



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

**„Pharmakologisches Screening neu synthetisierter
Tetrazolderivate (MGte4 und MGte5) an isolierten
Meerschweinchenorganen“**

verfasst von / submitted by

Stefan Vulic

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

Wien, 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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass meine Diplomarbeit entsteht.

Ich möchte mich herzlich bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine Freundlichkeit und engagierte Betreuung bedanken und dafür dass er es geschafft hat, uns Diplomanden eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und positive Energie während der Durchführung der Versuche zu geben.

*Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern aussprechen, die meine Entscheidungen immer unterstützt haben und für mich auf jede Art und Weise da waren.
Hvala vam puno mama i tata, bez vas ovo nikada ne bi bilo moguće!*

Ich danke vom ganzen Herzen einer Person, die für mich sehr besonders ist und die an mich während des ganzen Studiums geglaubt hat!

Abschließend ein großes Danke an meine besten Freunde!

Diese Diplomarbeit widme ich meiner Mutter !

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zielsetzung	1
2. Einleitung	2
2.1 Spasmolytika	2
2.1.1. Neurotrope Spasmolytika	2
2.1.1.1 Atropin und Scopolamin	2
2.1.1.2 Butylscopolamin und Ipratropium	3
2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika	4
2.1.2.1 Papaverin	4
2.1.2.2 Tiropramid	5
2.1.2.3 Weitere muskulotrope Spasmolytika	5
2.1.3. Organische Nitrate	5
3. Materialien und Methoden	7
3.1 Testsubstanzen MGte4 und MGte5	7
3.1.1 Nomenklatur und Strukturformel der Testsubstanz MGte4	7
3.1.2 Nomenklatur und Strukturformel der Testsubstanz MGte5	8
3.1.3 Einwaage der Testsubstanzen	8
3.1.4 Pipettierschema der Testsubstanzen MGte4 und MGte5	9
3.2 Tyrodelösung und Begasung	10

3.3	Vorkontraktion isolierter Organpräparate durch Kaliumchloridlösung	11
3.4	Versuchstiere	12
3.4.1	Anatomie von Meerschweinchen	13
3.4.2	Präparation der Organe	14
3.4.2.1	Isolierung des rechten Vorhofes	14
3.4.2.2	Isolierung der Pulmonalarterie	16
3.4.2.3	Isolierung des Papillarmuskels	17
3.4.2.4	Isolierung der Aorta	18
3.4.2.5	Isolierung des <i>Ileum terminalis</i>	19
3.5	Versuchsanordnung und Apparaturen	20
3.5.1	Versuchsapparatur A	21
3.5.2	Versuchsapparatur B	23
3.5.3	Gasversorgung	25
3.6	Versuchsablauf	25
3.6.1	Versuchsablauf am <i>Musculus papillaris</i>	26
3.6.2	Versuchsablauf am <i>Atrium cordis dextrum</i>	28
3.6.3	Versuchsablauf an der <i>Arteria pulmonalis</i>	29

3.6.4	Versuchsablauf an der <i>Aorta descendens</i>	30
3.6.5	Versuchsablauf am <i>Ileum terminalis</i>	31
3.7	Datenauswertung	32
3.7.1	Datenauswertung am Papillarmuskel	32
3.7.2	Datenauswertung am rechten Vorhof	33
3.7.3	Datenauswertung an der Aorta, Pulmonalarterie und am Dünndarm	34
3.8	Statistik	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Wirkung der Testsubstanz MGte4	36
4.1.1	Wirkung der Testsubstanz MGte4 am Papillarmuskel	36
4.1.2	Wirkung der Testsubstanz MGte4 auf das <i>Atrium cordis dexter</i>	40
4.1.3	Wirkung von MGte4 an der Pulmonalarterie (<i>Arteria pulmonalis</i>)	43
4.1.4	Wirkung von MGte4 auf das <i>Ileum terminalis</i>	46
4.1.5	Wirkung von MGte4 auf die <i>Aorta descendens</i>	49
4.2	Wirkung der Testsubstanz MGte5	52
4.2.1	Wirkung von MGte5 auf den <i>Musculus papillaris</i>	52
4.2.2	Wirkung der Testsubstanz MGte5 auf das <i>Atrium cordis dexter</i>	55

4.2.3 Wirkung von MGte5 auf die <i>Arteria pulmonalis</i>	58
4.2.4 Wirkung von MGte5 auf das <i>Ileum terminalis</i>	61
4.2.5 Wirkung von MGte5 auf die <i>Aorta descedens</i>	64
5. Diskussion	67
5.1 Vergleich der Ergebnisse an glattmuskulären Organen	67
5.2 Vergleich der Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur	69
6. Zusammenfassung	71
7. Literaturverzeichnis	73
8. Curriculum vitae	74

1. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die neu synthetisierten Substanzen MGte4 und MGte5 bezüglich ihrer Wirkungen an isolierten und präparierten Organen von Meerschweinchen getestet.

Die Substanzen wurden am Department für Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert.

Die Prüfung hinsichtlich pharmakologischer Wirkungen wurde am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik durchgeführt.

Die Wirkung der neu entwickelten Substanzen MGte4 und MGte5 wurde an fünf verschiedenen Organen getestet.

Der Papillarmuskel wurde einer Prüfung auf Inotropie unterzogen und der rechte Vorhof wurde hinsichtlich einer chronotropen Wirkung untersucht.

Die glattmuskulären Organe wurden auf einen vasodilatatorischen bzw. spasmolytischen Effekt getestet. Dazu zählen *Arteria pulmonalis*, Aorta und terminales Ileum.

Die ideale Substanz sollte möglichst gewebespezifisch sein, also ausschließlich an einem Organ eine Wirkung zeigen. Nur so wäre es möglich diese Substanz therapeutisch zu verwenden, da eine Substanz die unterschiedliche Wirkungen an mehreren Organen zeigt, automatisch auch Nebenwirkungen hat.

Ein möglicher Wirkmechanismus wurde im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht getestet, weil hier die Wirkung von nicht nur einer, sondern zwei Substanzen untersucht wurde.

2. Einleitung

2.1 Spasmolytika

Ein Spasmolytikum ist ein krampflösendes Arzneimittel. Es senkt den Spannungszustand der glatten Muskulatur oder löst deren Verkrampfung (spasmolytisch).

Anwendungsgebiet dieser Pharmaka sind Spasmen (Krämpfe) der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts, der Gallen und Harnwege, der Bronchien und der Gefäße.

Man unterscheidet zwischen neurotrophen und myotropen Spasmolytika (Mutschler 2008).

2.1.1. Neurotrope Spasmolytika

Die Wirkung von neurotrophen Spasmolytika kommt durch eine kompetitive Blockade von muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren zu Stande. Dabei wird die Bindungsmöglichkeit für den Neurotransmitter Acetylcholin am Rezeptor kompetitiv antagonisiert.

Weil Muskarinrezeptor-Antagonisten die Wirkung des Parasympathikus hemmen, nennt man sie ursprünglich auch Parasympatholytika (Forth et al. 2013).

Acetylcholin ist ein Transmitter des parasympathischen Nervensystems. Durch diese Rezeptorblockade kommt es folglich zur Erschlaffung der glatten Muskulatur.

Indiziert sind diese Pharmaka beispielsweise bei Spasmen der glatten Muskulatur im Bereich des Magen- Darm- Traktes, der ableitenden Gallen- und Harnwege sowie der weiblichen Genitalien (Mutschler 2008).

2.1.1.1 Atropin und Scopolamin

Atropin und Scopolamin sind natürliche Alkaloide. Sie sind die kennzeichnenden

Wirkstoffe der Tollkirsche (*Atropa belladonna*) des Bilsenkrauts (*Hyoscyamus niger*) und des Stechapfels (*Datura stramonium*), alle aus der Familie der *Solanaceae*. Das Racemat Atropin entsteht bei der Extraktion aus dem von der Pflanze synthetisierten Hyoscyamin (Forth et al. 2013).

Neben der pupillenerweiternden Wirkung (Mydriatikum), weist Atropin eine spasmolytische Wirkung im Bereich des Magen- Darm- Traktes auf. Es kann sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden (Mutschler 2008).

Atropin hemmt die Kontraktion der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Kanals, der Gallenwege, der Ureter und der Harnblase sowie die Magensäuresekretion. Die dafür notwendigen Dosierungen blockieren aber auch andere Muskarinrezeptoren und führen z.B. zu Mundtrockenheit und Tachykardie. Solche Nebenwirkungen sollten beim Butylscopolamin geringer sein (Forth et al. 2013).

Scopolamin besitzt eine zentraldämpfende Wirkung und wird hauptsächlich als transdermales therapeutisches System bei Reisekrankheit eingesetzt. Der antiemetische Effekt kommt dabei durch die zentralnervöse antimuscarinische Wirkung zustande (Mutschler 2008).

Atropin wirkt in therapeutischen Dosen wenig auf das Zentralnervensystem, in grösseren Dosen erregend, gepaart mit Unruhe, Desorientiertheit und Halluzinationen.

Scopolamin wirkt in kleinen Dosen zentraldämpfend, in größeren ebenfalls erregend (Forth et al. 2013).

2.1.1.2 Butylscopolamin und Ipratropium

Diese Substanzen sind nicht subtypselektive quartäre Derivate der natürlichen Alkaloide. Ihre Polarität lässt sie die Blut-Hirn-Schranke kaum durchdringen- zentrale Nebenwirkungen sind daher kaum zu befürchten. Die Polarität führt aber auch zu geringem Eindringen ins Auge nach konjunktivaler Applikation und zur schlechten

Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal und es verwundert, dass zuweilen gleiche Dosen für parenterale, orale oder rektale Gabe empfohlen werden (z.B 10-20 mg Buscopan).

Man sagt dem Butylscopolamin eine gewisse Präferenz für den Magen-Darm-Kanal, die Gallen- und die Harnwege nach, bei geringerer Wirkung etwa auf die Speicheldrüsen und verwendet es daher häufig bei Spasmen der glatten Muskulatur dieser Organe (Forth et al. 2013).

2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika

Bei muskulotropen Spasmolytika kommt es zur Erschlaffung der glatten Muskulatur durch direkte Einwirkung der Substanzen auf glatte Muskelzellen. Das vegetative Nervensystem spielt in diesem Fall keine Rolle. (Mutschler 2008)

Diese Verbindungen werden nach dem Prototyp Papaverin als papaverinartige Spasmolytika bezeichnet (Oberdisse 2002).

2.1.2.1 Papaverin

Papaverin, ein Isochinolin- Alkaloid, ist zu etwa 1% im Rohopium enthalten. Seine erschlaffende Wirkung auf die glatte Muskulatur ist nicht nur auf die des Magen-Darm-Traktes beschränkt, sondern betrifft, aufgrund der Phosphodiesterase- Hemmung auch die glatte Muskulatur in anderen Organsystemen wie Gefäßen und Bronchien, besonders dann wenn eine Tonuserhöhung besteht. Indiziert ist Papaverin bzw. sein Derivat Moxaverin bei Spasmen des Magen-Darm-Traktes, der ableitenden Gallen- und Harnwege sowie des Bronchialsystems. Die iv. Gabe muss unter besonderer Vorsicht und sehr langsam erfolgen, da es wegen der gefässdilatierenden und chinidinartigen Wirkungen zum Blutdruckabfall bzw. zu Herzrhythmusstörungen kommen kann. Daher ist die Gabe von Papaverin heute obsolet (Oberdisse 2002).

2.1.2.2 Tiropramid

Ein neueres muskulotropes Spasmolytikum ist Tiropramid, dass ebenfalls ein Hemmstoff der Phosphodiesterasen ist und damit zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischen Nukleotiden führt. Die Nebenwirkungen betreffen vor allem das ZNS mit Schläfrigkeit, Benommenheit und Schwindel. Wegen der relaxierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur der Gefäße kann es bei sehr hohen Dosen zu einem Abfall des Blutdrucks kommen (Oberdisse 2002).

2.1.2.3 Weitere muskulotrope Spasmolytika

Weitere muskulotrope Spasmolytika, teils mit anticholinergem Komponente, sind Mebeverin, Drofemin und Oxybutynin, die zur Behandlung von Spasmen im Bereich des Magen-Darm-Traktes und der ableitenden Harn- und Gallenwege eingesetzt werden.

Ein kompetitiver Muskarinrezeptorantagonist mit einer gewissen Bevorzugung der Blasenmuskulatur ist Tolterodin, der zur Behandlung der instabilen Harnblase mit Harndrang, Pollakiesurie und Dranginkontinenz eingesetzt wird. Die Miktionsfrequenz wird gesenkt und die Blasenkapazität erhöht. Im Vordergrund der Nebenwirkungen stehen anticholinerge Symptome (Oberdisse 2002).

2.1.3. Organische Nitrate

Heute werden therapeutisch bei *Angina pectoris* folgende organischen Nitrater verwendet: Glyceroltrinitrat (Nitroglycerin, GTN), Pentaerythryltetranitrat (PETN), Isosorbid 2,5-dinitrat (ISDN) und Isosorbid-5-mononitrat (ISMN). Diese organischen Nitrater werden in der glatten Muskulatur der Gefäße metabolisiert. Trotz ihrer erheblichen therapeutischen Bedeutung und ihrer 130-jährigen therapeutischen Anwendung ist der molekulare Mechanismus ihrer Bioaktivierung immer noch nicht

vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass aus organischen Nitraten NO entsteht, die die löslichen Guanylylcyclase aktivieren, dadurch cGMP erhöhen und eine Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur auslösen kann.

Alle Pharmaka, die unter Vermittlung von NO Gefäße dilatieren, werden als Nitrovasodilatoren oder NO-Donatoren bezeichnet (Forth et al. 2013).

3. Materialien und Methoden

3.1 Testsubstanzen MGte4 und MGte4

Beide Testsubstanzen wurden am Department für medizinische und pharmazeutische Chemie von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert.

MGte4 und MGte5 werden im Rahmen meiner Diplomarbeit einer ersten Testung der pharmakologischen Wirkung beider Substanzen unterzogen.

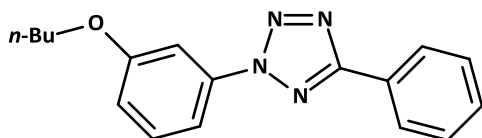
3.1.1 Nomenklatur und Strukturformel der Testsubstanz MGte4

Die Nomenklatur der Testsubstanz MGte4 lautet : 2-(3-butoxyphenyl)-5-phenyl-tetrazol.

Das Molekulargewicht dieser Testsubstanz beträgt 294.35 g/mol und die Substanz ist in Dimethylsulfoxid(DMSO) vollständig löslich.

Die Abbildung 1 zeigt die Strukturformel der Testsubstanz MGte4

Abb. 1

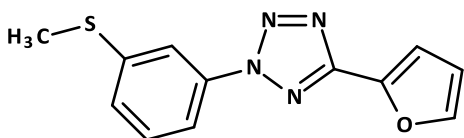


3.1.2 Nomenklatur und Strukturformel der Testsubstanz MGte5

Die Testsubstanz MGte5 wurde als 5-(2-furyl)-2-(3-methylsulfanylphenyl)tetrazol bezeichnet. Das Molekulargewicht dieser Testsubstanz beträgt 258.30 g/mol und die Substanz ist in Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig löslich.

Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformel der Testsubstanz MGte5

Abb. 2



3.1.3 Einwaage der Testsubstanzen

Beide Testsubstanzen wurden entsprechend der Größe des Organbades eingewogen.

Tabelle 1 zeigt die Einwaage der Testsubstanzen MGte4 und MGte5

Tab.1

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz(100µmpl/l)
MGte4	294.35	8 ml	0,24 mg
		25 ml	0,74 mg
MGte5	258.30	8 ml	0,21 mg
		25 ml	0,65 mg

3.1.4 Pipettierschema der Testsubstanzen MGte4 und MGte5

Die beiden Testsubstanzen sind wasserunlöslich und mussten in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden. Das ist ein dipolares Lösungsmittel und besonders gut für die Versuche geeignet, da es in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar ist. Die Stammlösung wurde täglich frisch vorbereitet und die gelöste Substanz konnte man am nächsten Tag nicht mehr verwenden. DMSO hat auch eine geringe Eigenwirkung auf die Organe, was man bei der Auswertung berücksichtigen musste.

Nachdem die konstante Kontrollphase erreicht war, wurden die Stammlösungen von 3 µl, 7 µl, 20 µl und 70 µl in Intervallen von 45 min in das Organbad mittels Eppendorfpipette injiziert. Die Zeitspannen von 45 min sollten einen konstanten Blutplasma Spiegel an Wirkstoffen gewährleisten. Die Stammlösung sollte vorsichtig, ohne dabei irgendwas zu berühren und immer im gleichen Bereich injiziert werden.

Tabelle 2 Pipettierschema von MGte4 und MGte5

Tab.2

Zeitpunkt	Volumen	Konzentration im Organbad
0 min	3 µl	3 µl
45 min	7 µl	10 µl
1:30 h	20 µl	30 µl
2:15 h	70 µl	100 µl
3:00 h	Versuchsende	Versuchsende



3.2 Tyrodelösung und Begasung

Bei der Tyrodelösung handelt es sich um eine modifizierte Krebs- Henseleit- Lösung, die dazu verwendet wurde um die isolierten Organe gleich nach der Entnahme und auch während der Präparation und Durchführung der Versuche, künstlich am Leben zu erhalten. Die nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode benannte physiologische Elektrolytlösung weist eine unterschiedliche Ionenzusammensetzung auf und musste täglich nach den Vorschriften von Reiter in einem zwei Liter Messkolben frisch zubereitet werden, während die dazu verwendeten Stammlösungen in größeren Mengen hergestellt wurden.

Um sowohl einen konstanten pH- Wert im physiologischen Bereich (pH 7,2- 7,4), als auch eine gute Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können, wurde die Nährlösung kontinuierlich mit Oxymix™ beziehungsweise Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Molakulargewicht	Stammlösung	ml Stammlsg. / l Tyrode	mmol/ l
NaCl	58,442 g/mol	1000,25 g/5l	33,60 ml	115,01
KCl	74,550 g/mol	50,33 g/5l	35,00 ml	4,73
NaHCO₃	84,010 g/mol	125,00 g/5l	83,70 ml	24,91
MgSO₄	120,370 g/mol	147,02 g/5l	1,18 ml	0,29
KH₂PO₄	136,090 g/mol	62,00 g/5l	1,18 ml	2,15
CaCl₂	110,980 g/mol	34,00 g/5l	3,20 ml	3,92
Glucose	180,160 g/mol	Reinsubstanz	1,98 g	-

Zur Bereitung der Tyrodelösung wurden die entsprechenden Mengen (s. o.) der Stammlösungen, bis auf die von Calciumchlorid, mit Hilfe einer Bürette nacheinander in einen zwei Liter Messkolben eingefüllt und die Glucose eingewogen und hinzugefügt. Der Messkolben wurde anschließend mit *Aqua bidestillata* auf etwa 75% des Endvolumens aufgefüllt. Die verbliebene CaCl₂- Stammlösung wurde in ein Becherglas pipettiert und etwa 15 Minuten mit Oxymix™ über ein Schlauchsystem begast, um eine vollständige Sauerstoff- und Kohlendioxidsättigung zu gewährleisten. Um ein Ausfallen schwerlöslicher Calciumsalze und eine damit einhergehende Trübung der Tyrodelösung zu vermeiden, musste die nun gesättigte Stammlösung tropfenweise in den Kolben pipettiert werden. Nach einer weiteren Begasung von etwa zehn Minuten wurde der Messkolben bis zur 21 Volumsmarke mit destillierten Wasser aufgefüllt und durch Schwenken homogenisiert. Die so gewonnene Tyrodelösung wurde unter anderem für die Herstellung von Kaliumchlorid- Lösung, zum Spülen und Befüllen der Organbäder, zur Aufbewahrung und zum Transport der Präparate verwendet.

3.3 Vorkontraktion isolierter Organpräparate durch Kaliumchloridlösung

Die täglich hergestellten Kaliumchloridlösungen wurden benötigt um eine maximale Kontraktion und konstante Versuchsbedingungen der Präparate zu gewährleisten. Die durch die Lösung verursachte Vorkontraktion war notwendig um eine mögliche vasodilatierende bzw. spasmolytische Aktivität der glatten Muskulatur durch die Testsubstanz feststellen zu können.

Die quergestreifte Muskulatur des *Musculus papillaris* wurde in einem physiologischen Nährmedium elektrisch gereizt, wodurch keine KCl-Lösung nötig war. Das einzige Präparat bei dem keine Vorkontraktion notwendig war, ist das Atrium cordis dexter, da es am Sinusknoten ein spontanes Erregungsbildungssystem besitzt.

Für das terminale Ileum wurde die Kaliumchlorid-Lösung mit einer Konzentration von 60 mmol verwendet und eine mit 90 mmol für Aorta und *Arteria pulmonalis*.

Die benötigten Mengen an KCl in einen Messkolben à 100 ml eingewogen und mit Tyrode auf 100 ml aufgefüllt.

Tabelle 4: Kaliumchlorid-Lösung für die Vorkontraktion

Organpräparat	Kaliumchlorid-Einwaage (in g)	Volumen der Nährlösung (in ml)
Ileum terminalis	0,45	100
Aorta	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100

3.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden etwa 6 – 10 Wochen alte, 400 – 600 g schwere Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) der Zuchtlinie „TRIK“ verwendet, da die Charakteristika ihrer Ionenkanäle denen der Menschen sehr ähnlich sind.

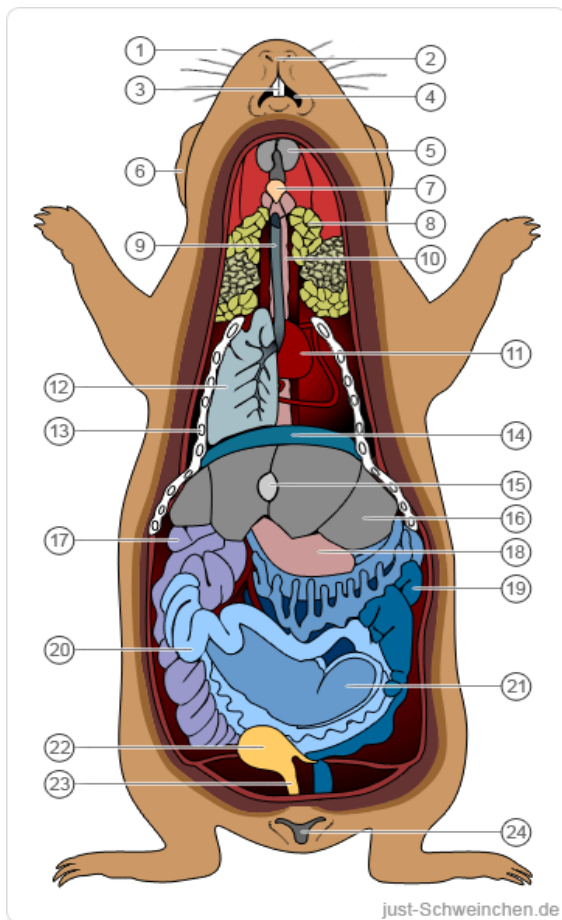
Nach der schnellen Tötung der Versuchstiere durch Fachpersonal wurden Abdomen und Thorax durch einen Längsschnitt geöffnet um die zu untersuchenden Organe so schnell wie möglich heraus zu präparieren, in eine vorbereitete Tyrodelösung zu transferieren und mit Oxymix™ zu begasen um die physiologischen Bedingungen auch nach der Entnahme zu gewährleisten und ein Absterben der Organe zu vermeiden.

Als erstes wurde das noch schlagende Herz entnommen, danach wurde ein Ende des etwa 20 cm langen Stück des Dünndarms (*Ileum terminalis*) mit einem roten Faden abgebunden (um die beiden Enden später nicht zu verwechseln) und entnommen. Als nächstes musste die thorakale Aorta mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette entlang des Rippenbogens heraus präpariert werden ohne sie zu dehnen. Präparation der Organe

Abbildung 3: Sezierbesteck



3.4.1 Anatomie von Meerschweinchen



- | | |
|------|---------------------------------------|
| 1 : | Schnurr-/Tasthaare |
| 2 : | Nase |
| 3 : | Zähne (obere Schneidezähne) |
| 4 : | Mundhöhle |
| 5 : | Lymphdrüsen |
| 6 : | Ohren |
| 7 : | Kehlkopf |
| 8 : | Speicheldrüsen |
| 9 : | Luftröhre (hier verkürzt dargestellt) |
| 10 : | Speiseröhre (liegt hinter Luftröhre) |
| 11 : | Herz |
| 12 : | Lungenflügel (2. fehlt in Abb.) |
| 13 : | Rippen/Brustkorb |
| 14 : | Zwerchfell |
| 15 : | Gallenblase |
| 16 : | Leber (4-teilig) |
| 17 : | Zwölffingerdarm |
| 18 : | Magen |
| 19 : | Dickdarm |
| 20 : | Dünndarm |
| 21: | Blinddarm |
| 22: | Blase |
| 23: | Harnleiter |
| 24: | Anus |

3.4.2 Präparation der Organe

Abbildung 4: Präparierbesteck und Lichtmikroskop



Die Präparation der Meerschweinchenorgane erfolgte aufgrund ihrer geringen Größe unter dem Lichtmikroskop (Nikon SMZ-10 A, Japan). Die Petrischalen aus Glas wurden mit dünnen Korkboden ausgelegt, der mit einem Gummischlauch am Rand fixiert wurde, zu drei Viertel mit Nährlösung befüllt und mit Oxymix™ begast. An dem Korkboden wurden die zu präparierenden Organe mit Stecknadeln fixiert. Anschließend wurden mit Präparierbesteck, wie z.B. Pinzette und Federgriff- Mikroschere umgebendes Fett- und Muskelgewebe entfernt.

Man musste während des gesamten Vorgangs schnell und präzise arbeiten um zu verhindern, dass das Gewebe zu lange im unbegasteten oder trockenen Zustand blieb und zudem nicht überdehnt oder verletzt wurde, da der Versuch an einem beschädigten Präparat nicht mehr durchführbar war bzw. die Ergebnisse verfälscht wurden.

3.4.2.1 Isolierung des rechten Vorhofes (*Atrium cordis dextrum*)

Die rasche Explantation des noch schlagenden Herzen war sehr wichtig für die Isolierung der einzelnen Präparate, wie dem rechten Vorhof und die Pulmonalarterie.

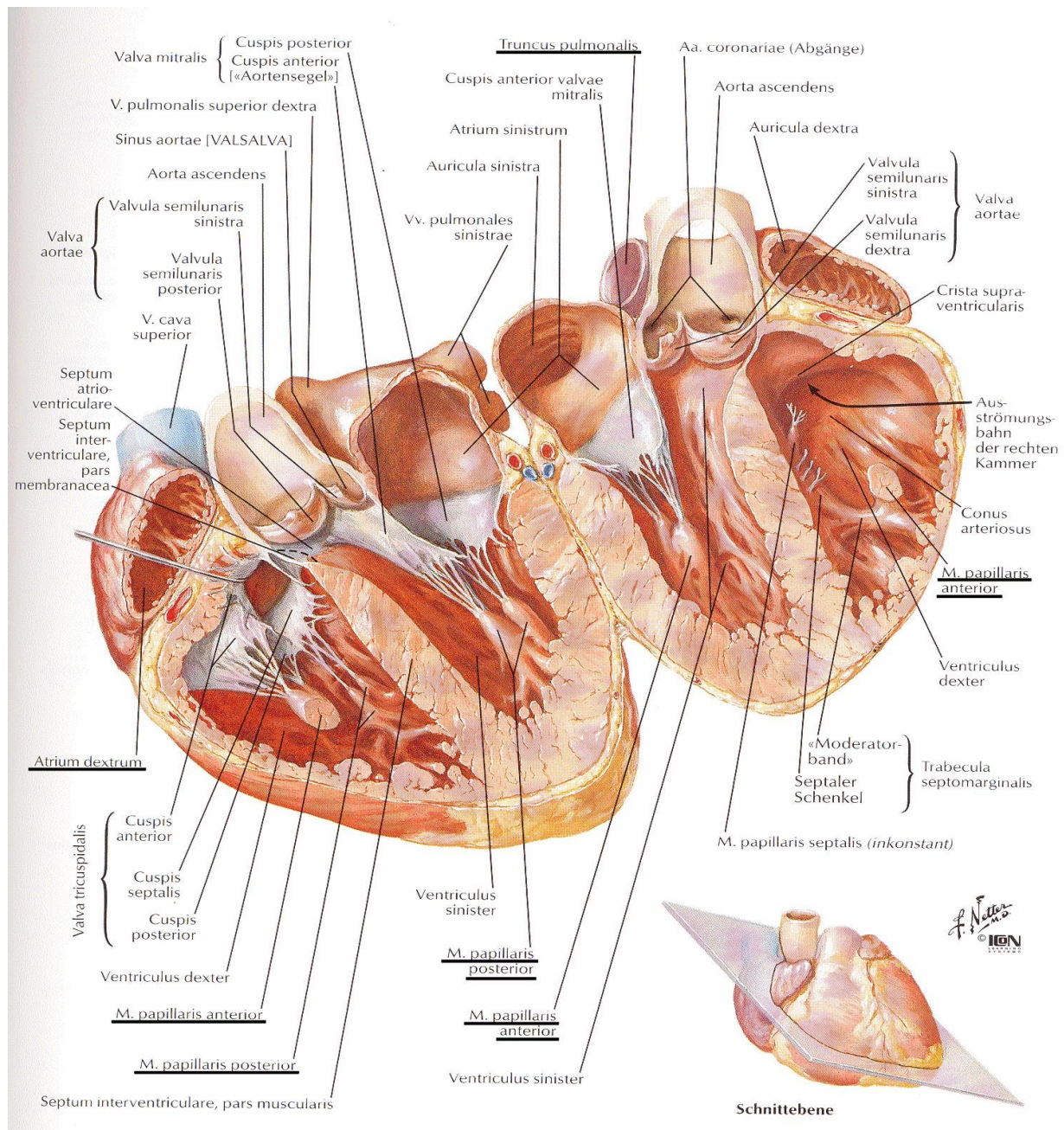


Abbildung 5 : Die Anatomie des Herzen

Um den *Atrium cordis dextrum*, inklusive Sinusknoten zu isolieren, musste das Herz erst mit Hilfe einer Federgriffschere unter dem Lichtmikroskop von noch anhaftenden Lungen- und Fettgewebe befreit werden. Danach wurde das Perikard vorsichtig geöffnet und der rechte Vorhof durch einen präzisen Schnitt entlang des *Sulcus coronarius* isoliert.

Am oberen – durch weißes Fettgewebe zu erkennen - und unteren Ende des rechten

Vorhofes wurden nun zwei kleine Häkchen aus Silberdraht mit dünnem Bindfaden in je einer anderen Farbe, befestigt um das Präparat anschließend im Elektrolytbad, mit Oxymix™ begast, in die Versuchsanordnung einzuspannen.

Das präzise Arbeiten war sehr wichtig, da eine Verletzung des Sinusknotens die Fähigkeit spontane Erregungen zu bilden, zerstört und das Herz dadurch nicht mehr geschlagen hätte.



Abbildung 6: Isolierung des rechten Vorhofes

3.4.2.2. Isolierung der Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*)

Nachdem der rechte Vorhof isoliert war, wurde nun die Pulmonalarterie abgetrennt. Auch hier war präzises Arbeiten sehr wichtig, da nur das etwa 1 cm lange Stück des *Truncus pulmonalis*, der von der rechten Herzkammer bis zur Aufgabelung in die rechte und linke Arterie reicht, verwendet werden konnte.

Die isolierte Pulmonalarterie wurde an dem Korkboden fixiert und überschüssiges Fett- und Muskelgewebe entfernt. Danach wurde das gereinigte Präparat vorsichtig in etwa 3

mm lange Ringe geschnitten und sofort, diesmal ohne Häkchen, direkt in die Versuchsanordnung eingespannt. Bis zum Einspannen musste das Präparat in Tyrodelösung mit Oxymix™ begast werden.

3.4.2.3 Isolierung des Papillarmuskels (*Musculus papillaris*)

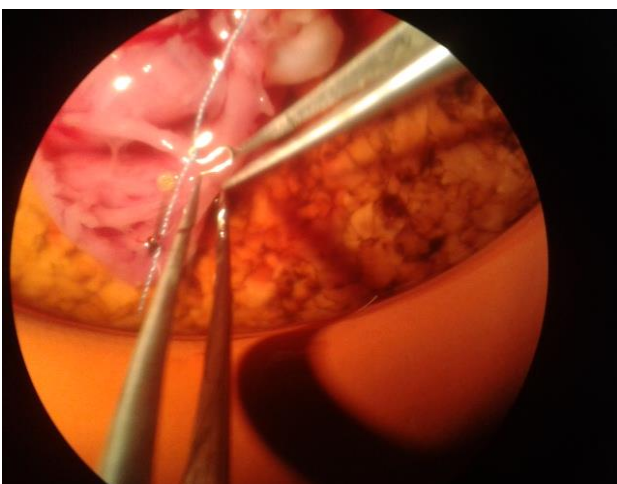
Nach der erfolgreichen Isolierung der anderen beiden Präparate konnte nun der Papillarmuskel aus dem Meerschweinchenherzen herausgetrennt werden.

Der durch nervliche Impulse stimulierte *Musculus papillaris* befindet sich zwischen Vorhof (Atrium) und Herzkammer (Ventrikel) und ist verantwortlich für ffnen und schließen der Herzklappen. Aufgrund seiner Kontraktion am Beginn der Kammersystole eignet er sich gut zur Untersuchung der Inotropie.

Um den Papillarmuskel zu freizulegen mussten der rechte und linke Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten, geöffnet und anschließend mit Stecknadeln fixiert werden.

Die Purkinje-Fasern, die das Erregungsleitungssystem des Muskels bilden mussten entfernt werden um spontane Aktivität zu vermeiden, da dies den Versuch beeinträchtigen könnte. Danach wurde ein Silberdrahthkchen mit Hilfe eines Fadens am Ansatz der Papillarmuskelsehne befestigt, der Muskel vollständig herausgeschnitten und bis zum Einspannen in die Versuchsanordnung in mit Oxymix™ begaster Nährlösung aufbewahrt.

Abbildung 7: Isolierung des Papillarmuskels



3.4.2.4 Isolierung der Aorta (*Aorta descendens*)

Die Aorta, die sich entlang des thorakalen Bereichs der Wirbelsäule befindet, musste mit Hilfe einer Pinzette angehoben und dann vorsichtig herausgeschnitten werden. Das etwa 3 cm lange Stück wurde in einer mit Tyrodelösung gefüllten Petrischale fixiert und vorsichtig von Fett- und Muskelgewebe, sowie von im Lumen gestocktem Blut befreit. Dabei ist darauf zu achten, dass das Präparat nicht verletzt wird und das überschüssige Gewebe vollständig entfernt ist, um eine eventuelle Einlagerung der Testsubstanz zu vermeiden. Nach erfolgreicher Reinigung wird die Aorta in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten und direkt, ohne Häkchen, in die Versuchsanordnung eingespannt.

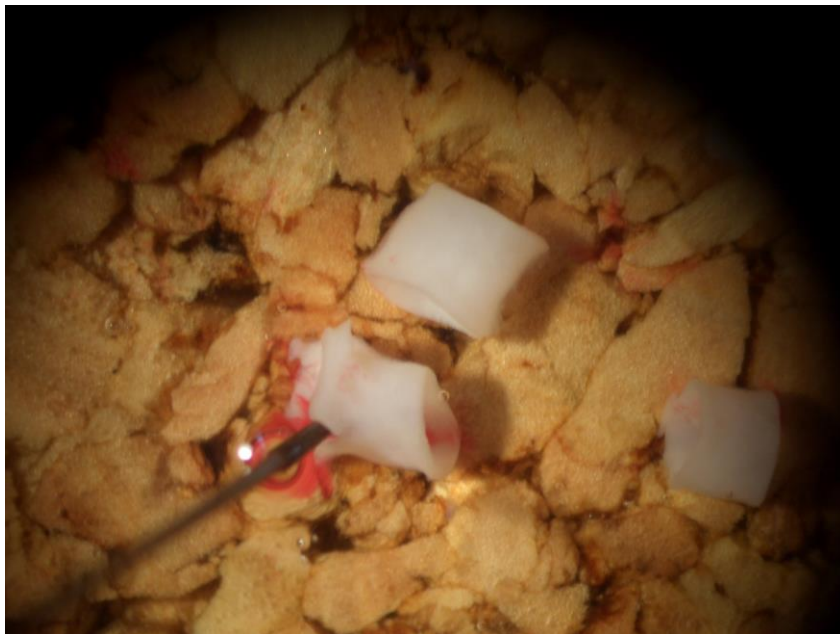


Abbildung 8: Isolierung der Aorta

3.4.2.5 Isolierung des *Ileum terminalis*

Nach der Entnahme der obigen Präparate kann zuletzt auch das *Ileum terminalis*, neben *Duodenum* und *Jejunum* der dritte Abschnitt des Dünndarms, entnommen werden. Dazu musste das Abdomen mit Hilfe einer OP- Schere in Längsrichtung aufgeschnitten werden um den Übergang von Dickdarm in Dünndarm zu lokalisieren. Danach wird das jejunale Ende mit einem Bindefaden abgebunden und ein etwa 20 cm langes Stück isoliert.

Die weitere Präparation erfolgte unter dem Lichtmikroskop, in einer mit Nährlösung gefüllten und mit Oxymix™ begasten Petrischale, wo ein etwa 0,5-1 cm langes Stück schräg abgeschnitten wurde, um eine möglichst große Öffnung zu erhalten und das Dünndarmstück ohne es zu überdehnen mit Präpariernadeln fixiert wurde um ein Einrollen zu verhindern. Nach dem Fixieren wurde mit einer Pasteurpipette und Tyrodelösung durchgespült um mögliche Chymusreste zu entfernen.

Die Häkchen wurden am jejunalen und caecalen Ende mit jeweils andersfarbigen Fäden befestigt, um sie beim Einspannen in die Apparatur nicht zu verwechseln. Man musste hierbei darauf achten die Öffnungen nicht zu verschließen um eine Zirkulation der Nährstofflösung und der Testsubstanz gewährleisten zu können.

Das Präparat wurde bis zum Versuch in Tyrodelösung aufbewahrt und mit Oxymix™ begast.

3.5 Versuchsanordnung und Apparaturen

Um verlässliche und vor allem vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, mussten die Versuchsbedingungen immer gleich sein. Somit war es nötig die physiologischen Verhältnisse, wie Temperatur, pH- Wert, kontinuierliche Begasung (Oxymix™) sowie eine ständige Nährstoffzufuhr der Präparate während der Versuche konstant zu halten.

Für die Versuche an den isolierten Meerschweinchenorganen wurden zwei unterschiedliche Apparaturen (A und B) verwendet, die das gleiche Funktionsprinzip aufwiesen und sich nur hinsichtlich ihres Aufbaus und Befestigungsmechanismus voneinander unterschieden.

Beide Apparaturen verfügten über mit Oxymix™ begaste Organbäder mit

Aufhängevorrichtungen für die isolierten Präparate, wobei die Glasschalen in transparenten Kunststoffbehältnissen mit unterschiedlich temperierten Wasser umspült wurden, um eine konstante physiologische Temperatur zu gewährleisten.

Die mit Silberhäkchen fixierten Organpräparate wurden mit Hilfe eines Silberdrahtes mit einem Kraftwandler verbunden und in die jeweilige Apparatur eingespannt. Veränderungen am Organ, wie z.B. Kontraktionen wurden mit dem Kraftwandler in elektrische Signale umgewandelt und an den Amplifier (4- Channel Transducer Amplifier, WPI)weitergeleitet, der das Signal verstärkte und zu einem Schreiber (Flatbed Recorder BD112, Kipp & Zonen) weiterleitete, wo die Ergebnisse auf Millimeterpapier aufgezeichnet wurden.

Nach den Versuchen wurden die Apparaturen durch absaugen der Tyrodelösung aus dem Organbad und durch mehrmaliges Durchspülen mit verdünnter Salzsäure und *Aqua bidestillata* gereinigt.

3.5.1 Versuchsapparatur A

Mit Hilfe der Versuchsapparatur A wurde die Wirkung der Testsubstanz auf den Papillarmuskel aufgezeichnet.

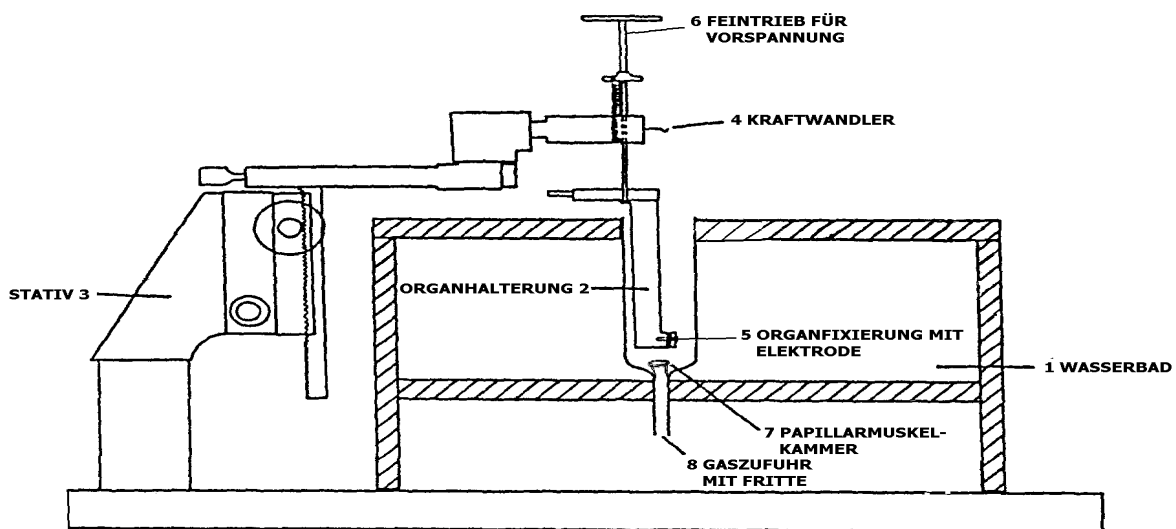
Das Wasserbad wird bis zur Markierung mit *Aqua bidestillata* aufgefüllt und mit einer Heizspirale, die mit einem Thermostat und einem Kontaktthermometer verbunden war, auf 35 °C erwärmt.

Über eine Glasfritte wurde das mit 25 ml Nährlösung gefüllte Organbad bzw. Muskelkammer mit Oxymix™ begast um sowohl eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung des Präparats zu gewährleisten als auch den pH-Wert konstant bei 7,2-7,4 zu halten.

Das Organ wurde am Ende der Organhalterung eingespannt, wo sich eine Elektrode und eine Plexiglasscheibe befanden, zwischen die, mit Hilfe einer Schraube, zwei Drittel des Papillarmuskels eingeklemmt wurde. Die Elektrode sorgte für die elektrische Stimulation des Präparats. Mit Hilfe des Feintriebs wurde eine spezifische Vorspannung angelegt um die Kontraktionskraft des Papillarmuskels zu maximieren.

Nach diesen Vorbereitungen wurde der Stativschlitten so eingestellt, dass sich zwei Drittel des Muskels im Organbad befanden.

Die Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung der Versuchsanordnung A



Nun wurden, wie bereits erwähnt, Veränderungen am Präparat über den Kraftwandler und den Amplifier an den Schreiber zur Aufzeichnung weitergeleitet.

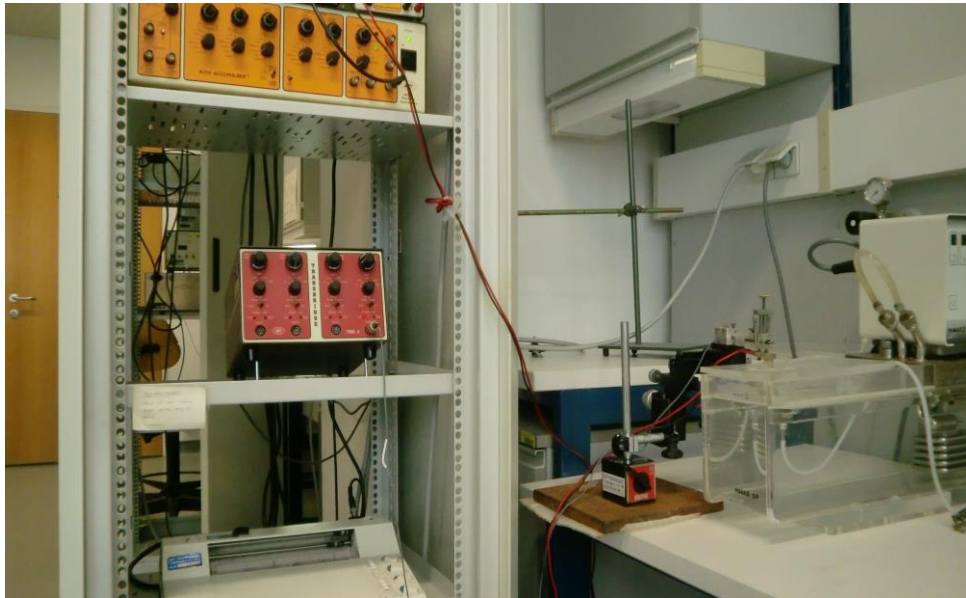
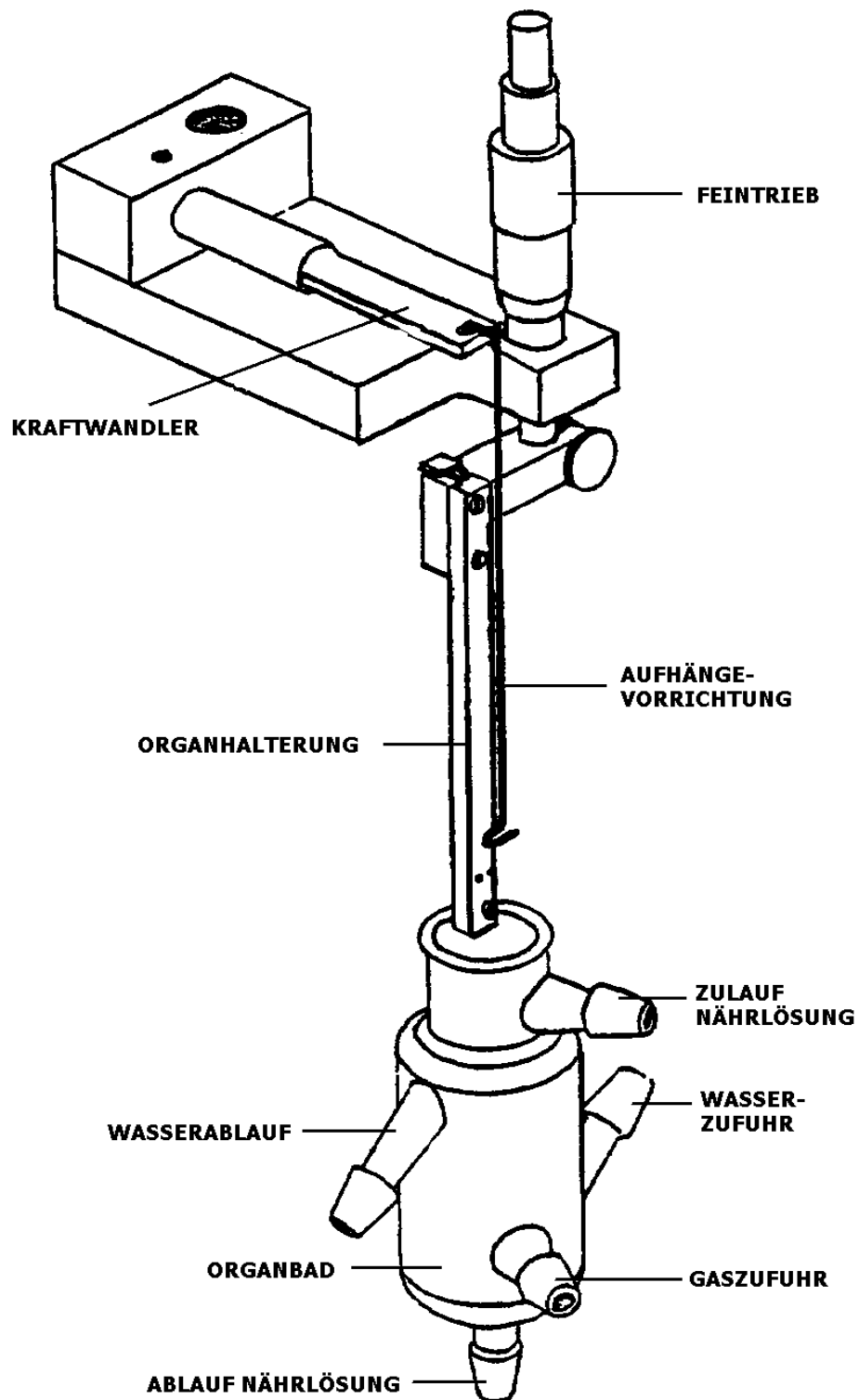


Abbildung 10 : Originalabbildung der Apparatur A

3.5.2 Versuchsapparatur B

Mit Hilfe der Apparatur B wurden die Versuche an den Präparaten *Arteria pulmonalis*, *Atrium cordis dextrum*, *Aorta descendens* und *Ileum terminalis* durchgeführt.



Die Versuche liefen ähnlich wie bei Apparatur A ab, allerdings gab es Unterschiede hinsichtlich der Größe des Organbades, der Temperatur und der Organhalterung.

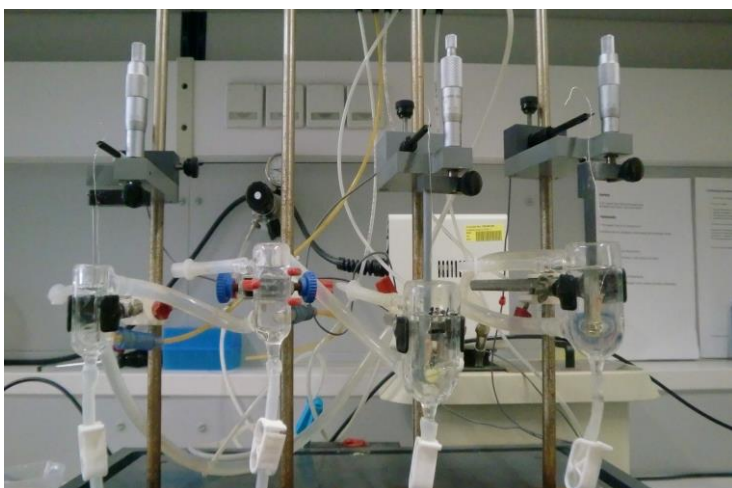
Das Organbad war eine 8 ml (möglich nur für Aorta und Pulmonalarterie) bzw. 25 ml fassende Muskelkammer aus doppelwandigem Glas, zwischen dessen Wänden sich mit Hilfe einer Heizspirale erwärmtes Wasser mit einer konstanten Temperatur von 37 °C befand.

Die Organbäder waren mit Tyrodelösung gefüllt und wurden kontinuierlich mit Oxymix™ begast.

Die vorbereiteten Präparate des *Ileum terminalis* und des *Atrium cordis dextrum* wurden mit Hilfe der zuvor angebrachten Silberhäkchen in der Apparatur fixiert während die Ringe der *Aorta descendens* und der *Arteria pulmonalis* direkt in der Aufhängevorrichtung und dem unteren Ende der Organhalterung eingespannt wurden.

Die befestigten Präparate wurden nun mit Hilfe des Stativschlittens in die Nährlösung abgesenkt, wobei darauf zu achten war, dass das Präparat die Wand des Glaszylinders nicht berührte, da es sonst zu einer Verfälschung der Ergebnisse gekommen wäre. Damit eine maximale Kontraktionskraft entsteht wurde auch hier mit dem Feintrieb eine Vorspannung angelegt. Anschließend wurden die mechanische Kontraktionen in ein elektrisches Signal umgewandelt und an den Schreiber weitergeleitet.

Abbildungen 10 und 11: Originalabbildung der Versuchsapparatur B und der Schreiber



3.5.3 Gasversorgung

Eine ausreichende Gasversorgung während Vorbereitung der Präparate und der Versuche war notwendig, da nur so eine andauernde Sauerstoffzufuhr, ein konstanter pH- Wert von 7,2-7,4 und eine gleichmäßige Verteilung der ins Organbad eingespritzten Testsubstanz gewährleistet werden konnte.

Das dazu verwendete Gasgemisch Carbogen bzw. Oxymix™ besteht zu 95% aus O₂ und zu 5% aus CO₂.

Über eine Gasleitstelle wurde die konstante und möglichst genau dosierte Gaszufuhr über mehrere Ventile und Kunststoffschläuche bis zu den Glasfritten der Versuchsapparaturen gewährleistet.



Abbildung 12 :Gashahn

3.6 Versuchsablauf

Für die Versuche am Musculus papillaris wurde Apparatur A und für jene an *Atrium cordis dextrum*, *Arteria pulmonalis*, *Ileum terminalis* und *Aorta descendens* Apparatur B verwendet.

Die Vorbereitung der Präparate und die Versuche wurden täglich nach den gleichen Methoden vorgenommen, die Geräte zu Beginn und am Ende, sowie bei jedem

Organwechsel sorgfältig gereinigt und die Organbäder mit 0,1N Salzsäure und *Aqua bidestillata* gespült um die Ergebnisse nicht durch Verunreinigungen zu beeinträchtigen.

Außerdem musste darauf geachtet werden die Testsubstanz möglichst an derselben Stelle, in Präparatnähe, ohne etwas mit der Pipette zu berühren in die Nährlösung einzuspritzen, um den Versuch nicht zu beeinträchtigen.

Die Versuche wurden mehrmals wiederholt um vergleichbare und aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können.

Tabelle 4: Pipettierschema

Applizierte Menge der Stammlösung	Endkonzentration/ Organbad
1µl	1µmol/l
2µl	3µmol/l
7µl	10µmol/l
20µl	30µmol/l
70µl	100µmol/l

3.6.1 Versuchsablauf am *Musculus papillaris*

Der vorbereitete Papillarmuskel musste in die Apparatur A eingespannt werden, da er ohne die elektrischen Impulse der Elektrode nicht fähig war selbstständig Kontraktionen zu erzeugen. Er wurde mit Hilfe des Häkchens eingehängt und zu etwa zwei Drittel zwischen die Elektrode und die Plexiglasscheibe geklemmt. Danach wurde er in das auf 35 °C temperierte, mit 25 ml Nährstofflösung gefüllte Organbad eingetaucht.

Das Gerät wurde nun auf eine Stromstärke von 5 mV (falls die Amplitude nicht groß genug war, auch auf 2 bzw. 1 mV), einen Speed von 5 mm/s und eine Vorspannung von etwa 4 mN eingestellt. Die Vorspannung musste während des gesamten Versuchverlaufs immer wieder überprüft und nachjustiert werden, um eine Abnahme der Kontraktionsfähigkeit des Präparats zu vermeiden.

Nach einer Anpassungszeit von etwa 30 Minuten wurde der Muskel mit Hilfe von Impulsen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms (~60 Amplituden/ Minute) gereizt, wobei man darauf achten musste nicht zu überreizen, da die Ergebnisse sonst verfälscht

worden wären.

In der darauf folgenden etwa 45-minütigen Kontrollphase von, wurden alle fünf Minuten fünf Kontraktionsamplituden aufgezeichnet bis eine Konstanz erreicht war.

Nun konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen werden, wobei alle 45 Minuten die nächsthöhere Konzentration (s. Pipettierschema) eingespritzt wurde und alle fünf Minuten sechs Kontraktionsamplituden aufgezeichnet wurden. Um eine möglichst übersichtliche Aufzeichnung zu erhalten, musste die Geschwindigkeit am Ende jeder Einwirkzeit bzw. Konzentrationsphase auf 20 mm/s eingestellt werden.

Die Dauer des Versuchs betrug drei Stunden, wobei alle fünf Minuten eine Messung durchgeführt wurde.

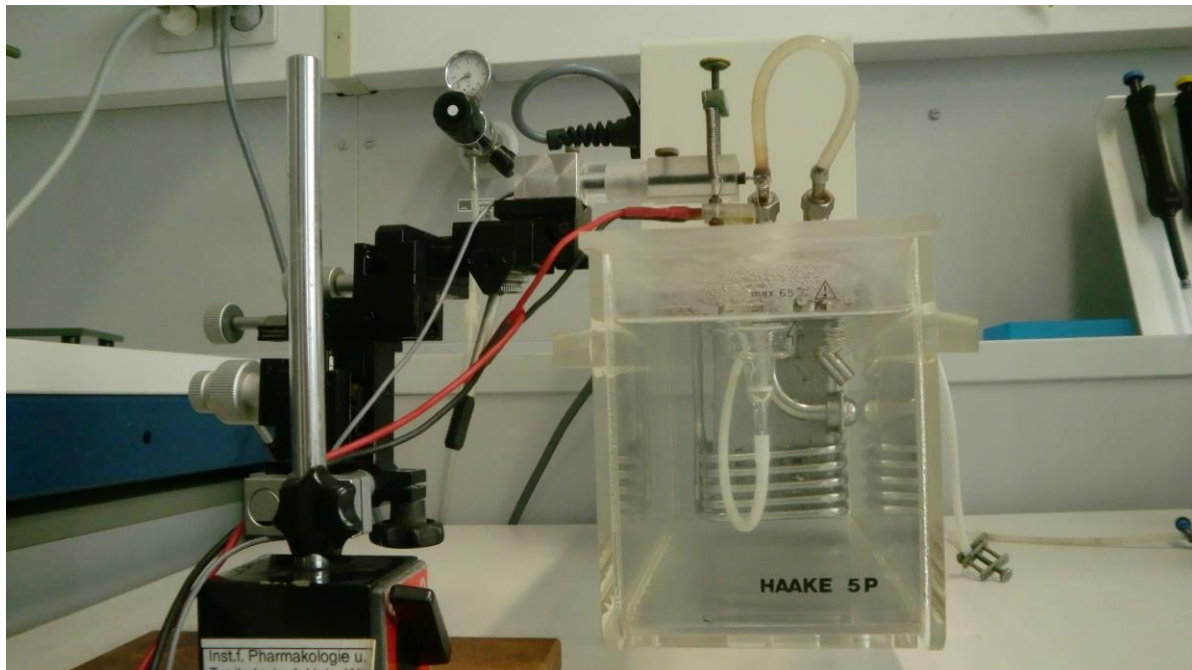


Abbildung 12: Versuchsaapparatur

3.6.2 Versuchsablauf am *Atrium cordis dextrum*

Der vorbereitete rechte Vorhof wurde mit dem oberen Ende – erkennbar am weißen Fettgewebe- oben in die Apparatur B eingespannt, wobei darauf zu achten war das Gewebe nicht zu spannen um die Autonomie des Sinusknotens, der auch ohne elektrische Stimuli fähig war spontane Schläge zu erzeugen, nicht zu gefährden. Nach dem Fixieren wird das Präparat in das Organbad eingetaucht.

Nach Inbetriebnahme des Verstärkers und des Schreibers, wurde mit dem Feintrieb bei einer Stromstärke von 5 mV und einem Speed von 5 mm/s eine Vorspannung von 10,4 mN (entspricht 10,4 cm am Millimeterpapier) eingestellt.

Während der Dauer des der 30- minütigen Anpassungszeit und des 45- minütigen Versuchs musste die Spannung häufiger nachjustiert werden, da der Vorhof wegen seiner Plastizität immer wieder nachgab.

Nach der Anpassungszeit fand die 45 Minuten dauernde Kontrollphase statt, während derer die Schlagfrequenz des Präparats auf Millimeterpapier aufgezeichnet wurde. Dabei wurde alle fünf Minuten für 12 Sekunden eine Kurve aufgezeichnet, wobei die 12 Sekunden sechs Kästchen entsprachen. Die Schlagfrequenz wurde solange kontrolliert bis man mindestens drei konstante regelmäßige Werte sehen konnte, erst dann konnte die kumulative Zugabe der Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (siehe Pipettierschema) mit Hilfe einer Kolbenhubpipette in das Organbad möglichst nah am Präparat begonnen werden.

Nach einer Einwirkzeit von jeweils 45 Minuten wurde die nächste Konzentration des Wirkstoffs eingespritzt. Die gesamte Versuchsdauer betrug drei Stunden, in denen alle fünf Minuten eine Messung durchzuführen war. Für die Auswertung der Aufzeichnungen musste die Schlaganzahl mit 5 multipliziert werden um die Schlagfrequenz pro Minute ermitteln zu können.

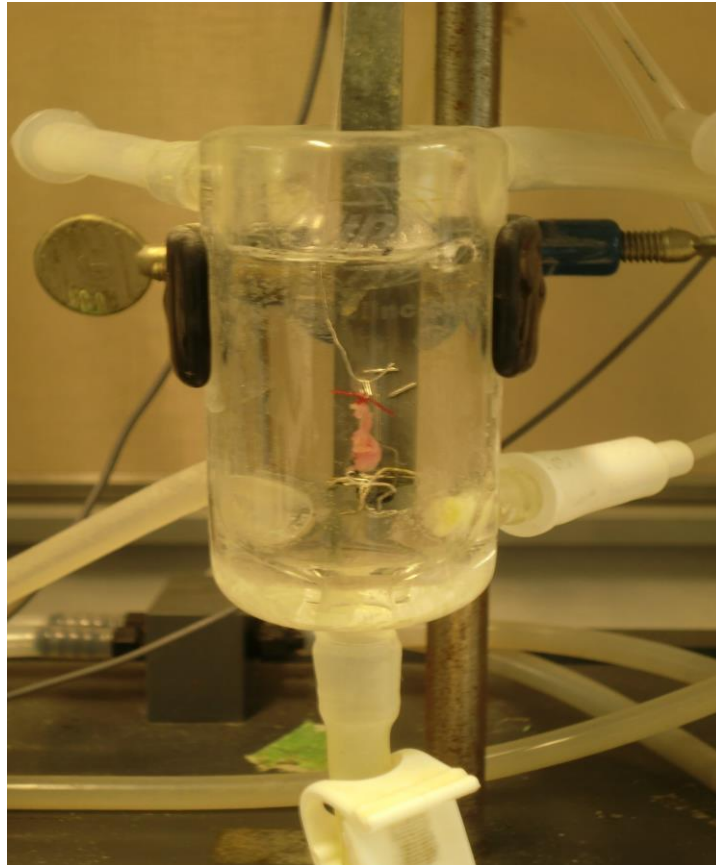


Abbildung 13: Organbad rechter Vorhof

3.6.3 Versuchsablauf an der *Arteria pulmonalis*

Die bereits vorbereiteten Ringe der Pulmonalarterie konnten direkt auf den L-förmig gebogenen Drähten der Aufhängevorrichtung von Apparatur B eingespannt werden, um dann in das im auf 37°C temperierten Wasserbad, mit 25 ml Tyrode gefüllte Organbad abgesenkt zu werden.

Das Präparat verblieb bei einer Einstellung von 5 mV, einem Speed von 1 mm/s und einer Vorspannung von 10 mN (entspricht 10 cm am Millimeterpapier) für 20 Minuten in der Nährlösung. Danach wurde die Tyrode durch 25 ml der 90 mmolaren KCl-Lösung ersetzt, um die Kontraktionskraft des Gefäßes zu maximieren. In dieser Lösung blieb das Präparat für mindestens 45 Minuten, bis die Frequenz der Kontraktionen konstant war, was durch die Aufzeichnung des Schreibers zu beobachtet wurde.

Sobald eine Konstanz festgestellt wurde, konnte mit der Einspritzung der Testsubstanz begonnen werden, wobei die verschiedenen Konzentrationen (siehe Pipettierschema) im

Abstand von 45 Minuten hinzugefügt wurden. Der Versuch dauerte drei Stunden, wobei durchgehend mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet wurde.

3.6.4 Versuchsablauf an der *Aorta descendens*

Da die Aorta, ebenso wie die Pulmonalarterie, eine ringförmige Struktur aufwies, konnte auch sie direkt in die Apparatur B eingespannt werden, wobei darauf zu achten war das Gefäß nicht zu überdehnen oder zu verletzen. Danach wurde das Präparat sofort mit Hilfe des Stativschlittens in das, durch das Wasserbad, auf 37 °C erwärmte, mit 25 ml Nährlösung befüllte Organbad eingetaucht. Nun wurde mit dem Feintrieb, der auf dem Nullpunkt positioniert worden war, eine Vorspannung von 19,6 mN bei einer Stromstärke von 10 mV und einem Speed von 5 mm/s eingestellt und es folgte eine Anpassungszeit von 20 Minuten, wobei mögliche Abweichungen mit dem Mikrometer korrigiert werden konnten.

Danach wurde der Amplifier auf 5 mV zurückgestellt, der Feintrieb wieder auf Nulllinie gebracht und die Nährlösung durch 25 ml der 90 mmolaren KCl-Lösung ersetzt, um die Kontraktionen der Aorta zu maximieren.

Nach mindestens 45 Minuten konnte anhand der Aufzeichnungen des Schreibers eine Konstanz festgestellt werden, wodurch die Zugabe der Testsubstanz nach dem Pipettierschema möglich wurde. Das Einspritzen erfolgte alle 45 Minuten in der nächsthöheren Konzentration und erfolgte möglichst immer an derselben Stelle ohne dabei das Präparat oder den Kraftwandler zu berühren.

Der Versuch dauerte insgesamt drei Stunden, wobei durchgehend mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde.

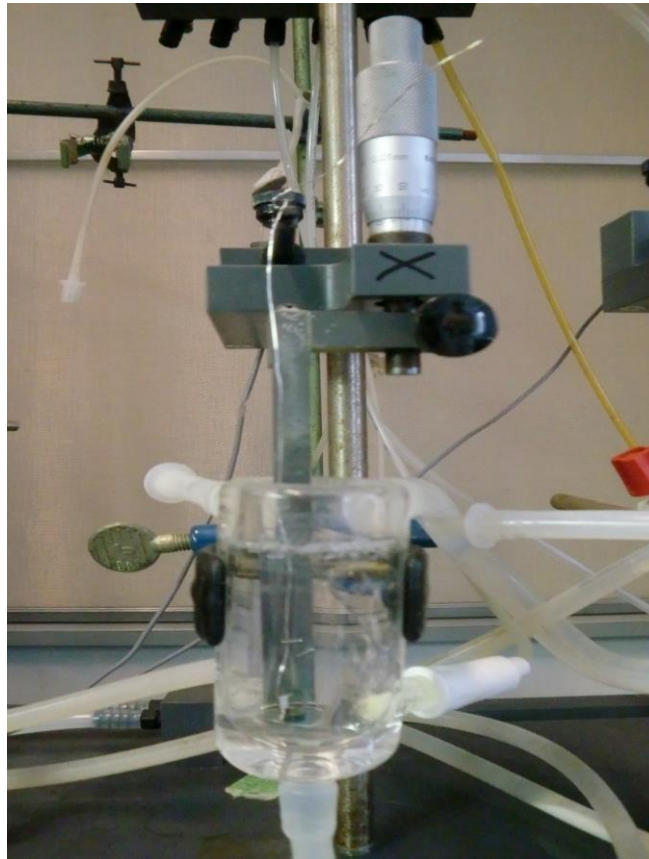


Abbildung 13: Organbad Aorta

3.6.5 Versuchsablauf am Ileum terminalis

Das vorbereitete Stück des Dünndarms wurde mit Hilfe der zuvor befestigten Silberdrahthäkchen in die Versuchsanordnung B eingespannt und dann ohne Verzögerung in das auf 37 °C temperierte, begaste, mit 25 ml Nährlösung gefüllte Organbad abgesenkt.

Das Präparat verblieb bei einer Einstellung von 5 mV, einem Speed von 1 und einer Vorspannung von 5mN 20 Minuten in der Tyrode. Danach wurde die Nährlösung abgelassen und durch 25 ml der 60 mmolaren KCl-Lösung ersetzt, um die Kontraktionskraft des Präparats zu maximieren.

Das Ileum terminalis blieb nun für mindestens 45 Minuten in dieser Lösung, bis mit Hilfe des Schreibers eine Konstanz feststellbar war.

Nachdem die Kontraktionsfrequenz konstant war, konnte mit dem Einspritzen der Testsubstanz begonnen werden, wobei im Abstand von 45 Minuten die jeweils nächsthöhere Konzentration (s. Pipettierschema) folgte.

Während der gesamten drei Stunden des Versuchs wurde eine Kurve gezeichnet.

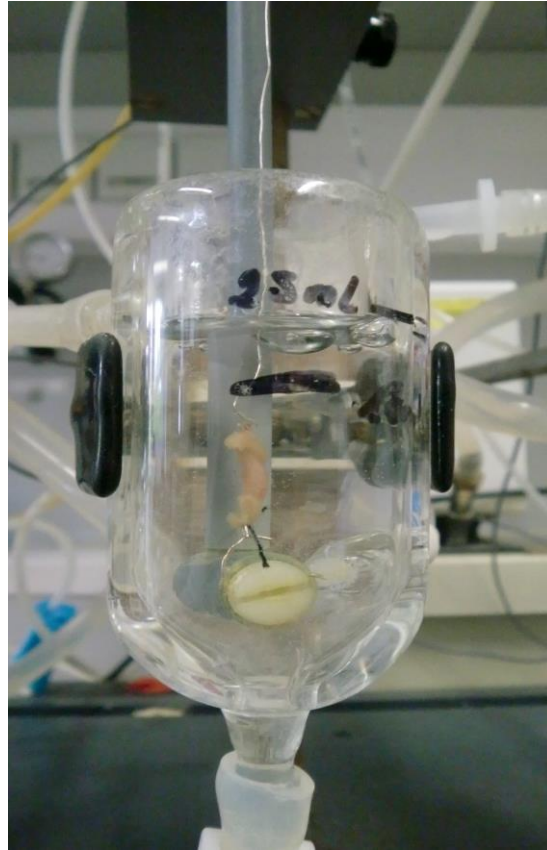


Abbildung 14: Organbad Dünndarm

3.7 Datenauswertung

3.7.1 Datenauswertung am Papillarmuskel

Die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel dient der Ermittlung einer inotropen Wirkung der Testsubstanzen MGte4 und MGte5. Sie kann in einem positiv inotropen, negativ inotropen oder neutralen Effekt resultieren.

Am Millimeterpapier erfolgt im Fünfminutentakt dazu eine Messung über 6 cm.

Anschließend werden die Amplituden der Schläge mit Hilfe eines Lineals auf 0,1 cm genau abgemessen und die Abhängigkeit der eingestellten elektrischen Spannung mit folgenden Faktoren multipliziert.

Tabelle 4: Multiplikationsfaktoren in Abhängigkeit der elektrischen Spannung

Elektrische Spannung	Multiplikationsfaktor
1mV	0,2
2mV	0,2
5mV	0,98

Die meisten Messungen wurden bei 2 mV aufgezeichnet und mit dem Faktor 0,4 multipliziert, um die Versuche zu standardisieren. Wurden aber die Versuche mit 5 mV Spannung durchgeführt, so war der Korrekturfaktor 0,98.

Nachdem die Konstanz eingestellt war, wurde der letzte Wert als Referenzwert (100%) gesetzt und die Stammlösung der Testsubstanz hinzupipettiert. Dabei kam es zu einer Kumulation der Testsubstanz.

3.7.2 Datenauswertung am rechten Vorhof

Der Versuchsablauf am rechten Vorhof diente der Ermittlung einer chronotropen Wirkung der Testsubstanzen Mgte4 und Mgte5. Sowohl eine positive als auch eine negative chronotrope Wirkung waren möglich! Ein neutraler Effekt war auch möglich!

Im Fünfminutentakt erfolgte eine Messung über 6 cm am Millimeterpapier bei einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec. Das entspricht einer Zeitspanne von 12 Sekunden.

Die Schläge über 6 cm wurden abgezählt und mussten mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um die Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten. Nachdem die Konstanz eingestellt war, wurde der letzte Wert als Referenzwert (100%) gesetzt und die Stammlösung der Testsubstanz hinzupipettiert. Dabei kam es zu einer Kumulation der Testsubstanz.

3.7.3 Datenauswertung an der Aorta, Pulmonalarterie und am terminalen Ileum

Die Versuchsdurchführung an der Aorta und an der Pulmonalarterie diente der Ermittlung einer vasodilatierenden Wirkung der Testsubstanzen.

Durch die Versuche am terminalen Ileum wurde die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz herausgefunden.

Um die Abnahme der Kontraktionskraft der isolierten Organe ermitteln zu können, mussten die Präparate zuerst chemisch mit der KCL-Lösung maximal vorkontrahiert werden. Wenn die Kontraktionskurve, die während des gesamten Versuchsablaufes mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde, die Plateauphase erreicht hatte, wurden die Testsubstanzen dazugegeben.

Die Kontraktionsamplituden, die vom Schreiber aufgezeichnet worden sind, wurden mittels eines Lineals abgemessen und mit dem Kalibrationsfaktor des Kraftwandlers (bei 5 mV:1 cm entspricht 0,98mN) multipliziert. Die genauen Messwerte wurden in mN ermittelt.

Bei den Messungen mit 2 mV oder 10 mV Spannung wurden Korrekturfaktoren 0,2 bzw 2 genommen.

Weiters wurde die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft in Bezug auf den Referenzwert ermittelt! Als letzter Schritt wurde daraus eine Konzentrationswirkungskurve erstellt, aus der dann der EC50-Wert berechnet werden konnte.

3.8 Statistik

Die Eigenwirkung des Lösungsmittels (Dimethylsulfoxid) musste berücksichtigt werden. Zuerst wurden die Messergebnisse der Versuche ausgewertet und danach der DMSO-Wirkung entsprechend substrahiert oder addiert.

Aus den Messdaten von Versuchen wurden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler(SEM=standard error of mean) berechnet und die Konzentrations-Wirkungskurven eingetragen. Die Veränderungen der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz wurden in Prozent auf die Ordinate und die injizierte Testsubstanz-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ logarithmisch auf die Abszisse aufgetragen. Das Ganze wurde mit dem Programm "Sigma Plot 9.0" gemacht.

Weiters wurde der EC₅₀-Wert auf graphischem Wege aus der Konzentrationswirkungskurve ermittelt. Dieser Wert ist jene effektive Konzentration meiner Testsubstanz, bei der

die Inotropie bzw. die Chronotropie auf die Hälfte des Ausgangswertes absinkt.

Die erhaltene Messergebnisse wurden unter Verwendung des „Student-t-Tests für gepaarte Beobachtungen“ hinsichtlich ihrer Signifikanz beurteilt, wobei die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% bzw 1% als signifikant und die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% als hochsignifikant bezeichnet wurden. Die Werte mit höheren Irrtumswahrscheinlichkeiten galten nicht als signifikant.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen die Wirkung von Testsubstanzen MGte4 und MGte5 auf die fünf verschiedenen Organe der Meerschweinchen und zwar: *Musculus papillaris*, *Aorta descendens*, *Arteria pulmonalis*, *Ileum terminalis* und *Atrium cordis dextrum*.

Pro Organ wurden mindestens vier Versuche durchgeführt, damit man eine Aussagekraft über die Wirkung erhalten kann. Nachdem die Konzentrations-Wirkungskurve für das jeweilige Organ erstellt wurde, wurden aus den erhaltenen Messdaten der arithmetische Mittelwert und die Standardfehler errechnet.

Für die Untersuchung des Wirkmechanismus meiner Substanzen mussten mindestens vier Versuche an einem Organ durchgeführt werden.

4.1 Wirkung der Testsubstanz MGte4

4.1.1 Wirkung der Testsubstanz MGte4 am Papillarmuskel (*Musculus Papillaris*)

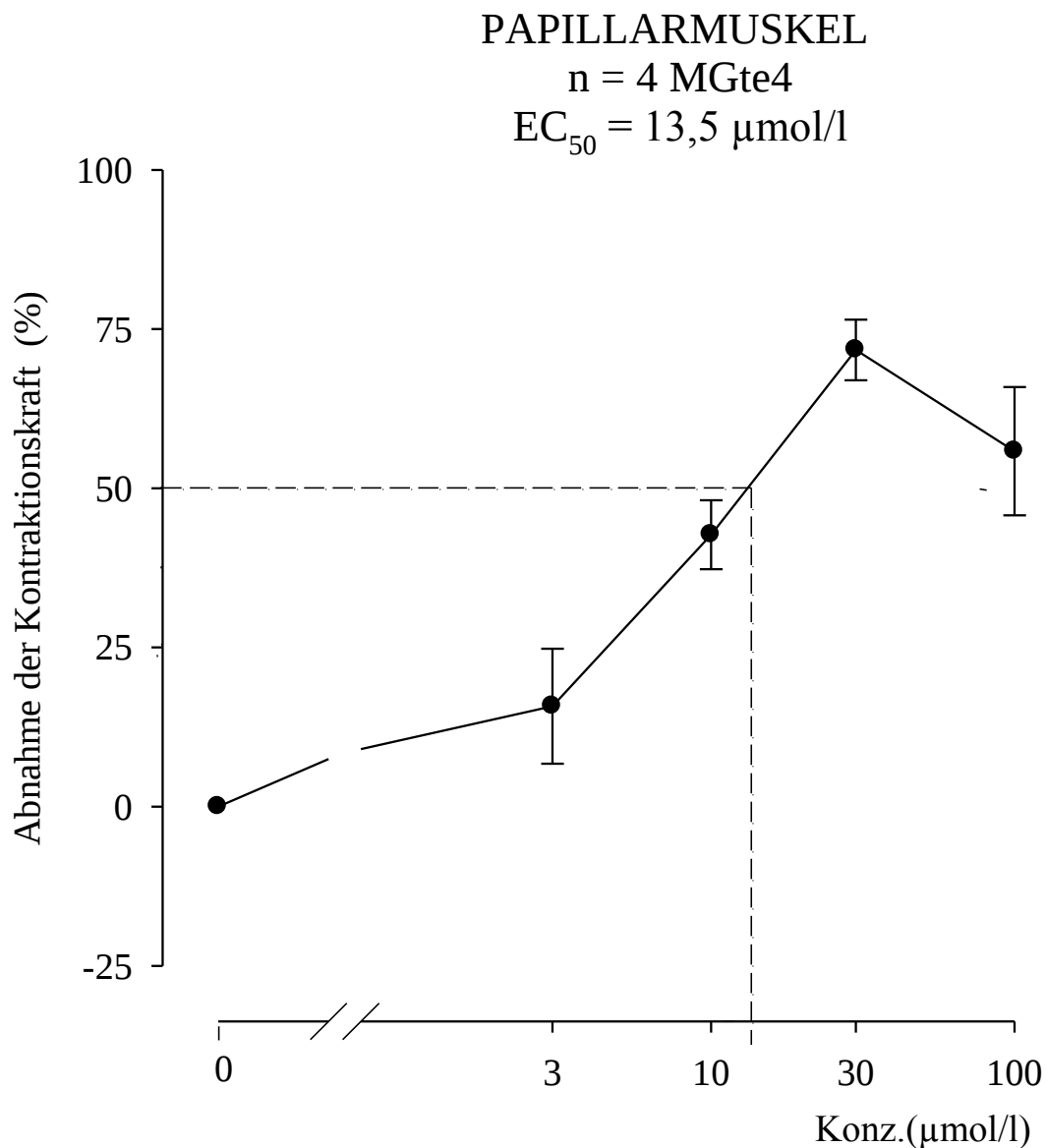
Die Wirkung der Testsubstanz auf isolierte elektrisch stimulierte *Musculus papillaris* wurde an vier Präparaten überprüft.

Tabelle 5: Wirkung von MGte4 am Musculus papillaris

MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,07 \pm 0,16$	0 ± 0	4	-
3	$1,2 \pm 0,10$	$10,03 \pm 9,72$	4	n.s
10	$1,52 \pm 0,21$	$33,83 \pm 8,83$	4	n.s
30	$1,85 \pm 0,29$	$53,86 \pm 13,04$	4	n.s
100	$1,71 \pm 0,35$	$37,67 \pm 13,30$	4	n.s

Die Tabelle 5 enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) sowohl in mN, als auch in Prozent. Weiters ist die Anzahl der durchgeführten Versuche sichtbar, sowie deren Irrtumswahrscheinlichkeit(P).

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte4 am Musculus papillaris

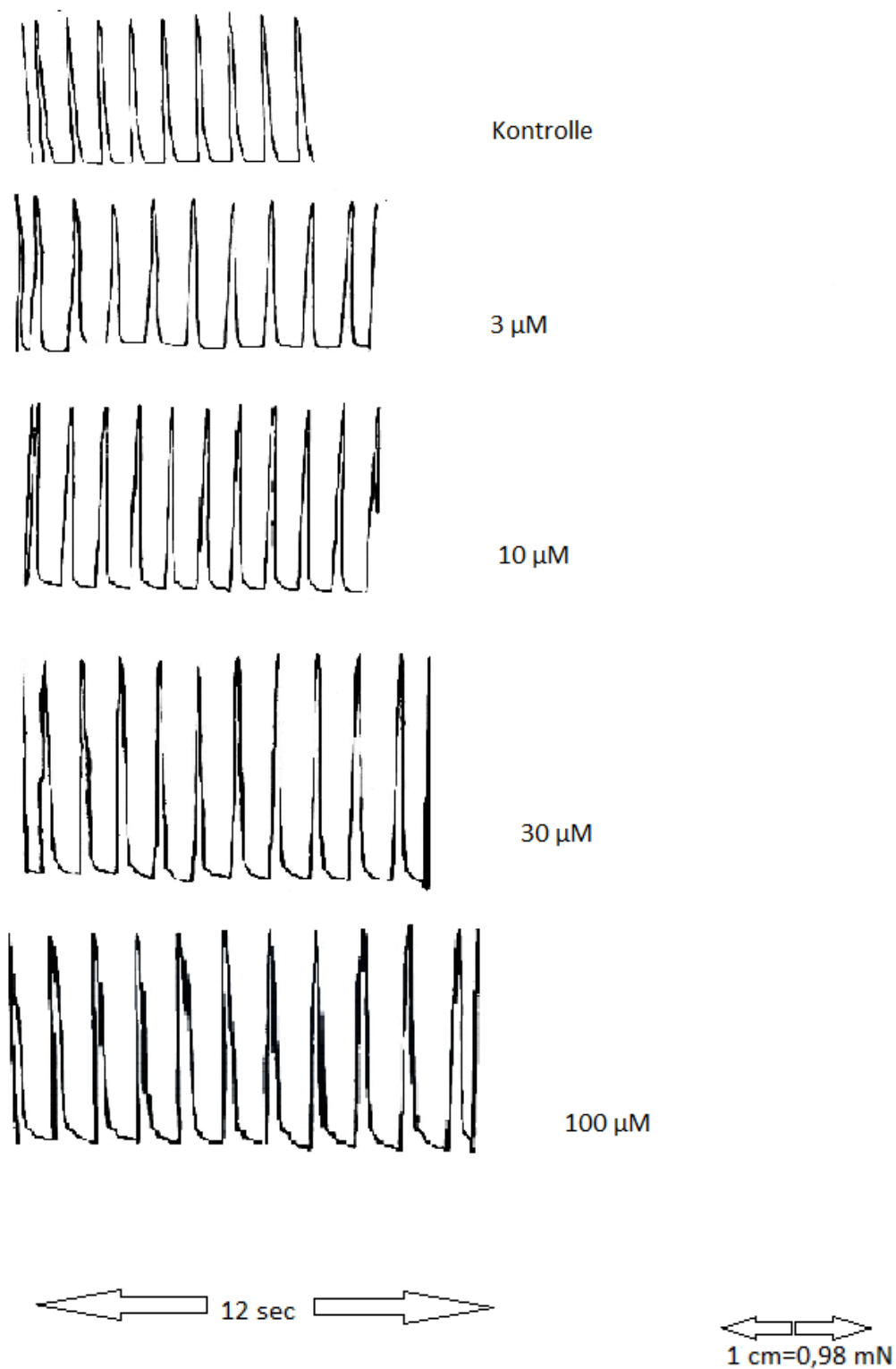


Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Inotropie des Papillarmuskels. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler(SEM).

MGte4 zeigte hier eine positiv inotrope Wirkung.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGte4 am Papillarmuskel



Die Originalabbildung zeigt eine stark positiv Inotrope Wirkung der Testsubstanz MGte4 am Papillarmuskel wobei die EC_{50} erreicht wurde. Die Messungen erfolgten im Fünfminutentakt über 6 cm.

4.1.2 Wirkung der Testsubstanz MGte4 auf das Atrium cordis dexter

Es wurde die chronotrope Wirkung der Testsubstanz untersucht - bei Versuchen am spontan schlagenden rechten Vorhof.

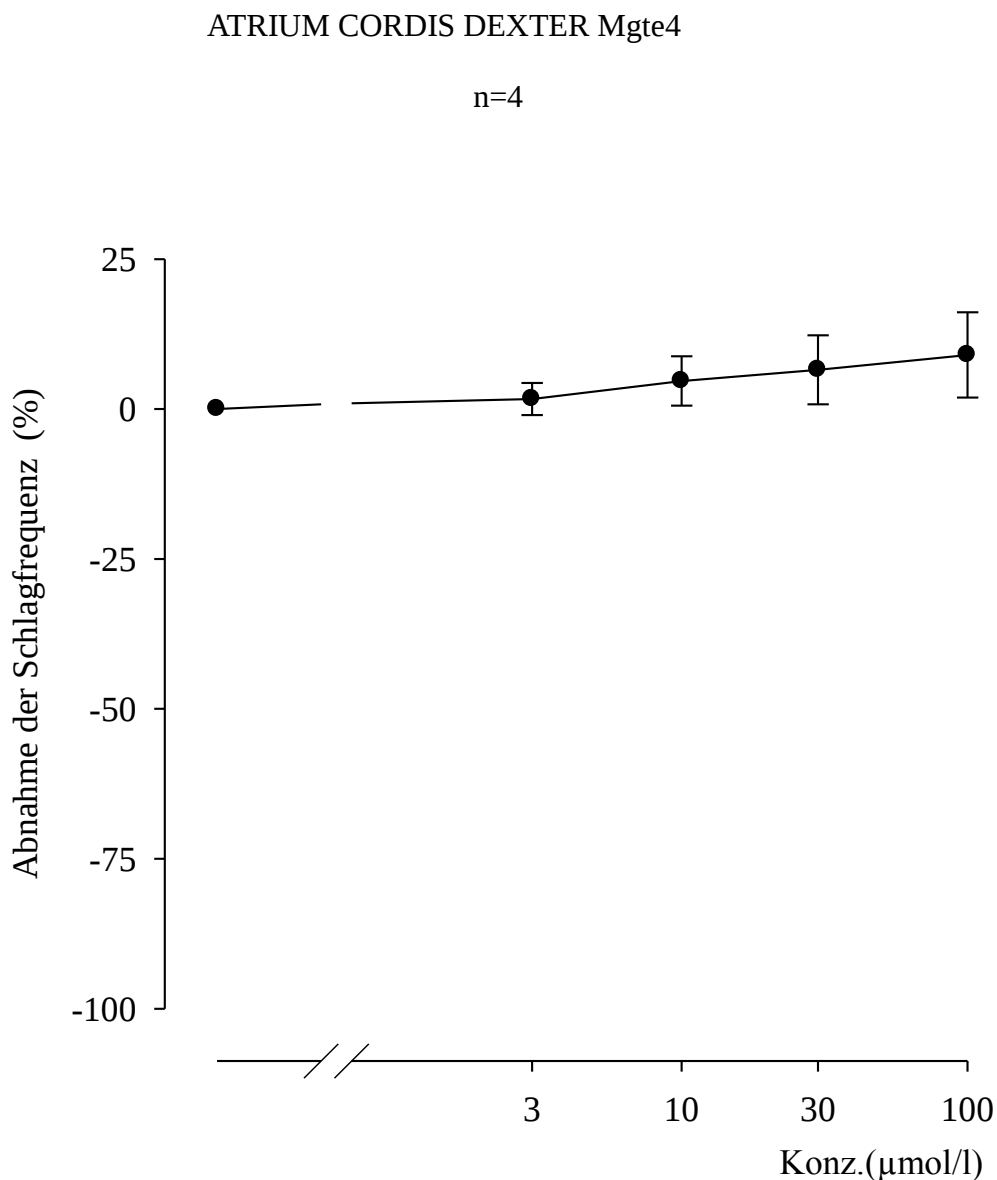
Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche von Mgte4 am Atrium cordis dexter

MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (mN)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	192,5 $\pm$ 20,87	0 $\pm$ 0	4	-
3	195 $\pm$ 20,51	1,67 $\pm$ 2,69	4	n.s
10	200 $\pm$ 19,69	4,67 $\pm$ 4,12	4	n.s
30	202,5 $\pm$ 17,85	6,53 $\pm$ 5,74	4	n.s
100	206,25 $\pm$ 15,86	9,0 $\pm$ 7,11	4	n.s

In der Tabelle wird das arithmetische Mittel (f) angeführt mit Standardabweichung (SEM) in mN und Prozent! Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde genauso dargestellt.

Weiters sieht man die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte4 am rechten Vorhof



Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt die Wirkung von MGte4 auf isolierte rechte Vorhöfe. Die x-Achse enthält die logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen der Testsubstanz in µmol/l. Die Änderung der Schlagfrequenz in Prozent ist auf der Ordinate aufgetragen. Die Punkte auf dem Graphen zeigen die Mittelwerte der Schlagfrequenz aus vier Versuchen, die Balken die dazugehörigen Standardfehler.

Diese Abbildung zeigt, dass eine leichte positive Chronotropie am rechten Vorhof festzustellen ist!



Kontrolle



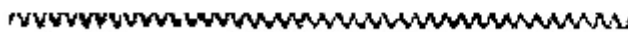
3 µM



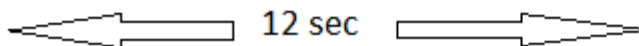
10 µM



30 µM



100 µM



12 sec

1 cm=0,98 mN

Abbildung 18: Die Originalabbildung der Testsubstanz MGte4 am rechten Vorhof

Die Originalabbildung bestätigt eine sehr leichte positive Chronotropie, die aber zu vernachlässigen ist.

4.1.3 Wirkung von MGte4 an der Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*)

Die Wirkung der Testsubstanz Mgte4 auf die vasodilatierende Wirkung der Arteria pulmonalis wurde an vier isolierten Präparaten getestet.

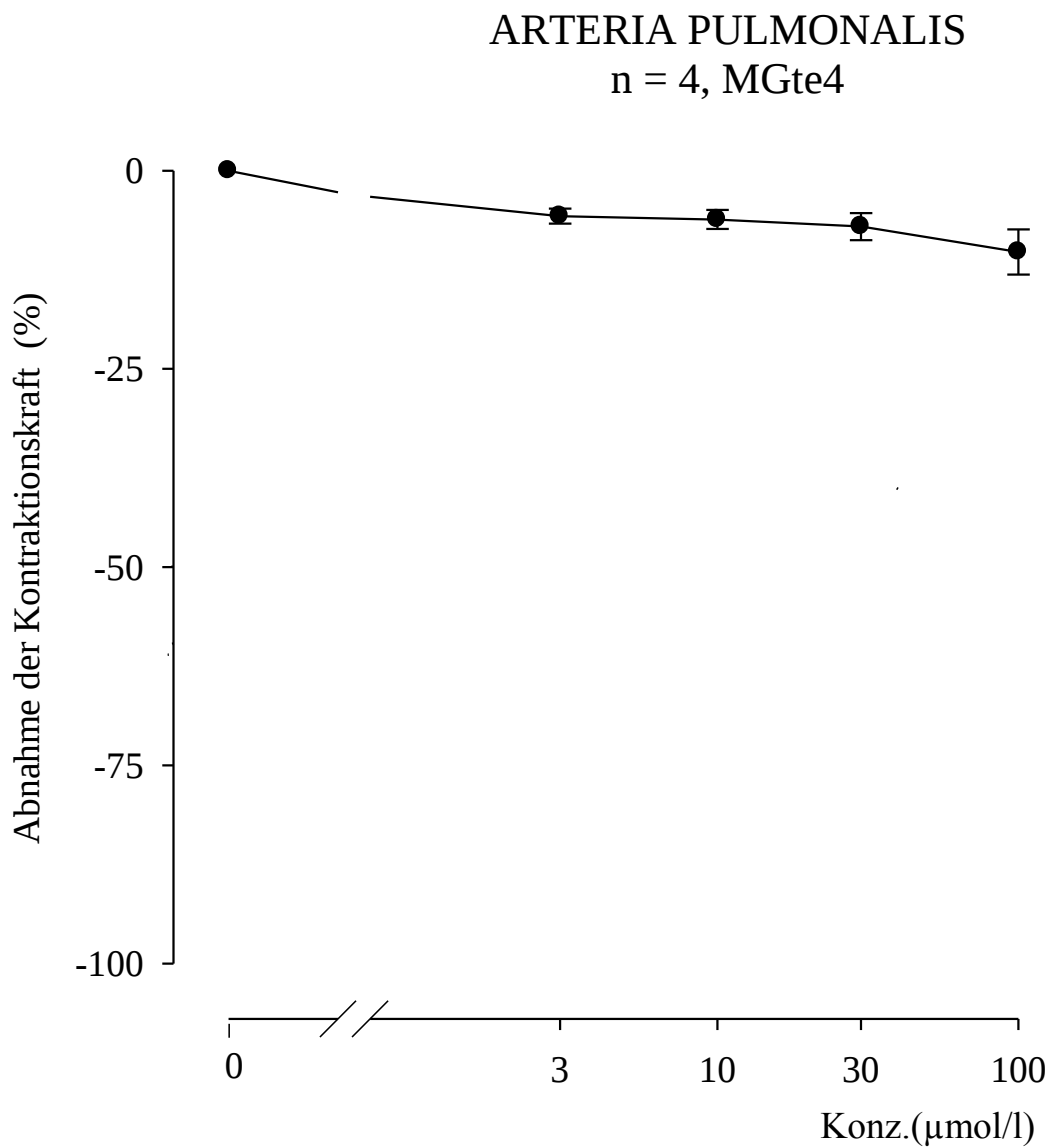
Tabelle 7:Wirkung von Mgte4 an der Pulmonalarterie

MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$12,86 \pm 0,76$	0+0	4	-
3	$12,13 \pm 0,72$	$-5,73 \pm 0,95$	4	n.s
10	$12,06 \pm 0,65$	$-6,16 \pm 1,20$	4	n.s
30	$11,94 \pm 0,65$	$-7,05 \pm 1,71$	4	n.s
100	$11,53 \pm 0,69$	$-10,26 \pm 2,84$	4	n.s

In der Tabelle wird das arithmetische Mittel (f_c) angeführt mit Standardabweichung (SEM) in mN und Prozent! Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde genauso dargestellt.

Weiters sieht man die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte4 an der Arteria pulmonalis

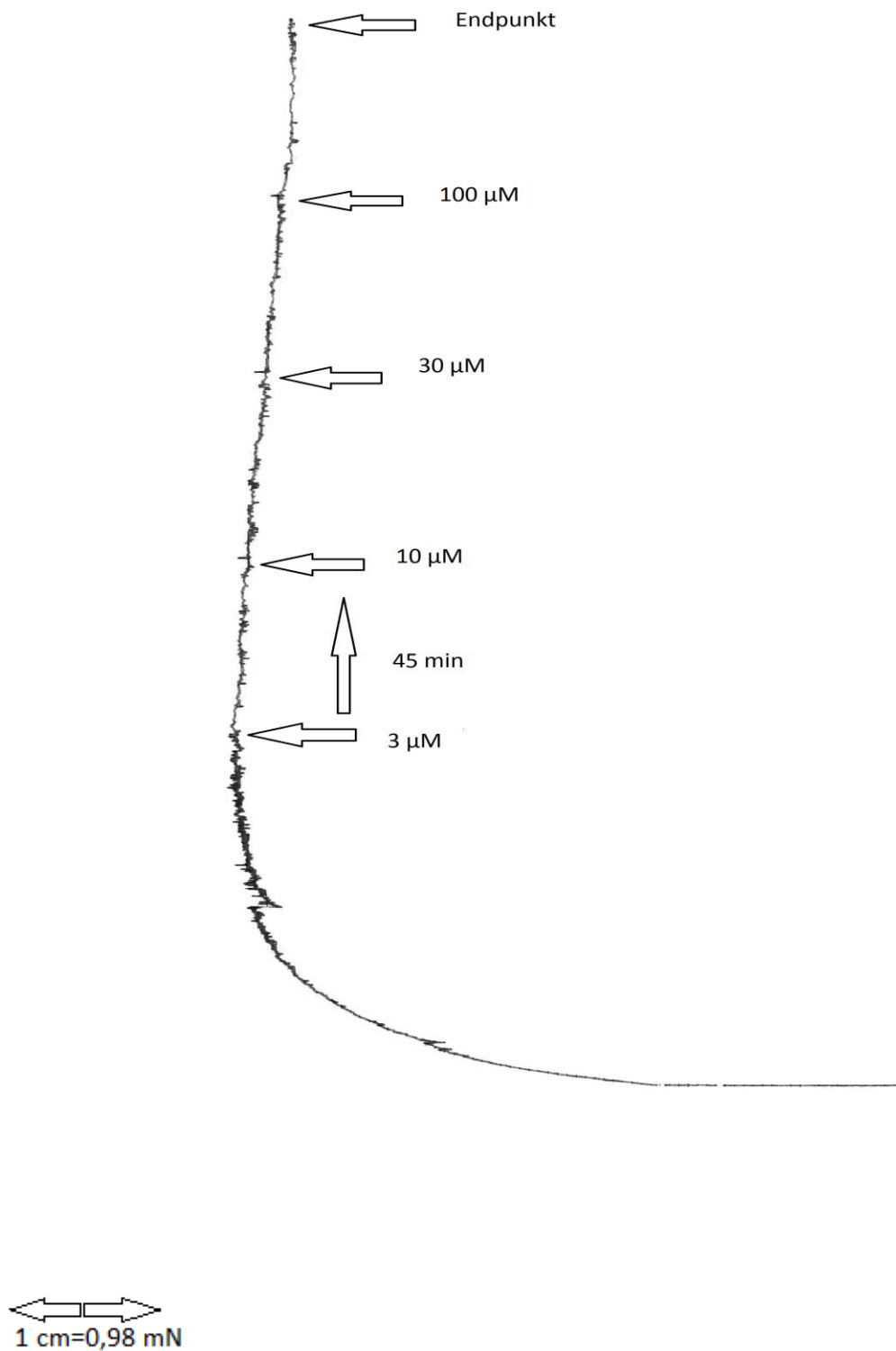


Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

An dieser Abbildung sieht man keine Wirkung auf die Inotropie.

Abbildung 20: Originalabbildung der Wirkung von MGte4 an der Pulmonalarterie



Die Originalabbildung bestätigt, dass es zu keiner Dilatation der Pulmonalarterie bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz MGte4 kommt.

4.1.4 Wirkung von MGte4 auf das *Ileum terminalis*

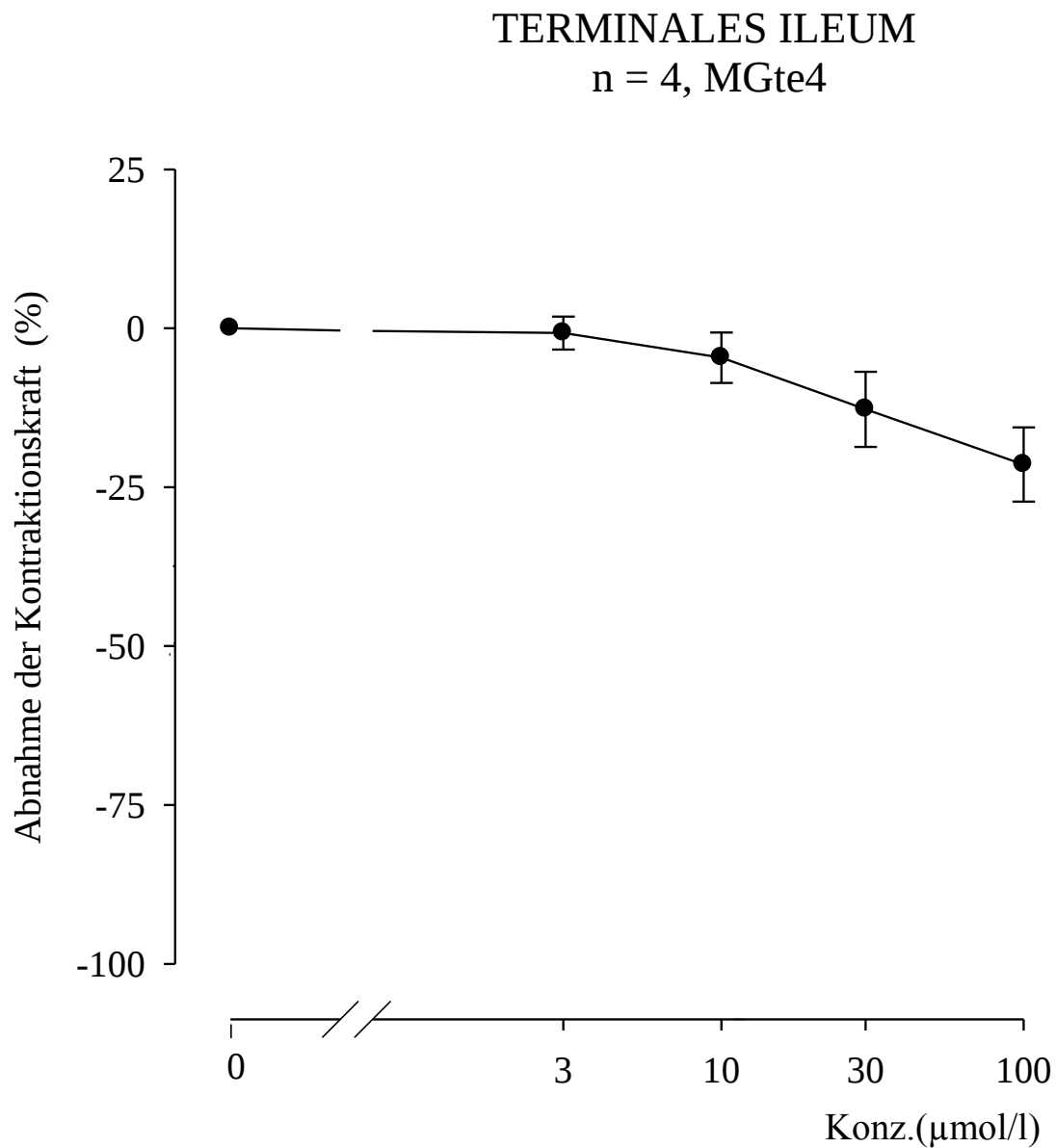
Die Wirkung der Testsubstanz MGte4 auf die spasmolytische Wirkung des Dünndarms wurde anhand von vier durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle zu sehen sind.

Tabelle 8 :Wirkung vom MGte4 am Dünndarm

MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,16 \pm 1,16$	0 ± 0	4	-
3	$8,05 \pm 1,03$	$-0,75 \pm 2,60$	4	n.s
10	$7,71 \pm 0,95$	$-4,63 \pm 3,97$	4	n.s
30	$7,0 \pm 0,73$	$-12,74 \pm 5,91$	4	0,05
100	$6,23 \pm 0,44$	$-21,44 \pm 5,84$	4	0,05

In der Tabelle wird der Mittelwert (f_c) angeführt. Dieser Wert wird in Form von Kontraktionskraft des Ileums in mN und in Prozent angegeben. Bei den Mittelwerten erfolgt eine Korrektur um den Standardfehler (SEM). Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) und die Anzahl der durchgeführten Versuche sind in der Tabelle genauso aufgelistet.

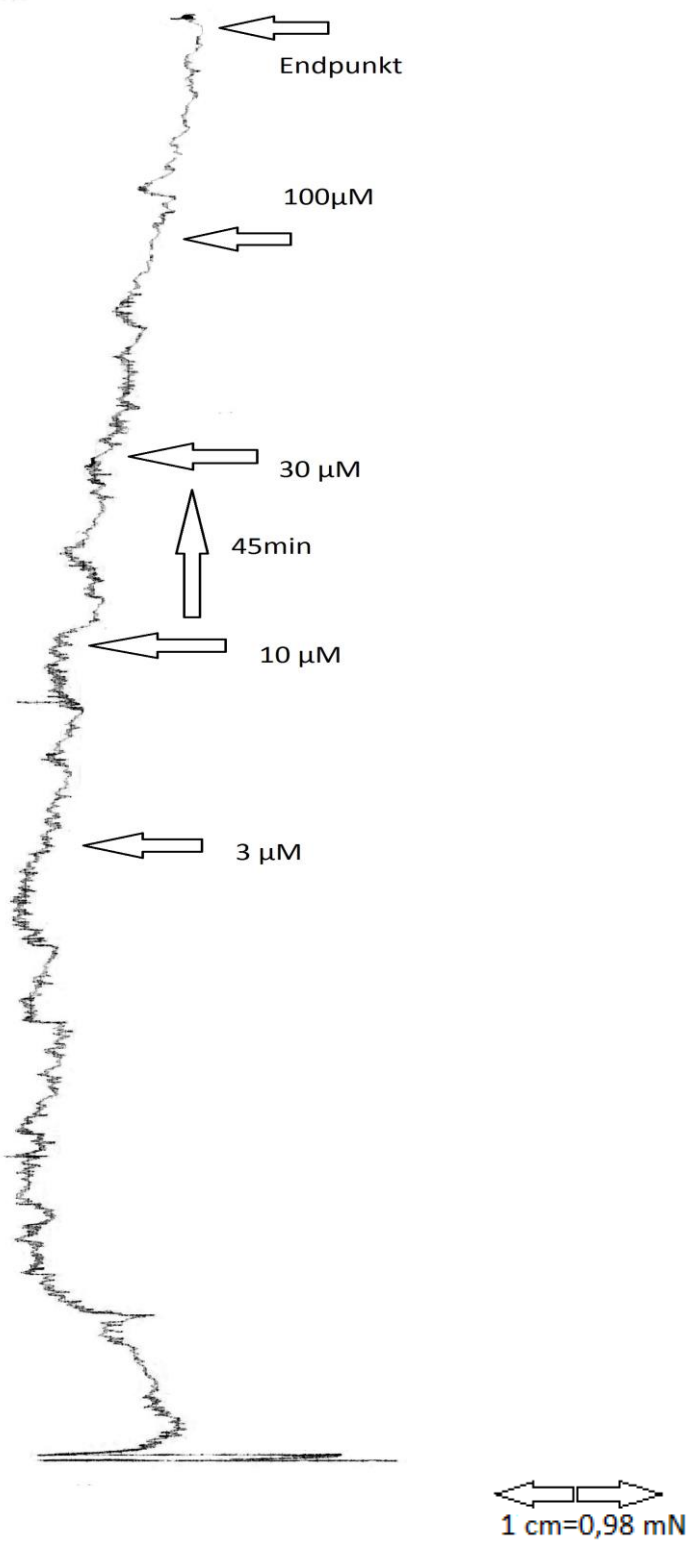
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte4 am terminalen Ileum



Auf der x-Achse dieser Konzentrations-Wirkungskurve ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt.

Bei dieser Abbildung sieht man, dass es zu einer minimalen bzw. keiner spasmolytischen Wirkung kommt. Dadurch kann EC_{50} nicht berechnet werden.

Abbildung 22: Originalabbildung der Wirkung von MGte4 am terminalen Ileum



Die Originalabbildung bestätigt, dass eine spasmolytische Wirkung der Substanz MGte4 am Terminalen Ileum nicht sichtbar ist.

4.1.5 Wirkung von MGte4 auf die *Aorta descendens*

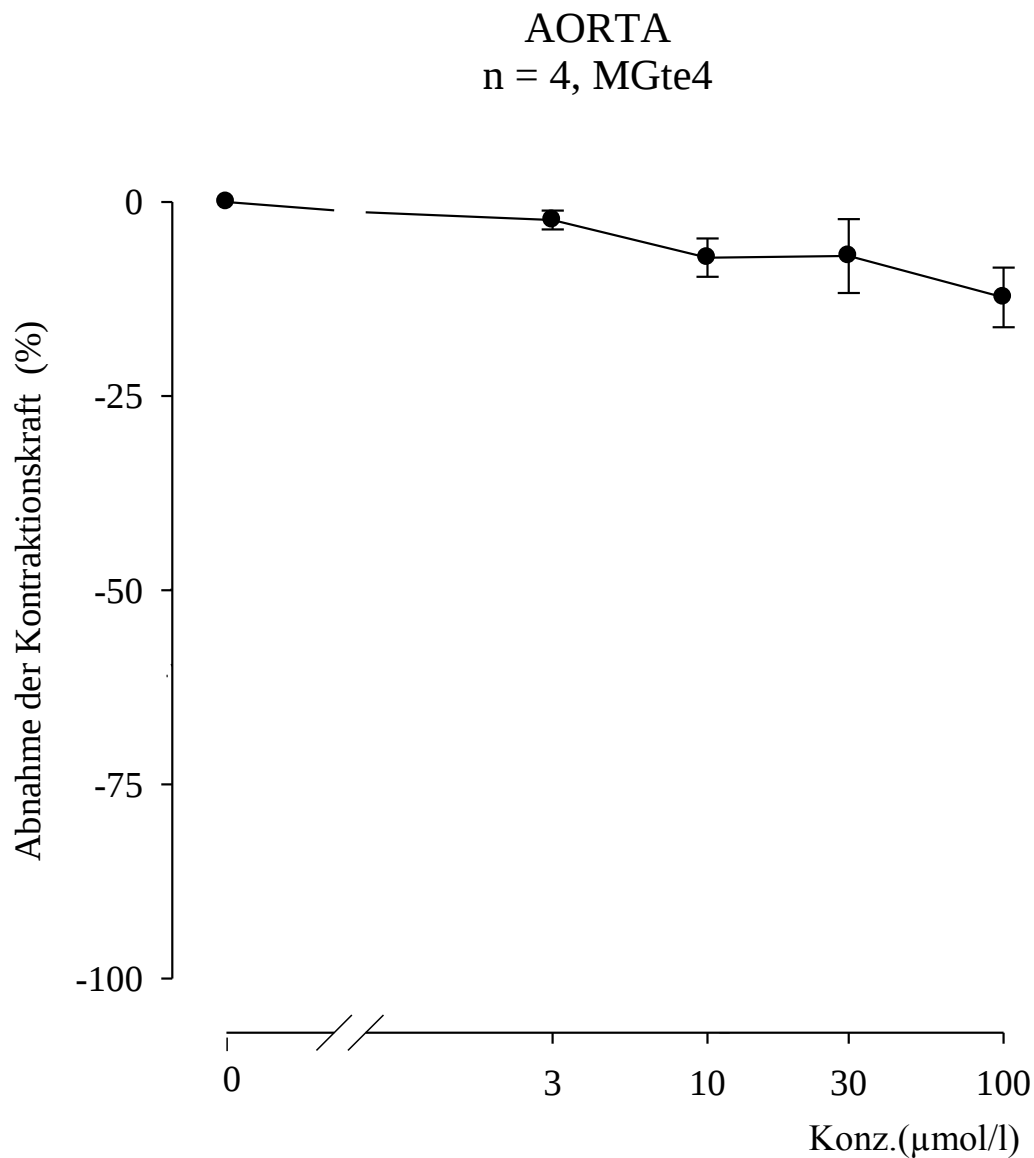
Die Wirkung der Testsubstanz Mgte4 auf die Änderung der Kontraktilität (Inotropie) der *Aorta descendens* wurde an vier isolierten Präparaten überprüft.

Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche von Mgte4 an der *Aorta descendens*

MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	10,51 $\pm$ 1,77	0 $\pm$ 0	4	-
3	10,21 $\pm$ 1,58	-2,32 $\pm$ 1,22	4	n.s
10	9,71 $\pm$ 1,56	-7,17 $\pm$ 2,47	4	n.s
30	9,61 $\pm$ 1,29	-6,97 $\pm$ 4,75	4	n.s
100	9,08 $\pm$ 1,24	-12,29 $\pm$ 3,84	4	0,05

In der Tabelle 9 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (fc) und die Standardfehler (SEM) sowohl in mN, als auch in Prozent dargestellt. Weiters ist die Anzahl der durchgeführten Versuche sichtbar sowie deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte4 an der Aorta

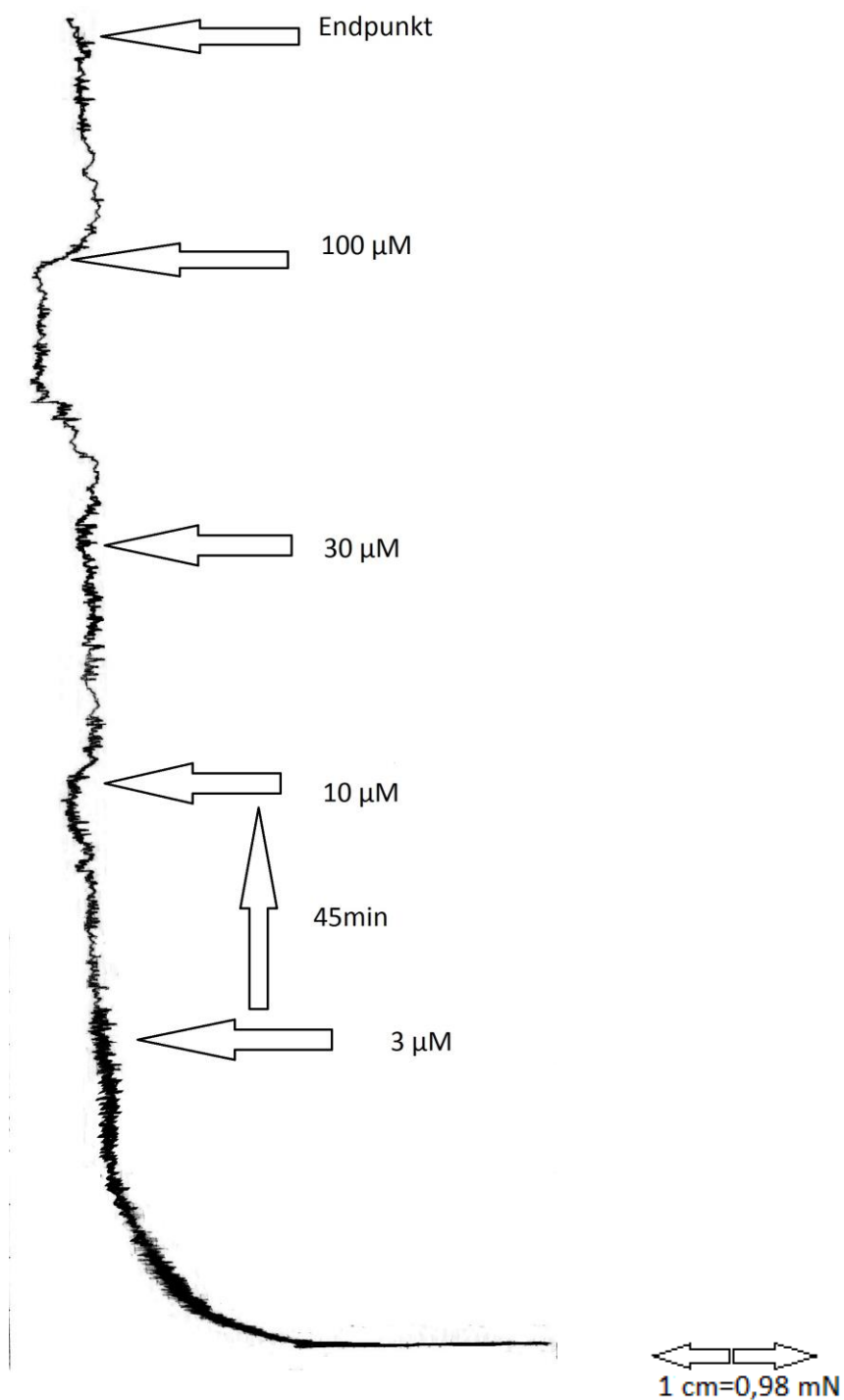


Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft der isolierten *Aorta descendens*. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

Hier kann keine vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz MGte4 festgestellt werden.

Abbildung 24: Originalabbildung der Wirkung von MGte4 an der Aorta



Der Kurvenverlauf ergibt sich durch das Einwirken der Testsubstanz MGte4 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die *Aorta descendens*. In dieser Kurve sieht man keine Wirkung auf die Kontraktion der Aorta. Die Pfeile stellen unterschiedliche Konzentrationsstufen dar, wobei der Zeitabstand zwischen den Substanzzugaben jeweils 45 min beträgt.

4.2 Wirkung der Testsubstanz MGte5

4.2.1 Wirkung von MGte5 auf den *Musculus papillaris*

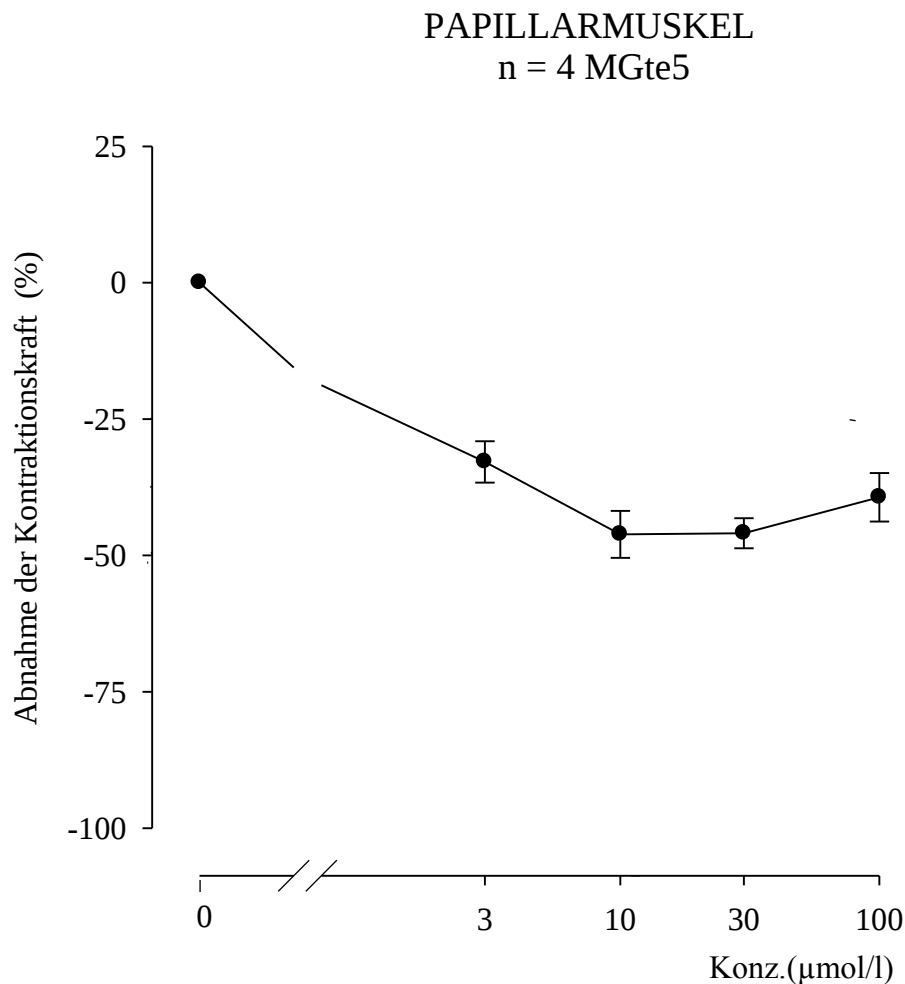
Eine mögliche negativ inotrope Wirkung meiner Testsubstanz auf isolierte und elektrisch stimulierte Papillarmuskel wurde an vier Präparaten getestet.

Tabelle 10: Wirkung von MGte5 am *Musculus papillaris*

MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,2 \pm 0,1$	0 ± 0	4	-
3	$0,81 \pm 0,1$	$-32,85 \pm 3,80$	4	0,05
10	$0,65 \pm 0,08$	$-46,14 \pm 4,29$	4	0,01
30	$0,64 \pm 0,05$	$-45,93 \pm 2,76$	4	0,01
100	$0,72 \pm 0,04$	$-39,32 \pm 4,45$	4	0,01

Die Tabelle 10 enthält die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und die Standardfehler (SEM) sowohl in mN als auch in Prozent. Weiters ist die Anzahl der durchgeführten Versuche sichtbar, sowie deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte5 am *Musculus papillaris*

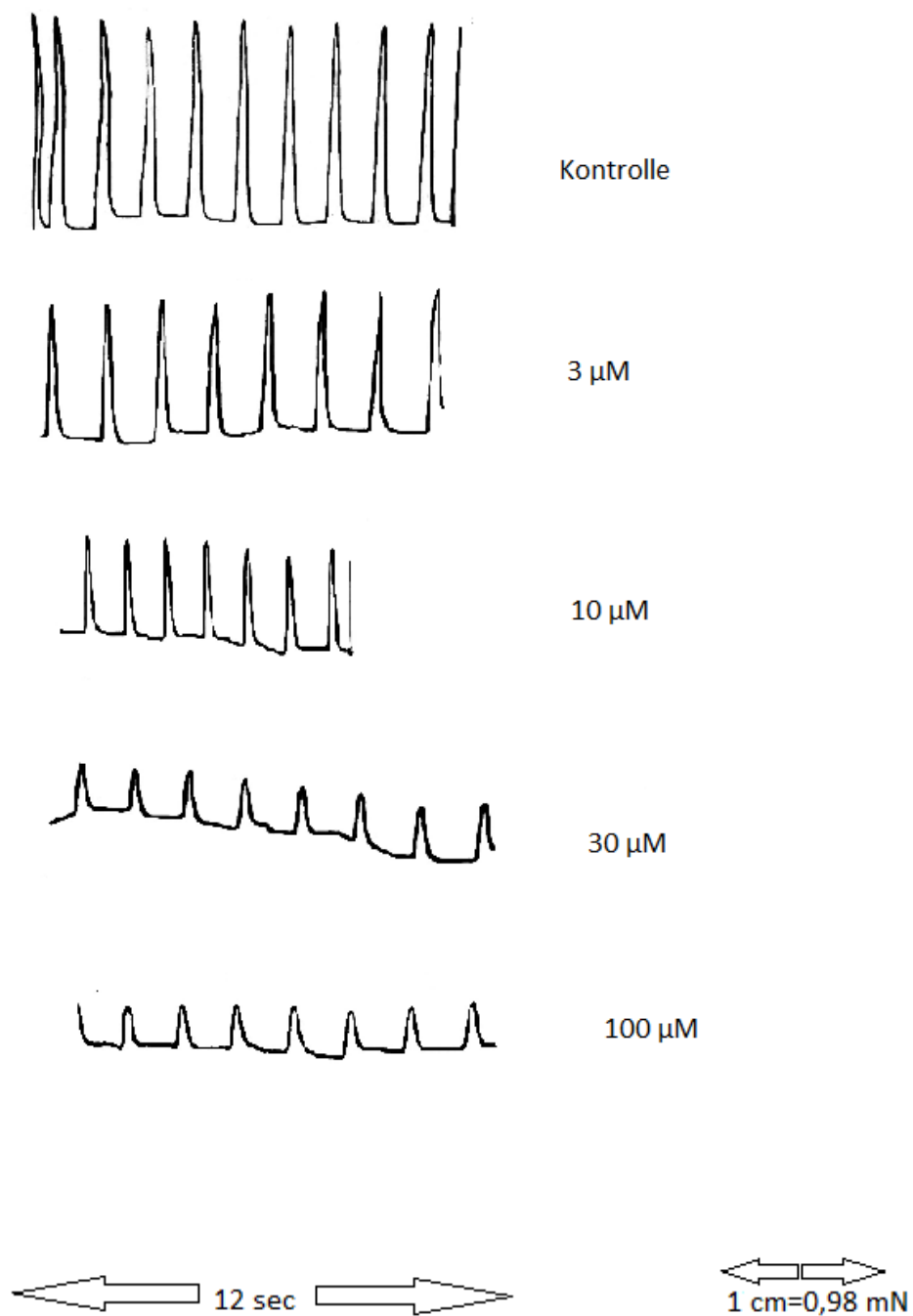


Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Inotropie des Papillarmuskels. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

Diese Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine negativ Inotrope Wirkung der Testsubstanz MGte5 am Papillarmuskel, obwohl EC_{50} nicht erreicht werden konnte.

Abbildung 26 :Originalaufzeichnung der Wirkung von MGte5 am Papillarmuskel



Durch die Wirkung der Testsubstanz MGte5 auf den *Musculus papillaris* in unterschiedlichen Konzentrationen nahm die Konzentrationskraft deutlich ab. Jedoch konnte der EC50-Wert nicht erreicht werden.

4.2.2 Wirkung der Testsubstanz MGte5 auf das *Atrium cordis dexter*

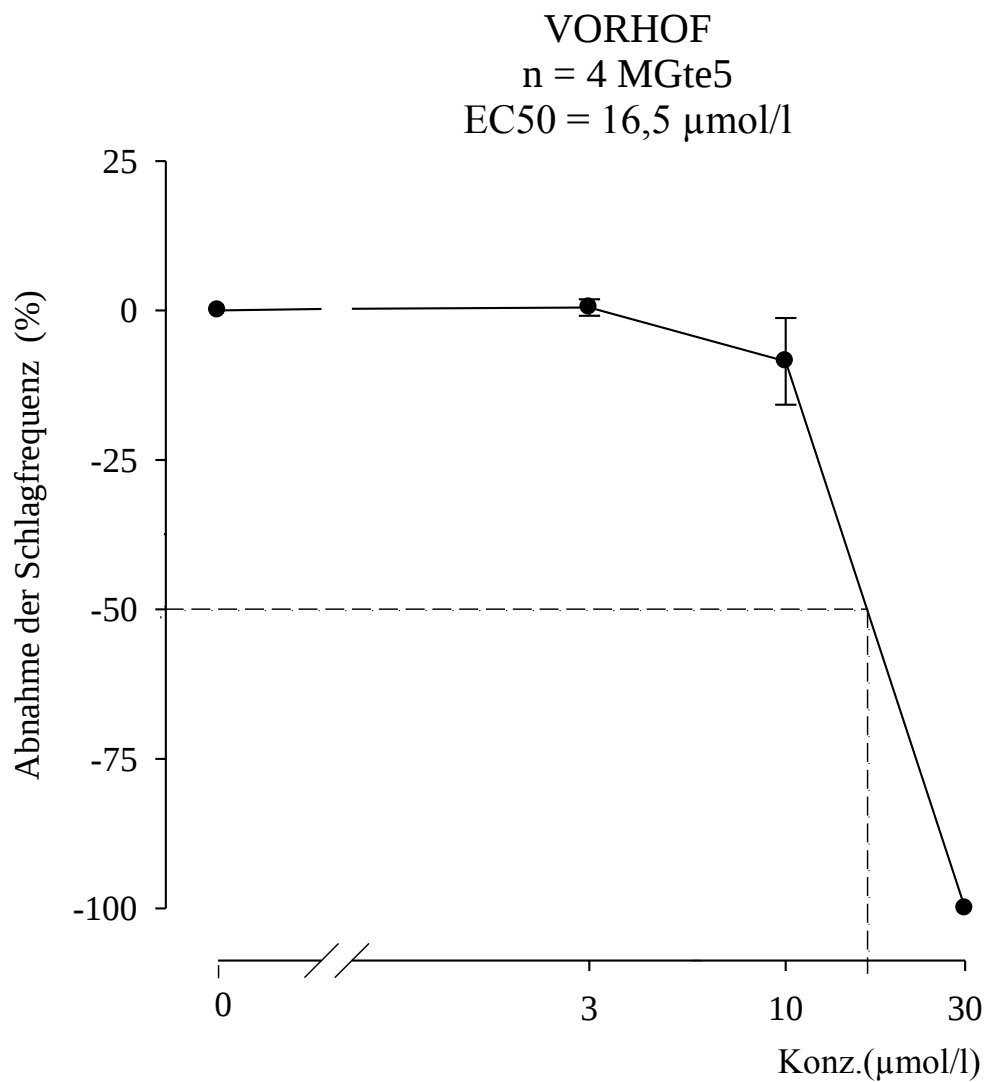
Es wurde die chronotrope Wirkung der Testsubstanz untersucht bei den Versuchen am spontan schlagenden rechten Vorhof.

Tabelle 11: Ergebnisse der Versuche von MGte5 am *Atrium cordis dexter*

MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	186,25 $\pm$ 11,25	0 $\pm$ 0	4	-
3	187,5 $\pm$ 12,99	0,49 $\pm$ 1,38	4	n.s
10	168,75 $\pm$ 11,06	-8,52 $\pm$ 7,25	4	n.s
30	0 $\pm$ 0	-100 $\pm$ 0	4	0,01

Diese Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) des Sinusknotens pro Minute und in Prozent an. Hier sind auch die Standardfehler (SEM) bei verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz aus vier Versuchen dargestellt sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte5 am rechten Vorhof



Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt die Wirkung von Mgte5 auf isolierte rechte Vorhöfe. Die x-Achse enthält die logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$. Die Änderung der Schlagfrequenz in Prozent ist auf der Ordinate aufgetragen. Die Punkte auf dem Graphen zeigen die Mittelwerte der Schlagfrequenz aus vier Versuchen, die Balken die dazugehörigen Standardfehler.

Diese Abbildung zeigt eine starke negative Chronotropie der Testsubstanz am rechten Vorhof. EC50 konnte auch ermittelt werden.

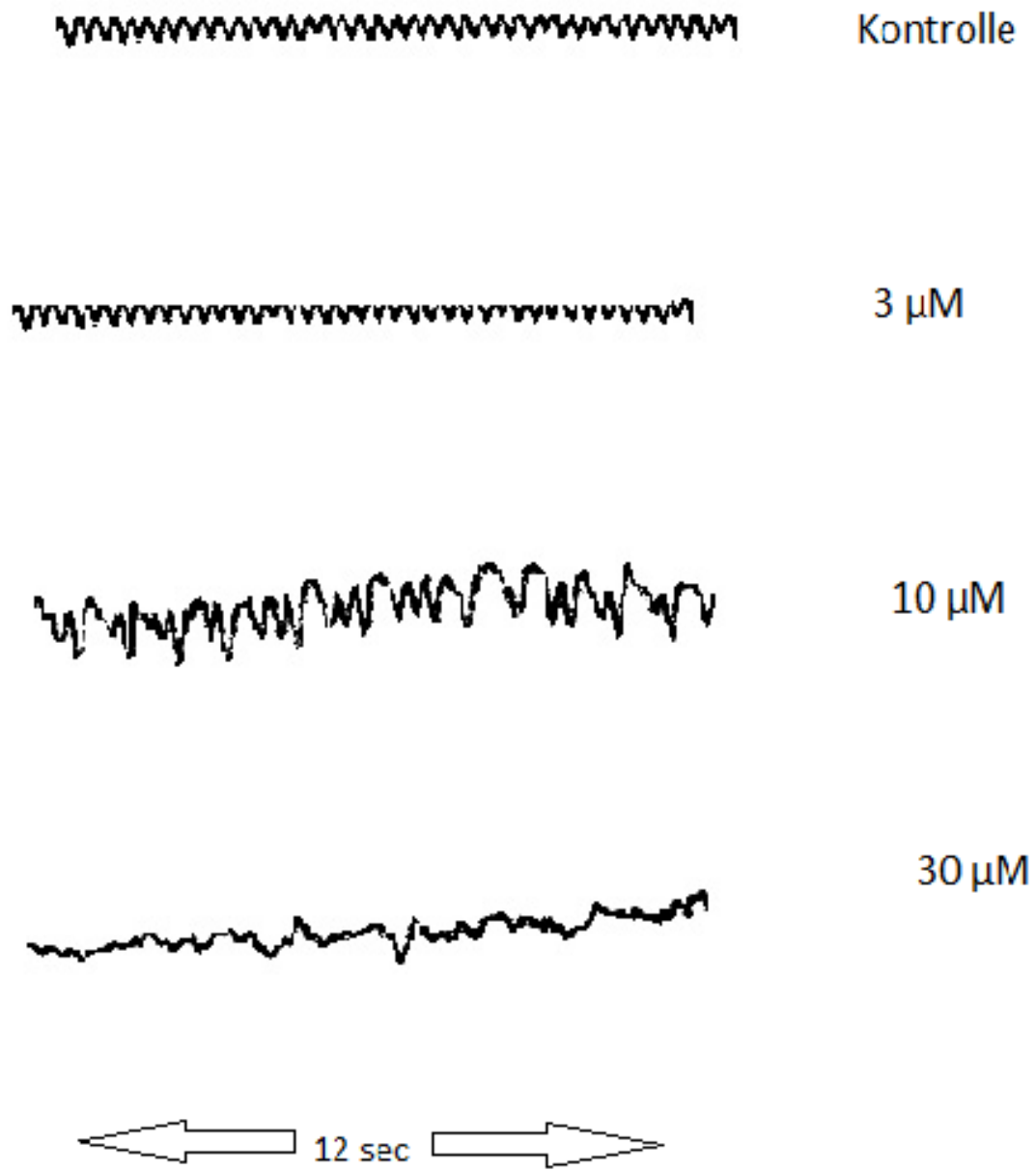


Abbildung 28:Originalabbildung der Wirkung von MGte5 am rechten Vorhof.

Die Abbildung bestätigt eine stark negative Chronotropie der Testsubstanz am rechten Vorhof.

4.2.3 Wirkung von MGte5 auf die Arteria pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz MGte5 auf die Kontraktionskraft der *Arteria pulmonalis* wurde an vier isolierten Präparaten überprüft.

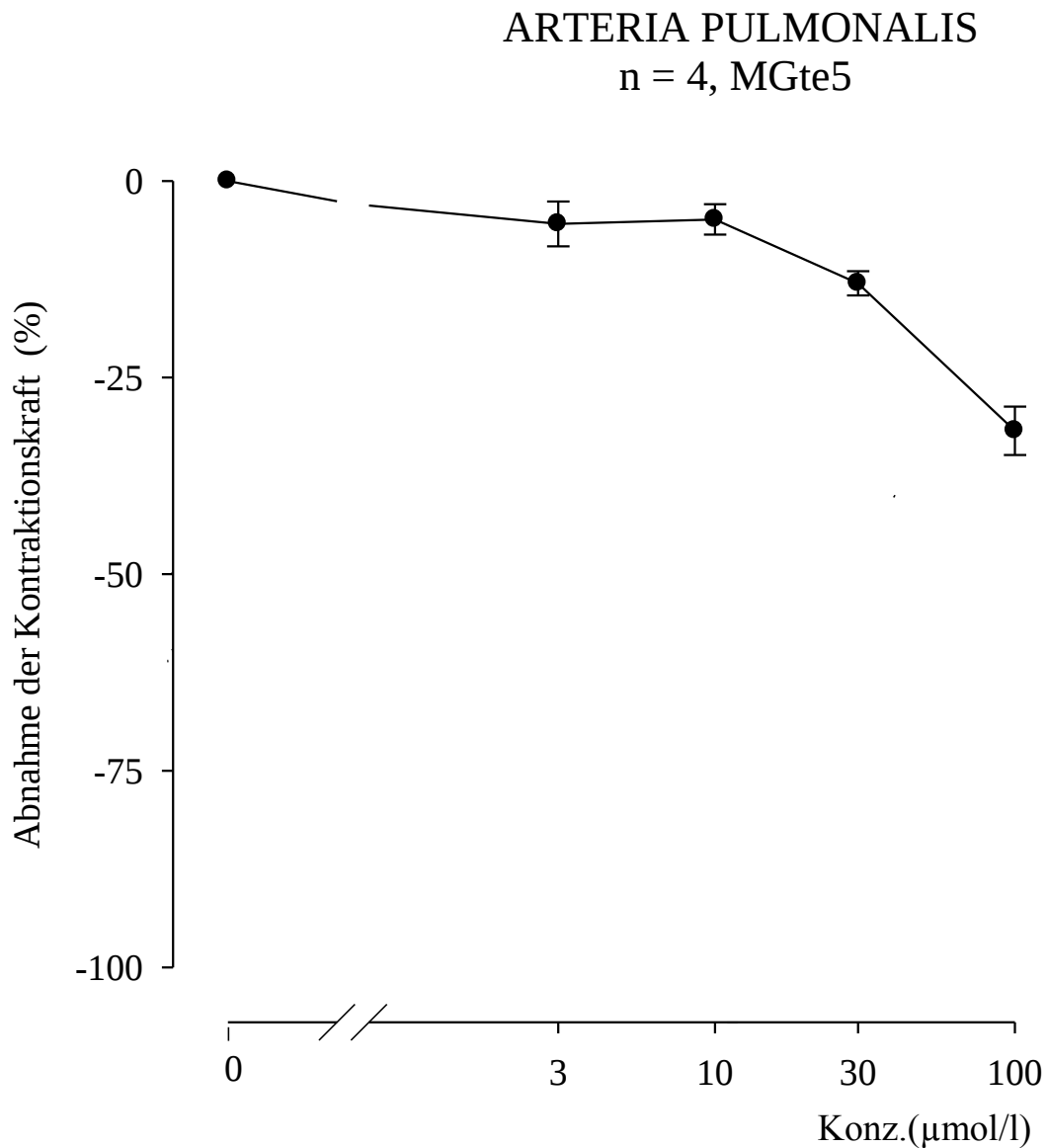
Tabelle 12: Wirkung von MGte5 an der Pulmonalarterie

MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsnzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$15,66 \pm 1,22$	0 ± 0	4	-
3	$14,73 \pm 0,95$	$-5,46 \pm 2,85$	4	n.s
10	$14,83 \pm 0,93$	$-4,89 \pm 1,93$	4	n.s
30	$13,6 \pm 1,02$	$-13,02 \pm 1,53$	4	0,05
100	$10,59 \pm 0,58$	$-31,77 \pm 3,07$	4	0,05

In der Tabelle wird das arithmetische Mittel(f_c) angeführt mit Standardabweichung (SEM) in mN und Prozent! Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde genauso dargestellt.

Weiters sieht man die Anzahl der durchgeführten Versuche.

Abbildung 29 :Konzentrations-Wirkungskurve von MGte5 an der *Arteria pulmonalis*

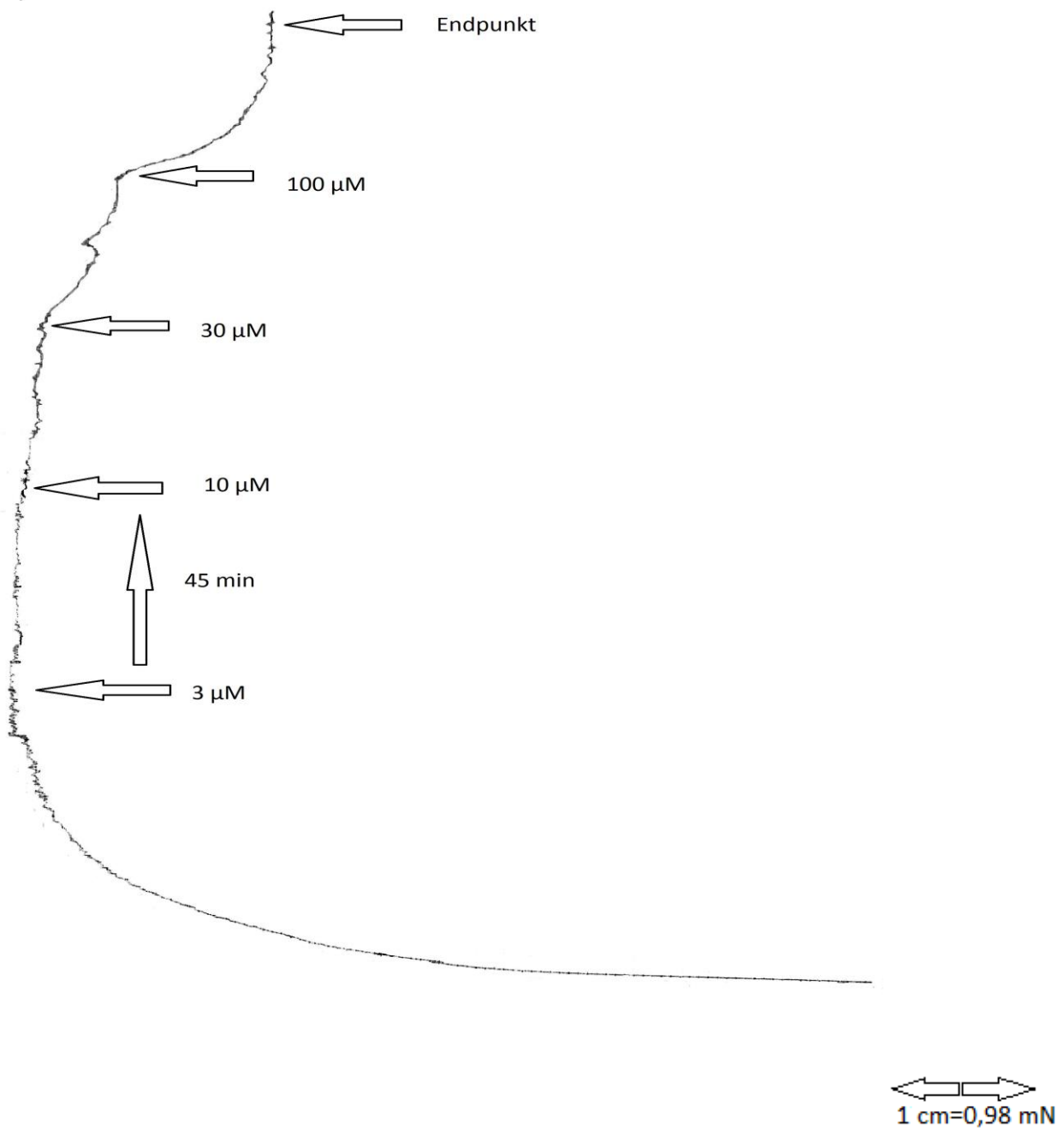


Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Kontraktionskraft der isolierten *Arteria pulmonalis*. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

An dieser Abbildung sieht man eine leichte Abnahme der Inotropie, wobei die EC₅₀ nicht erreicht werden kann.

Abbildung 30: Originalabbildung der Wirkung von MGte5 an der Pulmonalarterie



Diese Abbildung bestätigt, dass es zu einer leichten Dilatation der Pulmonalarterie bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz MGte4 kommt.

4.2.4 Wirkung von MGte5 auf das *Ileum terminalis*

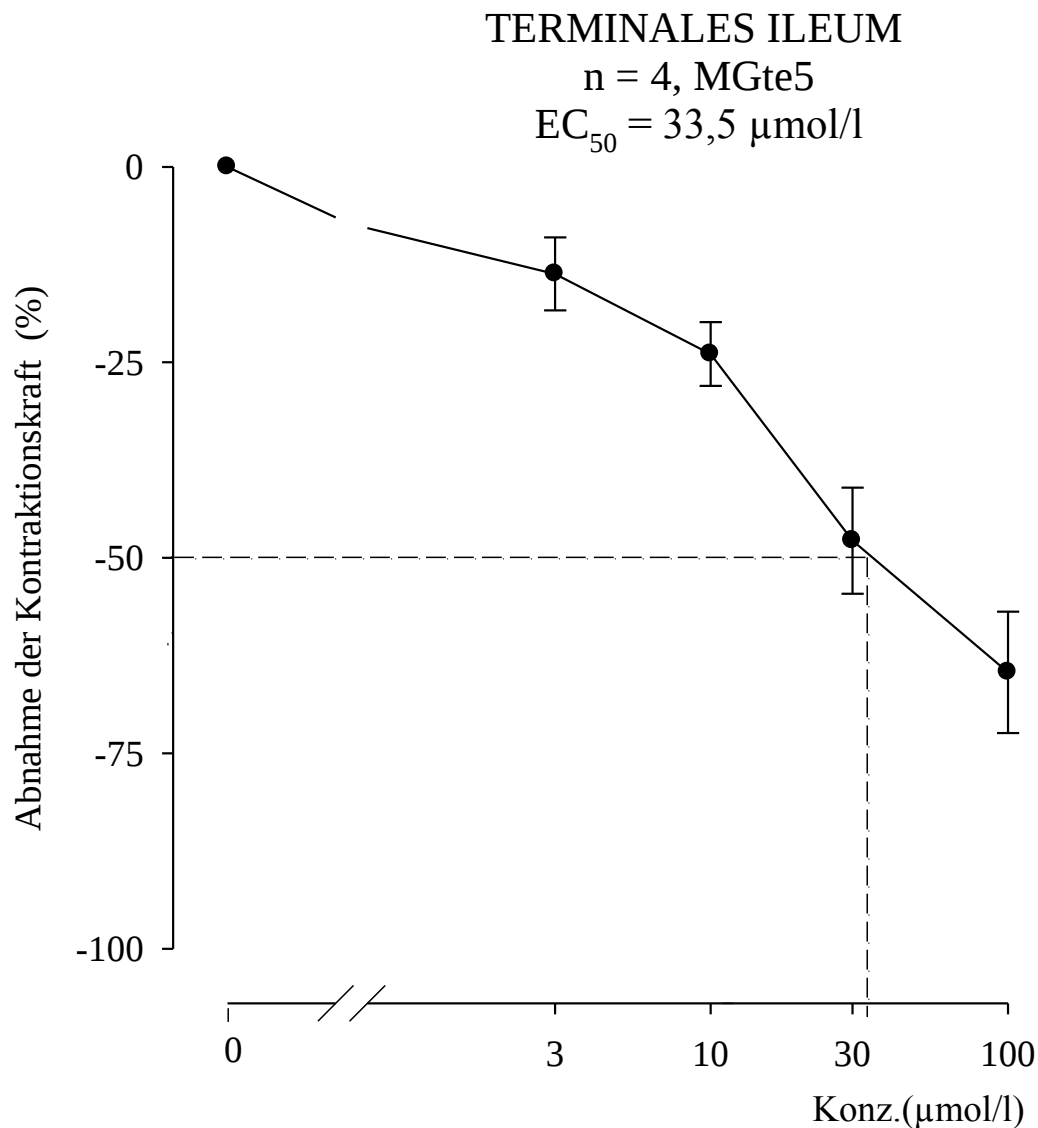
Die Wirkung der Testsubstanz Mgte5 auf die Inotropie des Ileums wurde an vier isolierten Präparaten ermittelt, welche in der Tabelle zu sehen sind.

Tabelle 13 :Wirkung vom MGte5 am Dünndarm

MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$7,42 \pm 0,51$	0 ± 0	4	-
3	$6,47 \pm 0,73$	$-13,69 \pm 4,68$	4	n.s
10	$5,67 \pm 0,56$	$-23,94 \pm 4,08$	4	0,05
30	$3,8 \pm 0,39$	$-47,81 \pm 6,79$	4	0,01
100	$2,51 \pm 0,42$	$-64,66 \pm 7,76$	4	0,01

In der Tabelle wird der Mittelwert (f_c) angeführt. Dieser Wert wird in Form von Kontraktionskraft des Ileums in mN und in Prozent angegeben. Bei den Mittelwerten erfolgt eine Korrektur um den Standardfehler (SEM). Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) und die Anzahl der durchgeführten Versuche sind in der Tabelle genauso aufgelistet.

Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungskurve von MgTe5 am terminalen Ileum

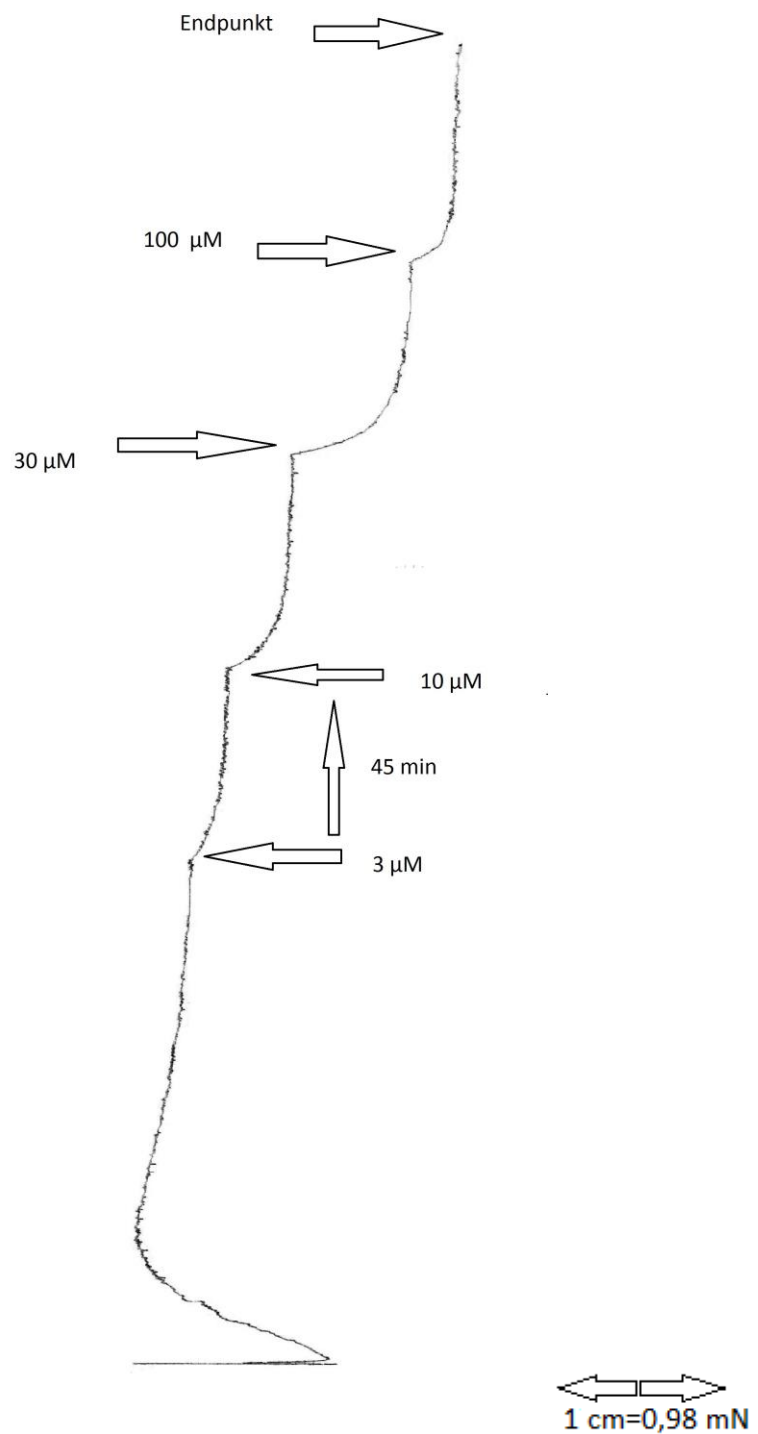


Auf der x-Achse dieser Konzentrations-Wirkungskurve ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt.

Die Punkte zeigen die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal verlaufenden Balken stellen die dazugehörigen Standardabweichung dar.

Bei dieser Abbildung sieht man dass es zu einer starken spasmolytischen Wirkung kommt. Dadurch kann man auch EC_{50} berechnen.

Abbildung 32 : Originalabbildung der Wirkung von MGte5 am Terminallem Ileum



Die Originalabbildung bestätigt, dass eine spasmolytische Wirkung der Substanz MGte5 am Terminaln Ileum sichtbar ist.

4.2.5 Wirkung von MGte5 auf die *Aorta descendens*

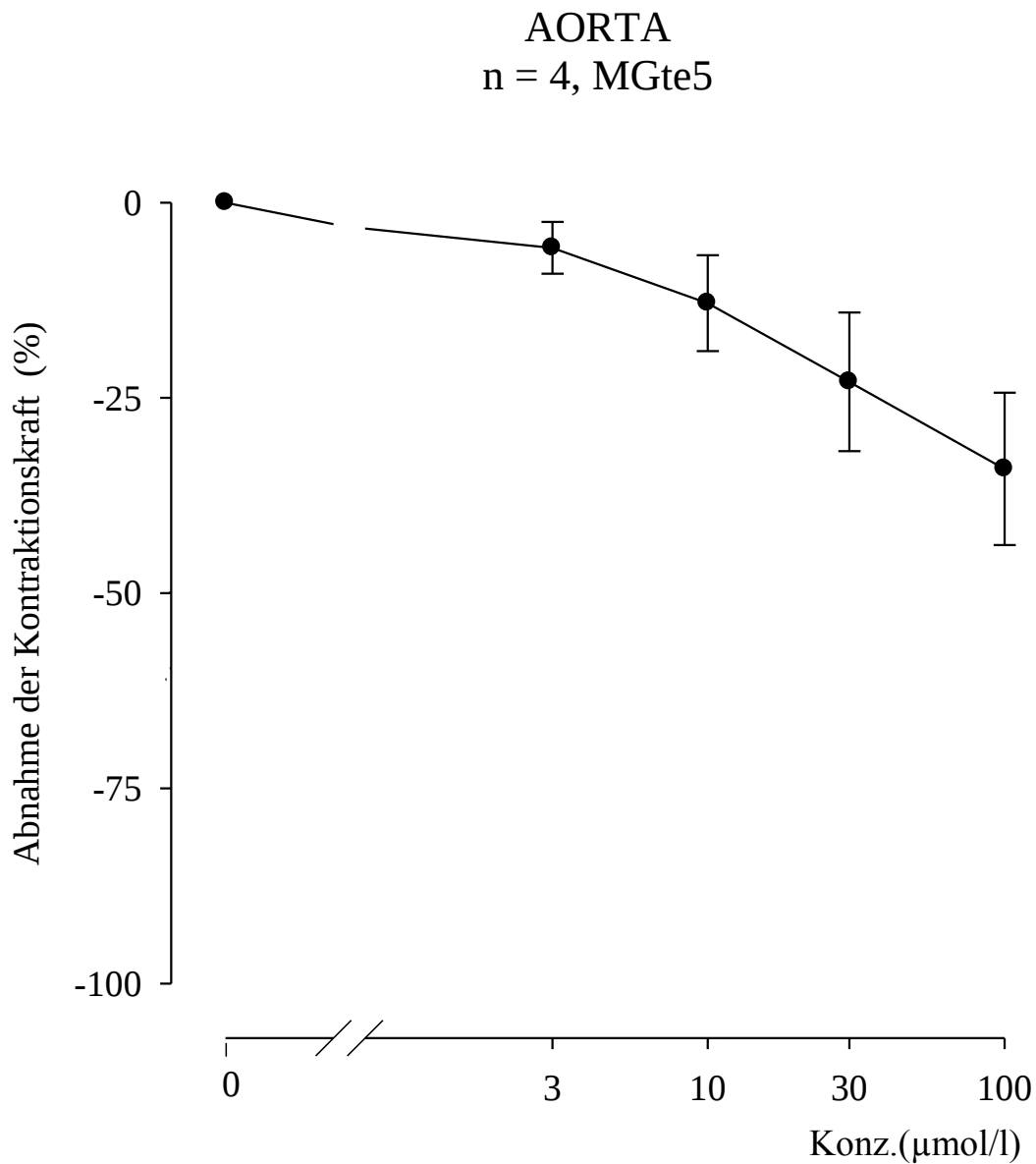
Die Wirkung der Testsubstanz MGte5 auf die Änderung der Kontraktilität (Inotropie) der *Aorta descendens* wurde an vier isolierten Präparaten überprüft.

Tabelle 14: Ergebnisse der Versuche von MGte5 an der *Aorta descendens*

MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)	Fc $\pm$ SEM (mN)	Fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	6,57 $\pm$ 0,59	0 $\pm$ 0	4	-
3	6,15 $\pm$ 0,41	-5,79 $\pm$ 3,32	4	n.s
10	5,63 $\pm$ 0,26	-12,88 $\pm$ 6,14	4	0,05
30	4,93 $\pm$ 0,32	-22,95 $\pm$ 8,87	4	0,05
100	4,19 $\pm$ 0,43	-34,1 $\pm$ 9,75	4	0,01

In der Tabelle 14 sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (fc) und die Standardfehler (SEM) sowohl in mN, als auch in Prozent dargestellt. Weiters ist die Anzahl der durchgeführten Versuche sichtbar, sowie deren Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Abbildung 33: Konzentrations-Wirkungskurve von MGte5 an der Aorta

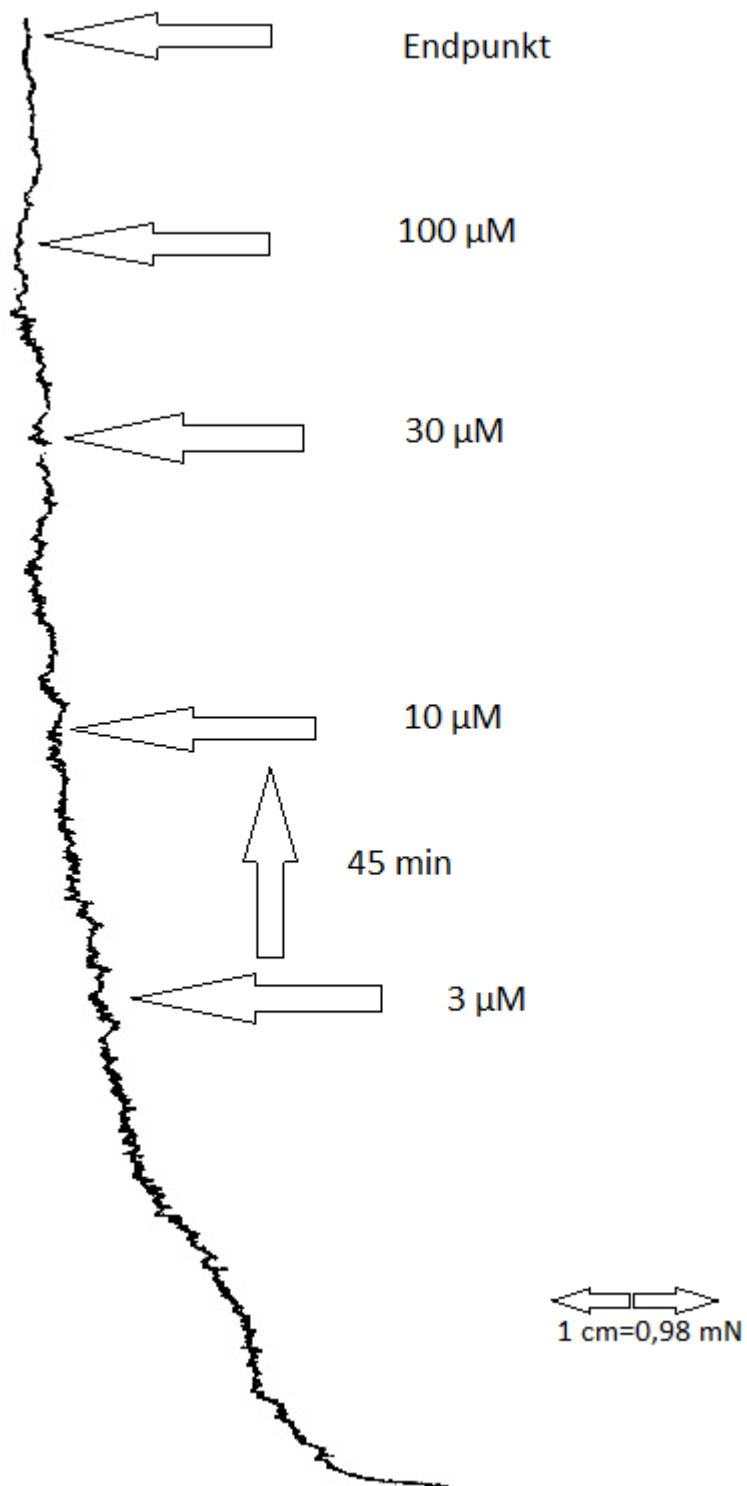


Auf der Abszisse dieser Abbildung ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte dar, die vertikal verlaufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

Hier kann eine leichte vasodilatierende Wirkung festgestellt werden, EC50 wird aber nicht erreicht.

Abbildung 34: Originalabbildung von Mgte5 an der Aorta



Die Originalabbildung zeigt eine sehr leichte vasodilatierende Wirkung meiner Testsubstanz.

5. Diskussion

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden Wirkungen von neu synthetisierten Substanzen MGte4 und MGte5 an fünf unterschiedlichen Organen getestet, die vom Meerschweinchen stammen: *Aorta descendens*, *Arteria pulmonalis*, *Ileum terminalis*, *Musculus papillaris* und *Atrium cordis dexter*.

Eine vasodilatatorische und spasmolytische Wirkung wurde auf glattmuskuläre Präparate erwartet! Am Papillarmuskel und am rechten Vorhof wurde eine Änderung der Inotropie bzw. Chronotropie vermutet.

Der genaue Prozess der Isolierung und Präparation der Organe, sowie der Versuchsaufbau wurden bereits in vorangegangenen Kapiteln detailliert beschrieben. Genau so wurden die Ergebnisse beschrieben und mit Hilfe von Tabellen, Diagrammen und Originalaufzeichnungen ausgewertet.

In diesem Kapitel werden die gewonnenen Ergebnisse aus den Experimenten näher analysiert und diskutiert.

5.1 Vergleich der Ergebnisse an glattmuskulären Organen

Die Präparate der Pulmonalarterie, der Aorta und des Dünndarms wurden verwendet um die Wirkungen der Testsubstanzen MGte4 und MGte5 festzustellen.

Die Versuchsdurchführung am terminalen Ileum dient der Ermittlung einer spasmolytischen Wirkung, während anhand der Versuche an der Pulmonalarterie und der Aorta analysiert wurde, ob die Testsubstanz an den beiden Organen eine vasodilatierende Wirkung verursacht.

Die oben genannten Präparate mussten mit einer Kaliumchlorid-Lösung maximal vorkontrahiert werden, damit ein konstanter Muskeltonus erreicht wird. Nach Erreichen der Plateauphase folgte die kumulative Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der beiden Testsubstanzen in Abständen von 45 Minuten.

Die Beeinflussung der Kontraktionskraft der einzelnen Präparate konnte als Kurve aufgezeichnet werden.

Tabelle 15: Wirkung von MGte4 auf die glatte Muskulatur

Organ	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ MGte4 bei Endkonzentration von 100 μM	EC_{50} MGte4 ($\mu\text{mol/l}$)
Arteria pulmonalis	$-10,26 \pm 2,84$	>100
Aorta descendens	$-12,29 \pm 3,8$	>100
Terminales Ileum	$-21,44 \pm 5,84$	>100

Anhand der Werte in der Tabelle ist ersichtlich, dass die Testsubstanz MGte4 keinen Effekt auf die Aorta und Arteria pulmonalis ausübt.

Eine sehr geringe Spasmolyse auf den Dünndarm konnte festgestellt werden, wobei dieser Wert vernachlässigt werden kann.

Tabelle 16: Wirkung von MGte5 auf die glatte Muskulatur

Organ	$f_c \pm \text{SEM} (\%)$ MGte5 bei Endkonzentration von 100 μM	EC_{50} MGte5 ($\mu\text{mol/l}$)
Arteria pulmonalis	$-31,77 \pm 3,07$	>100
Aorta descendens	$-34,1 \pm 9,75$	>100
Terminales Ileum	$-64,66 \pm 7,76$	33,5

Die Testsubstanz zeigt eine leichte vasodilatierende Wirkung auf die Aorta und Pulmonalarterie, sowie eine starke Relaxierung des Dünndarms. Hier wird der EC₅₀-Wert ermittelt.

Die Kontraktionskraft beträgt bei dem Kontrollwert 7,42±0,51 und nimmt immer wieder ab, sodass nach der Zugabe von 100 µmol/l dieser Wert 2,51±0,42 beträgt.

Die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt, beträgt 33,5 µmol/l. Je niedriger die effektive Konzentration, desto besser ist ein Wirkstoff anwendbar, wobei klinisch relevante Arzneistoffe eine EC₅₀ von weniger als 30 µM haben sollten.

Daraus kann man feststellen, dass die Testsubstanz MGte5 gut als Spasmolytikum geeignet ist und das Hauptergebnis meiner Diplomarbeit darstellt.

5.2 Vergleich der Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur

Der rechte Vorhof und der Papillarmuskel wurden präpariert, um die Wirkung der Testsubstanzen MGte4 und MGte5 auf die quergestreifte Herzmuskulatur zu zeigen.

Dabei wurde am rechten Vorhof auf eine positive bzw. negative Chronotropie geprüft.

Anhand des Papillarmuskels wurde eine positive bzw. negative inotrope Wirkung untersucht.

Tabelle 17: Wirkung von MGte4 auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Organ	f _c ± SEM (%) MGte4 bei Endkonzentration von 100 µM	EC ₅₀ MGte4 (µmol/l)
Atrium cordis dexter	9,0 ± 7,11	> 100
Musculus papillaris	37,67 ± 13,30	13,5

Diese Tabelle zeigt, dass die Testsubstanz MGte4 eine stark positiv inotrope Wirkung am Papillarmuskel hat und der EC₅₀ Wert schon bei 13,5 µmol/l erreicht wurde.

Tabelle 18: Wirkung von MGte5 auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Organ	f _c ± SEM (%) MGte5 bei Endkonzentration von 100 µM	EC ₅₀ MGte5 (µmol/l)
Atrium cordis dexter	-100 ± 0	16,5
Musculus papillaris	-39,32±4,45	>100

Die Testsubstanz MGte5 zeigt eine stark negativ chronotrope Wirkung am Vorhof, sowie eine negative Inotropie am Papillarmuskel, erreichte hier aber doch nicht die EC₅₀. Am rechten Vorhof wurde der EC₅₀-Wert bei 16,5 µmol/l erreicht. Der Kontrollwert betrug 186,25±11,25 Schläge pro Minute. Bei einer Konzentration von 10 µmol/l ist eine Abnahme der Schlagfrequenz sichtbar (168±11,06) und bei 30 µmol/l kam es zum Absterben des rechten Vorhofs.

6. Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit wurde durchgeführt um ein erstes pharmakologisches Wirkprofil der neu synthetisierten Substanzen MGte4 und MGte5 herauszufinden.

Diese Substanzen wurden in den Konzentrationen von 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ an fünf Organen (*Aorta descendens*, *Arteria pulmonalis*, *Musculus papillaris*, *Atrium cordis dexter* und *Ileum terminalis*) von Meerschweinchen getestet. Die genannten Organe werden täglich frisch entnommen, präpariert und anschließend in die Versuchsaapparaturen eingespannt, die mit Organbädern ausgestattet sind, um die physiologischen Bedingungen zu imitieren. Dazu werden die Organpräparate in eine Nährlösung eingetaucht, die eine Temperatur des menschlichen Körpers hat und begast, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu ermöglichen.

Die Wirkungen der Testsubstanzen auf die glatte Muskulatur wurden an den Präparaten der Pulmonalarterie, der Aorta und des terminalen Ileums getestet.

Dabei zeigt die Testsubstanz MGte4 keine Wirkung auf die oben genannten Organe.

Die Testsubstanz MGte5 zeigt eine leichte vasodilatorische Wirkung an der Aorta und Pulmonalarterie und eine starke Spasmolyse am Dünndarm. Dabei wurde der EC_{50} -Wert bei 33,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Um die Wirkungen auf die quergestreifte Herzmuskulatur zu testen, werden die Präparate des rechten Vorhofs und des Papillarmuskels verwendet.

Die MGte4 zeigt hier eine positiv Inotrope Wirkung am Papillarmuskel und eine sehr leichte positive Inotropie am rechten Vorhof.

Die Testsubstanz MGte5 wies eine stark negativ chronotrope Wirkung am rechten Vorhof auf, wobei der EC_{50} -Wert ermittelt werden konnte.

Es ist auch eine negative Inotropie am Papillarmuskel sichtbar, ohne aber die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt, zu erreichen.

Sowohl die Testsubstanz MGte4 als auch die Testsubstanz MGte5 zeigen eine Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur, wobei die Testsubstanz MGte5 zusätzlich eine spasmolytische Wirkung am Dünndarm hat. Diese Spasmolyse ist auch das Hauptergebnis dieser wissenschaftlichen Arbeit und die Substanz MGte5 wird hoffentlich

eines Tages eine pharmakologische Anwendung als Spasmolytikum finden, wobei das aufgrund der Nebenwirkungen, die sie am Herzen hervorruft, sehr schwer zu realisieren sein wird.

7. Literaturverzeichnis

Dellas C (2011) Crashkurs Pharmakologie. Urban und Fischer Verlag, 3.Auflage

Forth W, Henschler D, Rummel W (2013) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage

Hermann P, Amon T, Schubert–Zsilavec M, Hunius-Pharmazeutisches Wörterbuch, 11. Auflage

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

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

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2002) Pharmakologie und Toxikologie. Springer-Verlag. Berlin, 3. Auflage

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (2015)

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

8. Curriculum vitae

Stefan Vulic

Persönliche Daten :

Geburtsdatum und -ort: 01.08.1986 in Banjaluka, Bosnien und Herzegowina

Eltern: Svetislav Vulic (Diplomelektroingenieur)

Nevenka Vulic (Juristin)

Geschwister: keine

Schulische Ausbildung:

1992-2000: Grundschule (gleichbedeutend mit der Volksschule und der Gymnasialunterstufe in Österreich)

2000-2005: Sprach- Gymnasium in Banja Luka, Abschluss mit Matura (Vorzug)

Studium:

Seit 01.10.2006 Universität Wien – Diplomstudium Pharmazie

Berufserfahrung:

Oktober 2010- 2011: Apothekerhelfer in der Alpha Apotheke Wien

März 2011- September 2012: Apothekerhelfer in der Apotheke U2 Wien

Oktober 2012- dato: Apothekerhelfer in der Herz Jesu Apotheke Wien

Sonstige Ausbildungen:

Musikschule (6 Jahre, Klasse Akkordeon)

Turniertanz seit 1996 (Lateinamerikanische und Standardtänze, IDSF Mitglied, viele internationale Medaillen, Turniertanztrainerzertifikat für D-Klasse)

Fremdsprachenkenntnisse:

Serbokroatisch (Muttersprache)

Englisch fließend

Schulkenntnisse in Spanisch

Großes Latinum