



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Wirkungsprofil eines neu synthetisierten
Thiazolderivates (MGdth9) an isolierten Organen von
Meerschweinchen“

verfasst von / submitted by

Tobias Delle Donne

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZIEL	1
2	REIZDARMSYNDROM	2
2.1	MEDIKATION:	2
2.2	SPASMOLYTIKA.....	4
2.2.1	<i>Neurotrope Spasmolytika.....</i>	<i>4</i>
2.2.1.1	Atropin.....	4
2.2.1.2	Scopolamin	5
2.2.1.3	Butylscopolaminiumbromid	5
2.2.2	<i>Muskulotrope Spasmolytika.....</i>	<i>6</i>
2.2.3	<i>Neurotrop-muskulotrop wirkende Spasmolytika.....</i>	<i>6</i>
2.2.3.1	Mebeverin	7
2.2.4	Stickstoffmonoxid.....	7
3	MATERIAL& METHODIK	8
3.1	TESTSUBSTANZ.....	8
3.1.1	<i>Nomenklierung und Strukturformel</i>	<i>8</i>
3.1.2	<i>Einwaage.....</i>	<i>9</i>
3.1.3	<i>Pipettierschema.....</i>	<i>9</i>
3.2	NITRO-L-ARGININ.....	10
3.2.1	<i>Einwaage von Nitro-L-Arginin</i>	<i>10</i>
3.2.2	<i>Pipettierschema von Nitro-L-Arginin</i>	<i>11</i>
3.3	STAMMLÖSUNGEN.....	13
3.3.1	<i>Tyrode.....</i>	<i>13</i>
3.3.2	<i>KCl-Tyrode</i>	<i>15</i>
3.4	LÖSUNGSMITTEL.....	15
3.5	VERSUCHSTIERE.....	16
3.6	ORGANENTNAHME & PRÄPARATION	16
3.6.1	<i>Organentnahme</i>	<i>16</i>
3.6.2	<i>Präparation</i>	<i>17</i>
3.6.2.1	Isolierung des Atrium dextrum.....	17
3.6.2.2	Isolierung des Truncus pulmonalis	18
3.6.2.3	Isolierung des Musculus papillaris.....	18
3.6.2.4	Isolierung der Aorta descendens	19
3.6.2.5	Isolierung des terminalen Ileums	21
3.7	VERSUCHSANORDNUNG UND APPARATUREN.....	21
3.7.1	<i>Versuchsapparatur 1</i>	<i>21</i>

3.7.2	<i>Versuchsapparatur 2</i>	23
3.7.3	<i>Kraftwandler</i>	24
3.7.4	<i>Gasversorgung</i>	24
3.8	DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE	25
3.8.1	<i>Versuchsablauf am Musculus papillaris</i>	25
3.8.2	<i>Versuchsablauf an der Aorta descendens</i>	26
3.8.3	<i>Versuchsablauf am Truncus pulmonalis</i>	26
3.8.4	<i>Versuchsablauf am Ileum terminalis</i>	27
3.8.5	<i>Versuchsablauf am Atrium dextrum</i>	27
3.8.6	<i>Versuchsablauf am Ileum terminalis – Wirkmechanismus</i>	28
4	ERGEBNIS	29
4.1	DATENAUSWERTUNG AM ATRIUM DEXTRUM	29
4.2	DATENAUSWERTUNG AM ILEUM TERMINALIS	33
4.3	DATENAUSWERTUNG AM MUSCULUS PAPILLARIS	37
4.4	DATENAUSWERTUNG AN DER AORTA DESCENDENS	41
4.5	DATENAUSWERTUNG AM TRUNCUS PULMONALIS	45
5	TESTUNG DES WIRKMECHANISMUS	49
5.1	ALLGEMEIN	49
5.2	TESTUNG AM ILEUM TERMINALIS	49
6	DISKUSSION	56
6.1	ALLGEMEIN	56
6.2	ERGEBNISSE AN DER QUERGESTREIFTEN HERZMUSKULATUR	56
6.3	ERGEBNISSE AN DER GLATTEN MUSKULATUR	58
7	ZUSAMMENFASSUNG	59
8	LITERATURVERZEICHNIS	60
9	CURRICULUM VITAE	62

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: STRUKTURFORMEL MGDTH9	8
ABBILDUNG 2: : EPPENDORF-PIPETTEN.....	11
ABBILDUNG 3: : GERÄTSCHAFTEN FÜR DIE ORGANENTNAHME	17
ABBILDUNG 4 : QUERSCHNITT DES HERZENS	19
ABBILDUNG 5: : VERLAUF DER AORTA	20
ABBILDUNG 6: : VERSUCHSAPPARATUR 1.....	22
ABBILDUNG 7: : VERSUCHSAPPARATUR 2.....	23
ABBILDUNG 8: KRAFTWANDLER	24
ABBILDUNG 9 : ORIGINALABBILDUNG DER FREQUENZ DES VORHOFS	30
ABBILDUNG 10 : KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE DES VORHOFS.....	32
ABBILDUNG 11 : ORIGINALABBILDUNG DER KONTRAKTIONSKURVE DES DARMS	34
ABBILDUNG 12 : KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE DES DARMS	36
ABBILDUNG 13 : ORIGINALABBILDUNG DER AMPLITUDEN DES PAPILLARMUSKELS	38
ABBILDUNG 14 : KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE DES PAPILLARMUSKELS.....	40
ABBILDUNG 15 : ORIGINALABBILDUNG DER KONTRAKTIONSKURVE DER AORTA DESC	42
ABBILDUNG 16 : KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE DER AORTA	44
ABBILDUNG 17 : ORIGINALABBILDUNG DER KONTRAKTIONSKURVE DES TRUNCUS PULM.	46
ABBILDUNG 18 : KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVE DES TRUNCUS PULMONALIS	48
ABBILDUNG 19 : ORIGINALAB. WIRKMECHANISMUS AM DARM MIT 30 µM NITRO-L-ARGININ .	50
ABBILDUNG 20: BALKENDIAGRAMM WIRKMECHANISMUS DARM MIT 30 µM NITRO-L-ARG. ...	51
ABBILDUNG 21 : ORIGINALAB. WIRKMECHANISMUS AM DARM MIT 100µM NITRO-L-ARGININ	53
ABBILDUNG 22 : BALKENDIAGRAMM WIRKMECHANISMUS DARM MIT 100µM NITRO-L-ARG. .	54

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 : EINWAAGE VON MGDTH9	9
TABELLE 2: PIPETTIERSHEMA MGDTH9	10
TABELLE 3: EINWAAGE VON NITRO-L-ARGININ.....	11
TABELLE 4: PIPETTIERSHEMA VON NITRO-L-ARGININ, KONZENTRATION VON 30 μ M	12
TABELLE 5: PIPETTIERSHEMA VON NITRO-L-ARGININ, KONZENTRATION VON 100 μ M	12
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG DER TYRODELÖSUNG.....	13
TABELLE 7: TYRODEBESTANDTEILE FÜR 2 LITER	14
TABELLE 8: DATENAUSWERTUNG DES ATRIUM DEXTRUM.....	31
TABELLE 9: DATENAUSWERTUNG DES ILEUM TERMINALIS	35
TABELLE 10: DATENAUSWERTUNG DES MUSCULUS PAPILLARIS	39
TABELLE 11: DATENAUSWERTUNG DER AORTA DESCENDENS	43
TABELLE 12: DATENAUSWERTUNG AM TRUNCUS PULMONALIS	47
TABELLE 13: WIRKMECHANISMUS VON MGDTH9, KONZENTRATION 30 μ M NITRO-L-ARGININ	52
TABELLE 14: WIRKMECHANIS. VON MGDTH9, KONZENTRATION 100 μ M NITRO-L-ARGININ	55
TABELLE 15: WIRKUNG VON MGDTH9 AUF DIE QUERGESTREIFTE HERZMUSKULATUR.....	57
TABELLE 16: WIRKUNG VON MGDTH9 BEZOGEN AUF VASODILATATION UND SPASMOLYSE...	58

1 Ziel

Ziel dieser Diplomarbeit war es eine neu synthetisierte Substanz auf ihre pharmakologische Wirkung hin zu untersuchen. Die Substanz wurde am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien vom Dissertant Mario Gabriel aus der Arbeitsgruppe von Ao.Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert und mir dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Der praktische Teil meiner Diplomarbeit vollzog sich unter der Leitung von Ao.Univ.-Prof. Dr. Christian R. Studenik im Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien.

Um einen ersten Einblick in die pharmakologische Wirkung dieser neuen Substanz zu gewährleisten wurden Tests an isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Genauer habe ich die Wirkung dieser Substanz auf zwei verschiedene Muskeltypen untersucht: den Herzmuskel und die glatte Muskulatur. Am Herzmuskel wurde die Substanz hinsichtlich ihrer Chronotropie beziehungsweise ihrer Inotropie am rechten Vorhof beziehungsweise am Papillarmuskel geprüft. Die Tests an der glatten Muskulatur wurden an der Aorta und an der Lungenarterie vorgenommen. Hier wurde auf die vasodilatierende Wirkung der Substanz geachtet. Letzen Endes wurden noch Versuche an der glatten Darmmuskulatur durchgeführt, welche einen Aufschluss über die spasmolytische Wirkung der Substanz geben konnten.

Für eine Weiterentwicklung der Substanz/Substanzgruppe ist es ausschlaggebend, dass sie spezifisch an einem Organ beziehungsweise Gewebe eine Wirkung zeigt, da jegliche sekundäre Wirkung eine potentielle Nebenwirkung darstellt. Diese Nebenwirkung zu minimieren oder besser zu eliminieren und hingegen die Hauptwirkung zu potenzieren sind Aufgaben weiterer Syntheseschritte.

2 Reizdarmsyndrom

Reizdarmsyndrom ist eine funktionelle Darmerkrankung, die sich durch Schmerzen und Beschwerden im Bauchraum und einer Änderung der Stuhlgewohnheiten gekennzeichnet ist (Longstreth et al. 2006). Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt zwischen 5% und 20% (Agreus et al. 2000), wobei Frauen zirka zwei mal häufiger betroffen sind als Männer (Mutschler 2012). Bisher konnte keine strukturelle oder anatomische Begründung für die Pathophysiologie von Colon irritabile gefunden werden, obwohl zahlreiche Mechanismen vorgeschlagen wurden. Veränderungen der Darmmotilität könnten für den Wechsel der Stuhlgewohnheiten verantwortlich sein, worüber viele Patienten klagen (McKee et al. 1993). Die Kombination aus leichten Muskelkrämpfen, Überempfindlichkeit der Bauchregion und eine ungewöhnliche Entwicklung zentraler Schmerzen erklären nur partiell die Bauchschmerzen, die einen essentiellen Teil des Symptomkomplexes bilden (Aziz et al. 2000).

Reizkolon beschreibt einen chronischen schubförmig wiederkehrenden Zustand (Agreus et al. 2001). Aktuelle Richtlinien geben vor, ein Reizdarmsyndrom allein aufgrund von klinischen Befunden zu diagnostizieren und invasive Untersuchungen hingegen zu vermeiden oder nur dann vorzunehmen, wenn akute Symptome wie rektale Blutungen oder Gewichtsverlust auftreten (Wilson et al. 2004).

2.1 Medikation:

Da beim Reizdarmsyndrom auch die Psyche eine wichtige Rolle spielt, sei vorweggenommen, dass „durch Placebogabe bei 40-70% der Patienten positive Effekte erzielt werden“ (Aktories 2009).

In erster Linie wird RDS-Patienten eine ballaststoffreiche Diät aufgrund einer möglichen positiven Auswirkung auf die intestinale Durchgangszeit angeordnet (Harvey et al.

1973). Falls die Veränderung der Nahrungsgewohnheiten keine ausreichende Wirkung zeigt, werden verschiedene Arten von milden Muskelrelaxantien und Spasmolytika verordnet, um zu versuchen Symptome wie Schmerzen und Blähungen zu lindern (Spiller et al. 2007). Neuerdings wird auch Pfefferminzöl, welches eine krampflösende Wirkung zeigt, als OTC-Produkt zur Behandlung von irritable bowel syndrome eingesetzt (Hills et al. 1991). Ob diese Mittel für die Therapie von Colon irritabile nützlich sind wird kontrovers diskutiert. Der positive Effekt von Ballaststoffreicher Nahrung scheint laut Studien nur bei der Einnahme von Flohsamen (Ispaghula) ausreichend gegeben zu sein. Die Einnahme von Pfefferminzöl hat einen positiven Einfluss auf die Symptomatik von RDS, wobei noch zu wenig Datenmaterial vorliegt. Somit bleibt die Einnahme von Spasmolytika, vor allem beim Obstipationstyp des Colon irritabile Mittel der Wahl.

Neueste Medikationsversuche scheiterten bisher an den unerwünschten Arzneimittelwirkungen: „Von der Vorstellung ausgehend, dass Serotonin bei der viszeralen Nozizeption und der Regulierung der Magen-Darm-Funktion eine wichtige Rolle spielt, wurde zunächst der partielle 5-HT₄-Rezeptoragonist Tegaserod zur Behandlung des Reizdarmsyndroms mit Obstipation entwickelt. Die Substanz musste allerdings kurz nach der Zulassung wegen kardiovaskulärer Komplikationen wieder vom Markt genommen werden.“ (Mutschler 2012) oder sind für die Behandlung von IBS noch nicht zugelassen: „Mit Prucaloprid wurde nunmehr ein neuer, hoch selektiver 5-HT₄-Rezeptoragonist für die symptomatische Behandlung chronischer Verstopfung bei Frauen auf den Markt gebracht, wenn mit klassischen Laxantien keine ausreichende Wirkung erzielt wird. Für die Indikation Reizdarmsyndrom wurde die Substanz bis jetzt allerdings noch nicht zugelassen“ (Mutschler 2012).

2.2 Spasmolytika

Spasmolytika sind „Pharmaka, die den Tonus der glatten Muskulatur (Gastrointestinaltrakt, Gefäße, Bronchien u. a.) durch Rezeptor-Blockade (z.B.: Parasympatholytika) bzw. über andere Mechanismen (myotrope Spasmolytika, z.B.: Papaverin, Nitroglycerol) herabsetzen (Ammon 2010).

Spasmolytisch wirkende Arzneimittel werden eingeteilt in neurotrope, muskulotrope und neurotrop-muskulotrope Spasmolytika (Ammon 2010).

2.2.1 Neurotrope Spasmolytika

m-Cholinrezeptor-Antagonisten blockieren durch kompetitiven Antagonismus die Acetylcholin-vermittelte Erregungsübertragung an m-Cholinrezeptoren. Wegen ihrer durch den Angriff am parasympathischen Nervensystem ausgelösten Erschlaffung der glatten Muskulatur werden sie auch neurotrope Spasmolytika genannt (Mutschler 2012). Beispiele für neurotrope Spasmolytika sind: Atropin, Scopolamin und Butylscopolamin.

2.2.1.1 Atropin

Atropin hemmt die Kontraktion der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Kanals, der Gallenwege, der Ureteren und der Harnblase sowie die Magensäuresekretion (Aktories 2009).

2.2.1.2 Scopolamin

Scopolamin blockiert Muscarinrezeptoren in den Vestibulariskernen und im Brechzentrum und ist besonders wirksam zur Prophylaxe von Übelkeit und Erbrechen bei Kinetosen (Akories 2009).

2.2.1.3 Butylscopolaminiumbromid

Butylscopolaminiumbromid ist eine quaternäre Ammoniumverbindung, die bei oraler oder rektaler Anwendung nur zu etwa 5% resorbiert wird. (Akories 2009). Butylscopolamin ist bei Spasmen der glatten Muskulatur, vor allem des Gastrointestinaltrakts und der weiblichen Geschlechtsorgane, sowie zur Erleichterung endoskopischer Untersuchungen des Magen-Darm-Kanals indiziert (Mutschler 2012).

2.2.2 Muskulotrope Spasmolytika

Muskulotrope Spasmolytika unterdrücken phasische oder tonische Kontraktionen glattemuskulärer Organe. Ihr Wirkungsmechanismus ist nicht in allen Fällen geklärt. Definitionsgemäß haben diese Pharmaka weder eine stimulierende noch eine hemmende Wirkung auf die Rezeptoren der Transmitter des vegetativen Nervensystems (Estler 2007).

Die verschiedenen Gruppen muskulotrop wirkender Substanzen haben ihren bevorzugten Angriffspunkt:

- a) An der Gefäßmuskulatur
- b) der intestinalen glatten Muskulatur (Estler 2007)

2.2.3 Neurotrop-muskulotrop wirkende Spasmolytika

Stoffe die zusätzlich eine neurotrope (anticholinerge) spasmolytische Komponente aufweisen, werden als neurotrop-muskulotrope Spasmolytika bezeichnet... Zu den neurotrop-muskulotropen Spasmolytika gehören Mebeverin (Hauptindikation: Irritables Kolon), Oxybutynin und Propiverin (Mutschler 2012).

2.2.3.1 Mebeverin

Mebeverin ist ein direkt am glatten Muskel angreifendes „myotropes“ Spasmolytikum, das in klinischen Studien zwar zu einer geringen Schmerzlinderung führte, dagegen die Motilitätsstörungen (Diarröh, Obstipation) nicht besserte (Aktories 2009).

2.2.4 Stickstoffmonoxid

NO ist ein zentraler Mediator im kardiovaskulären, zentralen und peripheren Nervensystem sowie bei immunologischen Prozessen (Mutschler 2012).

NO bewirkt eine Inhibition der Darmmotilität (Christian F.Mang, 2002).

Die reaktive Stickstoffverbindung Stickstoffmonoxid wird enzymatisch in einer Reihe von Geweben in streng kontrollierter Weise synthetisiert. Ausgangssubstanz ist die Aminosäure L-Arginin, aus der das freie Radikal durch das Enzym NO-Synthase (NOS) gebildet wird. Bisher sind drei Isoenzyme bekannt, die unterschiedliche Genprodukte repräsentieren. Zwei der Enzyme werden konstitutiv exprimiert: eNOS vor allem im Gefäßendothel, nNOS vor allem im ZNS (Aktories 2009).

Die eNOS ist im Gefäßendothel lokalisiert und kann unter anderem über Muskarinrezeptoren aktiviert werden. Bei NO handelt es sich um einen relaxierenden Faktor, der auch als EDRF (Endothelium- derived relaxing factor) bezeichnet wird (Dellas 2011).

3 Material& Methodik

3.1 Testsubstanz

Synthetisiert wurde die Testsubstanz im Department für medizinische und pharmazeutische Chemie unter der Leitung von Ao.Univ. Prof. Dr. Thomas Erker. Anschließend wurde sie ersten pharmakologischen Versuchen unterzogen.

3.1.1 Nomenklierung und Strukturformel

Die Testsubstanz nennt sich laut IUPAC: 2-(2-furyl)-5-(3-methylsulfanylphenyl)-thiazol und besitzt ein Molekulargewicht von: 273,37 g/mol

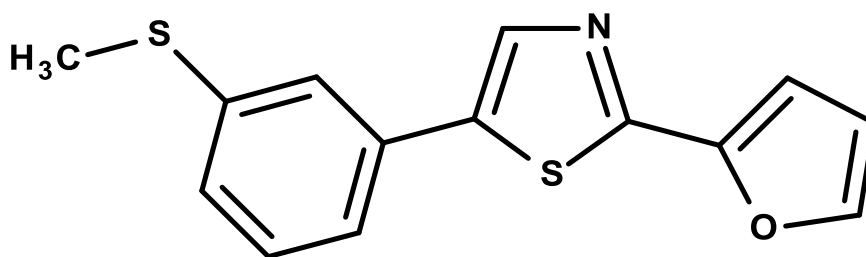


Abbildung 1: Strukturformel MGdth9

3.1.2 Einwaage

Für die Versuche standen zwei verschieden große Organbäder (25ml und 8 ml Fassungsvermögen) zu Verfügung. Je nach dem welches verwendet wurde, musste die Einwaage entsprechend gewählt werden.

Einwaage großes Organbad (25ml)	Einwaage kleines Organbad (8ml)
$(MG/100)/4$	$(MG/100)/12,5$
$(273,37 \text{ g/mol}/100)/4 = 0,683\text{mg}$	$(273,37 \text{ g/mol}/100)/12,5 = 0,219\text{mg}$

Tabelle 1 : Einwaage von MGdth9

Die eingewogene Substanz wurde anschließend in 100 µl DMSO vollständig gelöst. Mit dieser Stammlösung wurde dann im weiteren Versuchsablauf gearbeitet.

3.1.3 Pipettierschema

Um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten wurde ein genaues Pipettierschema gewählt, welches aus Angaben aus der Literatur entnommen wurde. Dabei musste darauf geachtet werden, immer in denselben Zeitintervallen eine genau definierte Menge der Stammlösung kumulativ dazuzuspritzen.

Zeitpunkt in Minuten	Volumen in μl	Konzentration im Organbad in μM
0	3	3
45	7	10
90	20	30
135	70	100
180	Versuchsende	Versuchsende

Tabelle 2: Pipettierschema MGdth9

3.2 Nitro-L-Arginin

Nitro-L-Arginin ist ein Derivat der basischen Aminosäure Arginin, die den höchsten Masseanteil an Stickstoff aller proteinogenen Aminosäuren besitzt. Nitro-L-Arginin ist ein Inhibitor der endothelialen NO-Synthase und wirkt dadurch vasokonstriktorisch. Nitro-L-Arginin wurde bei den Versuchen den Wirkmechanismus der Testsubstanz am Dünndarm aufzufindig zu machen verwendet. Dafür wurde Nitro-L-Arginin in zwei verschiedenen Konzentrationen in das Organbad gegeben. Die eNOS der Darmzellen wurde dadurch geblockt. Wenn bei folgender Zugabe die Testsubstanz doch noch eine spasmolytische Wirkung aufweisen konnte, so beruhte diese nicht auf der Stickstoffmonoxidfreigabe.

Das Molekulargewicht von Nitro-L-Arginin beträgt: 210,66 mg/mol.

3.2.1 Einwaage von Nitro-L-Arginin

Die Einwaage von Nitro-L-Arginin verlief identisch wie diejenige der Testsubstanz, wobei für die Wirkmechanismus-Versuche nur das 25 ml fassende Organbad zur Verfügung stand.

Einwaage großes Organbad (25ml)
$(MG/100)/4$
$(210,66g/mol/100)/4 = 0,53mg$

Tabelle 3: Einwaage von Nitro-L-Arginin

Zum Herstellen der Stammlösung wurde die eingewogene Menge an Nitro-L-Arginin anschließend mit 100µl 60 millimolarer KCL-Tyrode-Lösung gelöst

3.2.2 Pipettierschema von Nitro-L-Arginin

Auch hier wurden genau definierte Zeitabstände und Zugabemengen eingehalten, um eine statistische Signifikanz der Versuche zu gewährleisten. Zur Verwendung kamen sogenannte Eppendorf-Pipetten mit verschiedenen Volumina.



Abbildung 2: : Eppendorf-Pipetten

	Zeitpunkt Minuten	Volumen in μl	Konzentration im Organbad in μM
Nitro-L-Arginin Stammlösung	0	30	30
MGdth9 Stammlösung	45	100	100
	90	Versuchsende	Versuchsende

Tabelle 4: Pipettierschema von Nitro-L-Arginin mit einer Konzentration von 30 μM

	Zeitpunkt Minuten	Volumen in μl	Konzentration im Organbad in μM
Nitro-L-Arginin Stammlösung	0	100	100
MGdth9 Stammlösung	45	100	100
	90	Versuchsende	Versuchsende

Tabelle 5: Pipettierschema von Nitro-L-Arginin mit einer Konzentration von 100 μM

3.3 Stammlösungen

Für den Versuchsablauf waren mehrere jeden Tag frisch zubereitete Stammlösungen vonnöten.

3.3.1 Tyrode

Bei der verwendeten Tyrode (nach dem Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode) handelt es sich um eine modifizierte Krebs-Henseleit Tyrode. Sie ist eine physiologische Nährlösung und diente zum Einen für die Aufbewahrung der Organe, zum Anderen wurden auch die auf 37° Celsius temperierter Organbäder damit befüllt. Somit konnten die Versuchsorgane während den Arbeitsschritten mit den nötigen Elektrolyten versorgt werden.

Substanz	Molare Masse	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	Mmol/l
NaCl	58,44g/mol	1000,25g/5l	33,60	114,90
KCl	74,55g/mol	50,33g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01g/mol	125,00/5l	83,70	24,90
CaCl ₂	110,98g/mol	147,02g/5l	3,20	3,20
MgSO ₄	120,37g/mol	62,00g/250ml	1,18	1,18
KH ₂ PO ₄	136,09g/mol	34,00g/250ml	1,18	1,18
Glucose	180,16g/mol	Reinsubstanz	1,98	10

Tabelle 6: Zusammensetzung der Tyrodelösung

Zur Herstellung: Die Tyrode wurde jeden Tag aufs Neue frisch zubereitet. Als Aufbewahrungsgefäß wurde ein 2 Liter Messkolben verwendet. Das Kaliumchlorid wurde eingewogen und in den Kolben geleert. Weiters wurde die errechnete Menge der Stammlösungen von Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat und Kaliumhydrogencarbonat ins Gefäß pipettiert. Anschließend wurde der Kolben bis ungefähr drei Viertel mit destilliertem Wasser gefüllt und die davor genau abgewogene Glukose darin gelöst. Die Kalziumchlorid Stammlösung wurde nun langsam dazupipettiert, damit das schwerlösliche Salz zu keiner Trübung führen konnte. Dies würde die Charge nämlich unbrauchbar machen. Am Ende wurde der Messkolben noch bis zum Meniskus mit destilliertem Wasser aufgefüllt und schließlich noch 20 Minuten mit Oxymix begast.

Substanz	Menge
NaCl	67,2 ml
KCl	70 ml
NaHCO ₃	167,4 ml
CaCl ₂	6,4 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ SO ₄	2,36 ml
Glucose	3,96 g

Tabelle 7: Tyrodebestandteile für 2 Liter

3.3.2 KCl-Tyrode

Die modifizierte Krebs-Henselite Tyrode wurde nach einer bestimmten Gewöhnungszeit durch eine 60 millimolare Kaliumchlorid Tyrodenlösung bei den Darmpräparaten und durch eine 90 millimolare Kaliumchlorid Tyrodenlösung bei den Aorta- und Pulmonalarteriepräparaten ersetzt. Das überschüssige Kalium hemmt die Repolarisation der Zelle und führt somit zu einer maximalen und irreversiblen Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Molarität der Kaliumchlorid-Tyrode ging aus Erfahrungswerten hervor.

Zur Herstellung: Bei der Herstellung der Kaliumchlorid Tyrodenlösung werden 0,45 g Kaliumchlorid für die Darm-Lösung und 0,67 g Kaliumchlorid bei der Aorta- und der Lungenarterien-Lösung eingewogen und in 100 ml modifizierten Krebs-Henselite Tyrode gelöst.

3.4 Lösungsmittel

Da die getestete Substanz MGdth9 nicht wasserlöslich war musste sie vor der Zugabe in DMSO gelöst werden. DMSO steht für Dimethylsulfoxid und ist ein weit verbreitetes farb- und geruchloses, lipophiles Lösungsmittel. In der Pharmazie wird DMSO wegen der Besonderheit, leicht in die Haut und in den Zellmembranen einzudringen, oft als Penetrationsförderer bei topischen Arzneimitteln wie Salben und Gele verwendet. Konzentriert wirkt es jedoch zytotoxisch. Bei der Versuchsauswertung musste die Eigenwirkung des DMSO mitberücksichtigt werden. Auf Aorta und Lungenarterie zeigte Dimethylsulfoxid eine dilatatorische Wirkung, auf den Papillarmuskel zeigte DMSO eine negativ inotrope Wirkung und auf den Darm eine spasmolytische Wirkung die am Ende des Versuchs entgegengerechnet werden musste.

Für die Testsubstanz war folglich eine Stammlösung nötig, die täglich frisch zubereitet werden musste. Je nachdem welches Organbad verwendet wurde, waren verschiedene Einwaagen nötig.

3.5 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um Meerschweinchen des TRIK-Stammes. Bei den Versuchen werden sowohl weibliche als auch männliche Exemplare verwendet. Diese sind 400 bis 600 g schwer und acht bis zwölf Wochen alt. Der Exitus der Tiere erfolgt durch einen stumpfen Schlag am Hinterkopf. Dabei handelt es sich um eine Standardmethode für die Tötung von Labortieren dieser Art, da sie rasch und schmerzlos erfolgt.

3.6 Organentnahme & Präparation

3.6.1 Organentnahme

Nach der Tötung der Versuchstiere folgt die Organentnahme. Dabei wird die Bauchdecke mit einer Schere geöffnet. Als Erstes wird das Herz entnommen. Anschließend wird das Ende des terminalen Ileums mit einem Faden abgebunden und 40 cm des Darmes werden herausgeschnitten.

Als Nächstes erfolgt die Entnahme der Aorta. Diese befindet sich in Brusthöhe entlang der Wirbelsäule. Um die Hauptschlagader zu extrahieren wird sie am oberen Ende quer abgetrennt und dann vorsichtig mit kleinen Schnitten links und rechts entlang des Gefäßes exzidiert. Dabei ist besonders zu achten, das Organ nicht zu dehnen. Die Aorta ist ungefähr vier cm lang.

Nach der Entnahme der Organe sollten sie so schnell wie möglich in ein Becherglas mit Tyrode gelegt werden und mit Oxymix begast werden. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen außerhalb des Tierkörpers und verhindert in weiterer Folge ein Absterben der Organe.



Abbildung 3: : Gerätschaften für die Organentnahme

3.6.2 Präparation

Während der Präparation der einzelnen Organe arbeitet man mithilfe einer Stereolupe, um die einzelnen Arbeitsschritte so präzise als möglich zu gestalten. Die Organe liegen dabei in Petrischalen aus Glas, welche mit einem Korken ausgekleidet sind und bis zum Rand mit Tyrodelösung gefüllt sind. Das Präparierbesteck besteht grundsätzlich aus Pinzetten, Scheren und Federgriffschere. Für das Einhängen der Herz- und Darmpräparate in die Apparatur mussten am Organ Silberhäkchen mittels eines Fadens angebracht werden.

3.6.2.1 Isolierung des Atrium dextrum

Im rechten Vorhof befindet sich der Sinusknoten, der mittels elektrische Impulse für die rhythmischen Schläge des Herzens verantwortlich ist. Der Sinusknoten selbst ist nicht erkennbar, da seine Zellen undifferenziert sind. Um Untersuchungen bezüglich der chronotropischen Wirkung der Testsubstanz durchzuführen wurde also der gesamte rechte Vorhof isoliert. Dafür musste das Herz mittels Präpariernadeln in der Petrischale befestigt werden. Folglich wurde es gesäubert und von Fett- und Bindegewebe befreit. Nach dem Trennen des Atrium dexter von der Herzkammer entlang des Sulcus Coronarius, wurde dieser wiederum mit Präpariernadeln befestigt. Ein Häkchen aus Silberdraht wurde dann am oberen Ende des Atriums im Fettgewebe befestigt und ein zweites im unteren Teil des Vorhofs. Zur Befestigung der Häkchen wurde ein dünner Faden verwendet. Nach dem Präparieren des

Vorhofs musste er mittels den dafür angebrachten Silberhäkchens so schnell als möglich in die Apparatur eingehängt werden, da das Atrium sehr sensibel auf veränderte Bedingungen reagiert.

3.6.2.2 Isolierung des Truncus pulmonalis

Darauf folgte die Isolierung der Pulmonalarterie, genauer gesagt des Truncus pulmonalis, der aus der rechten Herzkammer entspringt. Nach der Säuberung wurde die Lungenarterie in zirka vier mm breite Ringe geschnitten und mittels einem Silberdraht, der fix in der Apparatur installiert ist eingehängt.

3.6.2.3 Isolierung des Musculus papillaris

Das Herz besitzt fünf Papillarmuskel, wobei die rechte Herzkammer drei und die linke Herzkammer zwei davon enthält. Der Papillarmuskel ist für das Öffnen und Schließen der Herzklappen zuständig. Dafür benötigt er keine spontane Schlagkraft, sondern wird innerviert. Um den Papillarmuskel freizulegen wurde die rechte Herzkammer entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet. Das für das Einspannen benötigte Silberhäkchen wird am Ansatz der Sehne des Papillarmuskels befestigt.

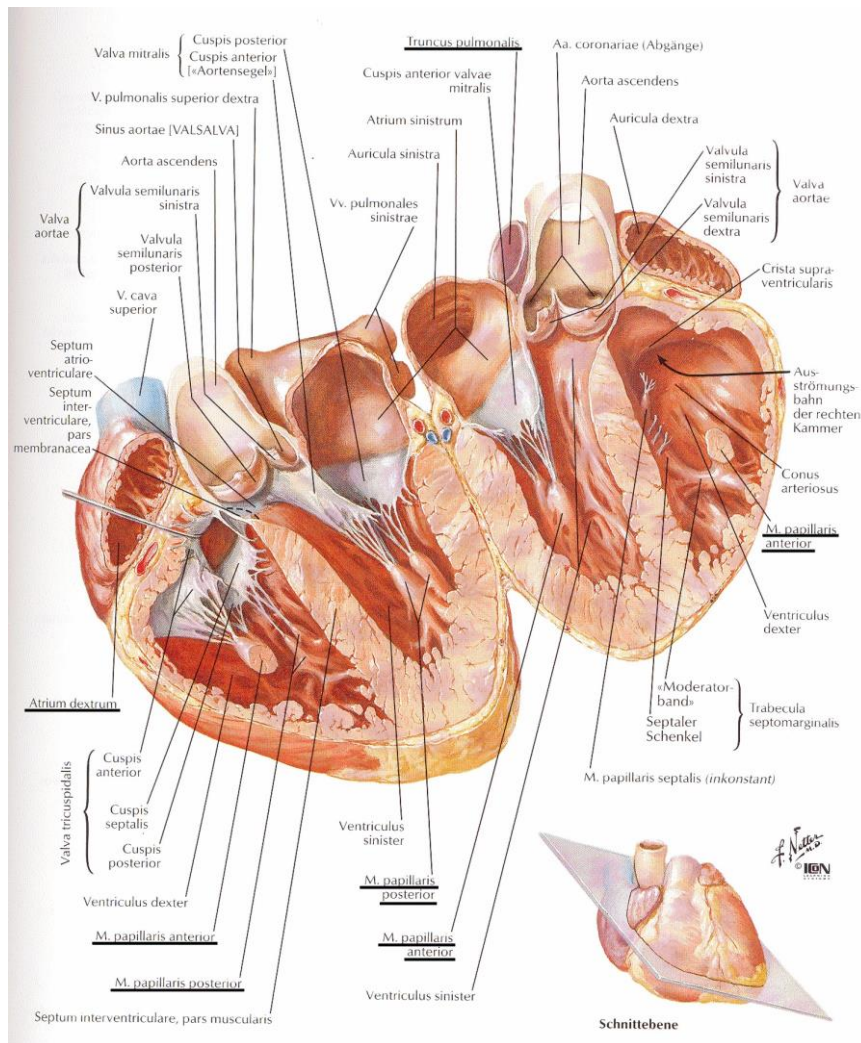


Abbildung 4 : Querschnitt des Herzens

3.6.2.4 Isolierung der Aorta descendens

Die sich im thorakalen Bereich befindende Hauptschlagader versorgt den Körper mit sauerstoffreichem Blut. wird nach der Entnahme in eine Petrischale gelegt und dort mit zwei Präpariernadeln befestigt. Nun erfolgt die Säuberung. Dafür zieht man mit einer Pinzette das Fettgewebe leicht an und entfernt dieses mit Hilfe einer Federgriffschere. Je näher man der Adventita kommt, umso wichtiger ist es präzise zu arbeiten. Ein Schnitt in die Hauptschlagader würde nämlich diesen Bereich unbrauchbar für die weiteren Versuche machen. Weiters ist bei diesen Organ besonders darauf zu Achten, dass während der Isolation kein Überdehnen stattfindet. Die eigentliche Hauptschlagader erkennt man unter der Stereolupe durch die glatte Struktur und die hellrosa Färbung. Die Aorta wird dann wie die Lungenarterie in zirka vier mm breite Ringe geschnitten und in die Apparatur eingehängt.

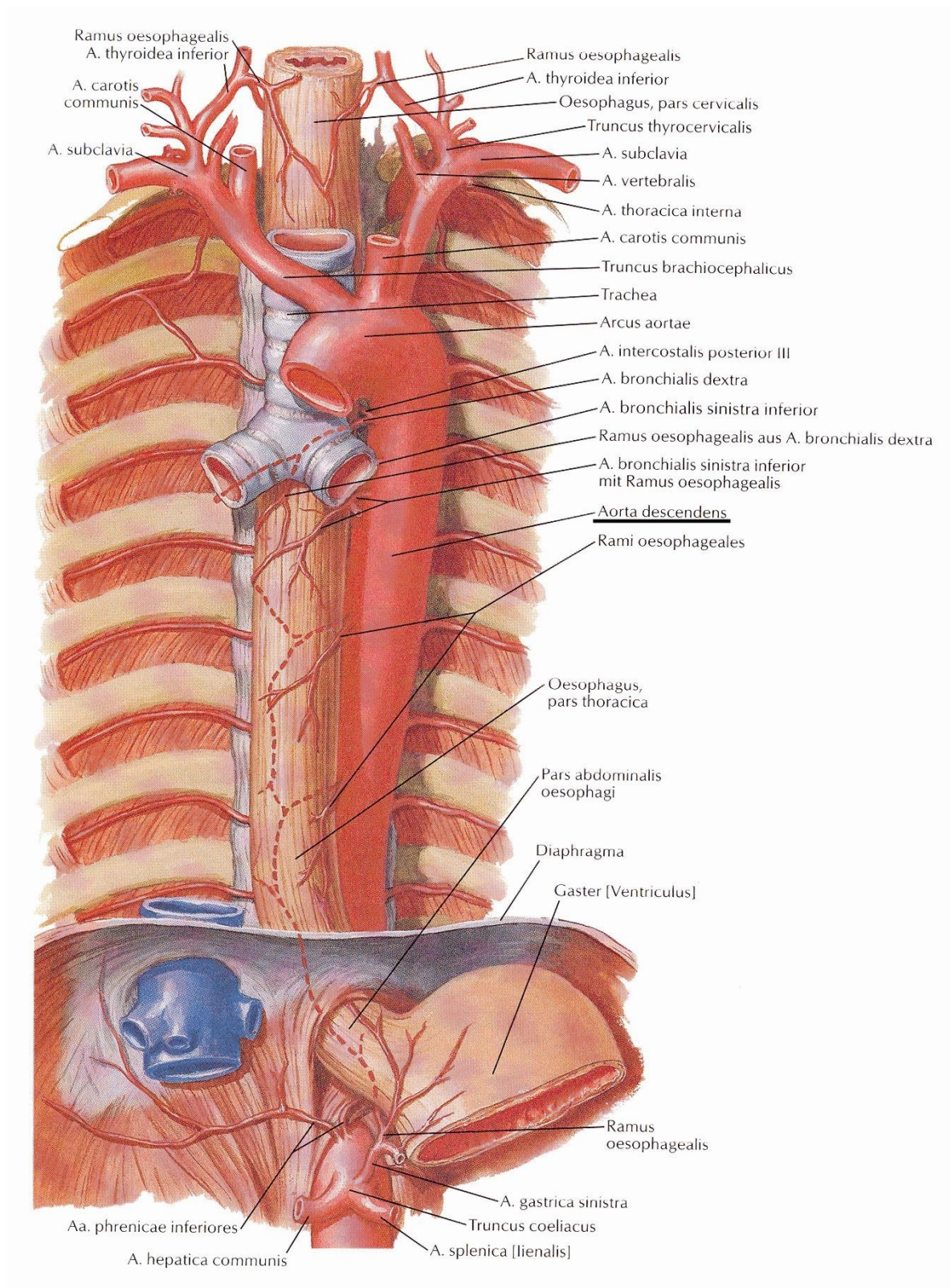


Abbildung 5: : Verlauf der Aorta

3.6.2.5 Isolierung des terminalen Ileums

Um die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz zu prüfen wurde der terminale Teil des Krummdarms verwendet. Dieser bildet mit dem Jejunum (Leerdarm) und dem Zwölffingerdarm (Duodenum) den Dünndarm (Tenue) Bei der Isolierung des Darms werden 0,5 cm über den Finger gelegt und so schräg abgeschnitten, dass unter der Stereolupe ein trapezförmiges Stück erkennbar ist. Das Darmstück wird dann mit zwei Präpariernadeln in der Petrischale befestigt. Anschließend wird der Darm mit einer Saugpipette gereinigt und eventuelles Fettgewebe entfernt. Die Silberhäkchen sind so zu befestigen, dass der Faden das Darmlumen nicht verschließt, denn eine Zirkulation der Testsubstanz muss gewährleistet werden.

3.7 Versuchsanordnung und Apparaturen

Bei biologischen Versuchen gibt es eine Vielzahl von Details die sich ändern. Um in einer wissenschaftlichen Arbeit reproduzierbare Daten zu bekommen, muss man versuchen alle sonstigen Abweichungen so gering als möglich zu halten. So ist es extrem wichtig, die für die Organe überlebenswichtigen Umstände aufrecht zu halten. Dabei handelt es sich um konstanter Temperatur, kontinuierliche Gasversorgung mit O₂ und CO₂, ständiger Nährstoffzufuhr und gleichbleibender physiologischer pH-Wert. Dafür wurden folgende Apparaturen entwickelt.

3.7.1 Versuchsassparatur 1

Die Versuchsassparatur 1 diente der Messung der Inotropie der neu synthetisierten Substanz am Musculus Papillaris. Um eine Konstante Temperatur zu erreichen besaß die Apparatur ein Wasserbad (1), worin destilliertes Wasser mittels einer Heizspirale auf 35°C ±1 erwärmt wurde. Die Organhalterung (2) wurde darin eingetaucht und vor dem Versuchsbeginn mit 25 ml modifizierter Krebs-Henselite Tyrode gefüllt. Nun wurde zehn Minuten gewartet, damit die Nährlösung die Solltemperatur erreichen konnte. Am unteren Ende der Organhalterung befand sich eine Gaszufuhr mit Fritte (8), die während des gesamten Versuchs das Testorgan mit O₂ und CO₂ versorgte. Der obere Teil des Papillarmuskels, der mit einem Silberhäkchens versehen war, wurde an einem Silberdraht, der direkt mit dem Kraftwandler (4) verbunden war, eingehängt. Der untere, freiliegende, Teil des Muskels wurde zu zwei Drittel mit einer

Pinzette zwischen eine Platin-Kathode (5) und eine Plexiglasplatte geklemmt. Die Platten wurden mit einem Schrauben fixiert. Da der Papillarmuskel keine Eigenregung besitzt wurde er extern mit einem Accupulser A310-Stimulus Isolator (World Precision Instruments, USA) stimuliert. Letztendlich wurde die Organfixierung in die Organhalterung getaucht und die genormte Vorspannung mit dem Feintrieb (6) eingestellt.

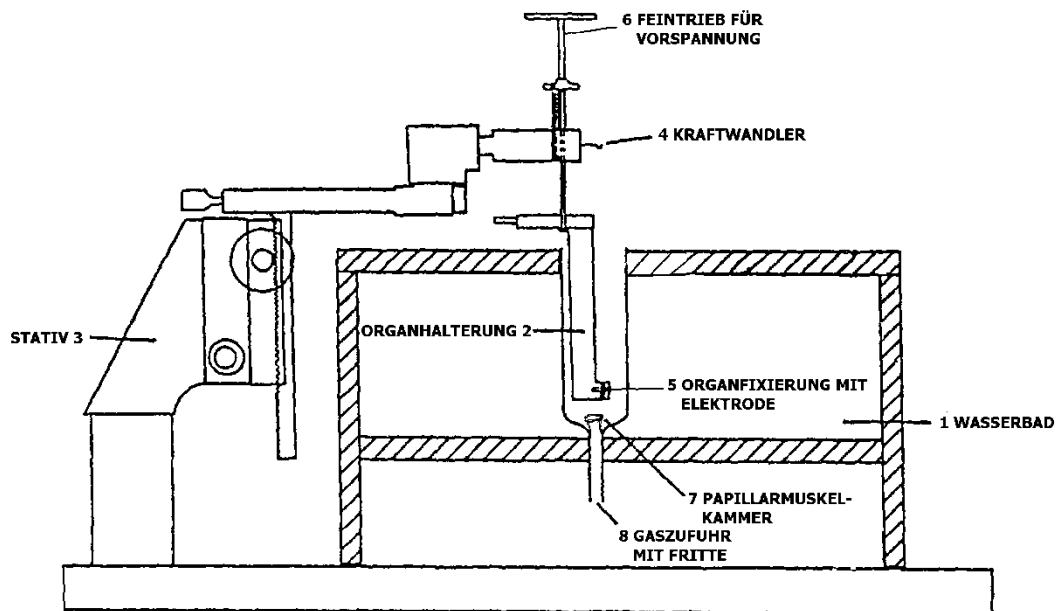


Abbildung 6: : Versuchsanordnung 1

3.7.2 Versuchsapparatur 2

An dieser Apparatur wurden die Untersuchungen an den Organen: Aorta descendens, Arteria Pulmoanlis, Atrium dexter und Terminales Ileum durchgeführt. Die Organbäder besaßen hier eine Doppelwand, die eine Zirkulation des genau auf $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ temperierten destillierten Wassers ermöglichte. Dies wurde mittels einem Wasserzulauf und einem Wasserablauf gewährleistet. Die Organbäder hatten zwei verschiedene Fassungsvermögen von 25 ml bzw. acht ml, wobei Letzteres wegen der geringeren Größe nur für die Versuche an der Aorta und an der Pulmonalarterie verwendet werden konnte. An den Organbädern befand sich am unteren Ende ein Flüssigkeitsablauf für die Nährlösung und in der Mitte eine Gaszufuhr für die konstante Zufuhr an Oxymix. Das Organ wurde mit den Silberhäkchen an dem Silberdraht, der hier auch direkt mit dem Kraftwandler verbunden war und an einem fixen Haken an der Organhalterung befestigt und in die Nährlösung getaucht. Bei den Versuchen mit der Aorta und der Lungenarterie waren keine Häkchen nötig und diese Organe wurden direkt eingespannt.

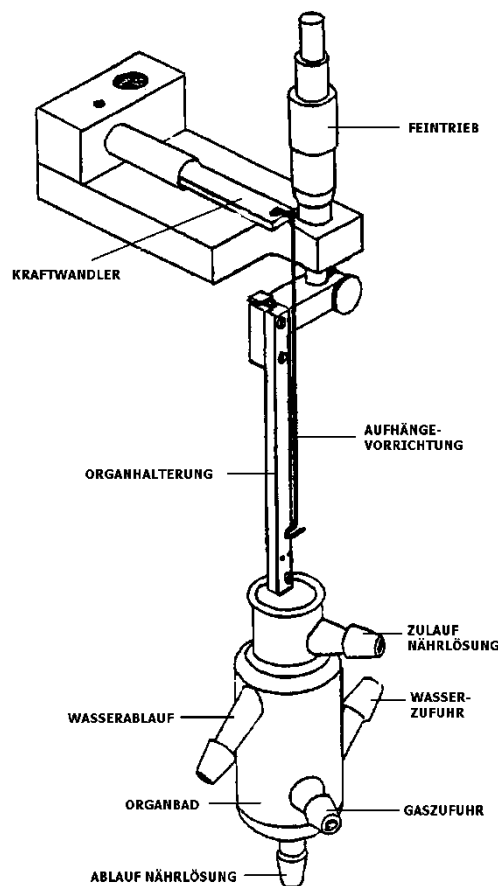


Abbildung 7: : Versuchsaapparatur 2

3.7.3 Kraftwandler

Um die Kontraktion bzw. die Relaxation der getesteten Organe zu messen war ein Kraftwandler nötig. Dieser überführt die mechanische Aktivität (Dehnungsänderung) über einen Dehnungsmessstreifen in ein elektrisches Signal. Dieser Impuls wurde anschließend mit einem Amplifier (4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, USA) verstärkt und mittels einen Flachbettschreiber (Flatbed Recorder BD112, Kipp & Zonen, Niederlande) aufs Millimeterpapier übertragen. Diese Aufzeichnungen konnten dann ausgewertet werden.

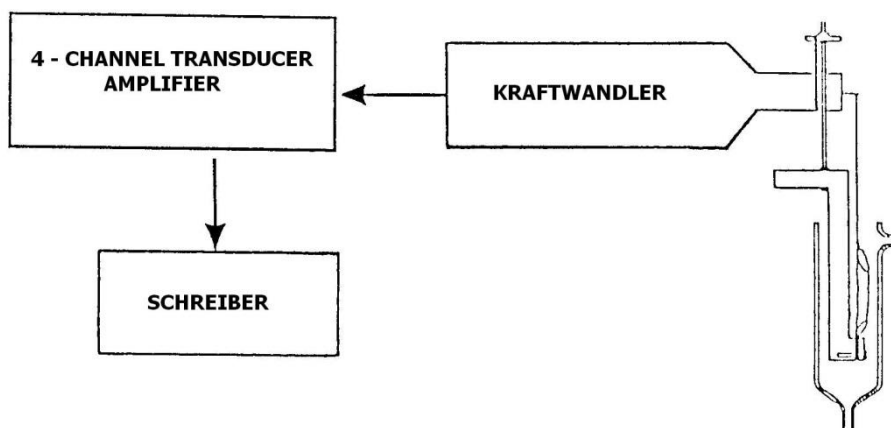


Abbildung 8: Kraftwandler

3.7.4 Gasversorgung

Eine kontinuierliche Versorgung der Versuchsorgane mit Gas von der Präparation über die Isolierung bis hin zum Versuch selbst ist, wie bereits erwähnt, von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen (speziell für die Sauerstoffzufuhr und für den physiologischen pH-Wert von 7,2-7,4). Beim verwendeten Gas handelt es sich um Oxymix, eine Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂, welches auch Carbogen genannt wird. Die Gaszufuhr wurde mittels Schraubklemmen reguliert und mit einer Fritte fein zerstäubt. Zu große Gasblasen konnten nämlich den Versuchsablauf stören.

3.8 Durchführung der Versuche

Dem Versuchsablauf liegt die Kraft der Organkontraktion zugrunde, die über einem Dehnungsmesstreifen aufgenommen und über einem Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Dabei wird auch ein Verstärker verwendet, der das Signal um das hundertfache potenziert. Um die Versuche untereinander vergleichbar zu gestalten, werden die Organe, die von alleine oder mittels Häkchen in der Organhalterung hängen, am Anfang des Versuchs auf eine standardisierte Länge vorgespannt.

3.8.1 Versuchsablauf am Musculus papillaris

Nachdem der Muskel, wie oben beschrieben, isoliert wurde, wurde er in die Versuchsanordnung 1 eingespannt. Dabei war zu beachten, dass das Organ so wenig Zeit wie möglich ohne Begasung verbrachte, da es sehr empfindlich war. Das mit einem Silberdrahhäkchen versehene Organ wurde am oberen Ende am Kraftwandler eingehakt und die unteren zwei Drittel zwischen der Platin- und der Plexiglasscheibe vorsichtig gequetscht. Über den Stativschlitten gelang die Organhalterung in das auf 35 Grad Celsius vortemperierte Organbad. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Organ auch wieder mittels einer Gaszufuhr mit Sauerstoff und Kohlendioxid angereichert. Der Papillarmuskel musste außerdem über einen externen elektrischen Impulsgeber jede Sekunde gereizt werden, da er im Gegensatz zum Vorhof keine eigenständige spontane Aktivität zeigt.

Die standardisierten Einstellungen, die mit einem Feintrieb durchgeführt wurden, lauteten für den Papillarmuskel: Vorspannung von 4 cm bei 5 mV. Dies entsprach einer Kraft von 3,92 mN.

Anschließend wurde 20 Minuten gewartet, damit sich das Organ akklimatisieren konnte. Gemessen wurde dann alle 5 Minuten für 12 Sekunden die Höhe der Amplitude, welche der Inotropie des Herzens entspricht. Sobald die Messungen für 15 Minuten konstant waren (± 1 cm) durfte der Wirkstoff gemäß dem vorgegebenen Konzentrationsschema hinzugegeben werden.

3.8.2 Versuchsablauf an der Aorta descendens

Nach der vorhin beschriebenen Isolierung wurde hier ohne Zuhilfenahme von Häkchen das ringförmige Aortastück in die Versuchsanordnung 2 gehängt. Der obere Haken war direkt mit dem Kraftwandler verbunden, der untere hingegen an der Organhalterung. Hier war besonders darauf zu achten, dass die Aorta nicht überdehnt wurde. Dies gelang meist, indem man die Apparatuhaken fast auf gleiche Höhe einstellte. Ein Überdehnen der Schlagader hätte fatale Folgen für den Versuchsablauf gehabt, da das Gefäß nicht mehr in dem Maße kontrahieren hätte können, wie es der Versuch vorgab. Auch hier wurde das Versuchspräparat in ein vortemperiertes Organbad getaucht und mit Oxymix begast.

Die standardisierten Einstellungen, die mit einem Feintrieb durchgeführt wurden, lauteten für die Aorta descendens: Vorspannung von 10 cm bei 10 mV. Dies entsprach einer Kraft von 19,6 mN.

Nach dem Ablauf der üblichen 20 Minuten für die Akklimatisierung wurde speziell bei der Hauptschlagader ein Wechsel von 10 auf 5 mV vollzogen und der Schreiber auf Null gestellt. Daraufhin wurde die modifizierte Krebs-Henselite Tyrode mit der oben beschriebenen frisch zubereiteten 90 millimolaren Kaliumchlorid-Tyrode ausgetauscht. Dadurch erfolgte die maximale und irreversible Kontraktion des Gefäßes. Der Versuch durfte nur durchgeführt werden, wenn die Kontraktionskurve des Schreibapparates über 5 cm lag und nach minimum 45 Minuten eine Konstanz eintrat. Bei Eintreten dieser Forderungen wurde die Testsubstanz nach dem Pipettierschema aus Tabelle XX hinzugefügt. Die Aufzeichnung erfolgte während den 45 Minuten pro Konzentration in der Geschwindigkeit mm/min.

3.8.3 Versuchsablauf am Truncus pulmonalis

Der Hergang und die Anforderungen des Versuchs an der Pulmolarterie stimmten bis auf die Vorspannung mit denen der Hauptschlagader überein. Die Kraft, die durch eine Vorspannung von 10 cm bei 5 mV erreicht wurde entspricht nämlich 9,81 mN und ist wesentlich geringer als die, die bei der Aorta descendens ausgeübt wurde.

3.8.4 Versuchsablauf am Ileum terminalis

Der mit zwei Silberdrahthäkchen präparierte terminale Teil des Krummdarms wurde an die dafür vorgesehenen Haken der Versuchsanordnung 2 vorsichtig eingehängt. Als bald wurde das Organ in das doppelwandige Bad hinabgelassen und mit O₂ und CO₂ versorgt.

Die standardisierten Einstellungen, die mit einem Feintrieb durchgeführt wurden, lauteten für den Darm: Vorspannung von 5 cm bei 5 mV. Dies entsprach einer Kraft von 4,92 mN.

Nachdem dem Organ 20 Minuten Zeit gelassen wurden, sich zu akklimatisieren wurde der Schreiber auf Null zurückgedreht und die Tyrode mit einer, wie im Kapitel „Stammlösungen“ beschriebenen, zuvor gemischten 60 millimolaren KCl-Tyrode ausgetauscht. Dadurch wurde eine maximale Kontraktion des Organs erlangt. Blieb die Konzentrationskurve des Schreibers oberhalb der 5 cm Marke und wurde die Kontraktion nach mindestens 45 Minuten Wartezeit konstant, so konnte nach dem schon mehrfach zitierten Pipettierschema der Versuchsprozess fortgeführt werden. Auch hier wurde die Entwicklung in der Geschwindigkeitseinstellung mm/min aufgezeichnet.

3.8.5 Versuchsablauf am Atrium dextrum

Der Versuch am rechten Vorhof wurde an der Apparatur 2 durchgeführt. Der mit 2 Silberhäkchen präparierte Vorhof wurde an den Organhalterungen befestigt, wie zuvor beim Darm beschrieben wurde. Anschließend wurde die Organhalterung in die Tyrode-Lösung versenkt. Bei diesem Test wurde die Chronotropie des Meerschweinchen-Herzens untersucht. Der Vorhof schlug dabei durch den in ihm befindlichen Sinusknoten spontan, also ohne Zuhilfenahme eines externen Impulses, wie beim Papillarmuskel.

Die standardisierten Einstellungen, die mit einem Feintrieb durchgeführt wurden, lauteten für den rechten Vorhof: Vorspannung von 10,4 cm bei 5 mV. Dies entsprach einer Kraft von 9,81 mN.

Nach einer 20 minütigen Akklimatisierungsphase im 37 Grad Celsius warmen Organbad und einer Dauerbegasung mit Oxymix wurde alle 5 Minuten für 12 Sekunden eine Messung vorgenommen. Die Geschwindigkeit des Schreibers war dabei auf mm/sec eingestellt. Nachdem mindestens 45 Minuten die Konstanz der Herzschläge überprüft wurde, konnte mit

der eigentlichen Messung, wieder 12 Sekunden alle 5 Minuten, und der Zugabe der Wirksubstanz nach dem üblichen Pipettierschema, begonnen werden.

3.8.6 Versuchsablauf am Ileum terminalis – Wirkmechanismus

Hierfür wurde das Präparat wie oben beschrieben hergerichtet, in die Apparatur 2 eingespannt und ins Organbad getaucht. Auch die Einstellungen für die Apparatur und dem Schreiber waren mit dem normalen Versuchsablauf am Darm ident und sind dem entsprechenden Kapitel zu entnehmen.

Auch hier galt es wieder eine 20 minütige Akklimatisierungsphase abzuwarten, bevor die modifizierte Krebs-Henseleit Tyrode mit der oben beschriebenen Kaliumchlorid-Tyrode ausgetauscht werden konnte. Dann wurde abgewartet, bis die Kontraktion des Darms konstant war und die Kontraktionskurve über 5 cm lag.

Anschließend wurden je nach Versuch 30 µl oder 100 µl Nitro-L-Arginin Lösung dazupipettiert und 45 Minuten verstreichen lassen. Während dieser Zeit blieb die Kurve entweder unverändert oder stieg leicht an, was darauf zurückzuführen war, dass sich durch die Blockade der eNOs der Ileum terminalis noch leicht kontrahierte. Nach dieser Zeiteinheit wurden 70µl Testsubstanz dem Organbad hinzugefügt und wiederum 45 Minuten gemessen.

Für das Verständnis der jetzt folgenden Datenanalyse war auch nachstehender Versuch von Bedeutung: Die untersuchte Substanz MGdth9 ist in DMSO löslich. Dieses Lösungsmittel verfügt über eine spasmolytische Eigenwirkung auf die glatte Muskulatur des Ileums, die in der Auswertung beachtet werden musste. Um diesen Korrekturfaktor zu berechnen wurden also, parallel zu den Versuchen zum Wirmechanismus, auch Versuche mit Nitro-L-Arginin und DMSO (zugefügt wie im oben erklärten Pipettierschema) durchgeführt. Erst nach Abzug der durch das DMSO erfolgten Spasmolyse konnte der Datensatz ausgewertet werden.

4 Ergebnis

4.1 Datenauswertung am Atrium dextrum

Der im rechten Vorhof befindliche Sinusknoten ist primär für die Schlagfrequenz des Herzens zuständig. Beim Versuch wurden 12 Sekunden lange Messungen durchgeführt und alle Spitzen gezählt. Eine Zunahme der Spitzenanzahl bedeutete eine Zunahme der Schlagfrequenz, eine Abnahme das Gegenteil. Je nach dem spricht man von einer positiv chronotrop oder negativ chronotrop wirkenden Testsubstanz. Wenn sich die Spitzenanzahl im Versuch nicht veränderte oder nur in geringem Maße (± 2 Schläge) hatte die Substanz keine Wirkung bezüglich der Chronotropie des Herzens.

12 Sekunden



0 μ M MGdth9
Kontrollwert



3 μ M MGdth9



10 μ M MGdth9



30 μ M MGdth9



100 μ M MGdth9

Abbildung 9 : Originalabbildung der Frequenz des Vorhofs

Folgende Tabelle zeigt, in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration, die Mittelwerte der Schlagfrequenz des Atrium dexter (fc) einerseits in Schläge pro Minute, andererseits in Prozent. All diese Werte sind jeweils um den Standardfehler SEM korrigiert. Die beiden letzten Spalten beinhalten die Anzahl der Versuche (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), die durch den Signifikanztest ermittelt wurde.

MGdth9	fc ± SEM (x/min)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 µmol	203,75 ± 11,79	0 ± 0,00	4	-
3 µmol	205,00 ± 10,80	0,74 ± 1,22	4	n.s.
10 µmol	212,50 ± 11,27	4,41 ± 1,24	4	n.s.
30 µmol	216,25 ± 8,75	6,51 ± 2,43	4	n.s.
100 µmol	197,50 ± 7,50	-2,42 ± 4,59	4	n.s.

Tabelle 8: Datenauswertung des Atrium dextrum

Aus obenstehender Tabelle und auch aus untenstehender Graphik kann man erkennen, dass trotz Zunahme der Konzentration der Testsubstanz keine signifikante Zu- oder Abnahme der Schlagfrequenz gemessen wurde und auch zu keiner Zeit während des Versuchs ein EC₅₀-Wert erreicht wurde.

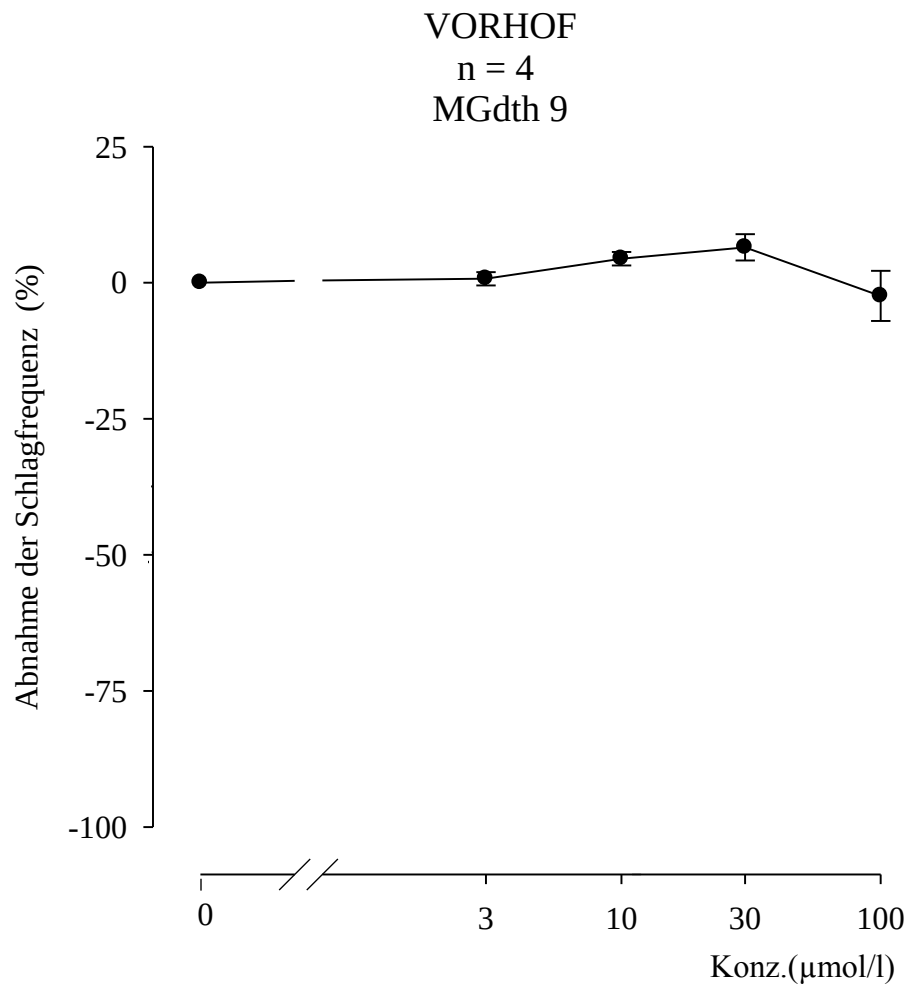


Abbildung 10 : Konzentrations-Wirkungskurve des Vorhofs; auf der Ordinate wird die Abnahme der Konzentrationskraft des Vorhofs in % angegeben und auf der Abszisse die Konzentration in µmol/l.

4.2 Datenauswertung am Ileum terminalis

Die folgende digitalisierte Originalabbildung beschreibt die Kontraktionskurve des Darms. Als Ausgangspunkt diente die Höhe des konstanten Messpunkts, bei dem noch keine Wirksubstanz zugefügt wurde ($0\mu\text{M}$) zum Nullpunkt. Anschließend wurden alle 45 Minuten Messungen durchgeführt und jeweils mit dem Ausgangspunkt in Relation gesetzt. Eine Abnahme der Kontraktion bedeutet somit eine spasmolytische Wirkung der Substanz.

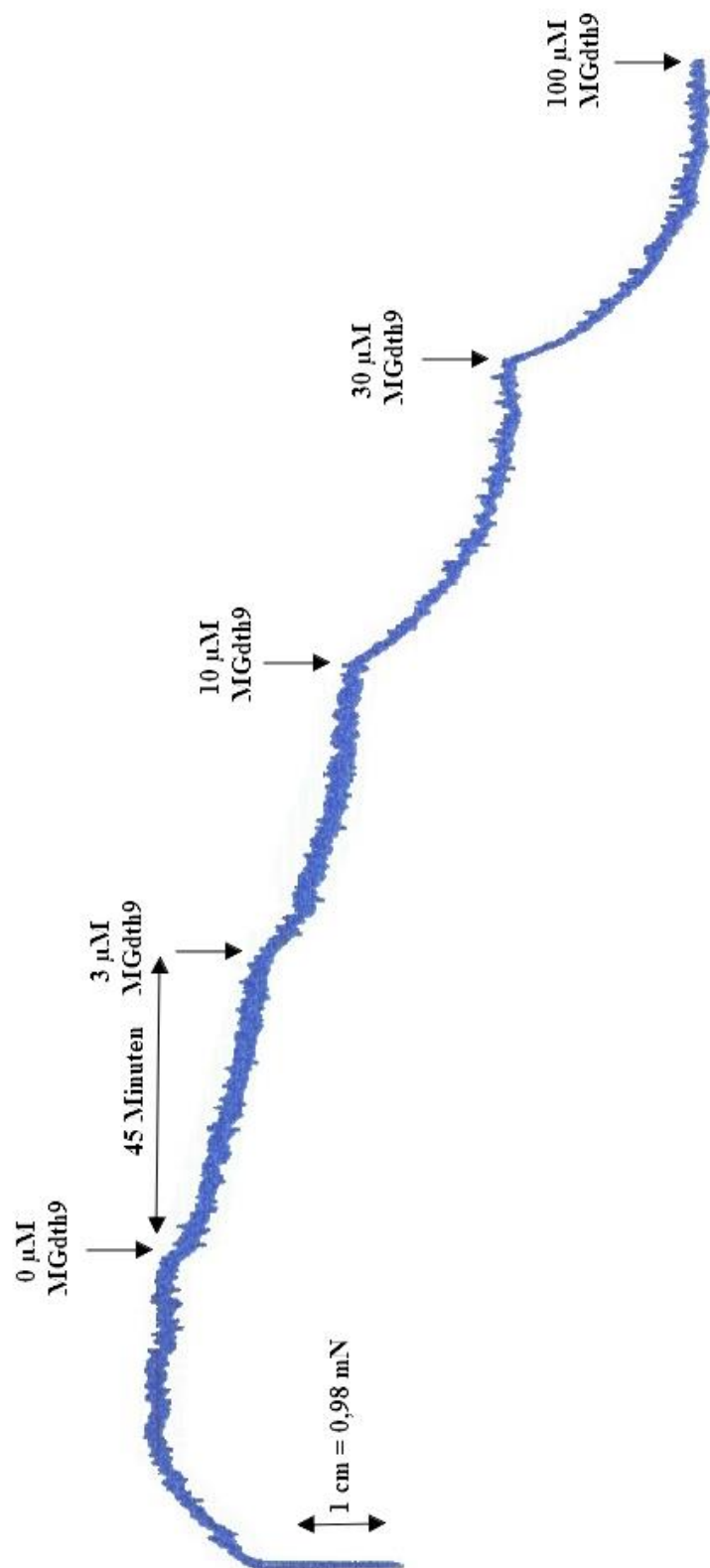


Abbildung 11 : Originalabbildung der Kontraktionskurve des Darms

Neben den schon bekannten Werten: Konzentration von MGdth9, Anzahl der Versuche (n) und Irrtumswahrscheinlichkeit (P), beschreibt die Tabelle die Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz in Millinewton und in Prozent, die um den Standardfehler (SEM) korrigiert wurden.

MGdth9	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 µmol	11,07 ± 1,77	0,00 ± 0,00	5	-
3 µmol	10,51 ± 1,70	-5,14 ± 2,66	5	n.s.
10 µmol	9,72 ± 1,53	-11,95 ± 4,47	5	0,05
30 µmol	7,22 ± 1,52	-36,50 ± 2,89	5	0,05
100 µmol	4,72 ± 1,11	-61,65 ± 5,31	5	0,01

Tabelle 9: Datenauswertung des Ileum terminalis

Wie man aus der Abbildung erkennen kann verhielt sich die Kontraktion des Darms indirekt proportional zur Konzentration der Testsubstanz. Dies bedeutet, dass MGdth9 eine signifikante spasmolytische Wirkung aufweist.

Am Darm konnte auch eine EC_{50} in Höhe von 59 µmol/Liter ermittelt werden, wie die nachfolgende Graphik zeigt. Dies bedeutet, dass die Testsubstanz zwar spasmolytisch aktiv ist, jedoch wahrscheinlich eine zu geringe Potenz aufweist, um therapeutisch eingesetzt zu werden.

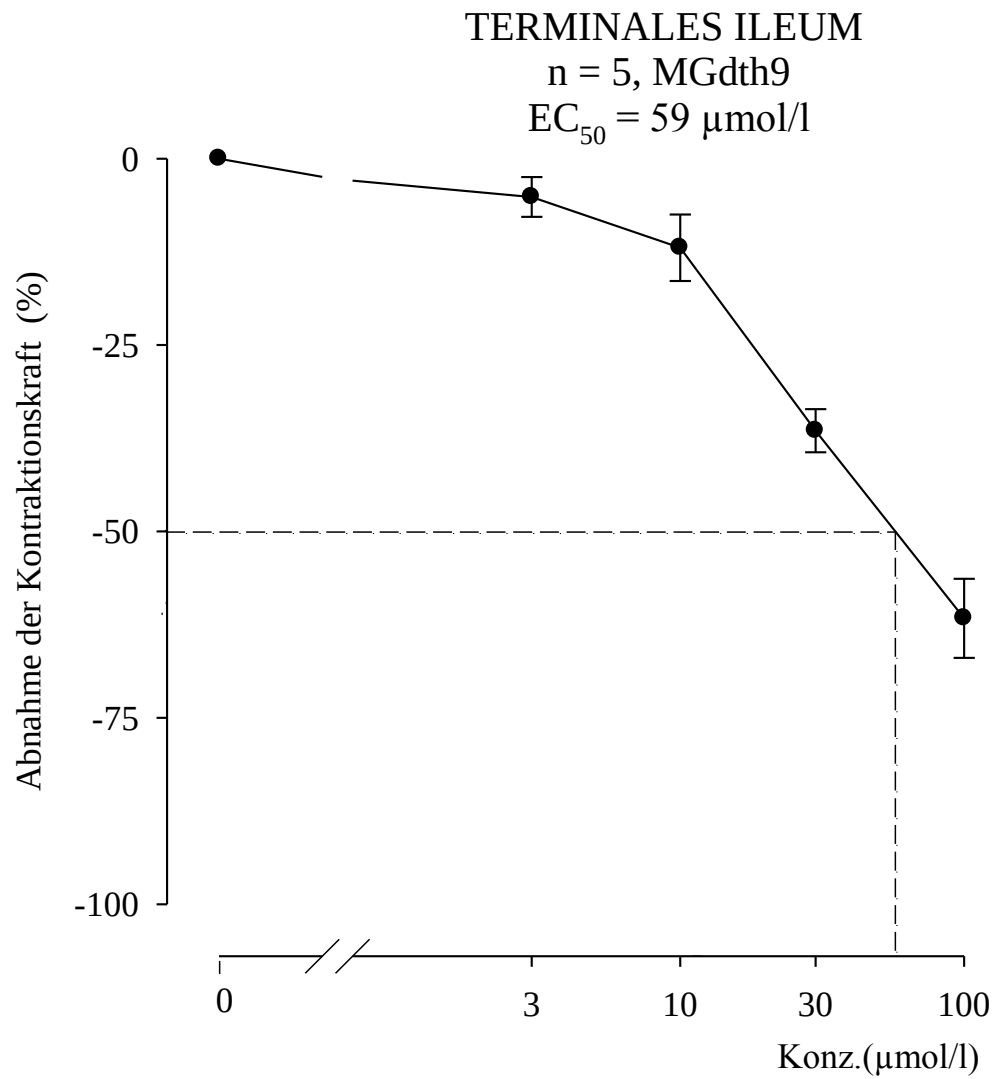


Abbildung 12 : Konzentrations-Wirkungskurve des Darms; auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums in % angegeben und auf der Abszisse die Konzentration in µmol/l.

4.3 Datenauswertung am Musculus papillaris

Die Aufzeichnungen am Papillarmuskel gaben Aufschluss über die Wirksamkeit der Testsubstanz in Bezug auf die Inotropie des Herzens. Dabei wurde im fünf Minuten Takt 12 Sekunden lang eine Messung durchgeführt und die Amplitude abgemessen. Als Kontrollwert diente die Amplitudenhöhe bei Konstanz der Ausschläge. Zur Bestimmung wurden immer jeweils jene Amplituden verwendet, die 45 Minuten nach dem Einspritzen der Testsubstanz aufgezeichnet wurden.

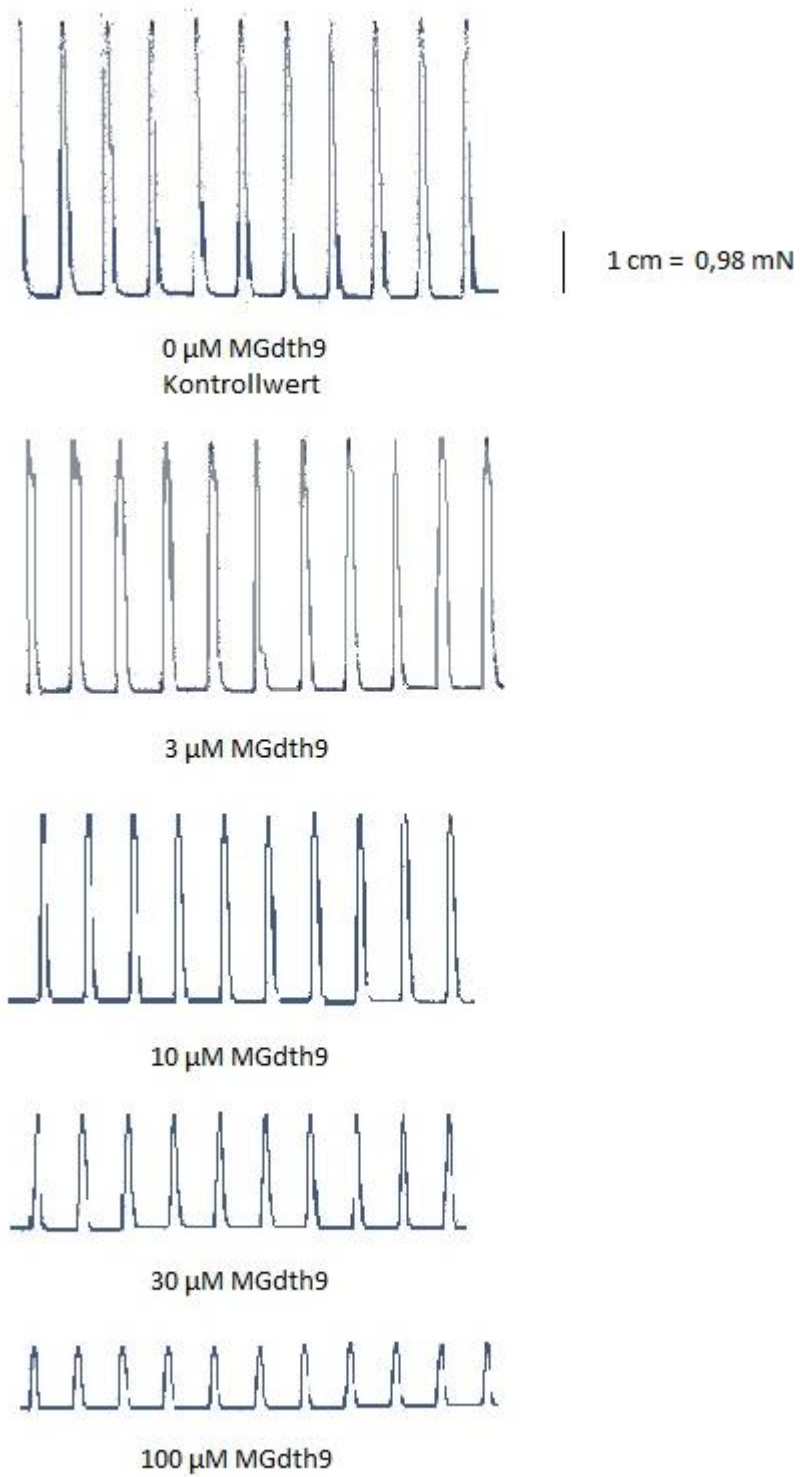


Abbildung 13 : Originalabbildung der Amplituden des Papillarmuskels

Nachstehende Tabelle beschreibt die Datenauswertung des Papillarmuskels. In der ersten Spalte werden die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen gelistet. In der zweiten und dritten Spalte stehen die Mittelwerte der Konzentrationsfrequenz, jeweils in Millinewton und in Prozent, die um den Standardfehler (SEM) korrigiert wurden. Spalte vier beinhaltet die Anzahl der Versuche und Spalte fünf die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

MGdth9	fc ± SEM (x/min)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 µmol	1,86 ± 0,44	0,00 ± 0,00	6	-
3 µmol	1,72 ± 0,55	-15,09 ± 9,49	6	0,05
10 µmol	1,58 ± 0,47	-19,66 ± 5,96	6	0,05
30 µmol	1,49 ± 0,39	-21,63 ± 3,95	6	0,05
100 µmol	1,41 ± 0,34	-24,62 ± 4,02	6	0,05

Tabelle 10: Datenauswertung des Musculus papillaris

Mit steigender Konzentration der Substanz nahm die Amplitudenhöhe kontinuierlich ab. Dies bedeutet, dass die getestete Substanz eine negativ inotrope Wirkung aufweist. Eine EC₅₀ wurde aber zu keinem Zeitpunkt des Versuchs erreicht. Das Herabsenken der Kontraktilität durch die Testsubstanz ist somit nicht nennenswert.

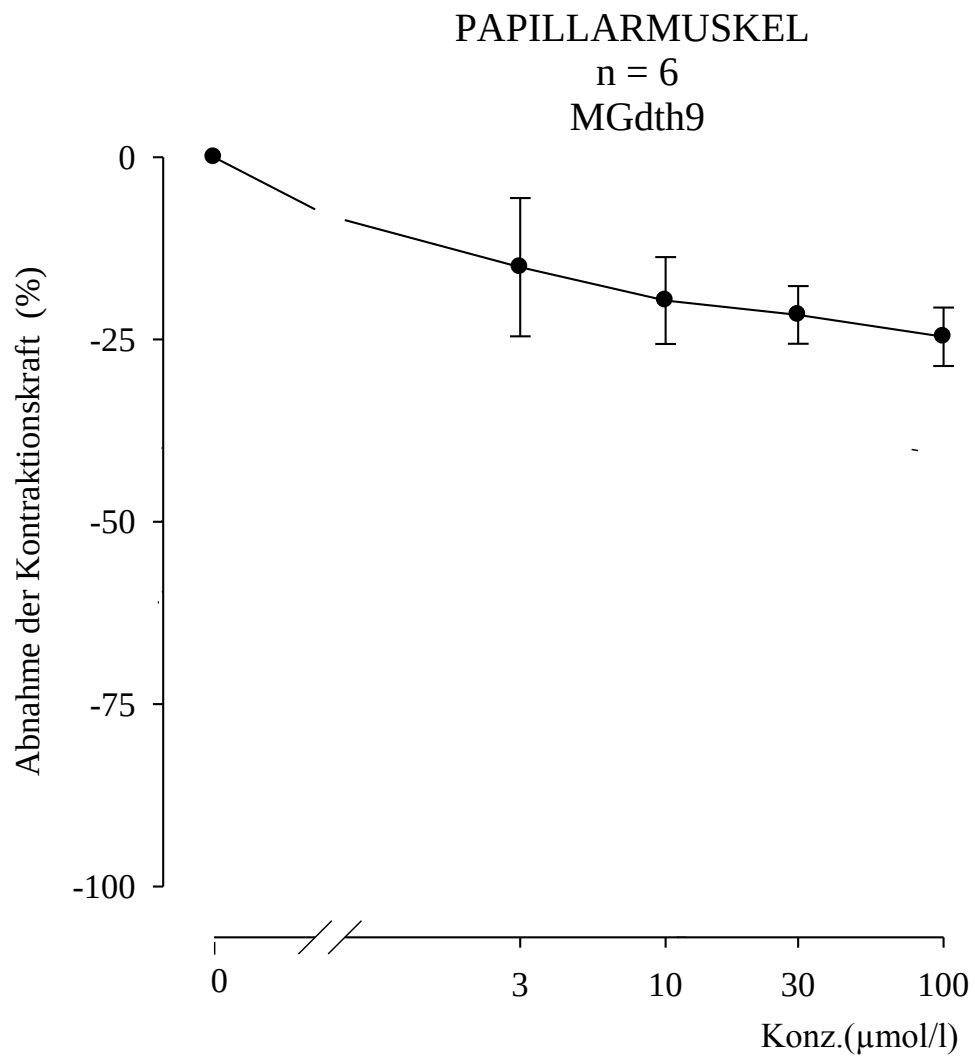


Abbildung 14 : Konzentrations-Wirkungskurve des Papillarmuskels; auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Musculus papillaris in % angegeben und auf der Abszisse die Konzentration in µmol/l.

4.4 Datenauswertung an der Aorta descendens

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um etwas über die gefäßrelaxierende Kraft der Testsubstanz in Erfahrung zu bringen. Auch hier wurde nach Erreichen der Konstanz alle 45 Minuten die Konzentration des Wirkstoffs erhöht und die Höhe der Kurve in Relation zum Ausgangspunkt gemessen. Ein Abfallen der Kurve würde somit eine Abnahme der Kontraktion des Gefäßes bedeuten.

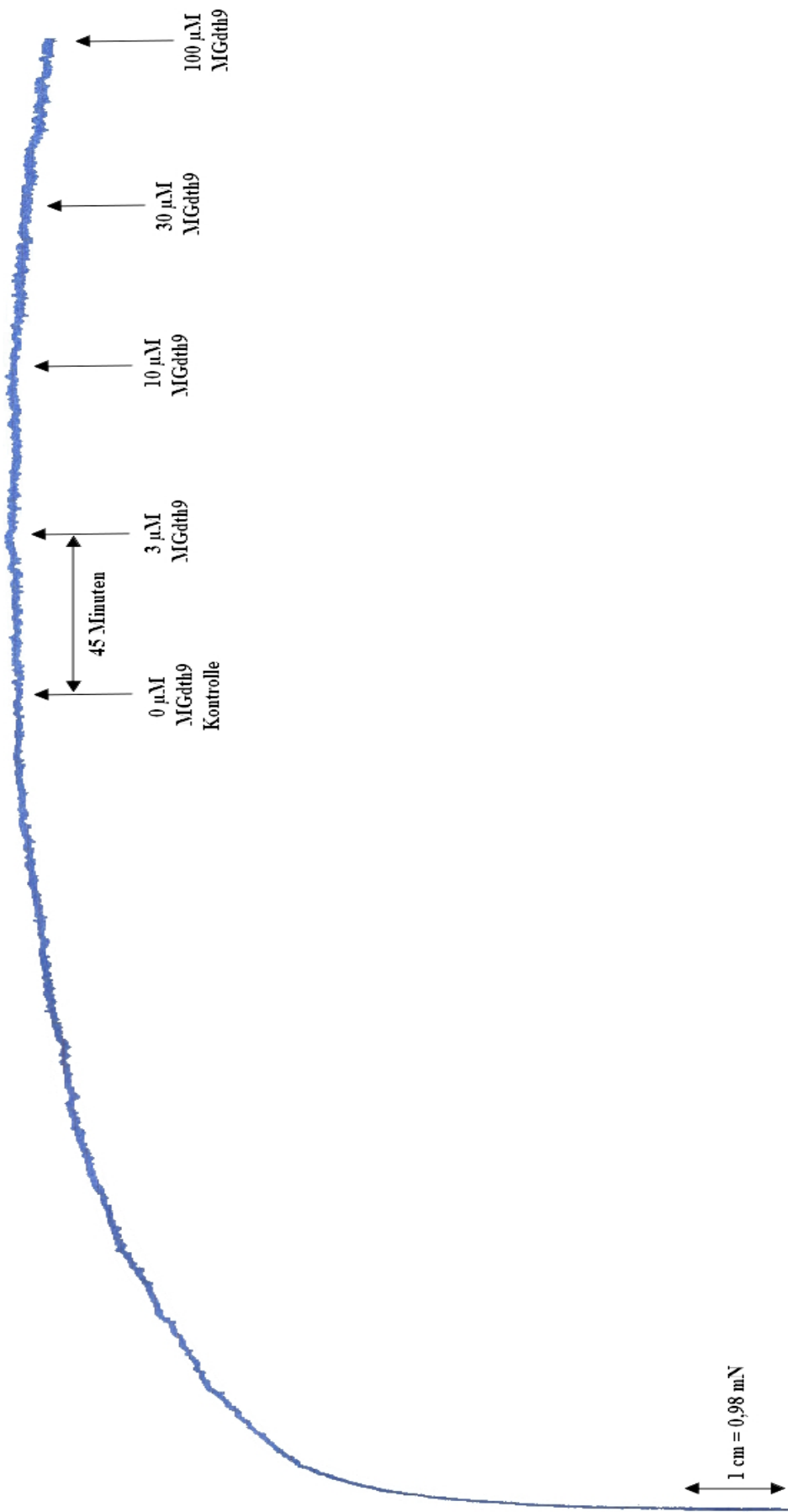


Abbildung 15 : Originalabbildung der Kontraktionskurve der Aorta descendens

Die nachstehende Tabelle zeigt in den Spalten von links nach rechts die Substanzkonzentration, die um den Standardfehler (SEM) korrigierten Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz in Millinewton und Prozent, die Versuchsanzahl und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

MGdth9	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 µmol	10,67 ± 0,65	0,00 ± 0,00	6	-
3 µmol	10,69 ± 0,69	0,12 ± 0,86	6	n.s.
10 µmol	10,68 ± 0,81	-0,23 ± 2,27	6	n.s.
30 µmol	10,40 ± 0,90	-3,07 ± 3,54	6	n.s.
100 µmol	9,76 ± 1,08	-9,46 ± 6,22	6	0,05

Tabelle 11: Datenauswertung der Aorta descendens

Die Dosis-Wirkungs-Kurve auf der folgenden Graphik sinkt nur im letzten Teil, was wahrscheinlich eher der relaxierenden Wirkung des Lösungsmittels DMSO zuzuschreiben ist, als der Testsubstanz selbst. Eine EC₅₀ wurde auch hier weit verfehlt.

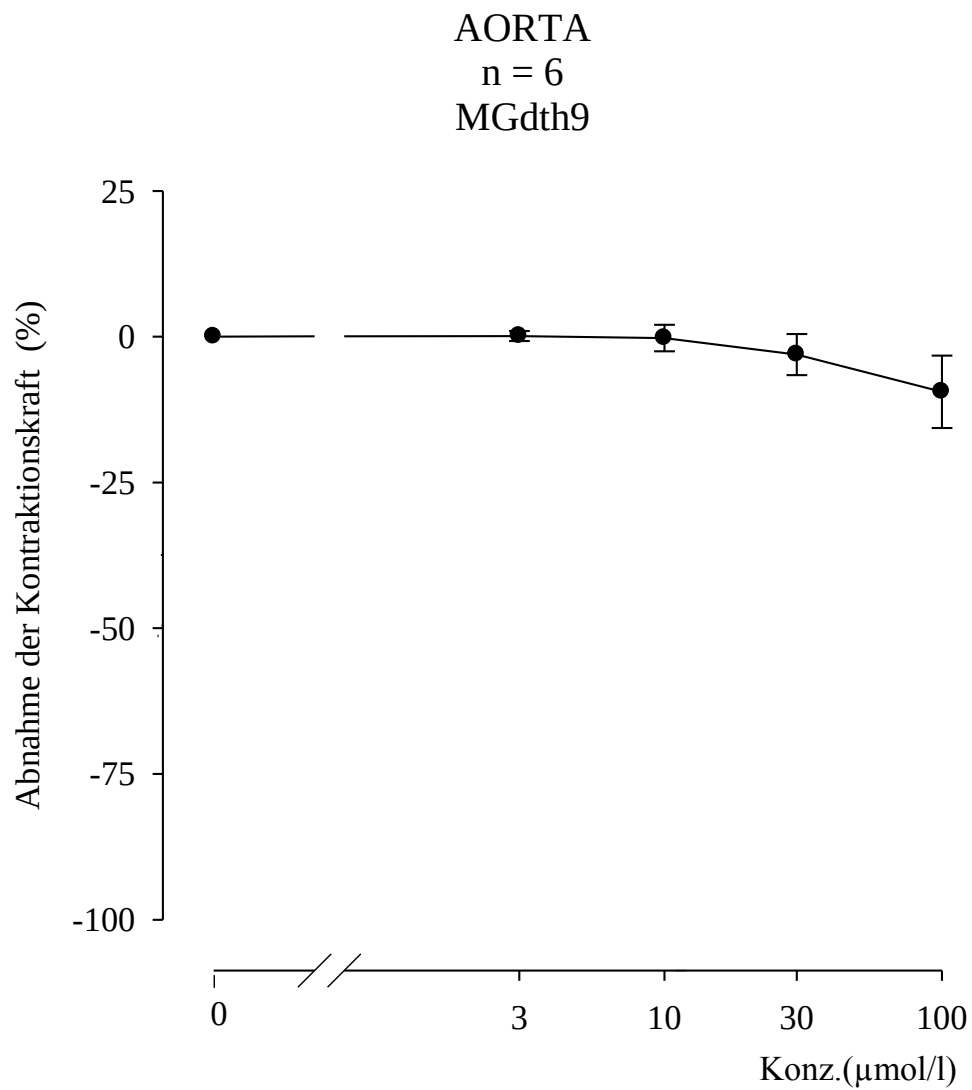


Abbildung 16 : Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta; auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta in % angegeben und auf der Abszisse die Konzentration in µmol/l.

4.5 Datenauswertung am Truncus pulmonalis

Auch der Versuch an der Pulmonalarterie diente dazu, die Wirkung von MGdth9 auf die Gefäßrelaxation zu beschreiben. Wie beim vorherigen Ansatz wurde auch hier ein Vergleich zwischen der Höhe der Kurve bei verschiedenen Konzentrationen mit einem Ausgangspunkt aufgestellt

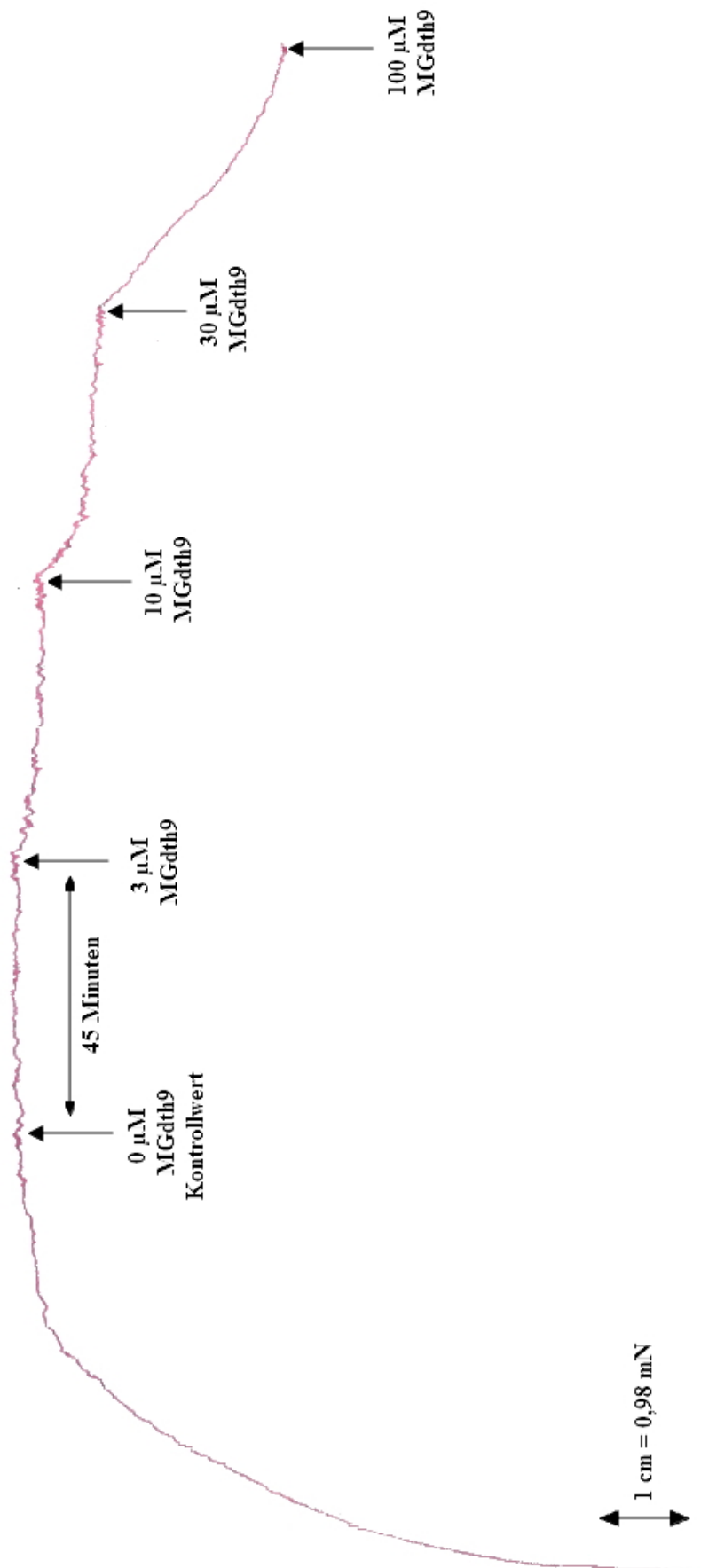


Abbildung 17 : Originalabbildung der Kontraktionskurve des Truncus pulmonalis

Die folgende Tabelle beschreibt die Auswertung der Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz der Testsubstanz in Millinewton und in Prozent (jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert) in Abhängigkeit zur Konzentration von MGdth9. In den beiden letzten Spalten befinden sich die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

MGdth9	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 µmol	13,87 ± 1,09	0,00 ± 0,00	4	n.s.
3 µmol	13,34 ± 1,11	-3,94 ± 0,53	4	n.s.
10 µmol	13,13 ± 1,06	-5,38 ± 0,84	4	n.s.
30 µmol	12,12 ± 1,05	-12,75 ± 1,26	4	0,05
100 µmol	8,96 ± 0,87	-35,49 ± 3,84	4	0,05

Tabelle 12: Datenauswertung am Truncus pulmonalis

Bei der Analyse der beiden Graphiken lässt sich ein leichte Relaxation der Pulmonalarterie erkennen, was aber auch hier auf die dilatatorische Eigenschaft des Lösungsmittels zurückzuführen ist. Eine EC_{50} wurde auch hier nicht erreicht.

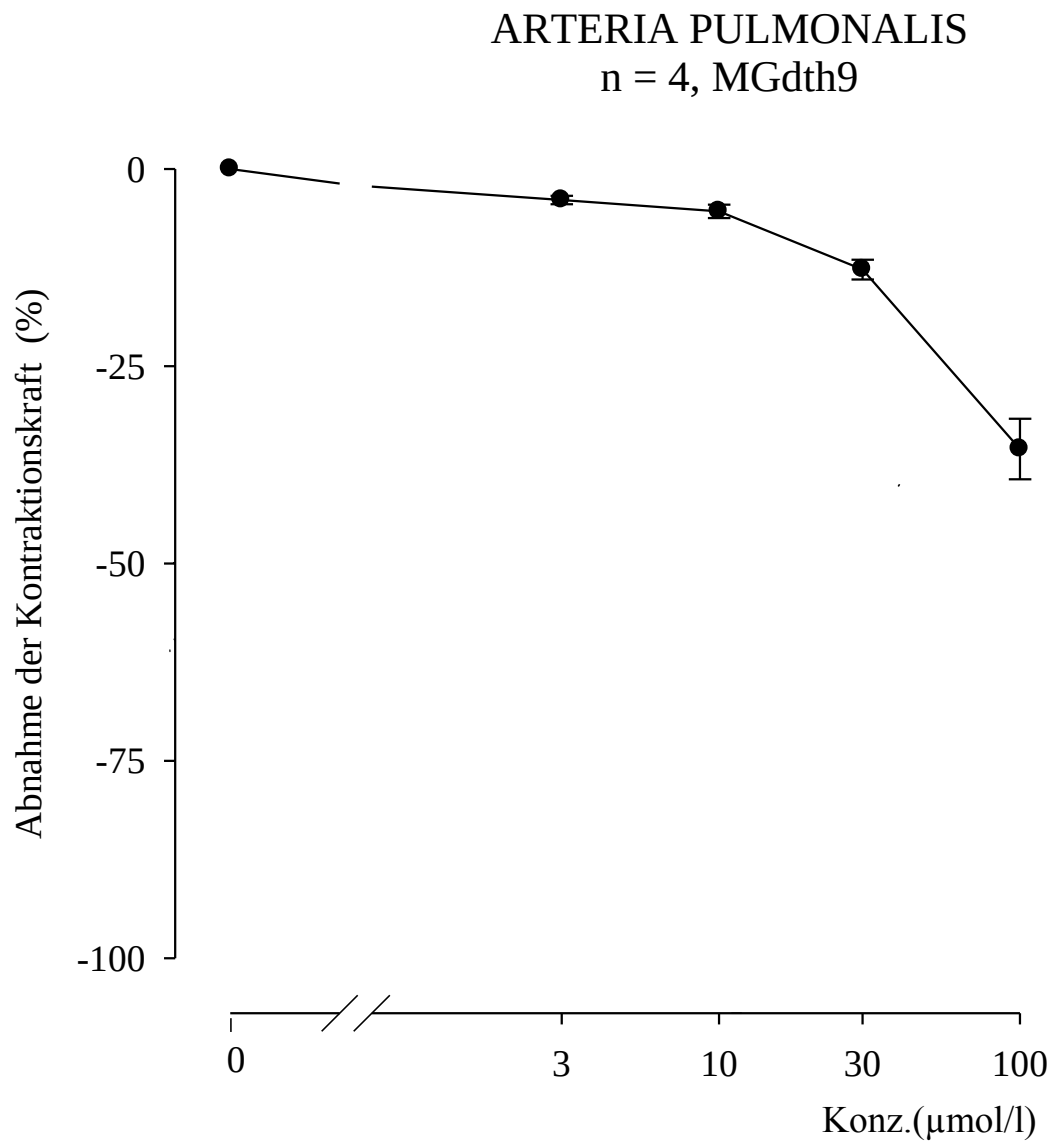


Abbildung 18 : Konzentrations-Wirkungskurve des Truncus pulmonalis; auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Truncus pulmonalis in % angegeben und auf der Abszisse die Konzentration in µmol/l.

5 Testung des Wirkmechanismus

5.1 Allgemein

Grundsätzlich kann der Wirkmechanismus nur an jenen Organen getestet werden, wo während der vorausgegangenen Versuche eine EC_{50} erreicht wurde. Bei MGdth9 war dies ausschließlich am Darm der Fall.

Für den praktischen Versuchsablauf änderte sich nur das Pipettierschema und die Versuchszeit. Bei der Testung des Wirkmechanismus wurden nämlich jeweils eine Konzentration an Nitro-L-Arginin und eine Konzentration von MGdth9 dazugegeben, wobei jeweils nur 45 Minuten getestet wurde.

5.2 Testung am Ileum terminalis

Die Konzentration der zugegeben Substanzen errechnete sich wie folgt: Die Menge an Nitro-L-Arginin entstammt Erfahrungswerten aus der Literatur und die Menge an MGdth9 musste über der von ihr erreichten EC_{50} liegen. Durch die Zugabe von Nitro-L-Arginin wurde die Stickstoffmonoxidfreigabe teilweise bzw. zur Gänze geblockt. Kam es nach dem Einspritzen der Testsubstanz zu einer Spasmolyse, erfolgte dies nicht über den Wirkmechanismus der endothelialen NO-Synthase. Wie aus der Originalabbildung ersichtlich ist war dies bei den beiden Versuchen der Fall. Somit wurde bewiesen, dass die Testsubstanz MGdth9 nicht über die eNO-Synthase spasmolytisch am Darm wirkt.

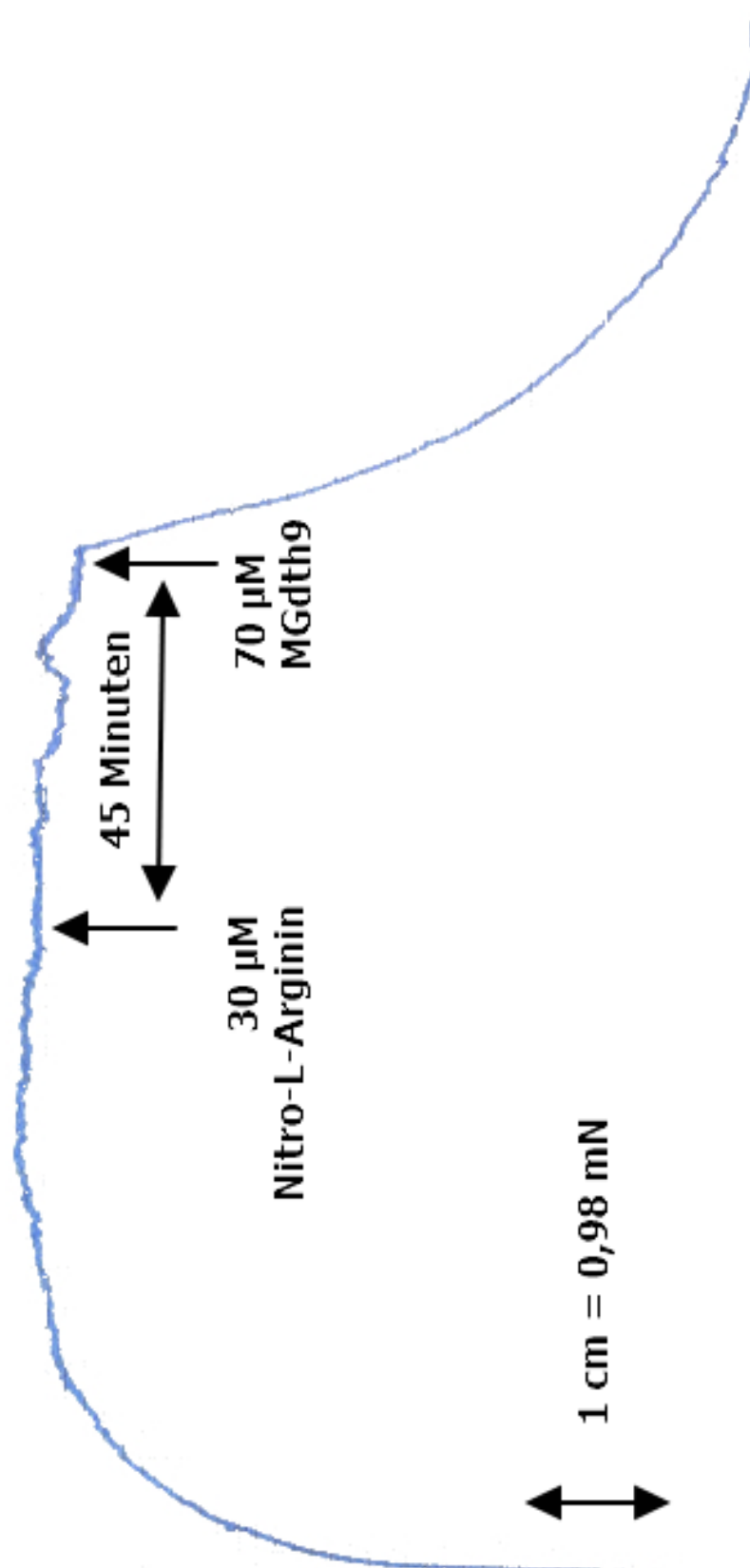


Abbildung 19 : Originalabbildung des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch 30µM Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz MGdth9

**Terminales Ileum, L-Argininmonohydrochlorid (30 μ M)
MGdth9, 70 μ mol/l
n=5**

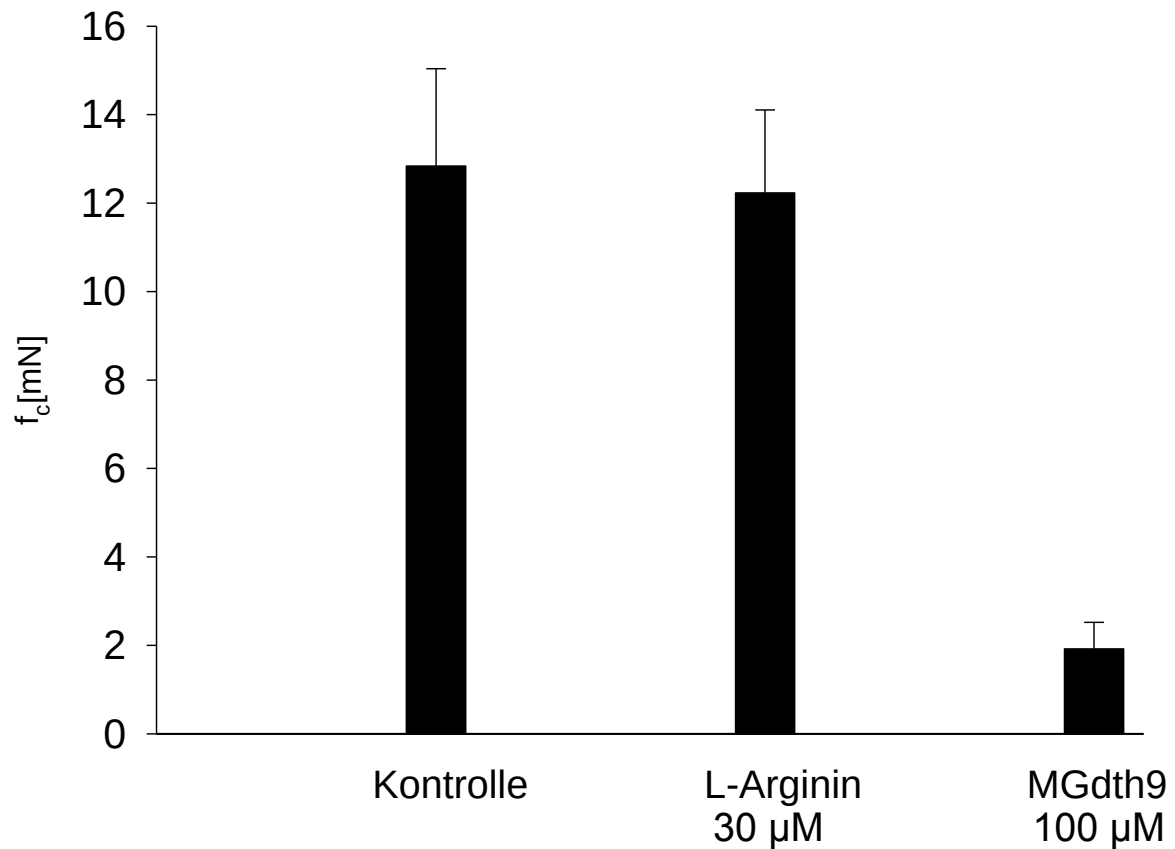


Abbildung 20: Balkendiagramm des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch 30 μ M Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz

Folgende Tabelle beschreibt die Ergebniswerte des durchgeführten Versuchs zur Testung der Wirksubstanz. Die Kontraktionsfrequenz liegt als Mittelwert, welcher um den Standardfehler (SEM) korrigiert wurde, in der Einheit Millinewton vor. Daneben finden sich die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

MGdth9	fc±SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	12,84 ± 2,20	5	-
30 µM Nitro-L-Arginin	12,23 ± 1,88	5	-
+ 100 µM Mgdth9	1,92 ± 0,60	5	0,01

Tabelle 13: Ergebnis der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGdth9 bei einer Konzentration von 30 µM Nitro-L-Arginin

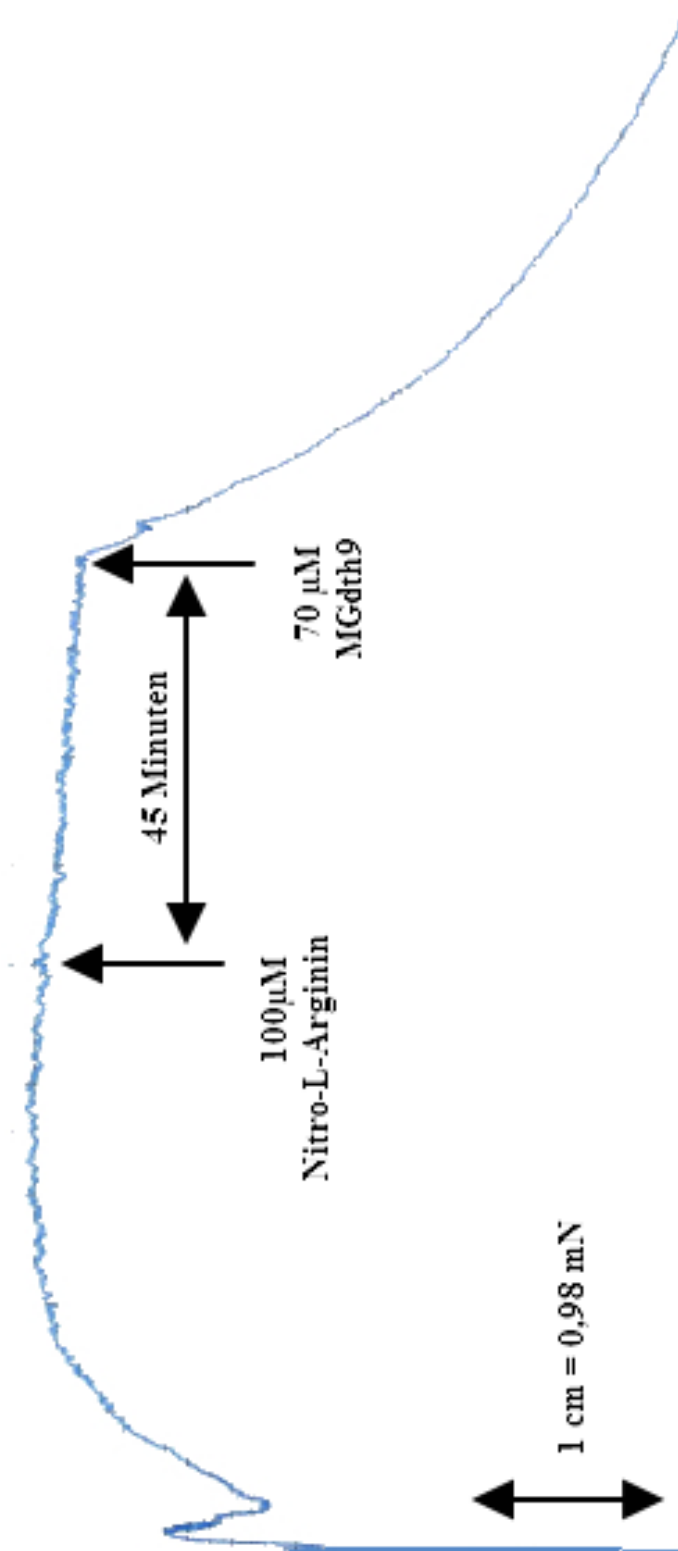


Abbildung 21 : Originalabbildung des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch 100µM Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz MGdth9

**Darm, L-Argininmonohydrochlorid (100 μ M)
MGdth9, 70 μ mol/l
n=4**

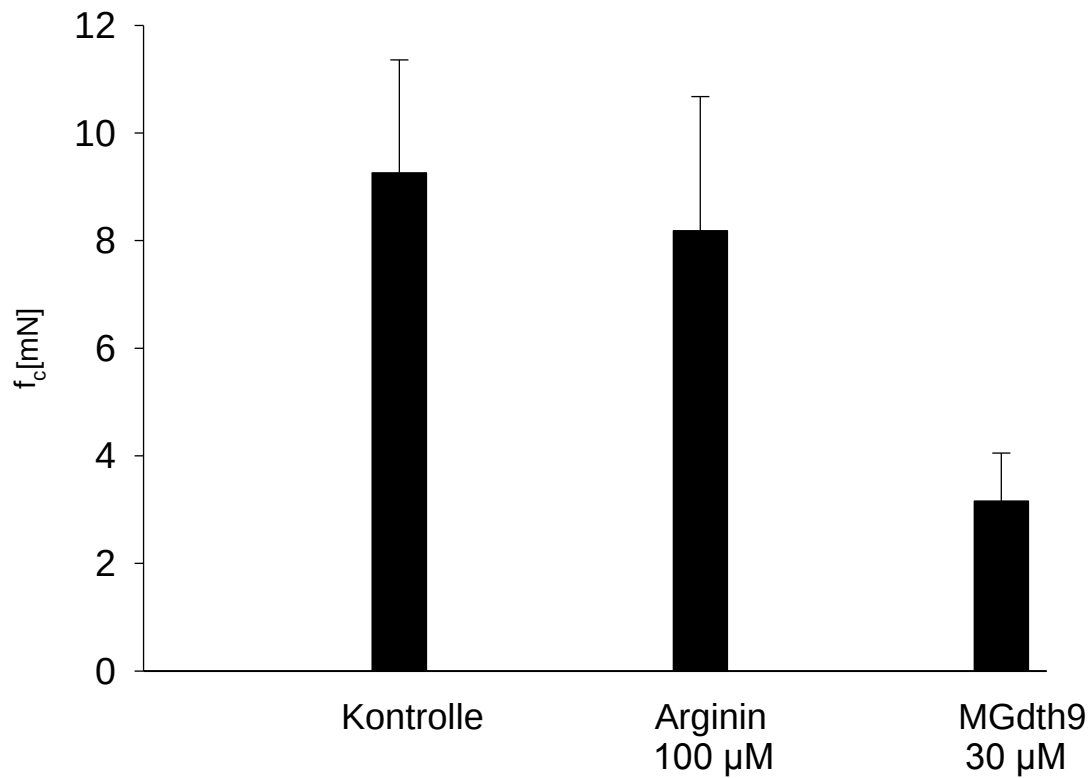


Abbildung 22 : Balkendiagramm des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch 100 μ M Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz MGdth9

Die Tabelle beschreibt abhängig von der Menge an Nitro-L-Arginin und der Testsubstanz die Kontraktionsfrequenz in Millinewton, die um den Standardfehler (SEM) korrigiert wurde. Die Anzahl der Versuche beschreibt die dritte Spalte und die vierte Spalte beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

MGdth9	fc±SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	9,26 ± 2,10	4	-
100 µM Nitro-L-Arginin	8,18 ± 2,49	4	-
+ 100 µM Mgdth9	3,16 ± 0,89	4	0,05

Tabelle 14: Ergebnis der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGdth9 bei einer Konzentration von 100 µM Nitro-L-Arginin

6 Diskussion

6.1 Allgemein

Die Versuche an MGdth9 wurden durchgeführt, um das pharmakologische Wirkprofil der Testsubstanz herauszufinden. Dafür wurden fünf isolierte Organe von Meerschweinchen verwendet. Um die Aussagekraft der Versuche zu Erhöhen, wurde auch die Versuchsanzahl den Standards der Literatur angepasst und statistisch ausgewertet.

Für die Wirkung an der quergestreiften Herzmuskulatur wurden der rechte Vorhof und der Papillarmuskel benutzt. Am Vorhof wurde auf eine potentiell chronotrope Wirkung getestet, am Papillarmuskel auf eine potentiell inotrope Wirkung.

Für die Wirkung an der glatten Muskulatur wurden die Hauptschlagader, die Pulmonalarterie und der Darm benutzt. An den beiden Widerstandsgefäßen wurde auf eine potentielle vasodilatierende Wirkung getestet, am Darm auf eine potentielle spasmolytische Wirkung.

6.2 Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur

Um eine Aussage über die Veränderung der Schlagfrequenz durch die Testsubstanz treffen zu können wurden die Versuche am Sinusknoten, dem primären Taktgeber des Herzens, durchgeführt. Dieser befindet sich bekanntlich im rechten Vorhof.

Der Einfluss der Wirksubstanz auf die Kontraktilität des Herzens wurde im Rahmen der Versuche am Papillarmuskel erforscht. Dieser benötigte zum Schlagen im Gegensatz zum Vorhof einen externen elektischen Impuls.

In folgender Tabelle werden die Ergebnisse an den beiden Organen ersichtlich gemacht und zugleich miteinander verglichen. Die mittlere Spalte beziffert beim Vorhof die Mittelwerte der Schlagfrequenz und beim Papillarmuskel die Mittelfwerte der Schlagkraft, immer um den Standardfehler (SEM) korrigiert. Die letzte Spalte beschrieb eine eventuell erreichte EC50 bei der Maximalkonzentration der Testsubstanz während des Versuchs.

Organ	f/fc ± SEM (%)	EC50 MGdth9 100µmol/l
Atrium dextrum	-2,42 ± 4,59	>100
Musculus papillaris	-24,62 ± 4,02	>100

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Wirkung von MGdth9 auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Substanz MGdth9 sowohl leicht negativ chronotrop als auch negativ inotrop wirkt. Das Sinken um 2,42 bzw. 24,62 Prozentpunkte ließ jedoch darauf schließen, dass der Grund nicht pharmakologischer sondern chemischer Natur war. Das für die Substanz verwendete Lösungsmittel hat eine Eigenwirkung, die den Versuchsablauf erklären könnte. Auch wurde keine mittlere effektive Konzentration erreicht. Somit ist festzuhalten, dass obwohl die Testsubstanz sowohl negativ chronotrop als auch inotrop wirkt, die Ergebnisse als nicht signifikant einzuordnen sind.

6.3 Ergebnisse an der glatten Muskulatur

Hier wurde das gefäßerweiternde Potential der Testsubstanz MGdth9 an der Hauptschlagader und der Pulmonalarterie erforscht und eine potentielle spasmolytische Wirkung am Hüft darm.

Nachstehende Tabelle beschreibt die mittlere Kontraktion der drei Organe mit glatter Muskulatur, jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert, in Prozent und die erreichte EC₅₀.

Organ	fc ± SEM (%)	EC ₅₀ MGdth9 µmol/l
Aorta descendens	-9,46 ± 6,22	>100
Truncus pulmonalis	-35,49 ± 3,84	>100
Ileum terminalis	-61,65 ± 5,31	59

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Wirkung von MGdth9 bezogen auf Vasodilatation und Spasmolyse

Die Tabelle lässt folgende Interpretation der Ergebnisse zu: Mgdth9 beeinflusste die glatte Muskulatur in unterschiedlichem Maße. Der Versuch führte an der Hauptschlagader und an der Pulmonalarterie zu einer leichten Gefäßerweiterung. Diese erfolgte erst im zeitlich letzten Teil des Versuchs. Die Ursache dieser Wirkung lag deshalb an der gefäßrelaxierenden Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO, das zu diesem Zeitpunkt reichlich vorhanden war. Anders verhielt es sich beim Versuch am Darm. Hier kam es zu einer deutlichen Spasmolyse und es wurde eine mittlere effektive Konzentration bei 59 µmol/l erreicht. Nun stellte sich die Frage nach der klinischen Relevanz des Wirkstoffs. Da für einen therapeutischen Einsatz eine besonders niedrige EC₅₀ von Vorteil ist und keine Werte über 30 µmol/l üblich sind, wird die getestete Substanz wohl kaum einen Weg in den Arzneimittelschatz finden.

7 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden Versuche an isolierten Organen von Meerschweinchen durchgeführt, um die biologische Wirkung einer neu synthetisierten Substanz zu untersuchen.

Anfangs musste ich verschiedene Präpariertechniken und den korrekten Umgang und die Einstellung der Messgeräte erlernen.

Die Meerschweinchenorgane wurden täglich frisch präpariert und in verschiedene Apparaturen, die den Organeigenschaften angepasst sind, eingespannt. Organbäder die konstant auf 37°C eingestellt sind, eine genau definierte Nährlösung und eine zusätzliche Begasung für den optimalen Sauerstoffgehalt, ermöglichen einen Versuchsablauf unter physiologischen Bedingungen. Um eine statistische Signifikanz zu gewährleisten wurde eine bestimmte Versuchszahl nie unterschritten. Außerdem wurde darauf Wert gelegt, die äußeren Umstände und den Versuchsablauf so gleich wie möglich zu gestalten.

Getestet wurde an folgenden Organen: Am rechten Vorhof wurde die Chronotropie, am Papillarmuskel die Inotropie gemessen. An der quergestreiften Herzmuskulatur zeigte MGdth9 keine Wirkung. An der Aorta und an der Pulmonalarterie wurde die Vasodilatation, am Darm die Spasmolyse gemessen. An der Lungenarterie zeigte die getestete Substanz eine leichte, vernachlässigbare, vasodilatatorische Wirkung. Am Darm hingegen zeigte sich eine deutliche spasmolytische Wirkung mit einer ermitteltet EC₅₀ von 59 µM. Somit konnte festgestellt werden, dass die Substanz MGdth9 eine Gewebselektivität an der glatten Muskulatur besitzt und nur eine spasmolytische Aktivität am Darm ohne cardialen Nebenwirkungen zeigt.

In weiterer Folge wurden Versuche hinsichtlich des Wirkmechanismus durchgeführt. Dafür wurde Nitro-L-Arginin als eNOS-Blocker eingesetzt. Trotz der Verwendung zweier verschiedenen hoher Konzentrationen konnte kein Einfluss auf die spasmolytische Aktivität durch Nitro-L-Arginin nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass bei der untersuchten Substanz andere Wirkmechanismen für die Spasmolyse am Darm zuständig sind.

8 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 (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.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2012) Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2898-1

Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. (2006) Functionale bowel disorders. *Gastroenterology*; 130:1480-91

Agreus L, Talley NJ, Svardsudd K, Tibblin G, Jones MP (2000) Identifying dyspepsia and irritable bowel syndrome: the value of pain or discomfort, and bowel habit descriptors. *Scand J Gastroenterol*; 35: 142-51

McKee DP, Quigley EM (1993) Intestinal motility in irritable bowel syndrome: Is IBS a motility disorder? Part 1. Definition of IBS and colonic motility. *Dig Dis Sci*;38:1761-2

Aziz Q, Thompson DG, Ng VW, Hamdy S, Sarkar S, Brammer MJ, et al. (2000) Cortical processing of human somatic and visceral sensation. *J Neurosci*;20:2657-63

Agreus L, Svardsudd K, Talley NJ, Jones MP, Tibblin G. (2001) Natural history of gastroesophageal reflux disease and functional abdominal disorders. *Am J Gastroenterol*;96:2905-14

Roberts L, Roalfe A, Bridge P, Singh S. Prevalence of irritable bowel syndrome: a community survey. *BR J Gen Pract*

Spiller R, Aziz Q, Creed FEA, Houghton L, Hungin P, Jones R, et al. (2007) Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut*;56:1770-98

Harvey RF, Pomare EW, Heaton Kw. (1973) Effects of increased dietary fibre on intestinal transit. *Lancet*;301:1278-80

Hills JM, Aaronson PL. (1991) The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology*;101:55-65

9 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Tobias Delle Donne

Geburtsdatum: 31. März 1989

Geburtsort: Bozen

Ausbildung:

Ab 2008: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

2008: Matura am Franziskanergymnasium Bozen