarms (terminales Ileum) verwendet.

Nach der Organentnahme wird zuerst das noch schlagende Herz präpariert. Währenddessen werden die Aorta und der Dünndarm in der Nährlösung mit Oxymix versorgt (Abbildung 7).

Abbildung 7: Oxymixbegasung von Ileum und Aorta



3.7.1 Präparierutensilien

3.7.1.1 Präparierset

Für die Präparation der Organe wird ein Präparierset, bestehend aus Petrischale, Korkring und Kunststoffring, benötigt (Abbildung 8). Die Petrischale wird vor der Präparation mit Tyrode befüllt. Der Kunststoffring verhindert das Aufschwimmen des Korkringes in der befüllten Petrischale. Die Organe werden für die Präparation am Korkring mit Nadeln fixiert.

Abbildung 8: Präparierset



3.7.1.2 Präparierinstrumente

Für die Präparationstechnik sind ein Stereomikroskop mit Zoom (Nikon, SMZ-10A, Japan) (Abbildung 9), Mikro-Federscheren sowie Mikro-Spitzscheren, anatomische Mikro-Pinzetten, Präpariernadeln, S-förmige Silberhaken und ein Präparierfaden notwendig (Abbildung 10).

Abbildung 9: Stereomikroskop (Nikon, SMZ-10A)



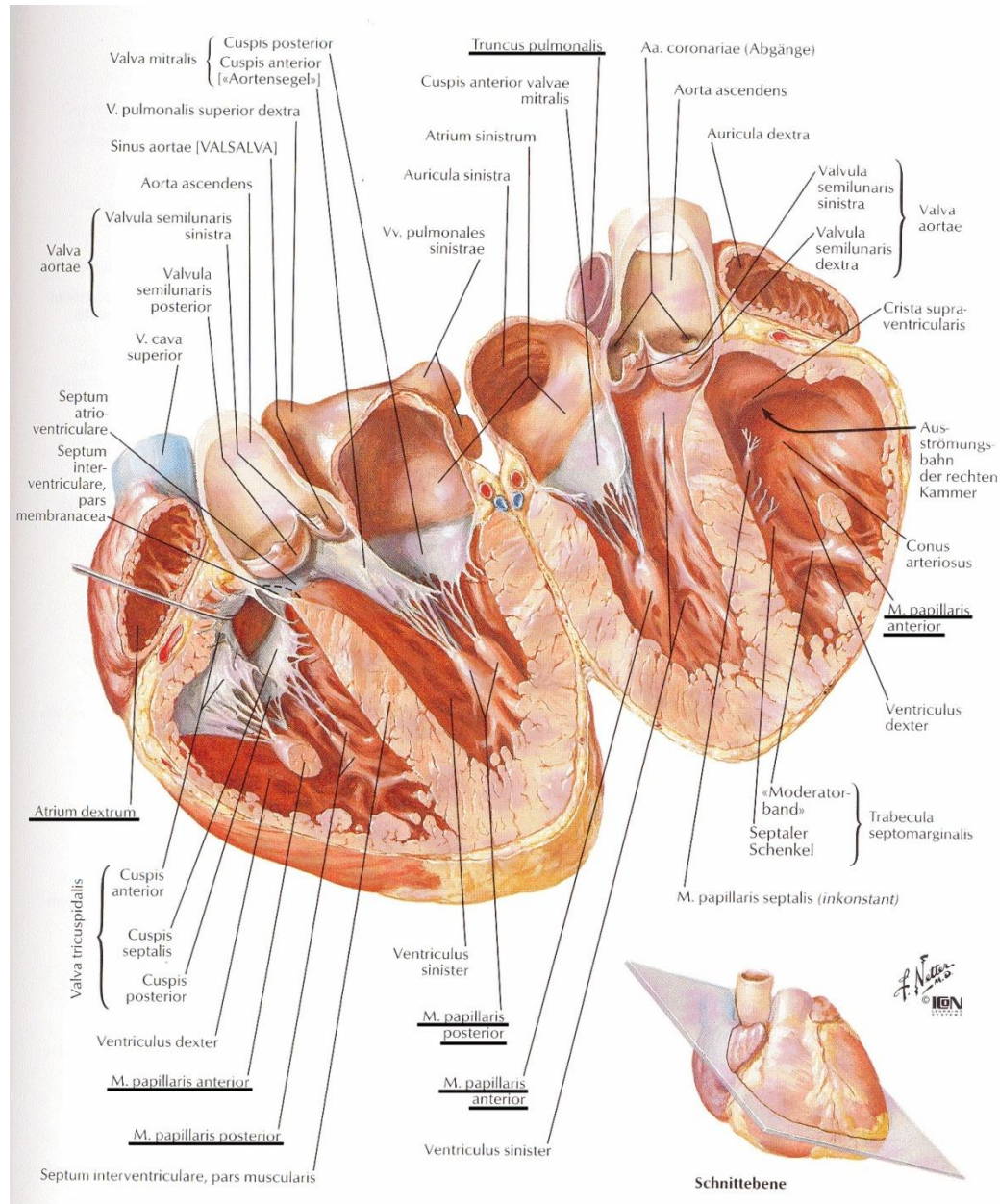
Abbildung 10: Präparierutensilien



3.7.2 Herzpräparation

Vorhof, Papillarmuskeln und Truncus pulmonalis werden allesamt der Reihe nach aus dem Herz (Abbildung 11) präpariert. Dies erfolgt rasch, da die Organe möglichst bald mit Oxymix versorgt werden müssen.

Abbildung 11: Anatomische Zeichnung des humanen Herzens (Netter 2003)



Quelle: Netter (2003)

Zuerst wird das Herz in einem mit Tyrode befüllten Präparierset mit Nadeln befestigt und unter dem Stereomikroskop mit der Mikro-Spitzschere eröffnet. Danach werden rechte und linke Herzhälfte sichtbar.

Anschließend wird das geöffnete, festgesteckte Herz ein- bis zweimal mit frischer Nährlösung gespült, um noch anhaftendes Blut zu entfernen. Sodann wird mit der Isolierung der Herzorgane begonnen.

3.7.3 Vorhofpräparation

Zuerst wird der rechte Vorhof isoliert, indem an der Vena cava superior und dem anhaftenden Fettgewebe entlang geschnitten wird. Der rechte Vorhof wird in weiterer Folge mit zwei Präpariernadeln am Korkring befestigt. Eine Nadel fixiert das Myokard an der Spitze des Vorhofes. Die zweite Nadel wird in einen kleinen Teil noch vorhandenen Fettgewebes positioniert, um funktionstüchtiges Myokard zu schonen. An beiden Enden wird innerhalb der Nadeln das Myokard mit dem Präparierfaden durch Knoten fixiert. Diese Knoten dienen dem sicheren und schonenden Halt von Silberhaken, die für die Aufzeichnung der myokardialen Aktivität notwendig sind.

Die Fäden werden gekürzt, damit sie beim Versuch anschließend nicht stören. Der fertig präparierte Vorhof wird für kurze Zeit in der mit Sauerstoff gesättigten Nährlösung aufbewahrt, bis dieser in die Versuchsanordnung gespannt werden kann.

3.7.4 Papillarmuskelpräparation

Meist befinden sich im rechten Ventrikel drei (Musculus papillaris anterior, Musculus papillaris posterior und der meist schwach ausgebildete Musculus papillaris septalis) und im linken Ventrikel zwei kräftige Papillarmuskeln (Musculus papillaris anterior und Musculus papillaris posterior) (Netter 2003).

Die Papillarmuskeln fixieren über Sehnenfäden (Chordae tendineae) die zwischen Vorhof und Ventrikel gelegenen Herzklappen und stellen so während der Myokardkontraktion (Systole) den suffizienten Klappenschluss sicher. Die rechte AV-Klappe besteht aus drei Segeln (Trikuspidalklappe) und die linke AV-Klappe aus zwei Segeln (Bikuspidal- bzw. Mitralklappe).

Für gewöhnlich lassen sich nur drei bis vier gut geeignete Papillarmuskelpräparate (kräftige Papillarmuskeln mit langen Chordae tendineae) pro Herz isolieren. Sind die Chordae tendineae nur rudimentär ausgeprägt, wirkt der Papillarmuskel mit der Herzklappe verwachsen und das Präparat ist für die weitere Untersuchung unbrauchbar.

Zuerst werden die Papillarmuskeln des rechten Ventrikels bearbeitet. Nahe am Papillarmuskel werden die Chordae tendineae mit dem Präparierfaden unter dem Stereomikroskop abgebunden und mit einem Knoten fixiert. Hierauf wird ein kleiner Silberhaken eingehängt, mit einem zweiten fest gezogenen Knoten befestigt und der Papillarmuskel mit einer Mikro-Federschere heraus geschnitten.

Unter dem Stereomikroskop wird der Silberhaken danach mit einer Mikro-Pinzette richtig positioniert und sodann die Muskeln in einem Becherglas mit sauerstoffgesättigter Tyrode aufbewahrt. Die Papillarmuskeln des linken Ventrikels lassen sich in gleicher Art und Weise isolieren.

3.7.5 Truncus pulmonalis Präparation

Der Truncus pulmonalis ist der gemeinsame Stamm der Lungenarterien und als solcher die abführende Arterie aus dem rechten Ventrikel. Dieser führt sauerstoffarmes Blut vom Herzen über die rechte und linke Pulmonalarterie zur Lunge.

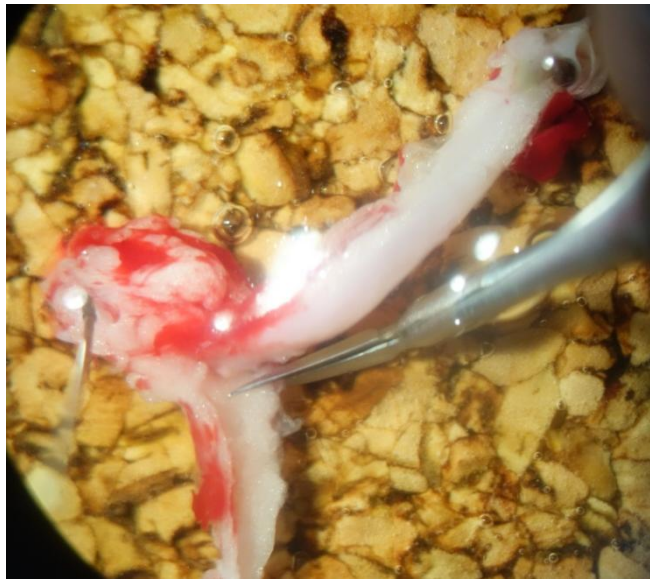
Für die Präparation wird der Truncus pulmonalis, welcher neben der Aorta ascendens verläuft, verwendet. Unter dem Stereomikroskop erkennt man am aufgeschnittenen Herzen den Truncus pulmonalis daran, dass dieser dünner als die Aorta und leicht weißlich durchscheinend ist. Genau daneben verläuft die rein weiße, etwas dickere Aorta. Mit der Mikro-Federschere werden für die Präparation des Truncus pulmonalis die nebenan verlaufende Aorta und das anhaftende Fettgewebe vorsichtig disseziert.

Je nachdem wie groß das präparierte Stück des Truncus pulmonalis ist, können entweder zwei Ringe oder ein Ring mit ca. 0,4 cm Länge gewonnen werden. Der präparierte Truncus pulmonalis wird anschließend gemeinsam mit den Papillarmuskeln in der Nährlösung im Becherglas gelagert.

3.7.6 Aortenpräparation

Der isolierte thorakale Teil der Aorta wird an beiden Enden mit Präpariernadeln locker und nicht zu gespannt am Korkring festgesteckt. Das weiße Fettgewebe wird mit Hilfe der Mikro-Federschere unter dem Stereomikroskop in kleinen Streifen sorgfältig abgetrennt, sodass am Ende nur mehr das hellrosa Gefäß sichtbar ist (Abbildung 12). Dieser Arbeitsschritt ist von essentieller Bedeutung, damit das Untersuchungsergebnis nicht durch eine mögliche Einlagerung des Wirkstoffes in das Fettgewebe verfälscht wird.

Abbildung 12: Präparation der Aorta unter dem Stereomikroskop



Die vom Fettgewebe befreite Aorta wird sodann in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten und in einem mit Tyrode befüllten und mit Oxymix begasten Becherglas bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt.

3.7.7 Präparation des terminalen Ileums

Der terminale Abschnitt des Ileums wird vor der Präparation im Becherglas für einige Minuten begast. Danach wird ein ca. 0,5 cm großes Stück mit einer Mikro-Spitzschere trapezförmig herausgeschnitten. Wichtig ist, dass die Enden abgeschrägt sind.

Nach der Reinigung dieses Dünndarmstückes werden die abgeschrägten Enden mit Präpariernadeln am Korkring befestigt. Anschließend wird auch hier unter dem

Stereomikroskop mit einem Präparierfaden ein Knoten innerhalb der Nadel an einem Ende des Stückes gemacht, ein Silberhaken eingefädelt und mit einem weiteren Knoten fixiert. Dieser Vorgang wiederholt sich beim anderen Ende des Dünndarmstückes, sodass zwei Haken an jeder Seite befestigt sind (Abbildung 13). Zu beachten ist, dass das Lumen des Dünndarmstückes offen bleibt und durch den Knoten nicht zugebunden wird. Der zu testende Wirkstoff soll durch das Lumen zirkulieren können.

Abbildung 13: Dünndarmpräparat



3.8 Geräte und Apparaturen

Um die elektromechanischen Untersuchungen korrekt und reproduzierbar durchzuführen, werden folgende Geräte benötigt: Apparatur 1, Apparatur 2, Organbad, Aufhängevorrichtung, Feintrieb, Kraftwandler, Reizgerät, Amplifier und Schreiber.

3.8.1 Apparaturen

Die im Folgenden als Apparatur 1 und Apparatur 2 bezeichneten Gerätschaften dienen der Feststellung des Gewebetonus unter der vordefinierten pharmakologischen Beeinflussung.

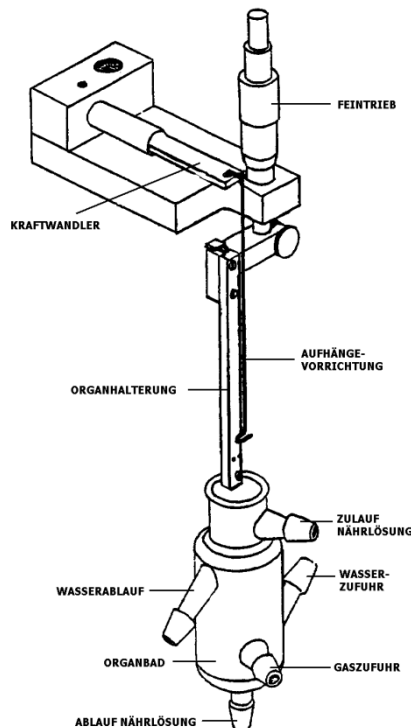
Um den Papillarmuskel elektrisch stimulieren zu können, ist eine Modifikation (Apparatur 2) und ein Reizgerät erforderlich.

3.8.1.1 Apparatur 1

Für Aorta thoracalis, Truncus pulmonalis, terminales Ileum und Atrium dextrum wird Apparatur 1 (Abbildung 14) verwendet. Apparatur 1 besteht aus einem doppelwandigen Organbad. Dieses beinhaltet einen Gasanschluss für Oxymix und einem Ablassschlauch für Tyrode. Über einen Zu- und Ablauf zum Zwischenraum des Doppelwandgefäßes sorgt temperiertes Wasser für eine konstante Temperatur der Versuchsanordnung.

An der Organhalterung der Apparatur wird am unteren Ende das Präparat an einem Silberdraht befestigt. Am oberen Ende wird das Präparat an einer speziellen Aufhängevorrichtung fixiert, die mit dem Kraftwandler verbunden ist, um den Tonus des Präparates festzustellen. Über den Feintrieb lässt sich die Vorspannung exakt regulieren. Eine verstellbare Positionierungsschraube erlaubt die Zentrierung der Versuchsanordnung im Organbad.

Abbildung 14: Skizze von Apparatur 1 (schematischer Aufbau)

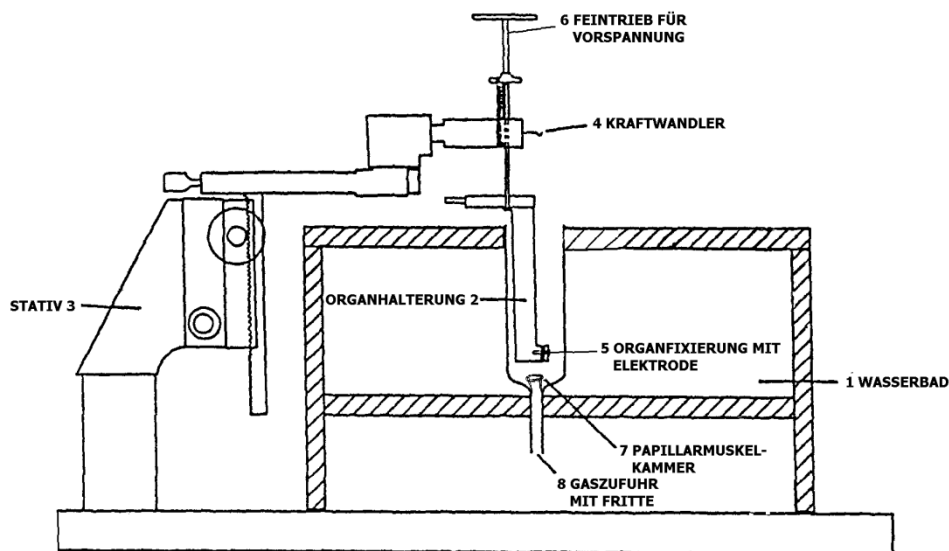


3.8.1.2 Apparatur 2

Apparatur 2 (Abbildung 15) ist für die Untersuchung der Papillarmuskeln konzipiert. Bei Apparatur 2 befindet sich das Organbad direkt im temperierten Wasserbad. Das Organbad enthält einen Zulauf für Carbogen, anders als in Apparatur 1 gibt es keinen Ablassschlauch für die Tyrode.

Bei Apparatur 2 wird der Musculus papillaris einerseits zwischen einer Elektrode und einer Plexiglasscheibe eingeklemmt, andererseits mit dem an den Chordae tendineae befestigten Silberhaken an der Aufhängevorrichtung, welche mit dem Kraftwandler in Verbindung steht, eingehängt. Auch hier ist die Vorspannung des Präparates mittels Feintrieb exakt regulierbar.

Abbildung 15: Skizze Apparatur 2 (schematischer Aufbau)



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien

3.8.2 Organbad

Das jeweilig zu untersuchende Organ verweilt während der Dauer des Versuches im Organbad. Zur Verfügung stehen Organbäder mit 8 ml Fassungsvermögen, geeignet nur für die Untersuchung von Truncus pulmonalis und Aorta, sowie mit 25 ml Fassungsvermögen, in welcher die Durchführung aller Versuche möglich ist.

Wie schon erwähnt werden die Organbäder über einen eigenen Zulauf für Oxymix permanent begast. Dies ist wichtig, um durch Diffusion des Sauerstoffes aus der Nährlösung die Vitalität der Gewebe zu erhalten.

In Apparatur 1 wird das Organbad mittels Zu- und Ablauf von temperierten Wasser im Zwischenraum des Doppelwandgefäßes auf 37 °C warm gehalten, bei Apparatur 2 befindet sich das Organbad direkt im Wasserbad, welches auf 35 °C eingestellt wird. Im Organbad in Apparatur 1 ist außerdem ein Ablauf für Flüssigkeit (z. B. Tyrode) enthalten. Apparatur 2 besitzt diesen Ablauf nicht und so muss die Flüssigkeit, um sie zu wechseln, in ein Becherglas gekippt werden.

3.8.3 Aufhängevorrichtung

Damit das Organ stabil im Organbad platziert werden kann, wird die Organaufhängevorrichtung benötigt. Diese besteht in Apparatur 1 aus zwei Silberdrähten, an denen die Arterienpräparate direkt angebracht bzw. Vorhof und terminales Ileum mittels Silberhaken festgemacht werden. Bei Apparatur 2 wird der Papillarmuskel auf einer Seite mittels eines Silberhäkchens in die Organhalterung eingehängt und auf der anderen zwischen Elektrode und Plexiglasscheibe eingeklemmt.

Die Organhalterung ist bei allen Versuchen so zu positionieren, dass weder die Aufhängevorrichtung noch das Organ in Berührung mit der Wand des Organbads kommen. Dies würde das Ergebnis verfälschen bzw. nicht auswertbar machen. Es ist sicherzustellen, dass das Organ rundum von Tyrode umgeben ist.

3.8.4 Feintrieb

Der Feintrieb dient in Apparatur 1 und 2 der präzisen Einstellung der Vorspannung. In mN (Milli-Newton) wird die Kraft angegeben, um die Organe standardisiert vorzudehnen. Somit werden die Versuche untereinander vergleichbar und reproduzierbar.

3.8.5 Reizgerät

Bei Apparatur 2 ist ein Reizgerät (Accupulser Signal Generator A360 und Stimulus Isolator A360, WPI, USA) zur elektrophysiologischen Stimulation des Papillarmuskels angeschlossen (Abbildung 16). Der elektrische Strom (bis zu 999 mA) fließt über eine Elektrode direkt zum in der Plexiglasscheibe eingeklemmten Papillarmuskel. Da dieser Muskel - im Gegensatz zum Vorhof - nicht von alleine schlägt, wird jener mit der Frequenz von einem Hertz (dies entspricht ca. 60 Schläge pro Minute) elektrisch angeregt.

Abbildung 16: Reizgerät



3.8.6 Kraftwandler

Der Kraftwandler (Typ AE875, Norwegen) erfasst kleinste Tonusänderungen der eingespannten Organe. Diese mechanischen Veränderungen der Kontraktilität (z. B. bei einer Vasodilatation auftretend) werden in elektrische Signale transformiert.

3.8.7 Amplifier

Der Amplifier (Verstärker; Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier, WPI, USA) ist zwischen dem Kraftwandler der Apparaturen und dem Schreiber zwischengeschaltet (Abbildung 17). Seine Aufgabe ist es, das elektrische Signal vom Kraftwandler zu verstärken und dem Schreiber zuzuführen.

Abbildung 17: Amplifier



3.8.8 Schreiber

Der Schreiber (Flatbed Recorder, BD 112, Kipp & Zonen, Niederlande) (Abbildung 18) erfasst das verstärkte Signal des Amplifiers und zeichnet auf Millimeterpapier mit Tinte die Ergebnisse des Versuches auf.

Die Parameter, wie die Papiergeschwindigkeit (speed), die Amplitudenhöhe in mV (range) und der Nullpunkt (zero), sind individuell – je nach Versuch - einzustellen.

Abbildung 18: Schreiber



3.9 Versuchsdurchführung

Vor jedem Versuch werden die Organbäder und die Organhalterungen mit destilliertem Wasser sorgfältig gespült und somit von möglich anhaftendem Staub gereinigt. Sodann

werden 8 ml Tyrode in das kleine bzw. 25 ml Tyrode in das große Organbad gefüllt, temperiert und mit Oxymix begast, sodass kleine Gasbläschen in der Nährstofflösung sichtbar aufstiegen.

Nachdem die Nährstofflösung, das Carbogen und die optimale Temperatur vorhanden sind, wird mit dem Einspannen der präparierten Organe begonnen.

In Tabelle 3 sind die Geräteeinstellungen bei den jeweiligen Organen zusammengefasst.

Tabelle 3: Geräteeinstellungen bei den Versuchsdurchführungen:

Organ	Vorspannung (mN)	mV	Amplitudenhöhe (in cm am Schreiber)	Geschwindigkeit
Aorta	19,6 (nach KCl-Zugabe 9,81)	10 mV (nach KCl-Zugabe 5mV)	10 cm	1 mm/min
Truncus pulmonalis	9,81	5 mV	10 cm	1 mm/min
terminales Ileum	4,92	5 mV	5 cm	1 mm/min
Atrium dextrum	10,4	5 mV (bei Bedarf später 2 oder 1 mV)	10,4 cm	5 mm/s
Musculus papillaris	3,92	5 mV (bei Bedarf später 2 oder 1 mV)	4 cm	5 mm/s

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien

3.9.1 MAH100.HCl-Stammlösung

Zuerst wird eine Stammlösung von 0,025 mol/l von MAH100.HCl hergestellt. Für das große (25 ml) Organbad werden 2,5 µmol (0,845 mg) in 100 µl gelöst, für das kleine (8 ml) Organbad werden 0,8 µmol (0,2704 mg) in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

3.9.2 Pipettierschema der allgemeinen Versuche

Zu den präparierten, in die Apparaturen eingespannten Organen, werden zunehmende Mengen (μl) der MAH100.HCl – Stammlösung mit Eppendorfpipetten (Abbildung 19) eingespritzt. Bei den allgemeinen Versuchsdurchführungen ist das Pipettiermuster (Tabelle 4) dasselbe.

Tabelle 4: Pipettierschema

Zeit	zugegebene Menge von MAH100.HCl - Stammlösung (in μl)	Konzentration im Organbad nach Zugabe von MAH100.HCl - Stammlösung (in $\mu\text{mol/l}$)
Initial (nach Erreichen des Kontrollwertes)	3	3
45 Minuten	7	10
90 Minuten	20	30
135 Minuten	70	100

Quelle: Department für Pharmakologie und Toxikologie Wien

Abbildung 19: Eppendorfpipetten



3.9.3 Versuchsdurchführung Gefäße (Aorta und Truncus pulmonalis)

Die präparierte, in kleine Ringe geschnittene Aorta und der präparierte Truncus pulmonalis werden direkt auf die Aufhängevorrichtung von Apparatur 1 angebracht. Die Versuche können sowohl im kleinen (8 ml) als auch im größeren (25 ml) Organbad durchgeführt

werden. Wichtig ist es, den Gefäßring zwischen den oberen und unteren Silberdraht der Aufhängevorrichtung so einzuhängen, dass der Gefäßring leicht gespannt ist. Mit Hilfe der Positionierungsschraube werden die Präparate mittig in das mit 8 bzw. 25 ml Tyrode befüllte Organbad platziert (Abbildung 20).

Abbildung 20: In Apparatur 1 eingespannter Truncus pulmonalis



Damit die Versuche untereinander vergleichbar sind, müssen die Organe mit Hilfe des Feintriebes standardisiert vorgespannt werden. Die Vorspannung beträgt beim Truncus pulmonalis 9,81 mN und bei der Aorta zu Beginn 19,6 mN.

Um gut auswertbare Diagramme zu erhalten, wird die Amplitudenhöhe durch Änderung der mV optimiert (Aorta: bei 10 mV 10 cm Amplitudenhöhe; Truncus pulmonalis: bei 5 mV 10 cm Amplitudenhöhe).

Die Geschwindigkeit (speed) des Papiervorschubs ist in beiden Fällen 1 mm pro Minute. Danach verweilen die eingespannten Gefäße für 20 Minuten (gemessen mit einer Stoppuhr) mit dieser Einstellung in der Tyrode.

In dieser Zeit wird ein Messzylinder mit genau 8 ml bzw. 25 ml KCl-Lösung für die Gefäße vorbereitet.

Nach den 20 Minuten wird beim Truncus pulmonalis wie folgt vorgegangen: man gibt dem Schreiber mit der Tastenkombination „pen down“ und „record on“ den Befehl den Versuch aufzuzeichnen. Die Tyrode wird durch den Ablassschlauch ausgelassen und durch die vorbereitete KCl-Lösung ersetzt. Dies führt zu einer kräftigen Kontraktion der glatten Muskulatur des Truncus pulmonalis.

Bei der Aorta ist dieser Vorgang ähnlich, jedoch werden die Einstellungen am Schreiber modifiziert: direkt vor Zugabe der KCl-Lösung wird die Empfindlichkeit des Schreibers von 10 mV auf 5 mV, welches 9,81 mN entspricht, verändert.

Der weitere Versuchsablauf ist für beide Gefäßtypen derselbe. Gleich nach der KCl-Lösungszugabe wird mittels Stoppuhr mindestens 45 Minuten kontrolliert zugewartet, bis sich ein konstanter Kontraktionszustand der Gefäßmuskelzellen (steady-state), in der Folge als Kontrollwert bezeichnet, einstellt. Der Kontrollwert ist dann erreicht, wenn an der grafischen Aufzeichnung des Schreibers über zehn Minuten (auf einer Strecke von mindestens einem Zentimeter) die Tonusänderung maximal um 1 mm abweicht und somit als fast waagrechte Linie dargestellt wird. Die aufgezeichnete Amplitudenhöhe des Kontrollwertes muss am Millimeterpapier mindestens 5 cm betragen, um den Versuch zu starten. Stellt sich die steady-state nach zwei Stunden nicht ein bzw. ist die Amplitudenhöhe unter 5 cm, ist das Präparat für den Versuch ungeeignet.

Während sich der konstante Kontrollwert einstellt, wird die MAH100.HCl-Stammlösung vorbereitet.

Der steady-state Kontrollwert ist nach mindestens 45 Minuten bis maximal zwei Stunden erreicht. Nach Markierung dieses Wertes mit einem Schreibstift am Millimeterpapier, werden 3 µl der MAH100.HCl-Stammlösung in das mit KCl-Lösung befüllte Organbad pipettiert, sodass eine Konzentration von 3 µM im Organbad entsteht. Nach exakt 45 Minuten wird wieder auf dem Millimeterpapier mit einem Schreibstift die steady-state Konzentration von 3 µM markiert und 7 µl der MAH100.HCl-Stammlösung hinzupipettiert. Im Organbad herrscht somit eine Konzentration von 10 µM. Dieser Vorgang wiederholt sich mit weiteren 20 µl (entspricht einer Konzentration von 30 µM im Organbad) und 70 µl (entspricht einer Konzentration von 100 µM im Organbad) MAH100.HCl-Stammlösung und weiteren jeweils exakt eingehaltenen 45 Minuten. Diese genau eingehaltenen 45 Minuten zwischen den verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen werden benötigt, da sich die steady-state

Konzentration erst nach ca. dieser Zeit einstellt und somit die Versuche standardisiert und reproduzierbar zu vergleichen sind.

Nach Ende der letzten 45 Minuten wird der Schreiber mit der Tastenkombination „pen up“ und „record off“ zum Anhalten gebracht, das Organ kann ausgespannt und entsorgt werden. Die Organbäder werden zuerst mit verdünnter HCl - Lösung und danach zweimal mit destilliertem Wasser gereinigt. Bei der Reinigung wird eine Zahnbürste benutzt und das Organbad mit dieser geschrubbt. Die Organhalterung wird beim zweiten Durchgang mit destilliertem Wasser mit der Zahnbürste geputzt. Außerdem lässt man während der Reinigung der Organbäder den Gashahn aufgedreht, um eventuell anhaftenden Wirkstoff und Schmutz an der Gasdüse sicher zu entfernen.

3.9.4 Versuchsdurchführung terminales Ileum

Das präparierte Stück des terminalen Ileums wird mit Hilfe der an den Enden befestigten Silberhaken an die Organhalterung der Apparatur 1 befestigt. Danach wird er so im mit Tyrode befüllten Organbad positioniert, dass weder das eingehängte Organ noch die Organhalterung den Rand des Organbads berühren (Abbildung 21) und die Begasung gestartet.

Abbildung 21: In Apparatur 1 eingespanntes Ileumpräparat



Nach Einstellung von 5 mV und speed bei 1 mm/min stellt man eine Vorspannung von 4,92 mN mittels Feintrieb ein. Am Schreiber werden folgende Einstellungen getätigt: bei 5 mV 5 cm Amplitudenhöhe. Nach 20 Minuten gibt man dem Schreiber mittels „record on“ und „pen down“ den Befehl den Versuch aufzuzeichnen und wechselt die Tyrode gegen die KCl-Lösung, um den konstanten Kontrollwert zu ermitteln.

Danach werden so wie oben beschrieben im Zeitabstand von 45 Minuten die verschiedenen Konzentrationen im Organbad (3, 10, 30 und 100 μ M) durch Zupipettieren der MAH100.HCL-Stammlösung erzeugt. Nach Ende des Versuches wird durch „record off“ und „pen up“ der Schreiber gestoppt und die Aufzeichnung zur Auswertung archiviert. Das Organbad wird, wie oben beschrieben, gereinigt.

3.9.5 Versuchsdurchführung Vorhof

Die Versuchsdurchführung am Vorhof erfolgt auch in Apparatur 1, jedoch unterscheidet sie sich etwas von den anderen in Apparatur 1 durchgeführten Versuchen.

Der präparierte Vorhof wird mit dem Fettgewebe nach oben mit Hilfe der gesetzten Silberhaken in Apparatur 1 eingespannt, sodann im Tyrode befüllte Organbad platziert (Abbildung 22).

Abbildung 22: In Apparatur 1 eingespannter Vorhof



Am Schreiber werden 5 mV und 5 mm/s eingestellt. Die Vorspannung von 10,4 mN wird mittels Feintrieb appliziert. Häufig sind die Kontraktionen des Vorhofmyokards mit freiem Auge erkennbar. Zudem registriert der Schreiber alle Schläge und kann sie gegebenenfalls auf Papier bringen.

Ist die Amplitudenhöhe der Pulsationen bei 5 mV zu klein, ist die Auswertung der Schläge nicht möglich. Durch Umstellen auf 2 mV oder 1 mV wird die Amplitude größer und die Schläge für die Ermittlung der spontanen Vorhofschlagfrequenz auszählbar.

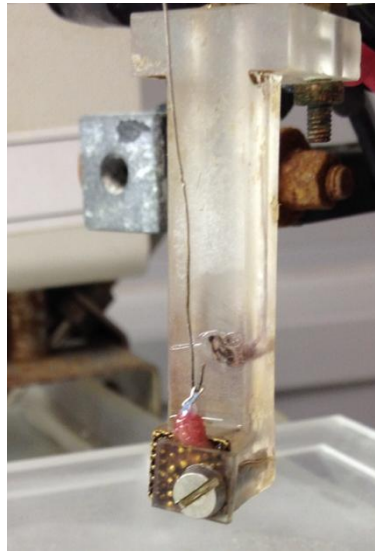
Nun wird mit den Kontrollwerten begonnen. Dazu wird dem Schreiber alle fünf Minuten der Befehl durch „record on“ und „pen down“ gegeben, die Schläge über sechs Zentimeter aufzuzeichnen. Sodann werden die Schläge innerhalb dieser sechs Zentimeter ausgezählt und das Ergebnis notiert. Dieser Vorgang wird für mindestens 30 Minuten wiederholt und kann beendet werden, wenn die letzten drei Messungen maximal eine Frequenzabweichung von einem Schlag aufweisen.

Ist ein guter Kontrollwert erreicht, erfolgt das Einspritzen der MAH100.HCl-Stammlösung. So wie bei den Gefäßen und beim terminalen Ileum werden nach Erreichen des Kontrollwertes, Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 μM im Organbad verwendet und zwischen jeder Konzentration exakt 45 Minuten gewartet, um jeweils eine steady-state Konzentration zu erreichen. Anders als bei den Gefäßen und dem terminalen Ileum wird beim Vorhof nach Einspritzung der jeweiligen Konzentration jedoch alle fünf Minuten eine Messung durchgeführt, die Schläge des Vorhofes mit Hilfe des Schreibers notiert und die Frequenz manuell am Millimeterpapier bestimmt. Nach der letzten Messung der 100 μM Konzentration wird der Vorhof entsorgt und das Organbad wie bereits beschrieben gereinigt.

3.9.6 Versuchsdurchführung Papillarmuskel

Der präparierte Papillarmuskel wird mit dem Silberhaken am oberen Ende in die Organhalterung der Apparatur 2 eingehängt, zwischen Elektrode und Plexiglas am unteren Ende eingeklemmt und mit einem Schraubenzieher befestigt (Abbildung 23). Dann wird die Organhalterung in das mit genau 25 ml Tyrode befüllte Organbad so eingetaucht, dass der Papillarmuskel gerade mit Nährlösung bedeckt ist. Das durch das temperierte Wasserbad eventuell aufgetretene Verdampfen der Tyrode während des Versuches führt zu einem Flüssigkeitsverlust, welcher durch Zugabe neuer Tyrode auf 25 ml ergänzt werden muss.

Abbildung 23: In Apparatur 2 eingespannter Papillarmuskel



Die Voreinstellungen am Schreiber sind beim Papillarmuskel bei 5 mV und 5 mm/s. Die Vorspannung mittels Feintrieb beträgt 3,92 mN. Da der Papillarmuskel im Gegensatz zum Vorhof von alleine nicht aktiv ist, wird er mittels Reizgerät mit einem Hertz elektrisch stimuliert.

Zu Beginn wird die Stromstärke auf 999 mA gestellt und gewartet bis der Papillarmuskel eine Aktivität zeigt. Kommt es zu einer Aktivität wird die Stromstärke soweit reduziert, bis der Papillarmuskel aufhört zu schlagen, addiert zu genau dieser Schwellenstromstärke zehn Prozent und führt den Versuch mit der so ermittelten Stromstärke durch. Diese Einstellung wird für die Versuchsdurchführung beibehalten, kann aber gegebenenfalls etwas nachreguliert werden.

Wichtig ist es, die Stromstärke nicht zu hoch zu wählen, da dies zu einer Überreizung des Papillarmuskels führen würde. In diesem Fall würde sich der Katecholaminspeicher entleeren (Rundowneffekt) und der Papillarmuskel erschöpfen (Furchgott et al. 1959).

Man könnte somit nicht mehr eruieren, ob der Effekt von der Substanz oder von diesem Rundowneffekt stammt.

Mit der richtigen Einstellung an den Geräten startet der Versuch wiederum mit einem Kontrollwert. Um den möglichen positiv oder negativ inotropen Effekt der Substanz nachzuweisen, muss zuerst ein repräsentativer Kontrollwert vorhanden sein. Dazu werden die

Kontraktionsamplituden mit Hilfe des Schreibers auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Alle fünf Minuten findet eine Messung über 12 Sekunden statt. Am Millimeterpapier ergibt sich bei der Einstellung von 5 mm/s eine Strecke von 6 cm. Die Längen der Kontraktionsamplituden werden mittels Lineal gemessen, die Werte notiert und der Vorgang alle fünf Minuten für mindestens 30 Minuten wiederholt, um bei zwei aufeinander folgenden Messungen eine Abweichung von maximal einem Millimeter zu bekommen. Die Höhe der Kontraktionsamplitude sollte mindestens zwei Zentimeter betragen. Sollte dies bei der Einstellung von 5 mV nicht gegeben sein, kann durch Einstellen von 2 bzw. 1 mV die Kontraktionsamplitude größer dargestellt werden. Sollte die Amplitude trotzdem kleiner als zwei Zentimeter sein, ist dieses Organ für die Messung ungeeignet und wird entsorgt.

Ist ein guter, geeigneter Kontrollwert vorhanden, wird mit der Einspritzung der zunehmenden Volumina MAH100.HCl-Stammlösung begonnen. Wie auch bei den anderen Organen werden die Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 μM im Organbad im Abstand von exakt 45 Minuten getestet. Ähnlich zum Vorhof wird alle fünf Minuten gemessen und die erhaltenen Kontraktionsamplituden werden ausgewertet.

Nach Versuchsende wird der Papillarmuskel entsorgt, das Organbad so wie bei Apparatur 1 mit einmal verdünnter HCl-Lösung und zweimal destilliertem Wasser mit einer Zahnbürste gereinigt und die Organhalterung mit destilliertem Wasser abgespült.

3.10 Wirkmechanismus

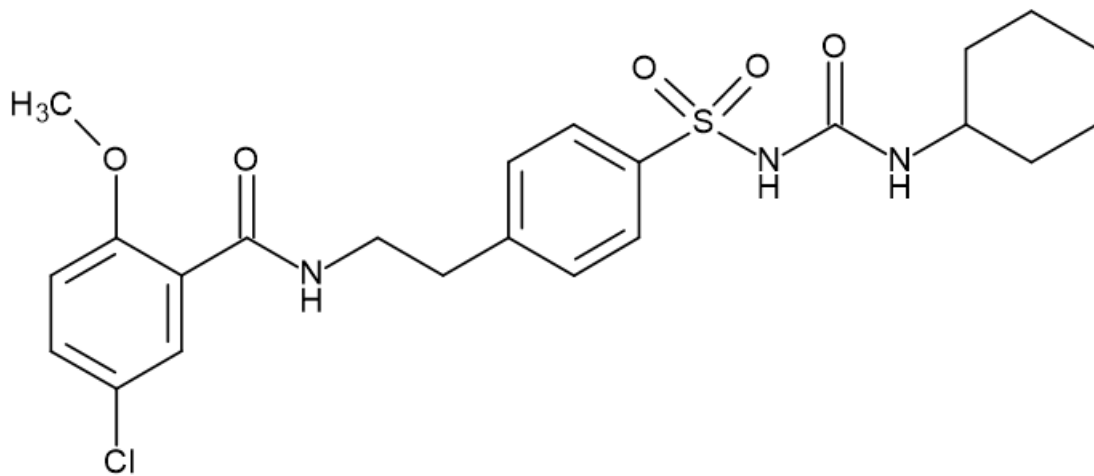
Die allgemeine Testung des terminalen Ileums lässt eine deutlich spasmolytische Aktivität erkennen, weshalb dieses Organ zur weiteren Testung des Wirkmechanismus heran gezogen wird.

Wegen der schwefelhaltigen Struktur, wird MAH100.HCl als potentieller Kaliumkanalöffner geprüft. Für die Versuche wird ein K_{ATP} -Kanalblocker (Glibenclamid) in zwei verschiedenen Konzentrationen (30 und 100 μM im Organbad) sowie MAH100.HCl in einer Konzentration von 30 μM (im Organbad) verwendet. Es wird eine Versuchsreihe mit 30 μM Glibenclamid und 30 μM MAH100.HCl und eine mit 100 μM Glibenclamid und 30 μM MAH100.HCl durchgeführt.

3.10.1 Herstellung der Wirkstofflösungen

Glibenclamid (Abbildung 24), Antagonist des ATP-abhängigen Kaliumkanals, wird vor der Versuchsdurchführung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Es werden zwei verschiedene Konzentrationen im Organbad benötigt: 30 μM und 100 μM . Dazu wird eine Glibenclamid-Stammlösung der Konzentration von 0,025 mol/l hergestellt: es werden 2,5 μmol (1,235 mg) Glibenclamid in 100 μl DMSO gelöst.

Abbildung 24: Strukturformel von Glibenclamid



MAH100.HCl wird, so wie bei der allgemeinen Testung, in destilliertem Wasser gelöst. Für die Untersuchung des Wirkmechanismus wird eine Konzentration von 30 μM im Organbad gebraucht.

3.10.2 Versuchsdurchführung des Wirkmechanismus

Für die Durchführung der Versuche wird das terminale Ileum wie bei den allgemeinen Versuchen präpariert, mit den zwei Silberhaken in die Organhalterung der Apparatur 1 eingespannt und in das mit 25 ml Tyrode befüllte Organbad platziert. Für eine Sauerstoffversorgung ist auch hier durch Zufuhr von Oxymix zu sorgen.

Das präparierte Organ wird wie bei der allgemeinen Versuchsdurchführung des terminalen Ileums in der Nährlösung mittels Feintrieb auf 4,92 mN vorgespannt. In der gewechselten KCl-Lösung wird dann auf einen konstanten steady-state Kontrollwert mit mindestens 5 cm

Amplitudenhöhe (bei 5 mV) für mindestens 45 Minuten gewartet. Der erhaltene steady-state Kontrollwert wird am Millimeterpapier mit einem Schreibstift gekennzeichnet. Dann wird mit der Einspritzung der vorbereiteten Glibenclamidlösung begonnen.

Bei der Versuchsreihe mit einer Konzentration von 30 μM Glibenclamid im Organbad, werden 30 μl Glibenclamidstammlösung zum Organ in die Tyrode gespritzt. Danach werden exakt 45 Minuten gewartet und anschließend 30 μl der MAH100.HCl-Stammlösung hinzu pipettiert (Tabelle 5). Die Tonusänderungen am Dünndarm werden für weitere 45 Minuten aufgezeichnet.

Tabelle 5: Pipettierschema Wirkmechanismus 30 μM Glibenclamid

Minuten	Zugegebene Menge der Stammlösung (in μl)
nach mind. 45 und max. 120 Minuten	30 μl Glibenclamidstammlösung
nach 45 Minuten	30 μl MAH100.HCl-Stammlösung

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien

Derselbe Vorgang wird bei der Versuchsreihe mit 100 μM Glibenclamidlösung ausgeführt. Hier werden 100 μl Glibenclamidstammlösung nach Erreichen eines Kontrollwertes und 30 μl MAH100.HCl-Stammlösung nach 45 Minuten zur Nährlösung gespritzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Pipettierschema Wirkmechanismus 100 μM Glibenclamid

Minuten	Zugegebene Menge der Stammlösung (in μl)
nach mind. 45 und max. 120 Minuten	100 μl Glibenclamidstammlösung
nach 45 Minuten	30 μl MAH100.HCl-Stammlösung

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien

Nach Versuchsende wird das Organ entsorgt und das Organbad sowie die Organhalterung so wie oben beschrieben gereinigt.

3.11 Auswertung, Statistik und grafische Darstellung der Versuche

Alle Messergebnisse werden zuerst manuell erfasst und im Anschluss daran mittels Computer ausgewertet.

Bei allen Versuchen wird der Kontrollwert mit 100 % angegeben und die verschiedenen zupipettierten MAH100.HCl – Konzentrationen in Relation zum Kontrollwert in Prozent ermittelt.

3.11.1 Manuelle Auswertung

3.11.1.1 Auswertung Truncus pulmonalis, Aorta und terminales Ileum

Die nach dem Versuchsablauf erhaltenen, durch den Schreiber dokumentierten Grafiken von Pulmonalarterie, Aorta und terminalem Ileum werden zuerst manuell ausgewertet. Dazu werden mit einem Lineal Kontrollwert und steady-state Werte von 3, 10, 30 und 100 μM in Zentimeter genau abgemessen und neben dem jeweiligen Wert am Millimeterpapier notiert. 0,98 mN entsprechen genau einem Zentimeter bei der Einstellung von 5 mV, um die resultierende Kraft zu berechnen wird das Zentimetermaß mit 0,98 multipliziert. Die Kontrollwerte werden mit 100 % angegeben und die verschiedenen MAH100.HCl-Konzentrationen in Relation dazu.

Schon bei der manuellen Auswertung können die Ergebnisse abgeschätzt werden. Dazu wird der Verlauf der Kurve genauer inspiziert. Krümmt sich die Kurve im Laufe des Versuches nach links und wird somit der in Zentimeter ermittelte Wert größer als der Kontrollwert, so kommt es zur Kontraktion der Gefäße und des terminalen Ileums. Bleiben die Werte der Kontrolle und der verschiedenen MAH100.HCl Konzentrationen auf demselben Niveau, so zeigt der zu prüfende Stoff an dem Organ keine Wirkung. Biegt sich allerdings die Kurve nach rechts und kommt es somit zu einer Abnahme der in Zentimeter ermittelten Werte, dann wirkt MAH100.HCl in den Versuchen vasodilatativ bzw. spasmolytisch.

3.11.1.2 Auswertung Vorhof

Am Atrium dextrum wird die Schlagfrequenz (Chronotropie) ausgewertet. Dazu werden die nach Versuchsdurchführung erhaltenen Millimeterpapierbögen benötigt und die darauf dokumentierten Schläge ausgezählt. Wie oben beschrieben wird alle fünf Minuten eine Messung über 6 cm (entspricht 12 Sekunden) aufgezeichnet. Die Pulsationsaufzeichnung innerhalb der 6 cm wird ausgezählt und mit fünf multipliziert. Das so erhaltene Ergebnis gibt die Schläge pro Minute an.

Der steady-state Kontrollwert des Vorhofes wird mit 100 % angegeben. Die erhaltenen Werte bei 3, 10, 30 und 100 μM werden ebenfalls in Prozent angegeben. Je nachdem ob die Schläge pro Minute zu- oder abnehmen hat die Substanz eine positiv oder negativ chronotrope Wirkung.

3.11.1.3 Auswertung Papillarmuskel

Die nach Versuchsdurchführungen erhaltenen Millimeterpapierbögen erhalten aufgezeichnete Kontraktionsamplituden der Papillarmuskeln. Die Kontraktionsamplituden werden in Zentimeter genau abgemessen und am Millimeterpapier notiert. Bei einer Einstellung von 5 mV werden die Werte wieder mit 0,98 multipliziert, bei einer Einstellung von 2 oder 1 mV mit 0,39, um ein Ergebnis in mN zu erhalten. Wiederum wird der Kontrollwert mit 100 % angegeben und die verschiedenen steady-state Werte der verschiedenen MAH100.HCl-Konzentrationen in Prozent, bezogen zum Kontrollwert, ausgerechnet.

Kommt es zu einer Zunahme der Kontraktionsamplitude, wirkt die Substanz am Papillarmuskel positiv inotrop. Bei einer Abnahme wirkt MAH100.HCl negativ inotrop.

3.11.1.4 Auswertung Wirkmechanismus

Die Auswertung des Wirkmechanismus erfolgt ähnlich. Der in Zentimeter angegebene und mit 0,98 multiplizierte Kontrollwert in mN wird als 100 % angegeben und die Konzentration von Glibenclamid sowie von MAH100.HCl in Relation dazu bestimmt.

3.11.2 Auswertung am Computer

Am Computer werden die manuell ermittelten Daten einerseits statistisch ausgewertet, andererseits grafisch dargestellt.

Für die statistische Auswertung wird eine Excel-Tabelle erstellt und die Mittelwerte sowie die Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean, SEM) berechnet.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wird mit dem Student – t – Test ermittelt. Durch diese lässt sich die Signifikanz der Ergebnisse feststellen, wobei Werte kleiner 5 % ($P < 0,05$) und kleiner 1 % ($P < 0,01$) signifikant sind. Werte kleiner 0,1 % ($P < 0,001$) sind hochsignifikant.

Nach der statistischen Auswertung wird eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit dem Computerprogramm „SigmaPlot 9.0“ erstellt. An der halblogarithmischen Abszisse (x-Achse) wird die Konzentration von MAH100.HCl in $\mu\text{mol/l}$ eingezeichnet, an der Ordinate (y-Achse) die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. An der erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurve lässt sich die EC_{50} -Konzentration (die effektive Konzentration, bei welcher es zu einer 50 %igen Wirkung kommt) in $\mu\text{mol/l}$ ablesen und genau einzeichnen.

Die grafische Darstellung des Wirkmechanismus erfolgt in einem Balkendiagramm. Auf der Ordinate wird die Kontraktionskraft in mN und auf der Abszisse die Kontrolle mit KCl, die Konzentrationen von Glibenclamid und MAH100.HCl abgebildet.

4 Ergebnisse

Zuerst werden die Ergebnisse der allgemeinen Versuchsreihen von Truncus pulmonalis, Aorta thoracalis, terminalen Ileum, Atrium dextrum und Musculus papillaris präsentiert. Im Anschluss daran die Ergebnisse des Wirkmechanismus am terminalen Ileum.

4.1 Ergebnisse der allgemeinen Versuchsreihen

Es wird pro Versuchsreihe jeweils eine Tabelle, eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve und ein eingescannter Originalversuch dargestellt.

In der Tabelle sind die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) in mN und Prozent sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) bei der jeweiligen Konzentration von MAH100.HCl ersichtlich.

Bei der grafischen Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist auf der x-Achse die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft bzw. beim Vorhof die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent angegeben. Die schwarzen Punkte zeigen die Mittelwerte der Konzentrationen im Organbad, die durch die Punkte gezeichneten Spannen markieren die Standardfehler (SEM). Mit zwei strichlierten Linien ist die EC_{50} (falls vorhanden) in die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eingezeichnet.

Pro Versuchsreihe findet sich ein eingescannter Originalversuch: die Einspritzzeitpunkte der MAH100.HCl-Konzentrationen sind jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet, die Zeitspanne von 45 Minuten bzw. 12 Sekunden und der Maßstab von 1 cm sind jeweils mit einem Doppelpfeil markiert.

4.1.1 Ergebnisse des Truncus pulmonalis

Am Truncus pulmonalis wird ein möglicher vasodilatativer Effekt von MAH100.HCl untersucht.

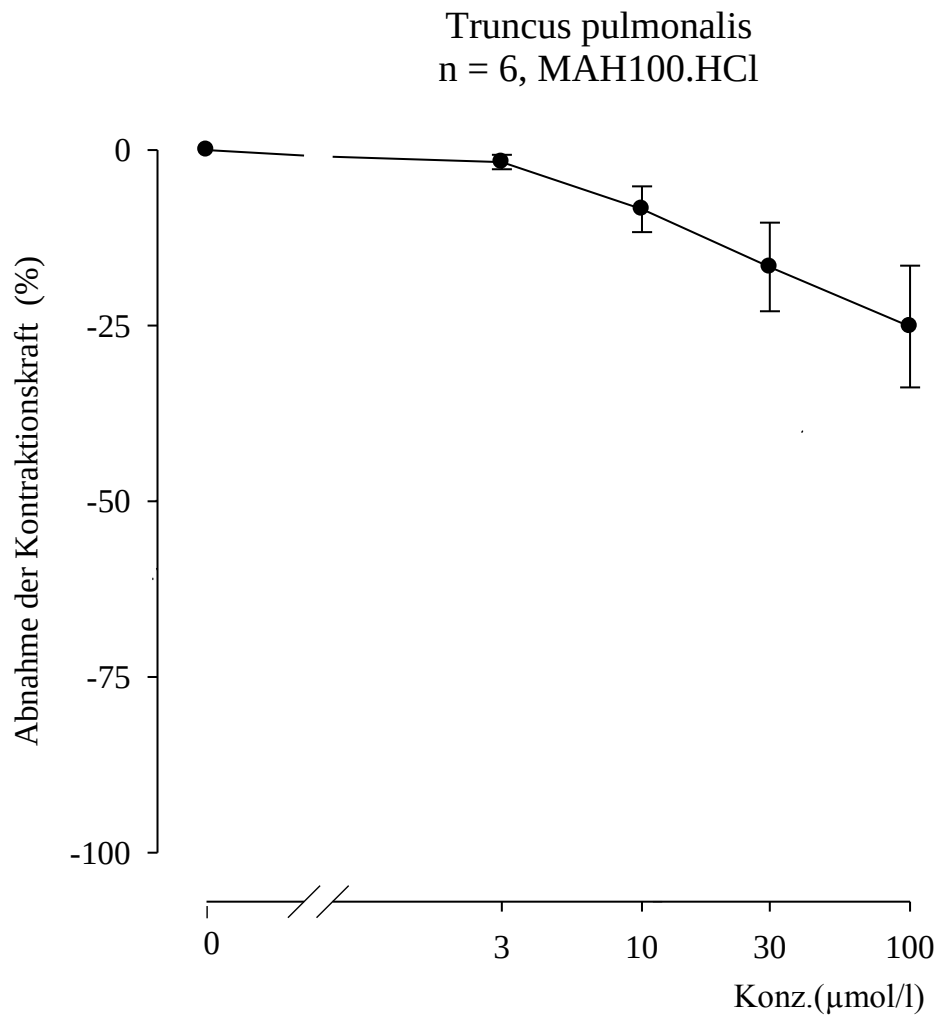
Tabelle 7: Versuchsergebnisse: Truncus pulmonalis

MAH100.HCl (μM)	Anzahl der Versuche (n)	f_c ± SEM (mN)	f_c ± SEM (%)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	6	10,53 ± 0,89	0 ± 0	--
3	6	10,35 ± 0,91	-1,72 ± 1,02	n.s.
10	6	9,66 ± 0,97	-8,43 ± 3,26	n.s.
30	6	8,79 ± 1,10	-16,66 ± 6,31	0,05
100	6	7,86 ± 1,14	-25,14 ± 8,66	0,05

Die Versuchsreihe des Truncus pulmonalis besteht aus 6 Versuchen. In Tabelle 7 sind die Konzentrationen von MAH100.HCl in μmol/l, die Anzahl der Versuche (n), die Mittelwerte der Kontraktionskraft (in mN und Prozent) und deren Standardfehler (SEM) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angegeben.

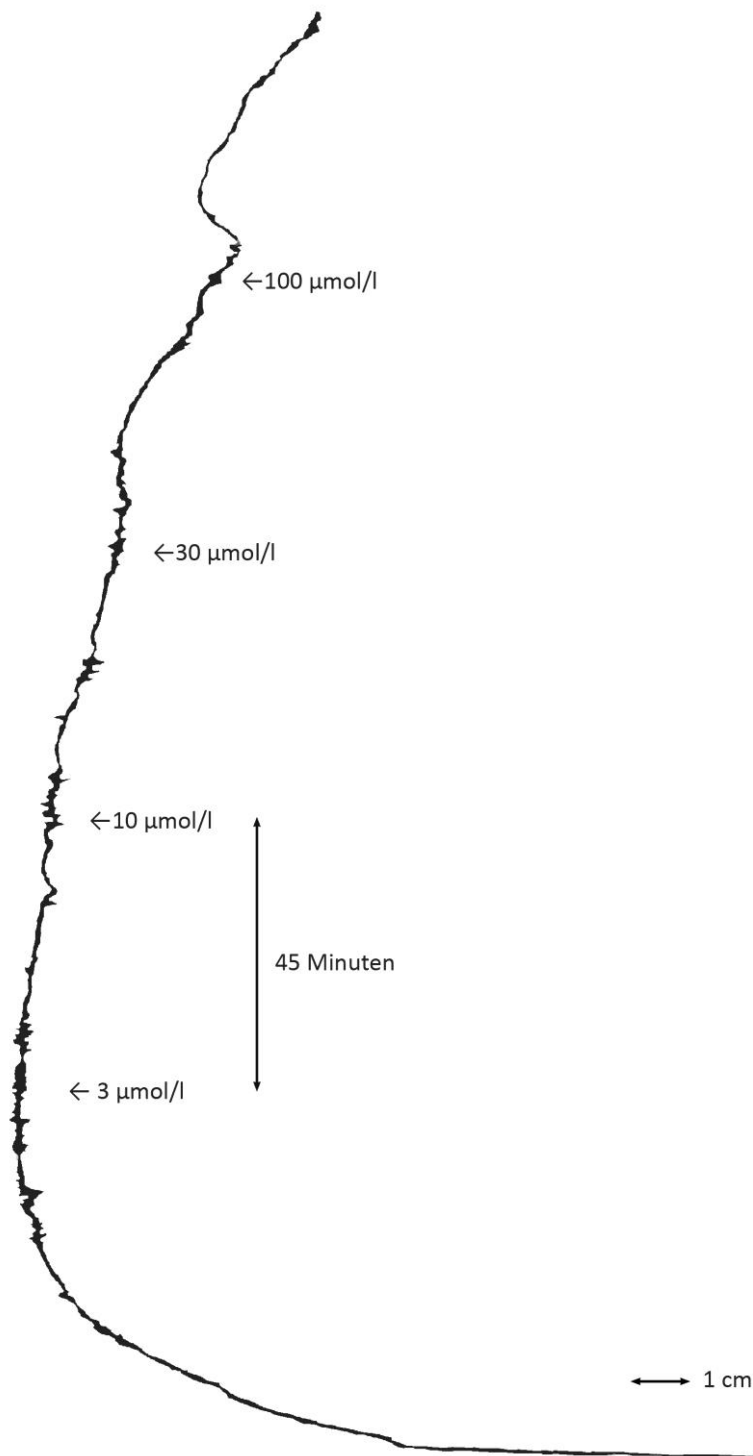
Die Mittelwerte der Kontraktionskraft zeigen eine leichte Abnahme bei zunehmenden MAH100.HCl-Konzentrationen. Dies bedeutet, dass MAH100.HCl leicht relaxierend auf die glatte Muskulatur des Truncus pulmonalis wirkt.

Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Truncus pulmonalis



Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 25) zeigt anschaulich, dass die Zunahme der MAH100.HCl-Konzentration im Organbad zu einer stetigen Kontraktionsabnahme an den Truncus pulmonalis Präparaten führt. Der Effekt von MAH100.HCl auf den Truncus pulmonalis ist schwach (kleiner -50 % Kontraktionsabnahme), daher ist die EC_{50} -Konzentration nicht bestimmbar.

Abbildung 26: Originalabbildung eines Versuches von Truncus pulmonalis



Aufzeichnung Truncus pulmonalis (16. 05. 2014)

In der ausgewählten Originalabbildung (Abbildung 26) ist durch Pfeile der Einspritzzeitpunkt der verschiedenen Konzentrationen im Organbad dargestellt. Die Zeit zwischen den

Konzentrationen beträgt 45 Minuten und ist so wie die Wegstrecke von 1 cm mit einem Doppelpfeil gekennzeichnet. 1 cm in der Abbildung entspricht 0,98 mN.

Auch auf der Originalabbildung ist erkennbar, dass die Substanz MAH100.HCl eine relaxierende Wirkung auf den Truncus pulmonalis hat. Auffallend ist, dass unmittelbar nach Zupipettieren von MAH100.HCl (vor allem bei 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) eine leichte Kontraktionszunahme, gefolgt von einer Kontraktionsabnahme auftritt.

4.1.2 Ergebnisse der Aorta thoracalis

An der Aorta thoracalis wird, so wie beim Truncus pulmonalis, eine mögliche relaxierende Wirkung auf die glatten Muskelzellen analysiert.

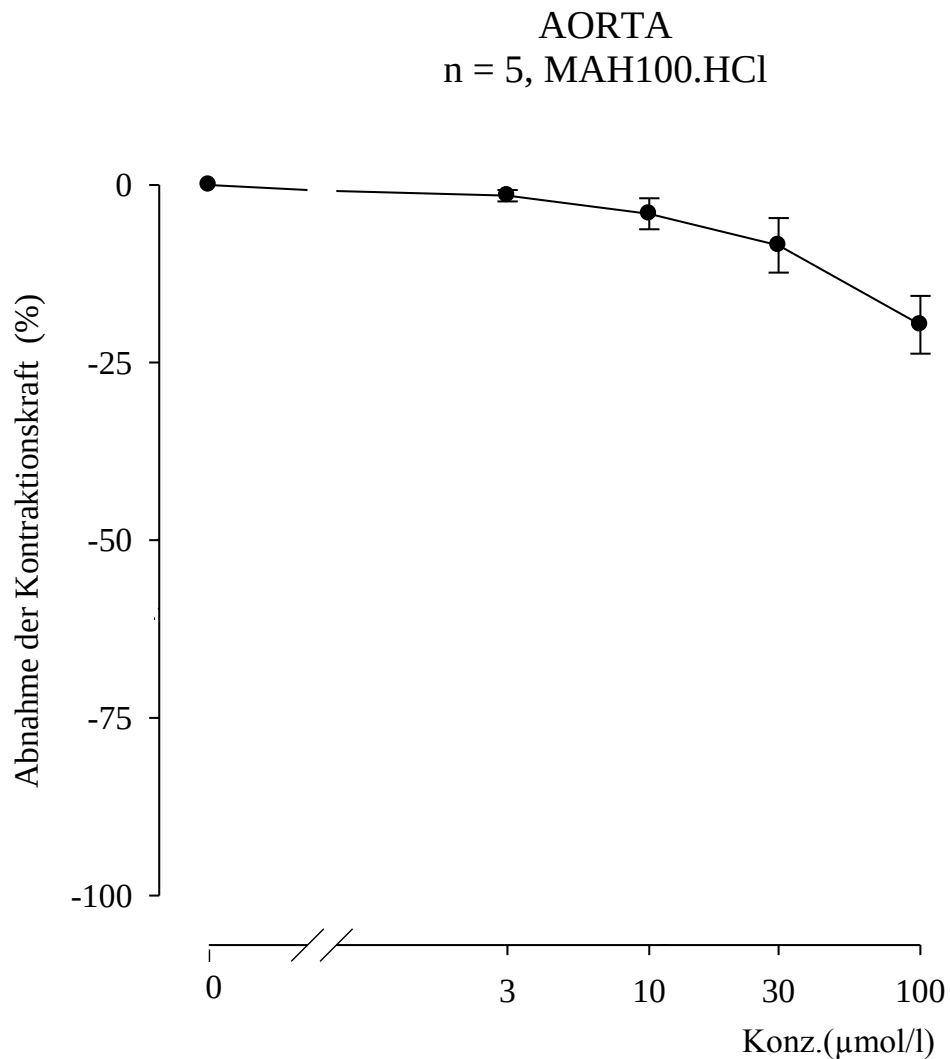
Tabelle 8: Versuchsergebnisse: Aorta thoracalis

MAH100.HCl (μM)	Anzahl der Versuche (n)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	5	$9,68 \pm 1,44$	$0,00 \pm 0,00$	--
3	5	$9,49 \pm 1,34$	$-1,52 \pm 0,81$	n.s.
10	5	$9,19 \pm 1,22$	$-4,08 \pm 2,19$	n.s.
30	5	$8,67 \pm 1,01$	$-8,51 \pm 3,84$	0,05
100	5	$7,57 \pm 0,79$	$-19,68 \pm 4,07$	0,05

Bei der Versuchsreihe der Aorta werden aus fünf Versuchen die Mittelwerte der Kontraktionskraft sowie deren Standardfehler in mN und Prozent angegeben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) findet sich in der letzten Spalte der Tabelle 8.

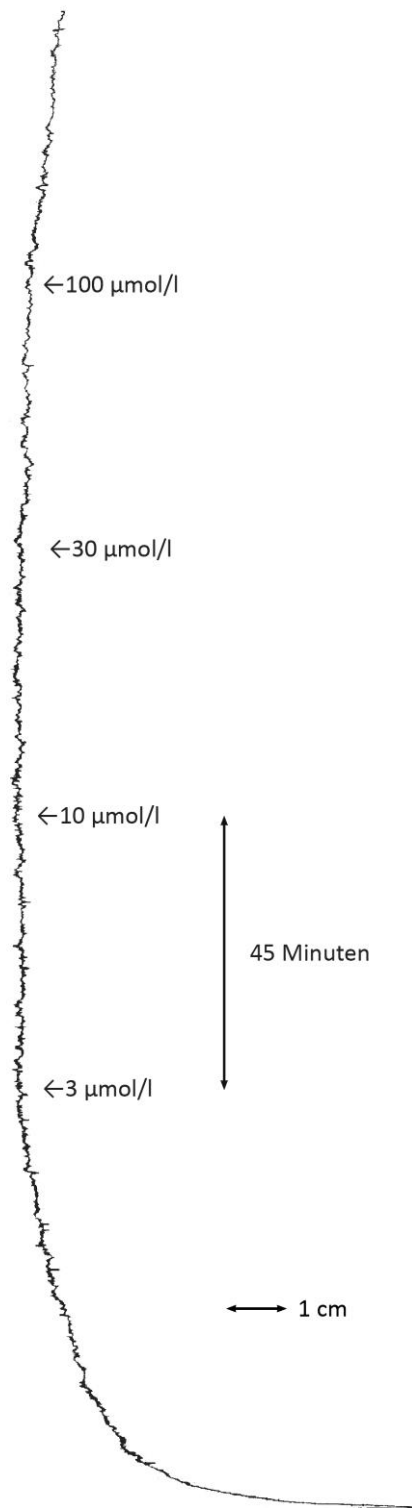
Eine geringe Dilatation ist auch hier mit zunehmenden Mengen an MAH100.HCl erkennbar.

Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Aorta thoracalis



Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 27) zeigt die in Tabelle 8 angeführten Mittelwerte der Kontraktionskraft (in %) grafisch dar. Die Aorta thoracalis Präparate relaxieren mit zunehmender Organbadkonzentration nur minimal, sodass auch hier kein EC_{50} -Wert ermittelt und eingezeichnet werden kann.

Abbildung 28: Originalabbildung eines Versuches von Aorta thoracalis



Aufzeichnung Aorta thoracalis (07. 05. 2014)

Die Originalabbildung (Abbildung 28) zeigt einen ausgewählten Versuch der Aorta. Es ist eine geringe Dilatation des Präparates vor allem bei 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl erkennbar.

So wie bei der Originalabbildung des Truncus pulmonalis sind die Einspritzzeitpunkte der Konzentrationen von MAH100.HCl im Organbad mit einem Pfeil sowie 1 cm und 45 Minuten mit einem Doppelpfeil markiert. Maßstab: 1 cm entspricht auch hier 0,98 mN.

4.1.3 Ergebnisse des terminalen Ileums

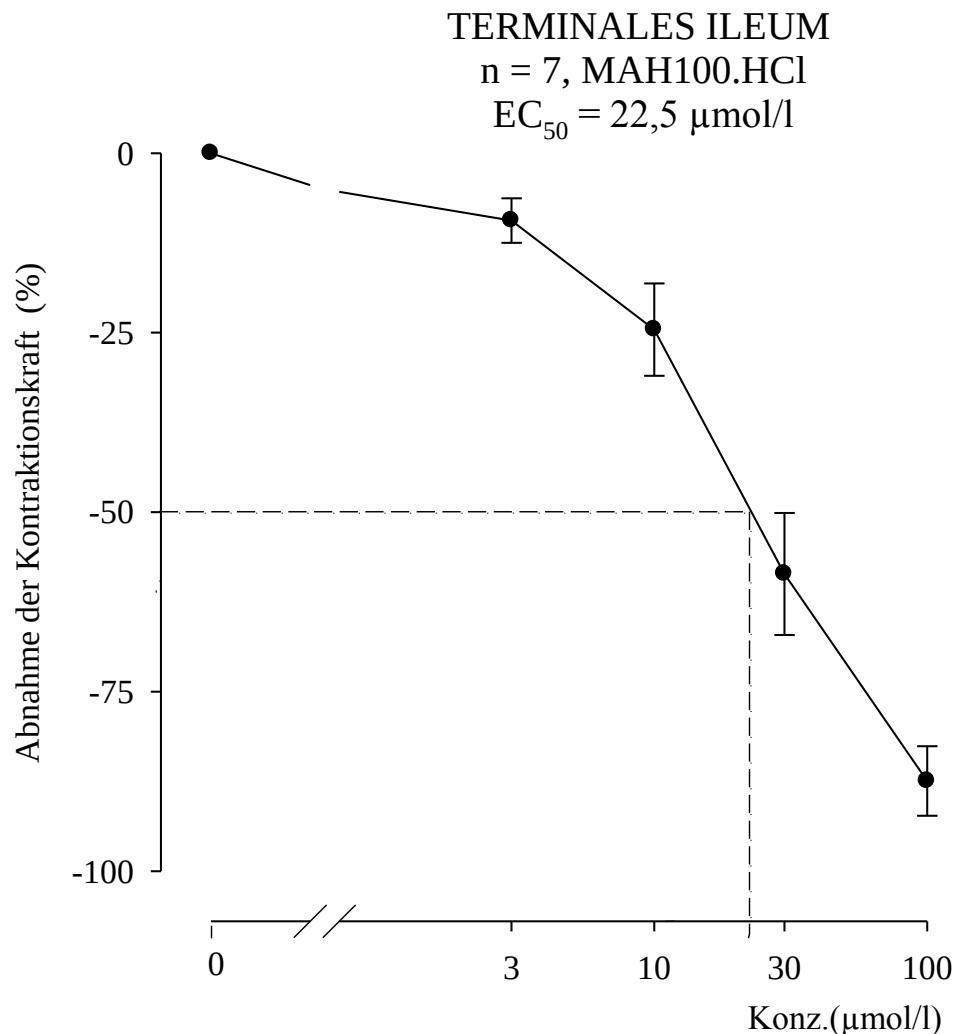
Am terminalen Ileum wird eine mögliche spasmolytische Wirkung von MAH100.HCl geprüft.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse: terminales Ileum

MAH100.HCl (μ M)	Anzahl der Versuche (n)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	7	$9,25 \pm 1,89$	$0,00 \pm 0,00$	--
3	7	$8,38 \pm 1,75$	$-9,38 \pm 3,11$	0,05
10	7	$7,15 \pm 1,76$	$-24,57 \pm 6,43$	0,01
30	7	$4,12 \pm 1,42$	$-58,60 \pm 8,50$	0,001
100	7	$1,43 \pm 0,78$	$-87,45 \pm 4,84$	0,001

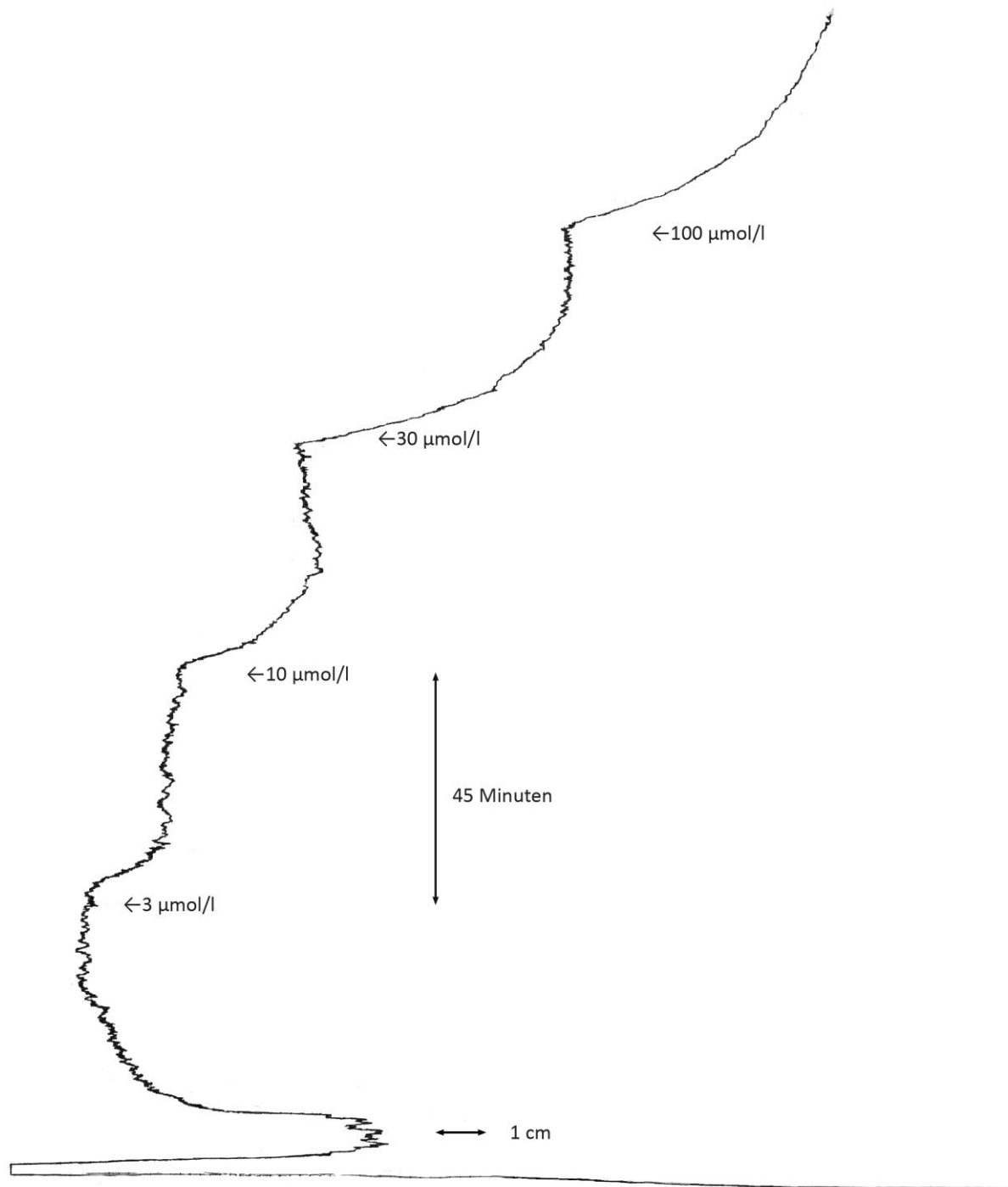
Die Versuchsreihe am terminalen Ileum besteht aus 6 Versuchen. Für die Ergebnisse des terminalen Ileums werden die Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler (in mN und Prozent) gebildet und zusammen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit in Tabelle 9 angezeigt. Mit zunehmender MAH100.HCl-Konzentration kommt es zu einer deutlichen Spasmolyse, welche an den Werten der Tabelle erkennbar ist.

Abbildung 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: terminales Ileum



In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 29) wird der spasmolytische Effekt bei den verschiedenen zupipettierten Volumina an MAH100.HCl klar sichtbar. Schon bei der Organbadkonzentration von 3 µmol/l MAH100.HCl kommt es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von durchschnittlich -9,38 % im Vergleich zum Kontrollwert. Bei einer Organbadkonzentration von 100 µmol/l MAH100.HCl beträgt der Mittelwert der Konzentrationskraftabnahme -87,45 %. Durch diese starke Kontraktionskraftabnahme (> -50 %) lässt sich eine EC₅₀-Konzentration ermitteln, welche beim terminalen Ileum im Durchschnitt bei 22,5 µmol/l liegt, mit strichlierten Linien in der Grafik eingezeichnet.

Abbildung 30: Originalabbildung eines Versuches vom terminalen Ileum



Aufzeichnung terminales Ileum (05. 05. 2014)

Die Einspritzzeitpunkte der verschiedenen Konzentrationen im Organbad sowie 1 cm und 45 Minuten sind wie schon beschrieben in Abbildung 30 markiert. Maßstab: 1 cm in der Abbildung entsprechen 0,98 mN.

An der Originalabbildung wird der deutlich spasmolytische Effekt gut erkannt. Gleich nach dem Zupipettieren der unterschiedlichen Konzentrationen von MAH100.HCl kommt es zur Kontraktionsabnahme am terminalen Ileum Präparat. Die Kontraktionsabnahme ist sogar schon bei 3 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl ersichtlich.

4.1.4 Ergebnisse der Atrium dextrum Präparate

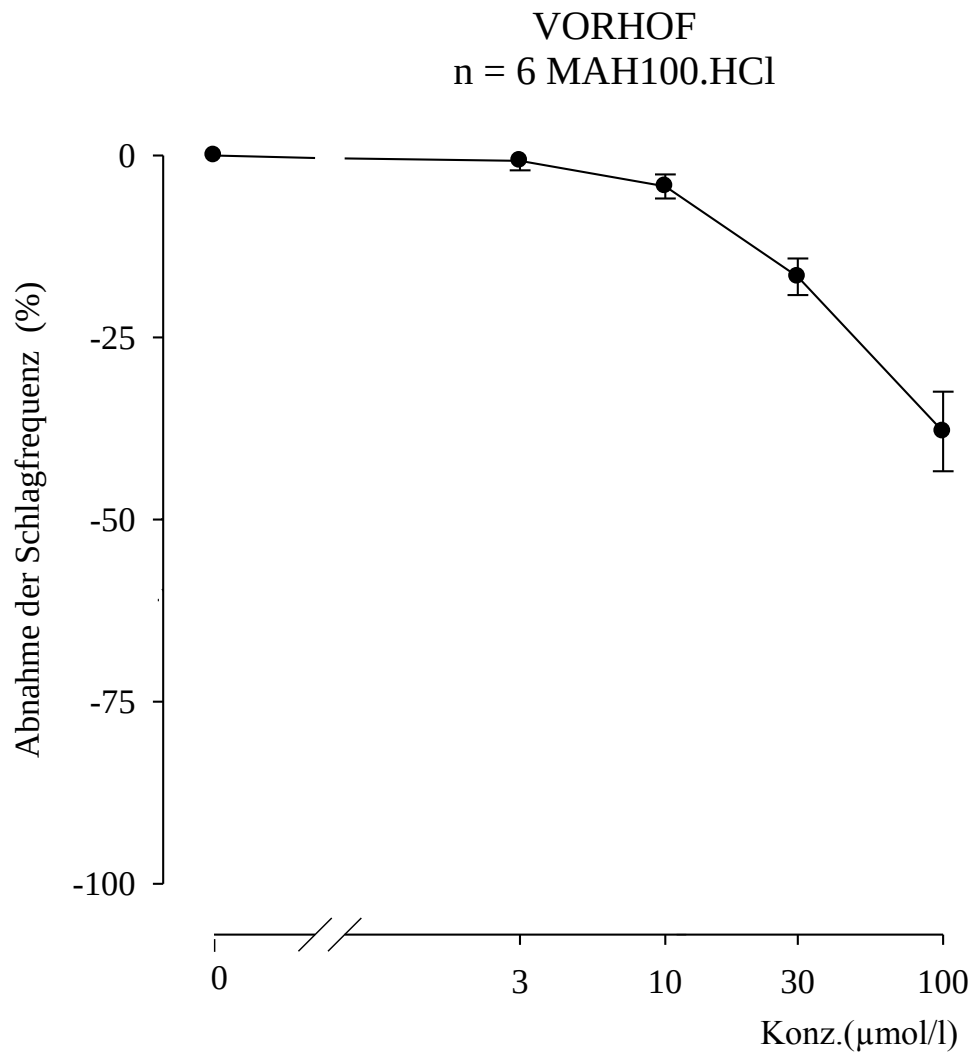
Am rechten Vorhof wird die Wirkung von MAH100.HCl auf die Schlagfrequenz untersucht.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse: Atrium dextrum

MAH100.HCl (μM)	Anzahl der Versuche (n)	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	6	$220,83 \pm 11,50$	$0,00 \pm 0,00$	--
3	6	$219,17 \pm 11,72$	$-0,74 \pm 1,32$	n.s.
10	6	$211,67 \pm 12,43$	$-4,25 \pm 1,65$	n.s.
30	6	$183,33 \pm 8,53$	$-16,68 \pm 2,51$	0,05
100	6	$135,83 \pm 10,91$	$-37,91 \pm 5,47$	0,01

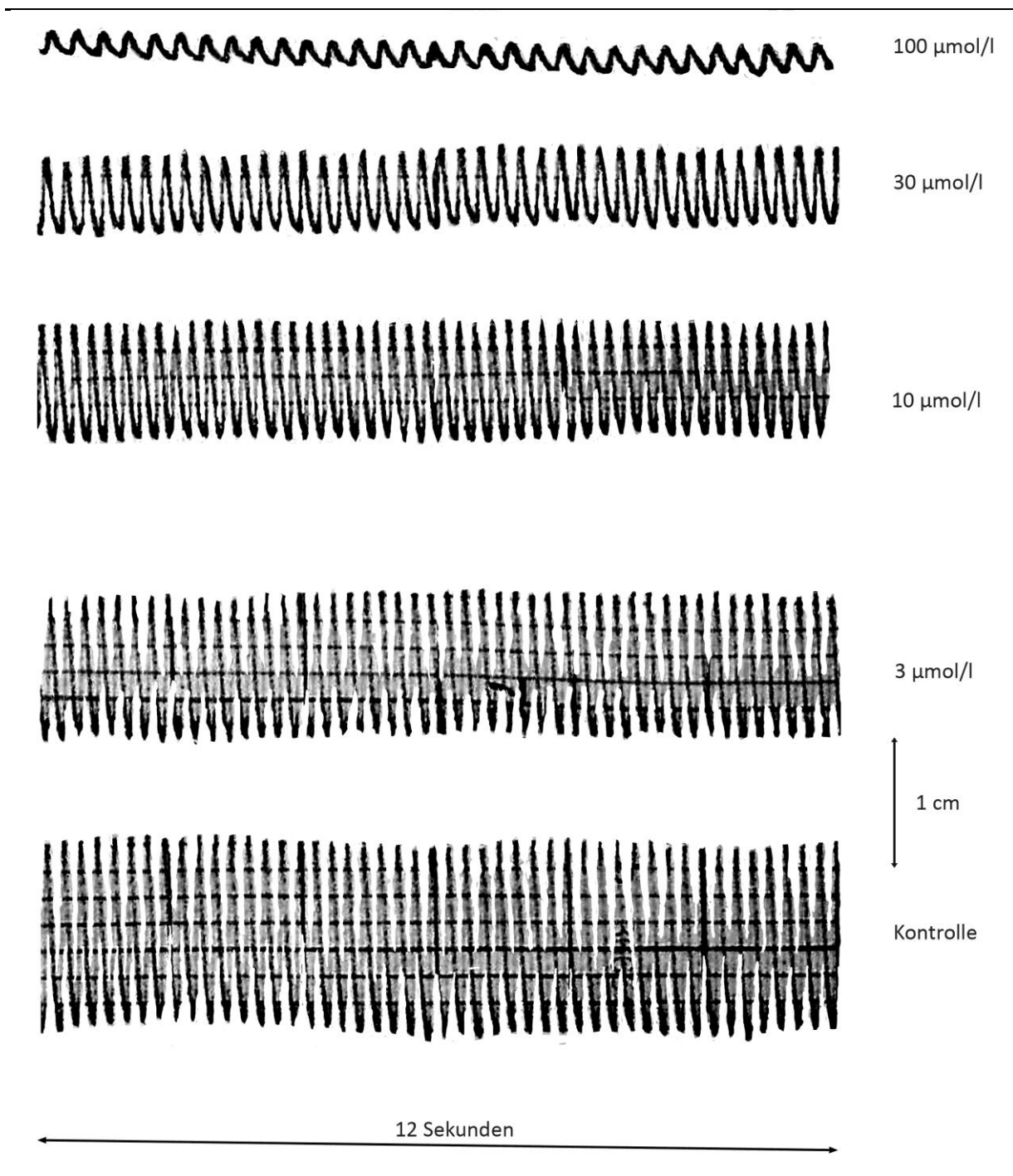
Für die Auswertung der Versuchsreihe vom Vorhof werden die Mittelwerte der Schlagfrequenz in Schläge pro Minute (x/min) und die Änderung in Bezug zum Kontrollwert in Prozent sowie deren Standardfehler von 6 Präparaten ermittelt. In der rechten Spalte von Tabelle 10 findet sich die Irrtumswahrscheinlichkeit (P). Beim Atrium dextrum ist bei den niedrigeren MAH100.HCl- Konzentrationen nur eine leichte Abnahme der Schlagfrequenz zu beobachten. MAH100.HCl wirkt gering negativ chronotrop am rechten Vorhof.

Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Atrium dextrum



In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 31) wird die Wirkung von MAH100.HCl am rechten Vorhof nochmal deutlich. Bis 30 µmol/l MAH100.HCl Organbadkonzentration kommt es zu einer geringen Abnahme der Schlagfrequenz (durchschnittlich -16,68 %). Bei der Konzentration von 100 µmol/l MAH100.HCl verringert sich die Schlagfrequenz deutlich. Trotzdem kann keine EC_{50} -Konzentration bestimmt werden.

Abbildung 32: Originalabbildung eines Versuches vom Atrium dextrum



Aufzeichnung Atrium dextrum (21. 05. 2014)

Die Originalabbildung (Abbildung 32) eines ausgewählten Versuches des rechten Vorhofes zeigt die jeweils letzte Messung bei den verschiedenen Konzentrationen von MAH100.HCl. Die Konzentrationen sind neben den Aufzeichnungen notiert. Ein Doppelpfeil zeigt wieder den Maßstab von 1 cm an, der andere Doppelpfeil die Zeitspanne von 12 Sekunden am Schreiber (entspricht 6 cm). Beim rechten Vorhof wird nicht die Kontraktionskraft, sondern

die Wirkung von MAH100.HCl auf die Herzfrequenz (Chronotropie) untersucht. Dazu werden die Schläge innerhalb der 12 Sekunden ausgezählt und mit 5 multipliziert, um die Schläge pro Minute zu erhalten.

An der Originalabbildung bestätigt sich die leichte Schlagfrequenzabnahme bis 30 µmol/l und die deutlich stärkere bei 100 µmol/l MAH100.HCl-Organbadkonzentration.

4.1.5 Ergebnisse des Papillarmuskels

Am Musculus papillaris wird die Wirkung von MAH100.HCl auf die Inotropie analysiert.

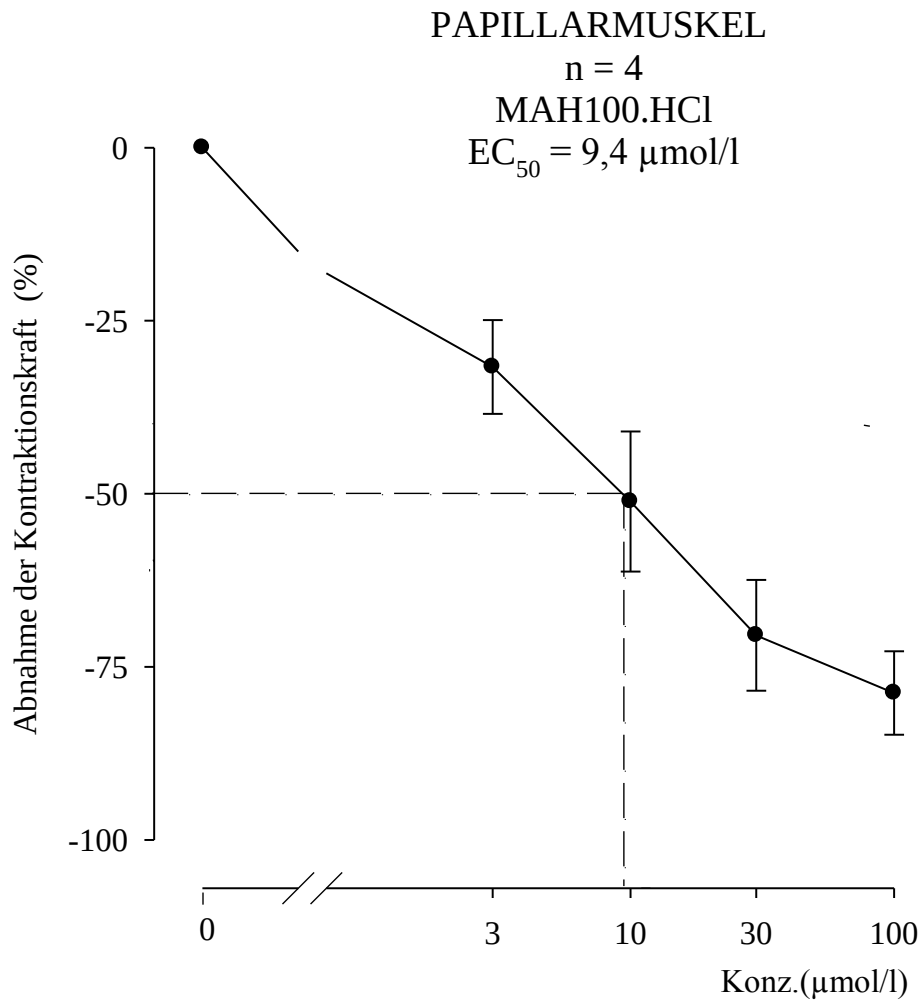
Tabelle 11: Versuchsergebnisse der Papillarmuskeln

MAH100.HCl (µM)	Anzahl der Versuche (n)	f_c ± SEM (mN)	f_c ± SEM (%)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	4	2,88 ± 0,55	0,00 ± 0,00	--
3	4	1,96 ± 0,36	-31,68 ± 6,78	0,05
10	4	1,42 ± 0,33	-51,12 ± 10,11	0,01
30	4	0,87 ± 0,27	-70,45 ± 8,00	0,001
100	4	0,64 ± 0,24	-78,79 ± 6,03	0,001

Für die Versuchsreihe am Papillarmuskel werden aus 4 Versuchen die Mittelwerte der Kontraktionskraft (in mN und Prozent) sowie deren Standardfehler berechnet. Diese Werte sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

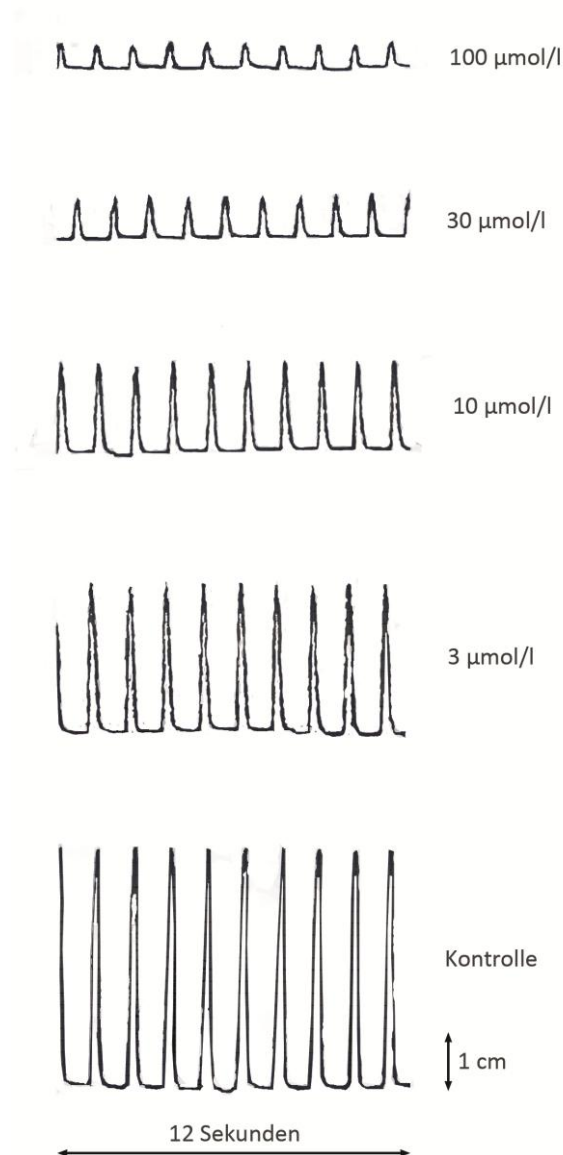
Bei den Versuchen des Papillarmuskels zeigt sich die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft verglichen mit allen anderen Präparaten. Schon die Zugabe von 3 µmol/l verringert die Kontraktionskraft um durchschnittlich -31,68 %. Bei 100 µmol/l beträgt die Kontraktionsabnahme durchschnittlich -78,79 %. Das bedeutet, dass die Testsubstanz MAH100.HCl am Papillarmuskel eine stark negativ inotrope Wirkung hat.

Abbildung 33: Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Musculus papillaris



In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 33) ist die Abnahme der Kontraktionskraft in Bezug zum Kontrollwert in Prozent bei den verschiedenen MAH100.HCl-Konzentrationen eingezeichnet. Die Werte der Tabelle werden anschaulich dargestellt und es wird der stark negativ inotrope Effekt deutlich sichtbar. Bei den Versuchen des Papillarmuskels lässt sich durch den starken Effekt eine EC₅₀-Konzentration bestimmen, die 9,4 µmol/l beträgt.

Abbildung 34: Originalabbildung eines Versuches vom Musculus papillaris



Aufzeichnung Musculus papillaris bei 5mV (06. 06. 2014)

Die Originalabbildung (Abbildung 34) eines ausgewählten Versuches vom Papillarmuskel zeigt die jeweils letzte Messung der Kontraktionsamplituden der verschiedenen MAH100.HCl-Konzentrationen. Die Konzentrationen sind neben den jeweiligen Amplituden beschriftet. So wie beim rechten Vorhof markieren zwei Doppelpfeile den Maßstab von 1 cm und die Wegstrecke von 12 Sekunden (entspricht 6 cm). 1 cm entspricht bei 5 mV 0,98 mN und bei 2 oder 1 mV 0,39 mN.

An der Originalabbildung wird diese negativ inotrope Wirkung am Papillarmuskel bestätigt.

4.2 Ergebnisse des Wirkmechanismus am terminalen Ileum

Am terminalen Ileum wird zusätzlich zur allgemeinen Testung ein in Frage kommender Wirkmechanismus untersucht. MAH100.HCl wirkt stark spasmolytisch am terminalen Ileum ($EC_{50} = 22,5 \mu\text{mol/l}$). Die Testsubstanz wird als potentieller K_{ATP} -Kanalöffner geprüft. Dazu wird analysiert, ob der potentielle K_{ATP} -Kanalöffner (MAH100.HCl) einen K_{ATP} -Kanalblocker (Glibenclamid) in der Wirkung hemmt.

Wie schon beschrieben wird zuerst Glibenclamid und nach 45 Minuten MAH100.HCl zu den Präparaten pipettiert. Kommt es zu einer deutlichen Spasmolyse durch MAH100.HCl ist vermutlich ein anderer Wirkmechanismus für die spasmolytische Wirkung verantwortlich.

Die Versuche des Wirkmechanismus am terminalen Ileum werden einerseits mit $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid (K_{ATP} -Kanalblocker) und $30 \mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl und andererseits mit $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und $30 \mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl durchgeführt. Bei den Ergebnissen des Wirkmechanismus findet sich jeweils eine Tabelle mit Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft inklusive Standardfehler ($f_c \pm \text{SEM}$) in mN bei Kontrolle, Glibenclamid- und MAH100.HCl-Konzentrationen sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P). Die grafische Darstellung erfolgt beim Wirkmechanismus in Form eines Balkendiagramms, wobei die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN auf der Ordinate und Kontrolle, 30 bzw. $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und $30 \mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl auf der Abszisse aufgezeichnet sind. Bei den beiden Versuchsreihen wird jeweils eine Originalabbildung ausgewählt und kurz beschrieben.

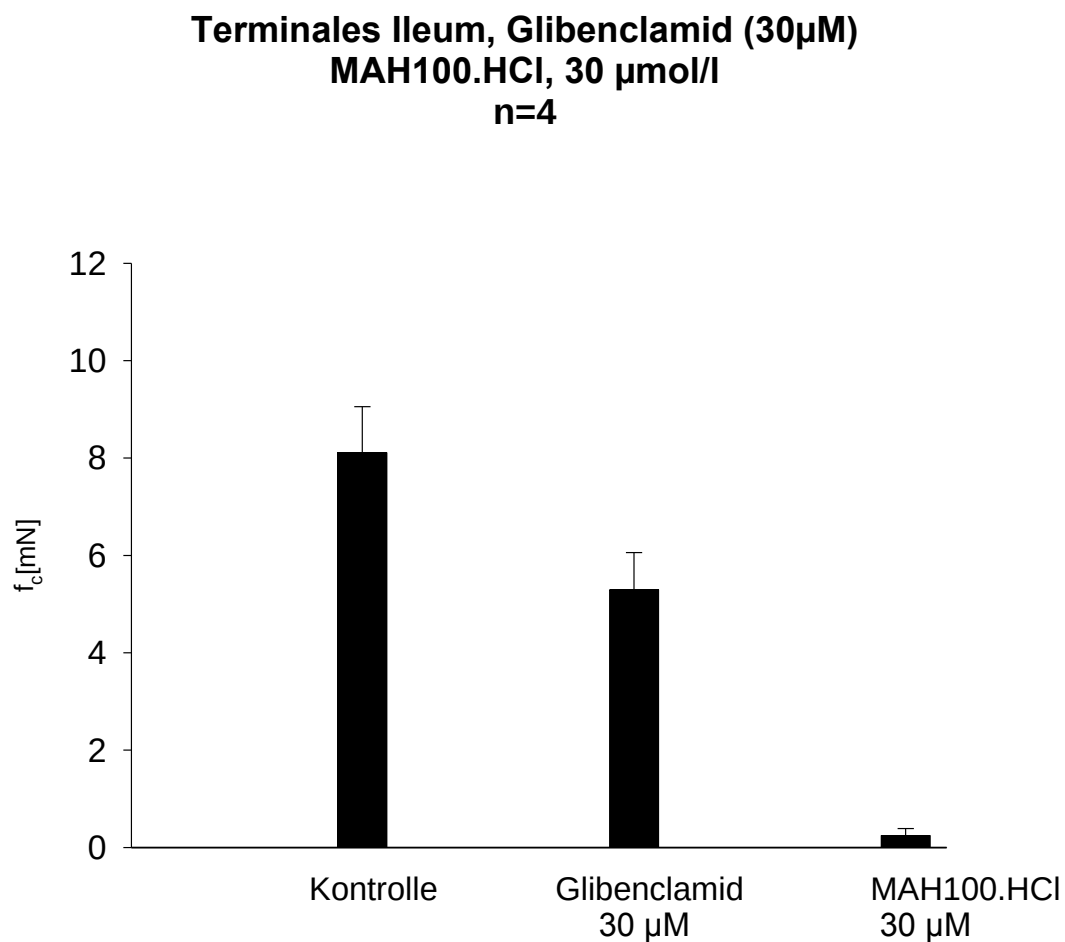
4.2.1 Ergebnisse des Wirkmechanismus von $30 \mu\text{M}$ Glibenclamid und $30 \mu\text{M}$ MAH100.HCl

Tabelle 12: Versuchsergebnisse des Wirkmechanismus vom terminalen Ileum ($30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid)

Konzentration (μM)	Anzahl (n)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle ($0 \mu\text{M}$)	4	$8,11 \pm 0,95$	--
Glibenclamid ($30 \mu\text{M}$)	4	$5,29 \pm 0,77$	--
MAH100.HCl ($30 \mu\text{M}$)	4	$0,25 \pm 0,14$	0,05

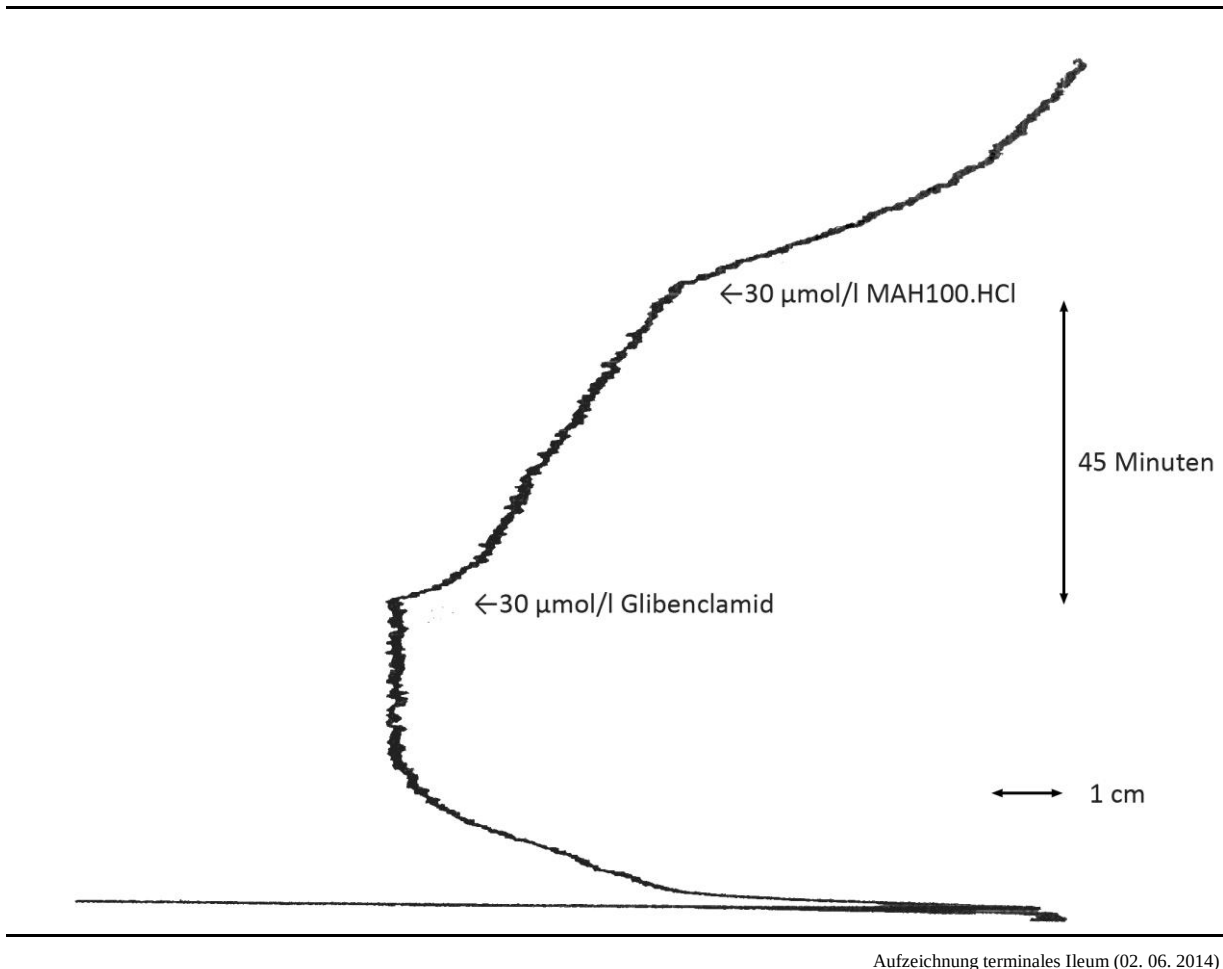
Wie Tabelle 12 entnommen werden kann, werden aus 4 Versuchen die Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft in mN sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von Kontrolle, 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl bestimmt. Durch 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid wird eine leicht spasmolytische Wirkung beobachtet. Durch Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl kommt es zu einem deutlich spasmolytischen Effekt.

Abbildung 35: Balkendiagramm vom Wirkmechanismus des terminalen Ileums (30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid)



Am Balkendiagramm (Abbildung 35) werden die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler für Kontrolle, 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl dargestellt. Eine geringe spasmolytische Wirkung ist bei Zugabe von Glibenclamid ersichtlich. Bei Zugabe von MAH100.HCl kommt es zu einer drastischen Kontraktionsabnahme.

Abbildung 36: Originalabbildung eines Versuches des Wirkmechanismus (30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid)



An der Originalabbildung (Abbildung 36) eines ausgewählten Versuches des terminalen Ileums sind die Einspritzzeitpunkte von der Glibenclamid- bzw. MAH100.HCl-Konzentration mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstab von 1 cm und die Zeitspanne von 45 Minuten sind mit einem Doppelpfeil markiert. So wie bei den allgemeinen Versuchen am terminalen Ileum entspricht 1 cm 0,98 mN.

Bei der Originalabbildung bestätigt sich der leicht relaxierende Effekt durch Glibenclamid und der starke Effekt nach MAH100.HCl-Zugabe.

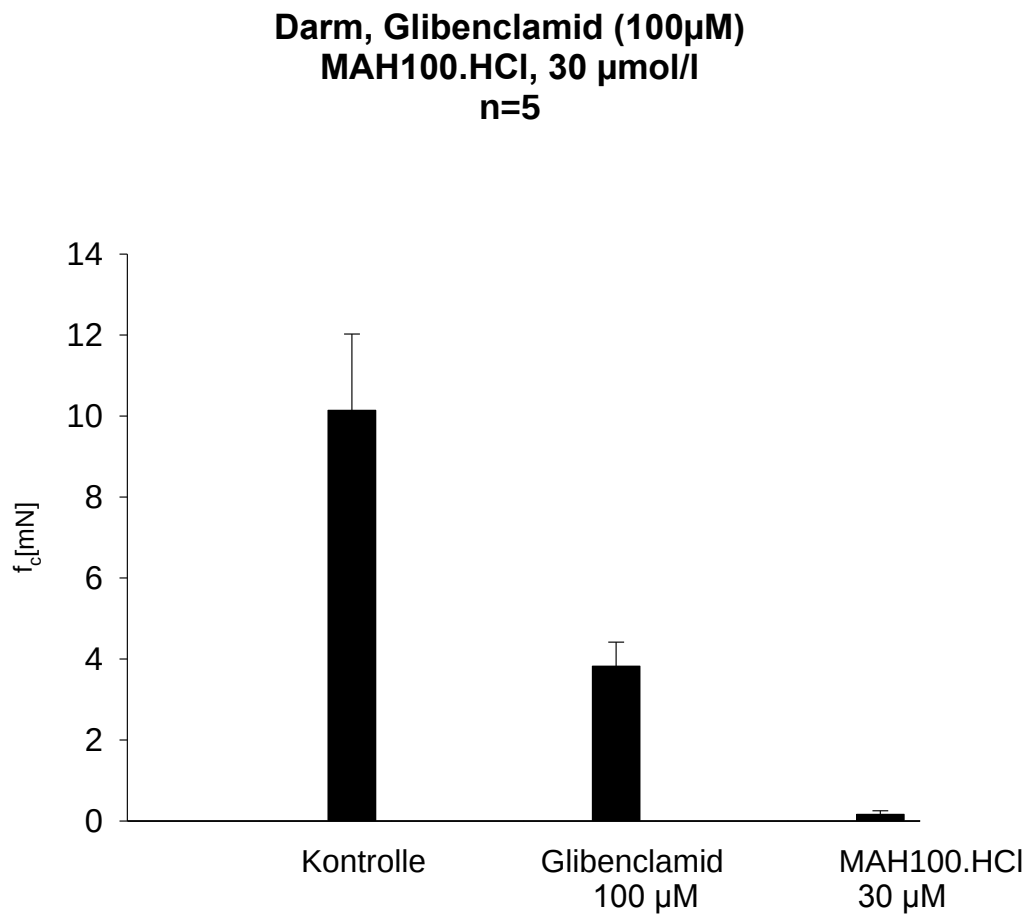
4.2.2 Ergebnisse des Wirkmechanismus von 100 μ M Glibenclamid und 30 μ M MAH100.HCl

Tabelle 13: Versuchsergebnisse des Wirkmechanismus vom terminalen Ileum (100 μ mol/l Glibenclamid)

Konzentration (μ M)	Anzahl (n)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0 μ M)	5	$10,14 \pm 1,89$	--
Glibenclamid (100 μ M)	5	$3,82 \pm 0,59$	--
MAH100.HCl (30 μ M)	5	$0,16 \pm 0,09$	0,05

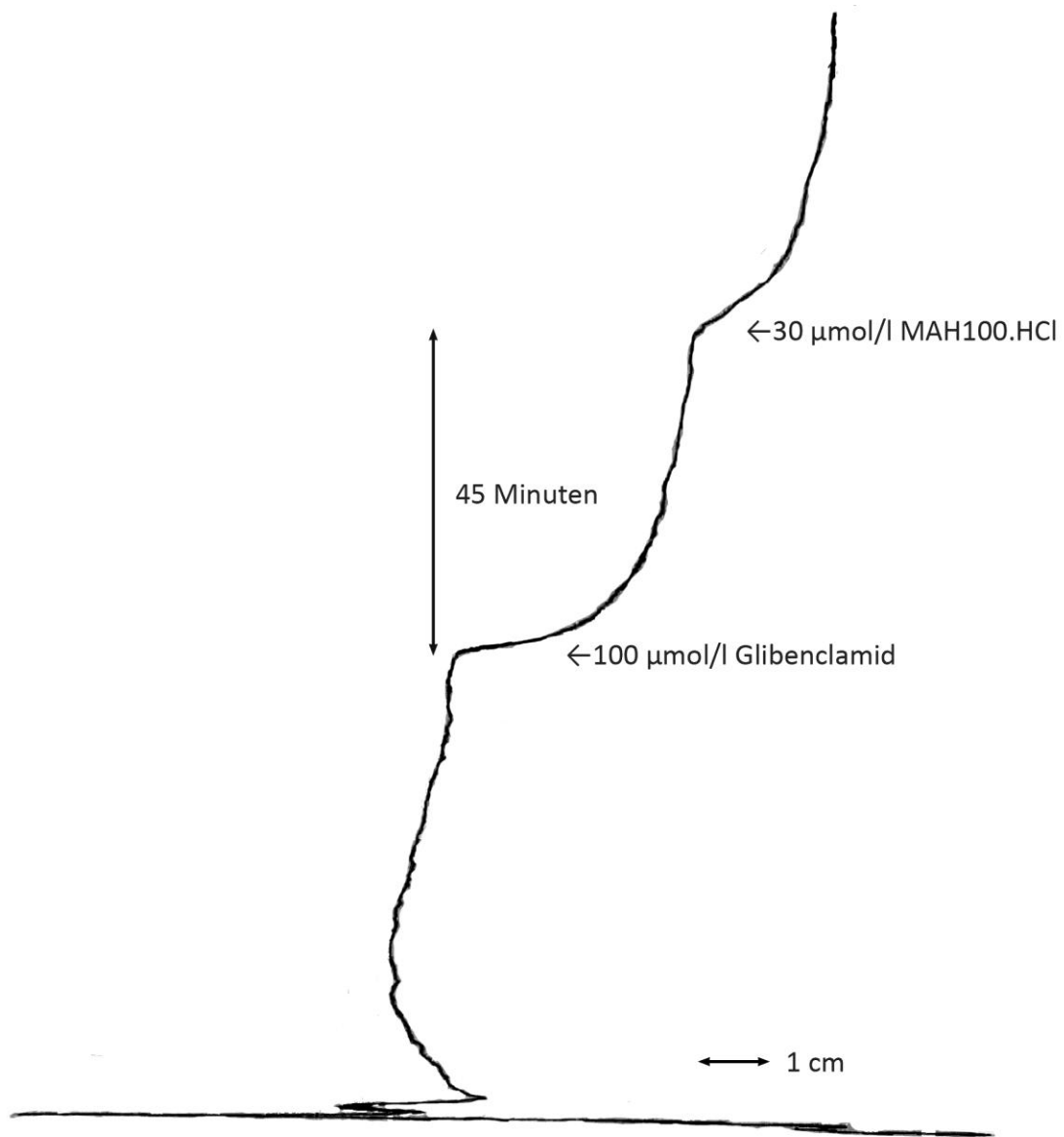
Die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN und deren Standardfehler sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit werden aus fünf Versuchen bei Kontrolle, 30 μ mol/l Glibenclamid und MAH100.HCl gebildet. Nach Zugabe von Glibenclamid fällt der durchschnittliche Mittelwert der Kontraktionskraft von 10,14 mN auf 3,82 mN. Bei Zugabe von MAH100.HCl ist ebenfalls eine deutlich spasmolytische Wirkung erkennbar (Tabelle 13).

Abbildung 37: Balkendiagramm vom Wirkmechanismus des terminalen Ileums (100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid)



Die Mittelwerte der Kontraktionskraft und deren Standardfehler in mN der fünf Versuche sind im Balkendiagramm (Abbildung 37) noch einmal anschaulich dargestellt. Die spasmolytische Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid sowie von 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl ist gut erkennbar.

Abbildung 38: Originalabbildung eines Versuches des Wirkmechanismus am terminalen Ileum (30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid)



Aufzeichnung terminales Ileum (27. 05. 2014)

Für die Originalabbildung (Abbildung 38) wird wieder ein Versuch ausgewählt und mit Pfeilen der jeweiligen Substanzkonzentrationen (Glibenclamid und MAH100.HCl) und Doppelpfeilen vom Maßstab von 1 cm und der Zeitspanne von 45 Minuten gekennzeichnet. So wie schon beschrieben wird der abgemessene Zentimeterwert mit 0,98 multipliziert, um auf mN umzurechnen.

Der spasmolytische Effekt am terminalen Ileum ist bei beiden Substanzen (Glibenclamid und MAH100.HCl) gut zu erkennen.

5 Diskussion

In diesem Abschnitt werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert und miteinander verglichen.

5.1 Wirkung von MAH100.HCl auf die glatte Muskulatur

MAH100.HCl wird an zwei verschiedenen Gefäßtypen (Truncus pulmonalis und Aorta thoracalis) und am terminalen Ileum getestet.

5.1.1 Wirkung von MAH100.HCl auf den Truncus pulmonalis

Am Truncus pulmonalis kann durch Zugabe verschiedener Volumina der MAH100.HCl-Stammlösung ein leicht vasodilatativer Effekt beobachtet werden, die Wirkung ist allerdings zu schwach ausgeprägt, um eine EC_{50} -Konzentration ermitteln zu können. Bei MAH100.HCl-Konzentration von 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad ist die Kontraktionsabnahme im Durchschnitt kleiner als -10 %. Selbst bei 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl-Konzentration im Organbad beträgt die Kontraktionsabnahme durchschnittlich nur -25,14 %.

5.1.2 Wirkung von MAH100.HCl auf die Aorta thoracalis

An den Präparaten der Aorta kann ein minimal vasodilatativer Effekt analysiert werden. Bei einer MAH100.HCl-Konzentration von 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad beträgt die Kontraktionsabnahme durchschnittlich weniger als -5 %. Durch 30 $\mu\text{mol/l}$ kommt es zu einer Kontraktionsabnahme von durchschnittlich -8,51 % und bei 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer durchschnittlichen Kontraktionsabnahme von weniger als -20 %. Da nur eine geringe Wirkung vorhanden ist kann auch bei der Aorta kein EC_{50} -Wert ermittelt werden.

5.1.3 Vergleich der Wirkung auf Truncus pulmonalis und Aorta thoracalis

Werden die Ergebnisse von Truncus pulmonalis und Aorta thoracalis miteinander verglichen, fällt auf, dass die Substanz MAH100.HCl eine ähnlich schwache Wirkung an den beiden verschiedenen Gefäßtypen hervorruft. Ein Grund für die vergleichbare Wirkung könnte sein,

dass die Gefäßtypen ähnlich aufgebaut sind und die Testsubstanz an den glatten Muskelzellen der Gefäße eine schwache Wirkung zeigt.

Aufgrund der schwachen Wirkung an beiden Versuchsreihen, kann keine EC₅₀-Konzentration bestimmt werden.

5.1.4 Wirkung von MAH100.HCl auf die Dünndarmpräparate

Am terminalen Ileum ist schon ab einer Organbadkonzentration von 3 µmol/l eine spasmolytische Wirkung sichtbar (durchschnittlich -9,38 % Kontraktionsabnahme). Die spasmolytische Wirkung wird durch Zugabe höherer Konzentrationen der Testsubstanz verstärkt bis es schließlich bei 100 µmol/l MAH100.HCl zu einer Kontraktionsabnahme von durchschnittlich -87,45 % kommt. Beim Dünndarm ist die Wirkung ausgeprägt. Die ermittelte EC₅₀-Konzentration beträgt 22,5 µmol/l.

5.1.5 Vergleich der Wirkung von MAH100.HCl auf das terminale Ileum und die Gefäßpräparate

Das untersuchte Gewebe entspricht sowohl bei den Gefäßen (Aorta thoracalis und Truncus pulmonalis) als auch beim terminalen Ileum glatter Muskulatur. Obwohl alle Präparate aus glatter Muskulatur aufgebaut sind, lässt sich nur am terminalen Ileum eine ausgeprägte Wirkung beobachten. Schon die Zugabe von 3 µmol/l MAH100.HCl führt beim Dünndarm durchschnittlich zu einer Kontraktionsabnahme von -9,38 %. Bei den Gefäßpräparaten hingegen beträgt die Kontraktionsabnahme durchschnittlich weniger als -2 %. Der Vergleich bei 100 µmol/l Organbadkonzentration von MAH100.HCl zeigt den Unterschied noch deutlicher: bei den Gefäßpräparaten beträgt die Kontraktionsabnahme lediglich ca. -25 % beim Truncus pulmonalis und ca.- 20 % bei der Aorta thoracalis, beim terminalen Ileum kommt es zu einer Kontraktionsabnahme bei 100 µmol/l Organbadkonzentration von MAH100.HCl von ca. -87 %. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse nochmal detailliert zusammengefasst und anschaulich gegenüber gestellt.

Tabelle 14: Vergleich der Kontraktionsabnahme von 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl an den glattemuskulären Präparaten in Bezug zum Kontrollwert

MAH100.HCl - Organbadkonzentration	f_c (durchschnittliche Kontraktionsabnahme in %)		
	Truncus pulmonalis	Aorta thoracalis	terminales Ileum
3 $\mu\text{mol/l}$	-1,72	-1,52	-9,38
100 $\mu\text{mol/l}$	-25,14	-19,68	-87,45

5.2 Wirkung von MAH100.HCl auf die Herzmuskulatur

Die Ergebnisse von MAH100.HCl auf das Atrium dextrum und den Musculus papillaris werden in diesem Abschnitt diskutiert und verglichen.

5.2.1 Wirkung von MAH100.HCl auf den rechten Vorhof

Am rechten Vorhof wird die Auswirkung von MAH100.HCl auf die Schlagfrequenz (Chronotropie) des rechten Vorhofes analysiert.

Bei der Konzentration von 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl im Organbad ändert sich die Schlagfrequenz nur unwesentlich: durchschnittlich kleiner als -5 %. Bei der Organbadkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl beträgt die Abnahme der Schlagfrequenz im Durchschnitt -16,68 %. 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl-Organbadkonzentration erzielen die stärkste Frequenzabnahme mit durchschnittlich -37,91 %. Ein geringer negativ chronotroper Effekt kann beobachtet werden, dieser ist jedoch zu schwach, um eine EC_{50} -Konzentration ermitteln zu können.

5.2.2 Wirkung von MAH100.HCl auf den Papillarmuskel

Die Auswirkungen auf die Inotropie durch Zugabe der Testsubstanz werden am Papillarmuskel untersucht.

Am Papillarmuskel zeigt MAH100.HCl die stärkste Wirkung. Schon bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ Organbadkonzentration kommt es zu einer Kontraktionsabnahme von

durchschnittlich -31,68 %. Bei 10 $\mu\text{mol/l}$ ist eine Kontraktionsabnahme von ca. -51 % und bei 30 $\mu\text{mol/l}$ von ca. -70 % gegeben. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ kommt es zu einer Kontraktionsabnahme von ca. -79 %. Die ermittelte EC_{50} -Konzentration beträgt 9,4 $\mu\text{mol/l}$. Somit zeigt sich eine stark ausgeprägte negativ inotrope Wirkung.

5.2.3 Vergleich der Wirkung von MAH100.HCl auf den Vorhof und den Papillarmuskel

Sowohl der rechte Vorhof als auch der Papillarmuskel bestehen aus Herzmuskelzellen. MAH100.HCl wirkt selektiv am Papillarmuskel stark negativ inotrop, am Vorhof ist ein gering negativ chronotroper Effekt vorhanden. Dies wird schon bei der Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl – Organbadkonzentration ersichtlich: Schlagfrequenzabnahme am Atrium dextrum durchschnittlich -0,74 % - Kontraktionsabnahme am Papillarmuskel durchschnittlich -31,68 %. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Organbadkonzentration wird der Unterschied akzentuiert: beim rechten Vorhof nimmt die Schlagfrequenz um ca. -38 % ab und die Kontraktilität des Papillarmuskels um ca. -79 % ab (Tabelle 15).

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Schlagfrequenzabnahme am Atrium dextrum und der Kontraktionsabnahme am Musculus papillaris in Prozent

MAH100.HCl - Organbadkonzentration	durchschnittliche Schlagfrequenz ($f_{x/\text{min}}$) - bzw. Kontraktionsabnahme (f_c) in %	
	Atrium dextrum	Musculus papillaris
3 $\mu\text{mol/l}$	-0,74	-31,68
100 $\mu\text{mol/l}$	-37,91	-78,79

5.3 Vergleich der EC_{50} -Konzentrationen

MAH100.HCl hat eine ausgeprägte Wirkung auf das terminale Ileum und auf den Papillarmuskel. Bei beiden Versuchsreihen kann die effektive Konzentration, bei der 50 % der Wirkung eintritt (EC_{50} -Wert), bestimmt werden. Der untersuchte Effekt ist beim terminalen Ileum die Kontraktionskraft und beim Vorhofpräparat die Schlagfrequenz. Der

EC₅₀-Wert vom terminalen Ileum beträgt 22,5 µmol/l und jener vom Papillarmuskel 9,4 µmol/l (Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich der EC₅₀-Werte von terminalen Ileum und Papillarmuskel

	terminales Ileum	Musculus papillaris
EC₅₀ - Konzentration	22,5 µmol/l	9,4 µmol/l

5.4 Diskussion der Ergebnisse des Wirkmechanismus

MAH100.HCl wird nach der allgemeinen Testung noch auf einen in Frage kommenden Wirkmechanismus geprüft. Wie in der Einleitung beschrieben wird vermutet, dass die Testsubstanz Schwefelwasserstoff freisetzt und womöglich K_{ATP}-Kanäle öffnet. Deshalb wird zum eingespannten Dünndarmpräparat ein K_{ATP}-Kanalblocker pipettiert und nach 45 Minuten MAH100.HCl.

In der Versuchsreihe mit 30 µmol/l Glibenclamid und 30 µmol/l MAH100.HCl zeigt sich im Vergleich zum Kontrollwert (durchschnittlich 8,11 mN) bei 30 µmol/l Glibenclamid eine Kontraktionskraft von durchschnittlich 5,296 mN und bei 30 µmol/l MAH100.HCl von durchschnittlich 0,25 mN.

Bei der Versuchsreihe mit 100 µmol/l Glibenclamid und 30 µmol/l MAH100.HCl liegt der durchschnittliche Kontrollwert bei 10,14 mN, 100 µmol/l Glibenclamid-Konzentration bei durchschnittlich 3,82 mN und 30 µmol/l MAH100.HCl-Konzentration bei durchschnittlich 0,16 mN (Tabelle 17).

Tabelle 17: Vergleich der Kontraktionskraft (f_c) samt Standardfehler (SEM) in mN der beiden Versuchsreihen des Wirkmechanismus am terminalen Ileum

	f_c ± SEM (mN)		
	Kontrolle	Glibenclamid	MAH100.HCl
Versuchsreihe 1 (30 µmol/l Glibenclamid)	8,11 ± 0,95	5,29 ± 0,77	0,25 ± 0,14
Versuchsreihe 2 (100 µmol/l Glibenclamid)	10,14 ± 1,89	3,82 ± 0,59	0,16 ± 0,09

Schon durch Zugabe von Glibenclamid kommt es zu einer Kontraktionsabnahme. Dies ist möglicherweise durch das Lösungsmittel (DMSO) zu erklären. Durch Zugabe von MAH100.HCl kommt es zu einer weiteren deutlichen Kontraktionsabnahme.

MAH100.HCl scheint nur eine untergeordnete Rolle an der Öffnung von K_{ATP} -Kanälen zu spielen. Die spasmolytische Wirkung von MAH100.HCl trotz vorheriger Blockierung der K_{ATP} -Kanäle lässt darauf schließen, dass MAH100.HCl kein K_{ATP} -Kanalöffner ist und möglicherweise andere Mechanismen für den spasmolytischen Effekt verantwortlich sind. Es sind weitere Untersuchungen bezüglich des Wirkmechanismus notwendig.

6 Zusammenfassung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wird die Wirkung der Testsubstanz MAH100.HCl auf verschiedene isolierte Organe vom Meerschweinchen untersucht und ein ausgewählter Wirkmechanismus genauer geprüft.

Die isolierten Organe, welche präpariert und getestet werden sind Atrium dextrum, Musculus papillaris, Aorta thoracalis, Truncus pulmonalis und terminales Ileum.

MAH100.HCl wird in verschiedenen Konzentrationen (3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$) an den Organen getestet.

Die Ergebnisse dieser Testung werden statistisch ausgewertet und Konzentrations-Wirkungs-Kurven werden erstellt.

An Truncus pulmonalis und Aorta thoracalis kann eine leicht vasodilatative Wirkung beobachtet werden, am Vorhof ein leicht negativ chronotroper Effekt. Da die Wirkung an diesen Organen zu schwach ausgeprägt ist, kann keine EC_{50} -Konzentration ermittelt werden.

An den Präparaten des terminalen Ileums und des Papillarmuskels ist eine deutliche Wirkung sichtbar. Beim terminalen Ileum erzielt MAH100.HCl eine EC_{50} -Konzentration von 22,5 $\mu\text{mol/l}$ und wirkt somit spasmolytisch. Am Papillarmuskel wird ein negativ inotroper Effekt analysiert – die EC_{50} -Konzentration beträgt in diesem Fall 9,4 $\mu\text{mol/l}$.

Der Wirkmechanismus eines potentiellen K_{ATP} -Kanalöffners wird genauer am terminalen Ileum geprüft. Dazu werden zwei Versuchsreihen mit 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und jeweils 30 $\mu\text{mol/l}$ MAH100.HCl – Organbadkonzentration durchgeführt.

Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigen einen spasmolytischen Effekt trotz Blockade der K_{ATP} -Kanäle. Aus diesem Grund ist MAH100.HCl wahrscheinlich nicht ursächlich an der Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen beteiligt.

7 Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, ISBN 978-3-437-42522-6

Ammon HPT (2004) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, ISBN 3-11-017487-1

Ammon HPT (2010) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 10. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin / New York, ISBN 978-3-11-020631-9

Estler C-J, Schmidt H (2007) Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis, 6. Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart, ISBN-10: 3-7945-2295-8; ISBN-13: 978-3-7945-2295-8.

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

Gharib-Naseri MK, Saberi S, Mard SA, Latifi SM (2012) Bronchodilatory Effect of Hydrogen Sulfide in Rat. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 15: 907-915

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. Biochemical and Biophysical Research Communications 237: 527-531

Karow T, Lang-Roth R (2012) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis, 21. Auflage, Selbstverlag des Verfassers, Pulheim

Kojda G (2002) Pharmakologie/Toxikologie systematisch, 2. Auflage, UNI-MED Verlag AG, Bremen, ISBN 3-89599-148-1

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FBM, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK (2005) Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. FASEB Journal 19: 1196-1198

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013) Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2898-1

Netter FH (2003) Atlas Anatomie des Menschen, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2002) Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, ISBN 3-540-41993-4

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

Stipanuk MH, Beck PW (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J 206: 267-277

Yan H, Du J, Tang C (2003) The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. Biochem Biophys Res Comm 313: 22-27

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. EMBO Journal 20: 6008-6016

8 Curriculum vitae

Andrea Obermayer

geboren am 12. November 1989 in Melk
österreichische Staatsbürgerschaft

Ausbildung

ab 2008 bis November 2014	Diplomstudium Pharmazie in Wien
2000 – 2008	Realgymnasium (besonders musischer Zweig) in St. Pölten

Praktika

September 2014	Praktikum in der Rosen Apotheke (St. Pölten)
Juli 2012	Praktikum bei Sandoz in Kundl (Tirol)
Juli 2008, Juli 2009 und August 2010	Mitarbeiterin im Röntgeninstitut Frühwald (St. Pölten)
Juli 2006	Praktikum bei der NÖ-Landeshypothekenbank (St. Pölten)

Diplomarbeit

29.4.2014 - November 2014	Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie (Wien)
---------------------------	---

vertiefende Wahlfächer im Studium

Universität Wien	TCM - neue Herausforderungen für den Pharmazeuten Einführung in die pflanzliche Zell - und Gewebekultur Alternativmethoden zum Tierversuch Spezielle Methoden der pharmazeutischen Chemie 1-4 Pharmazeutisch technologisches Seminar Informatik für Pharmazeuten
Medizinische Universität Wien	Einführung in die Gentechnologie Gentechnik für Mediziner (Übung) Medizinische Virologie (Seminar) Funktionelle Phlebologie

Auslandsaufenthalt

Juli 2005	Sprachseminar in Brighton (UK)
-----------	--------------------------------

besondere Kenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift
sehr gute PC-Kenntnisse
(MS Office: Word, Excel, Powerpoint)