



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten Triazol-Derivats (MGtr6.HCl) an isolierten Präparaten von Meerschweinchen“

verfasst von / submitted by

Isabella Fehrer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra 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

Danksagung

Als ich im Oktober 2010 meine ersten Schritte im Pharmaziezentrum gemacht habe, hätte ich es nie für möglich gehalten, dass die folgenden 5 Jahre und 9 Monate so rasch vergehen und sich meine Studienzeit schon wieder dem Ende zuneigen würde. Es ist nun an der Zeit all jenen zu danken, die mich in diesem Lebensabschnitt unterstützt, mit mir gelacht und gefeiert haben, mich aber auch getröstet haben. Einen ganz großen Dank möchte ich an Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik richten, der nicht nur meine wissenschaftliche Arbeit sondern auch mich betreute. Ihre ausgiebige Unterstützung hat einen großen Teil zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Ein weiterer Mensch, der schon mein ganzes Leben hinter mir steht und mich tatkräftig unterstützt, ist meine Mutter Ingrid Fehrer. Ihr gebührt wohl der größte Dank. Durch ihren unermüdlichen Glauben an mich und ihre Tatkräftigkeit hat sie mir nicht nur im Studium durch schwierige Phasen geholfen. Sie ist eine wirkliche Powerfrau.

Weiters danke ich auch noch meinem Vater Gerald Fehrer der mir vorgelebt hat problematische Situationen mit einer gewissen Leichtigkeit zu nehmen. Ohne ihn hätte ich es wohl auch nicht so weit geschafft.

Danke auch an meine liebe Schwester Steffi, für die vielen lustigen Stunden mit dir während den Lernpausen, aus denen ich Kraft schöpfen konnte.

Auch meiner Oma Rosemarie Fehrer gebührt eine Danksagung, da sie durch ihre aufregende Lebensgeschichte, ihre Intelligenz und ihre Verbissenheit stets eine Vorbildwirkung hatte.

Natürlich ist auch mein Freund Thomas Wimmer maßgeblich an meinem Erfolg beteiligt. Er war wohl die Person die am meisten die emotionalen Komponenten dieses Studiums mitbekam. Herzlichen Dank für deine Unterstützung.

Ebenfalls nicht zu vergessen sind meine lieben Freunde die mir immer zur Seite standen und mich während meiner Studienzeit begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung	1
2	Einleitung	3
2.1	REIZDARMSYNDROM	3
2.2	MEDIKATION	3
2.3	SPASMOLYTIKA.....	4
2.3.1	<i>Neurotrope Spasmolytika</i>	4
2.3.2	<i>Muskulotrope Spasmolytika</i>	5
2.3.3	<i>Neurotrop muskulotrope Spasmolytika</i>	6
3	Material und Methodik.....	7
3.1	TESTSUBSTANZ.....	7
3.1.1	<i>Nomenklatur und Struktur</i>	7
3.1.2	<i>Einwaage</i>	7
3.1.3	<i>Pipettierschema</i>	8
3.2	NITRO-L-ARGININ.....	9
3.3	EINWAAGE VON NITRO-L-ARGININ	9
3.4	NÄHRLÖSUNG	10
3.5	KALIUMCHLORIDLÖSUNG	12
3.6	LÖSUNGSMITTEL.....	13
3.7	GAS	13
3.8	VERSUCHSTIERE.....	14
3.9	ORGANE	14
3.10	PRÄPARATION DER ORGANE	15
3.10.1	<i>Präparation Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)</i>	16
3.10.2	<i>Präparation Truncus pulmonalis (Pulmonalarterie)</i>	17
3.10.3	<i>Präparation terminales Ileum (Darm)</i>	17
3.10.4	<i>Präparation Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)</i>	17
3.10.5	<i>Präparation Musculus papillaris (Papillarmuskel)</i>	19
3.11	GERÄTE UND APPARATUREN	19
3.11.1	<i>Apparaturen</i>	19
3.11.2	<i>Wasserbad</i>	23
3.11.3	<i>Kraftwandler, Verstärker und Schreiber</i>	24
3.12	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	24
3.12.1	<i>Versuchsdurchführung Aorta descendens</i>	25

3.12.2	Versuchsdurchführung <i>Truncus pulmonalis</i>	27
3.12.3	Versuchsdurchführung <i>Terminales Ileum</i>	27
3.12.4	Versuchsdurchführung <i>Atrium cordis dextrum</i>	28
3.12.5	Versuchsdurchführung <i>Musculus papillaris</i>	29
3.13	WIRKMECHANISMUS	29
3.13.1	Versuchsdurchführung des Wirkmechanismus.....	30
3.14	DATENAUSWERTUNG	30
3.14.1	Manuelle Auswertung	31
3.14.2	Auswertung am Computer	33
4	Ergebnisse	34
4.1	ERGEBNISSE	34
4.1.1	Ergebnisse <i>Aorta descendens</i>	34
4.1.2	Ergebnisse <i>Truncus pulmonalis</i>	38
4.1.3	Ergebnisse <i>terminales Ileum</i>	41
4.1.4	Ergebnisse <i>Atrium cordis dextrum</i>	44
4.1.5	Ergebnisse <i>Musculus papillaris</i>	47
4.2	ERGEBNISSE DES WIRKMECHANISMUS TERMINALES ILEUM	50
4.2.1	Ergebnisse des Wirkmechanismus von 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	50
4.2.2	Ergebnisse des Wirkmechanismus von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	54
5	Diskussion	57
5.1	WIRKUNG VON MGTr6.HCl AUF DIE GLATTE MUSKULATUR	57
5.1.1	Wirkung von MGTr6.HCl auf die <i>Aorta descendens</i>	58
5.1.2	Wirkung von MGTr6.HCl auf den <i>Truncus pulmonalis</i>	58
5.1.3	Wirkung von MGTr6.HCl auf das terminale Ileum.....	58
5.2	WIRKUNG VON MGTr6.HCl AUF DIE HERZMUSKULATUR	59
5.2.1	Wirkung von MGTr6.HCl auf <i>Atrium cordis dextrum</i>	59
5.2.2	Wirkung von MGTr6.HCl auf <i>Musculus papillaris</i>	60
5.3	WIRKMECHANISMUS	60
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literaturverzeichnis.....	63

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel MGtr6.HCl

Abbildung 2: Eppendorf-Pipetten

Abbildung 3: Gashahn

Abbildung 4: Gerätschaften für die Organentnahme

Abbildung 5: Präparation der Organe

Abbildung 6: Verlauf der Aorta

Abbildung 7: Querschnitt des Herzens

Abbildung 8: Versuchsaapparatur 1

Abbildung 9: Versuchsaapparatur 2

Abbildung 10: Kraftwandler

Abbildung 11: Versuchsdurchführung Aorta

Abbildung 12: Versuchsdurchführung terminales Ileum

Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta

Abbildung 14: Originalabbildung der Kontraktionskurve der Aorta

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve des Truncus Pulmonalis

Abbildung 16: Originalabbildung der Kontraktionskurve des Truncus Pulmonalis

Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve des Darms

Abbildung 18: Originalabbildung der Kontraktionskurve des Darms

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve des Vorhofs

Abbildung 20: Originalabbildung der Frequenz des Vorhofs

Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve des Papillarmuskels

Abbildung 22: Originalabbildung der Amplituden des Papillarmuskels

Abbildung 23: Balkendiagramm Wirkmechanismus am Darm mit 30 μ M Nitro-L-Arginin

Abbildung 24: Originalabbildung Wirkmechanismus am Darm mit 30 μ M Nitro-L-Arginin

Abbildung 25: Balkendiagramm Wirkmechanismus Darm mit 100 μ M Nitro-L-Arginin

Abbildung 26: Originalabbildung Wirkmechanismus am Darm mit 100 μ M Nitro-L-Arginin

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einwaage von MGtr6.HCl

Tabelle 2: Pipettierschema MGtr6.HCl

Tabelle 3; Einwaage von Nitro-L-Arginin

Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode (physiologische Nährlösung)

Tabelle 5: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kaliumchlorid- Lösung

Tabelle 7: gemessener Effekt auf die Organe

Tabelle 8: Multiplikationsfaktor für Papillarmuskel

Tabelle 9: Versuchsergebnisse der Aorta

Tabelle 10: Versuchsergebnisse Truncus Pulmonalis

Tabelle 11: Versuchsergebnisse terminales Ileum

Tabelle 12: Versuchsergebnisse Atrium dextrum

Tabelle 13: Versuchsauswertung Musculus papillaris

Tabelle 14: Wirkmechanismus von MGtr6.HCl mit einer Konzentration von 30µM Nitro-L-Arginin

Tabelle 15: Wirkmechanismus von MGtr6.HCl mit einer Konzentration von 100µM Nitro-L-Arginin

Tabelle 16: Wirkung von MGtr6.HCl auf Vasodilatation und Spasmolyse

Tabelle 17: Wirkung von MGtr6.HCl auf die quergestreifte Herzmuskulatur

1 Zielsetzung

Der praktische Teil dieser Diplomarbeit befasste sich mit der genauen Untersuchung der neu synthetisierten Testsubstanz MGtr6. HCL und der möglichen Wirkung an isolierten und darauf präparierten Organen von Meerschweinchen.

Die Testsubstanz wurde am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien vom Dissertant Mario Gabriel aus der Arbeitsgruppe von Ao.Univ.- Prof. Dr. Thomas Erker hergestellt und mir im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit zur Verfügung gestellt.

Um erste Einblicke in das pharmakologische Wirkprofil dieser neuen Substanz zu bekommen, wurden sowohl Organe der quergestreiften Muskulatur, wie Vorhof und Papillarmuskel, als auch Organe der glatten Muskulatur, wie Arteria pulmonalis, Aorta descendes und das terminale Ileum in verschiedenen Versuchsreihen herangezogen.

Eine eventuell vasodilatierende Wirkung der Substanz MGtr6.HCl wurde an den Präparaten der Pulmonalarterie und der Aorta getestet. Das Dünndarmpräparat wurde verwendet um eine eventuelle spasmolytische Wirkung der Testsubstanz nachzuweisen. Weiters wurden noch Herzpräparate zur Untersuchung verwendet, um einen möglichen Einfluss auf die Chronotropie (Vorhof) und die Inotropie (Papillarmuskel) zu untersuchen.

Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, war einerseits das korrekte Umgehen mit den Geräten unabdinglich, andererseits das Erlernen der speziellen Präpariertechnik und auch die genaue Einstellung der Messgeräte.

Mit Hilfe der einzelnen Organe wurde darauf jeweils eine Versuchsreihe durchgeführt. Die Ergebnisse wurden genau ausgearbeitet, graphisch dargestellt und jeweils eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, mit der nun der EC_{50} - Wert ermittelt werden konnte. Um die Substanz therapeutisch einsetzen zu können sind vor allem niedrige EC_{50} - Werte von Bedeutung, da nur diese einen ausreichenden Effekt bei niedriger Dosierung gewährleisten und gleichzeitig das Nebenwirkungsrisiko gering halten.

Sobald bei einem Organ nach erfolgreicher Auswertung das Erreichen einer EC_{50} festgestellt werden konnte, also jener Konzentration, bei der die Hälfte des Maximaleffekts erzielt wurde; wurde dieses Organ zu weiteren Untersuchungen des Wirkmechanismus ausgewählt. Im

Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit wurde das terminale Ileum zu spezifischeren Untersuchungen herangezogen.

2 Einleitung

2.1 Reizdarmsyndrom

Unter dem Begriff Reizdarmsyndrom versteht man eine funktionelle Darmerkrankung, welche sich vor allem durch Schmerzen und Beschwerden im Bauchraum als auch durch veränderte Stuhlgewohnheiten bemerkbar macht (Longstreth et al. 2006). Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt etwa zwischen 5% und 20% (Agreus et al. 2000), wobei bewiesen ist, dass Frauen von eben dieser zweimal häufiger betroffen sind als Männer (Mutschler 2012). Trotz zahlreicher Untersuchungen und Forschungen konnten bisher weder strukturelle noch anatomische Begründungen für die Pathophysiologie von Colon irritabile zur Aufklärung dienen. Die in Folge der Erkrankung eintretende Veränderung der Darmmotilität ist wohl ein Grund für die Verschlechterung der Stuhlgewohnheit (McKee et al. 1993), wohingegen die Muskelkrämpfe und auch die Überempfindlichkeit der Bauchregion nur partiell die massiven Bauchschmerzen der betroffenen Patienten erklären (Aziz et al. 2000).

Reizcolon, oder auch unter Colon irritabile bekannt, stellt einen chronischen schubförmigen wiederkehrenden Zustand dar (Agreus et al. 2001). Aktuelle Richtlinien empfehlen dieses Syndrom aufgrund von klinischen Befunden zu diagnostizieren und invasive Untersuchungen zu vermeiden oder nur etwa dann vorzunehmen, wenn die Symptome (wie rektale Blutungen) bereits akut aufscheinen (Wilson et al. 2004).

2.2 Medikation

In erster Linie wird den betroffenen Patienten vor allem eine Lebensstiländerung nahe gelegt. Mit besonderem Augenmerk auf ausreichende Bewegung, viel Flüssigkeit und ballaststoffreiche Ernährung, da diese in Verbindung mit einer positiven Auswirkung auf die intestinale Durchgangszeit des Nahrungsbreis steht (Harvey et al. 1973).

Falls diese Umstellung keine ausreichende Wirkung zeigen sollte, zieht man verschiedene Arten von Muskelrelaxantien und Spasmolytika in Betracht, um den Symptomen, wie Schmerzen und Blähungen, vorzubeugen (Spiller et al. 2007). Auch das OTC- Produkt Pfefferminzöl wird wegen seiner spasmolytischen Wirkung immer mehr zur Behandlung von

Colon irritabile eingesetzt (Hills et al.1991). Da einerseits aber noch einiges an Datenmaterial fehlt, um die positive Wirkung von Pfefferminzöl wirklich zu bestätigen und andererseits auch die Einnahme von ballaststoffreicher Nahrung laut Studien nur zusammen mit der Einnahme von Flohsamen, die stark quellend sind, eine positive Auswirkung auf das Reizdarmsyndrom zeigen, bleibt die Einnahme von Spasmolytika die Medikation der Wahl.

Vor allem an den zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind bisher neue Medikationsversuche gescheitert: „ Von der Vorstellung ausgehend, dass Serotonin bei der viszerale 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). Weiters gibt es noch potentielle Mittel die aber noch nicht zugelassen sind: „ 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).

2.3 Spasmolytika

Unter Spasmolytika versteht man Arzneimittel, die in der Lage sind den Tonus der glatten Muskulatur wie Gastrointestinaltrakt, Gefäße und zum Beispiel Bronchien durch Rezeptor-Blockade (z.B. Parasympatholytika) oder über andere Mechanismen (myotrope Spasmolytika, z.B: Papaverin) herabzusetzen (Ammon 2010).

Die spasmolytisch wirkenden Pharmaka unterliegen der Einteilung in neurotrope, muskulotrope und neurotrop- muskulotrope Spasmolytika (Ammon 2010).

2.3.1 Neurotrope Spasmolytika

Da diese Substanzen durch den Angriff am parasympathischen Nervensystem eine Erschlaffung der glatten Muskulatur bewirken, werden sie auch neurotrope Spasmolytika genannt (Mutschler 2012). Sie fungieren als m-Cholinrezeptor Antagonisten und blockieren

daher durch ihren kompetitiven Antagonismus die Acetylcholin-vermittelte Erregungsübertragung an m-Cholinrezeptoren und beeinflussen daher Rezeptoren des Nervensystems. Beispiele für neurotrope Spasmolytika sind: Atropin, Scopolamin und Butylscopolamin.

2.3.1.1 Atropin und Scopolamin

Atropin und Scopolamin sind neurotrope Spasmolytika die durch unterschiedliche Wirkmechanismen getrennt voneinander betrachtet werden können.

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

Und zum anderen gibt es die Substanz Scopolamin, welche die Muscarinrezeptoren in den Vestibulariskernen und im Brechzentrum blockiert. Scopolamin ist vor allem zur Prophylaxe von Übelkeit und Erbrechen bei Kinetosen wirksam (Aktories 2009).

2.3.1.2 Butylscopolaminiumbromid

Der Arzneistoff Butylscopolaminiumbromid, welcher durch eine quartäre Ammoniumverbindung charakterisiert ist, wird bei oraler oder rektaler Anwendung nur zu etwa 5% resorbiert (Aktories 2009). Bei Spasmen der glatten Muskulatur, vor allem im Gastrointestinaltrakt und die weiblichen Geschlechtsorgane betreffend, sowie zur Erleichterung endoskopischer Untersuchungen des Magen-Darm-Kanals wird Butylscopolamin indiziert. (Mutschler 2012).

2.3.2 Muskulotrope Spasmolytika

Unter muskulotrope Spasmolytika versteht man Pharmaka, welche die phasischen oder tonischen Kontraktionen der glattmuskulären Organe unterdrücken. Der genaue Wirkmechanismus ist aber noch nicht im Detail geklärt. Aber laut Definition weisen diese

Pharmaka weder eine stimulierende noch eine hemmende Wirkung auf die Rezeptoren der Transmitter des vegetativen Nervensystems auf (Estler 2007).

Diese Gruppe der Spasmolytika kann auch bezüglich ihren bevorzugten Angriffspunkt, wie an der Gefäßmuskulatur oder an der intestinalen glatten Muskulatur eingeteilt werden (Estler 2007).

2.3.3 Neurotrop muskulotrope Spasmolytika

Zu den neurotrop muskulotropen Spasmolytika zählen Pharmaka, die zusätzlich noch eine neurotrope (anticholinerge) spasmolytische Komponente in ihrem Wirkmechanismus aufweisen. Zu dieser Gruppe zählt man unter anderem Mebeverin, welches hauptsächlich indiziert wird beim Krankheitsbild des irritablen Colon (Mutschler 2012).

2.3.3.1 *Mebeverin*

Mebeverin ist ein myotropes Spasmolytikum, das eine Wirkung durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur erzielt. Laut klinischen Studien ist es zwar in der Lage eine geringe Schmerzlinderung zu bewirken, aber die Motilitätsstörungen (Obstipation) werden nicht gebessert (Aktories 2009).

3 Material und Methodik

3.1 Testsubstanz

Die Testsubstanz wurde mir vom Department für medizinische und pharmazeutische Chemie zur Verfügung gestellt. Synthetisiert wurde diese unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Dissertant Mario Langer und anschließend wurde die Wirkung dieser Substanz in pharmakologischen Versuchen erforscht.

3.1.1 Nomenklatur und Struktur

Die Testsubstanz nennt sich laut IUPAC 3-(3Butoxyphenyl)-5-phenyl-4H-1,2,4-triazol Hydrochlorid und besitzt ein Molekulargewicht von 329,82.

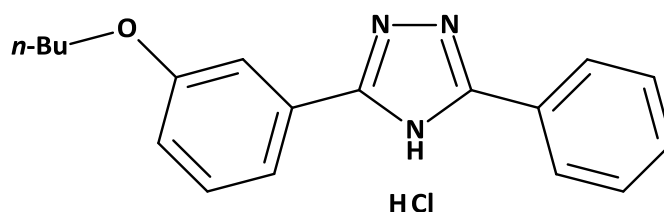


Abbildung 1: Strukturformel MGtr6.HCl

3.1.2 Einwaage

Es standen jeweils 2 Organbäder in verschiedenen Größen zur Verfügung, welche entweder 25ml oder 8ml Fassungsvermögen aufweisen. Je nachdem welches zur Versuchsdurchführung gewählt wurde, musste die Einwaage darauf abgestimmt werden.

Tabelle1: Einwaage von MGtr6.HCl

<u>Einwaage großes Organbad</u> (Fassungsvermögen 25ml)	<u>Einwaage kleines Organbad</u> (Fassungsvermögen 8ml)
$\frac{(MG \div 100)}{4}$	$\frac{(MG \div 100)}{12,5}$
$\frac{(329,82 \text{ g mol} \div 100)}{4} = 0,82 \text{ mg}$	$\frac{(329,82 \text{ g mol} \div 100)}{12,5} = 0,26 \text{ mg}$

Sobald die Substanz eingewogen wurde, wurde diese in 100 µl DMSO vollständig gelöst. Mit dieser Stammlösung konnte dann in den anschließenden Versuchsreihen gearbeitet werden.

3.1.3 Pipettierschema

Um eine bestimmte Reproduzierbarkeit der Versuche zu sichern, war ein striktes Pipettierschema von absoluter Wichtigkeit. Dieses wurde aus der Literatur entnommen. Besonders auf die Zugabe einer genau definierten Menge der Stammlösung in denselben Zeitintervallen musste geachtet werden.

Tabelle 2: Pipettierschema MGtr6.HCl

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



Abbildung 2: Eppendorf-Pipetten

3.2 Nitro-L-Arginin

Nitro-L- Arginin ist ein Derivat der basischen Aminosäure Arginin, welches durch den höchsten Masseanteil an Stickstoff von allen proteinogenen Aminosäuren charakterisiert ist. Diese Substanz weist vor allem eine vasokonstriktorische Wirkung durch die Inhibition der endothelialen NO-Synthase auf. Nitro-L-Arginin war in den Versuchsreihen von Bedeutung um den Wirkmechanismus der Testsubstanz am Dünndarm genauer zu erforschen. Bei der Durchführung wurde diese Hilfssubstanz in zwei verschiedenen Konzentrationen in das Organbad gespritzt. Darauf wurden die eNOS der Darmzellen blockiert. Sollte nach der Zugabe von Nitro-L-Arginin die Testsubstanz doch noch eine spasmolytische Wirkung aufweisen, so resultierte diese dann nicht durch die Stickstoffmonoxidfreigabe.

Die Substanz Nitro-L-Arginin weist ein Molekulargewicht von 210,66 mg/mol.

3.3 Einwaage von Nitro-L-Arginin

Bei der Einwaage von Nitro-L-Arginin hielt man sich an die gleichen Vorschriften wie bei der Einwaage der Testsubstanz, mit der Ausnahme, dass bei den Versuchsreihen des Wirkmechanismus nur das 25ml fassende Organbad verwendet wurde.

Tabelle 3: Einwaage von Nitro-L-Arginn

<u>Einwaage großes Organbad</u> (Fassungsvermögen 25 ml)
$\frac{(Mg \div 100)}{4}$
$\frac{(329,82 \text{ } \mu\text{mol} \div 100)}{4} = 0,82\text{mg}$

Um die endgültige Stammlösung herzustellen, wurde die eingewogene Menge an Nitro-L-Arginin dann noch mit 100 µl 60 millimolarer KCL-Tyrode- Lösung vermengt.

3.4 Nährlösung

Als Tyrode (Physiologische Nährlösung) wurde eine Modifikation der Krebs- Henseleit-Lösung verwendet, welche entsprechend der Vorschrift nach Reiter (1967) angefertigt wurde. Diese Lösung war von großer Wichtigkeit um die physiologische Funktion der isolierten Organe aufrecht zu erhalten. Wichtige Bestandteile waren unter anderem verschiedene Ionen sowie Glucose.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode (physiologische Nährlösung)

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

Tabelle 5: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

Substanz	Menge
NaCl	67,2 ml
KCl	70,0 ml
NaHCO ₃	167,4 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ PO ₄	2,36 ml
CaCl ₂	6,4 ml
Glucose	3,96 g

Die Nährlösung wurde an jedem Versuchstag jeweils in der Früh frisch zubereitet. In einem 2 Liter- Messkolben wurden die Bestandteile aus Tabelle 2 wie NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, KH₂PO₄ und Glucose, mit Ausnahme von Calciumchlorid, in der jeweils vorgeschriebenen Menge zusammengeführt. Anschließend wurde der Kolben auf ca. drei Viertel des Volumens mit Aqua bidestillata aufgefüllt und danach kräftig geschüttelt um die gleichmäßige Durchmischung der Inhaltsstoffe zu gewährleisten. Darauf wurde die Lösung für etwa 20 Minuten mit Oxymix (Carbogen) begast. Nach 20 Minuten wurde darauf das Calciumchlorid tropfenweise mit einer Pipette hinzugefügt. Unbedingt zu beachten war die langsame Zugabe, da sonst die Gefahr von schwerlöslich bildenden Calciumsalzen bestand und die darauf folgende Trübung der Tyrode, womit diese unbrauchbar geworden wäre. Als letzter Schritt wurde der Kolben dann vollständig bis zur 2 Liter- Markierung mit Aqua bidestillata aufgefüllt.

Die fertig hergestellte Tyrode war am jeweiligen Versuchstag von absoluter Wichtigkeit sowohl für die Präparation und Lagerung, als auch während der Versuchsabläufe zur Aufrechterhaltung der Organfunktion.

3.5 Kaliumchloridlösung

Für Versuche an der glatten Muskulatur, wie der Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum, wurden die Organbäder mit einer Kaliumchloridlösung befüllt. Durch die Benutzung dieser Lösung kam es zu einer maximalen Kontraktion der glatten Muskelzellen, was wiederum notwendig war um im Anschluss auf eine vasodilatierende beziehungsweise spasmolytische Wirkung der Testsubstanz schließen zu können.

Die Kaliumchloridlösung wurde ebenfalls an jedem Versuchstag frisch zubereitet. Die Herstellung erfolgte zunächst so, dass man je nach Versuchsorgan die notwendige Menge an Kaliumchlorid auf einem Kartenblatt einwog. Anschließend wurde das gewogene Kaliumchlorid, das man aus Tabelle 5 entnahm, in einen 100 ml Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit der frisch zubereiteten Tyrode von diesem Tag aufgefüllt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kaliumchlorid- Lösung

Präparat	$\frac{KCl\ g}{100ml\ Tyrode}$	Konzentration (mmol/l)
Aorta descendens	0,67	90
Arteria pulmonalis		
Terminales Ileum	0,45	60

3.6 Lösungsmittel

Da die getestete Substanz MGtr6.HCl nicht in Wasser löslich war, musste diese vor Start der Versuche in DMSO gelöst werden. DMSO ist ein Dimethylsulfoxid und sehr weit verbreitet als farb- und geruchloses, lipophiles Lösungsmittel. Da dieses Lösungsmittel auch besondere Eigenschaften aufweist, etwa das leichte Eindringen in die Haut und in die Zellmembranen, wird es in der Pharmazie auch gerne bei Herstellung topischer Arzneimittel wie Salben verwendet um die Penetration zu fördern. In zu hoher Konzentration weist es jedoch eine zytotoxische Wirkung auf. Besonders bei den abschließenden Auswertungen der Versuche musste die Eigenwirkung des Lösungsmittel DMSO mitberücksichtigt werden. DMSO zeigt sowohl eine dilatatorische Wirkung, wie an der Aorta und Lungenarterie, als auch eine negativ inotrope Wirkung an den Papillarmuskeln, sowie eine spasmolytische Wirkung auf den Darm, welche am Ende des Versuchs zurückgerechnet werden musste.

3.7 Gas

Bei der Tyrodenherstellung war die 20 minütige Begasung mit Oxymix (Carbigen) unabdinglich, da eben dieser wichtige Schritt zu einer Sättigung der Nährlösung mit Sauerstoff führte und auch einen konstanten pH- Wert von 7,2 – 7,4 gewährleistete. Unter Oxymix versteht man ein Gasgemisch, welches sich aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid zusammensetzt.



Abbildung 3: Gashahn

3.8 Versuchstiere

Um die Versuche durchführen zu können, wurden jeden Tage Organe von männlichen oder weiblichen Meerschweinchen herangezogen. Es handelte sich dabei um Meerschweinchen, die aus einem Grazer Reptilienzoo bezogen wurden. Die Tiere wiesen ein durchschnittliches Gewicht von 250- 600g auf.

Da besonders die Ionenströme von Meerschweinchen eine enorme Ähnlichkeit mit denen des menschlichen Herzens zeigen, wurden diverse Versuchsreihen an Organen von Meerschweinchen durchgeführt.

3.9 Organe

An jedem Versuchstag wurde ein Meerschweinchen ausgewählt und dieses mit genauem Genickschlag getötet, wodurch der Tod sofort eintrat. Direkt im Anschluss wurde das Meerschweinchen mit Hilfe einer Schere entlang des Thorax geöffnet und das noch schlagende Herz entnommen. Unmittelbar danach wurde ein Teil des terminalen Ileums herausgeschnitten, ebenso wie die thorakale Aorta.

Um ein frühzeitiges Absterben der Organe zu verhindern wurden diese sofort nach der Entnahme jeweils separat in ein Becherglas mit der frisch zubereiteten Tyrode gegeben und darauf möglichst rasch mit Oxymix (Carbogen) begast.



Abbildung 4: Gerätschaften für die Organentnahme

3.10 Präparation der Organe

Nach der erfolgreichen Entnahme der Organe, folgte unmittelbar darauf die Präparation dieser unter einem Lichtmikroskop. Das entsprechende Organ wurde mit Hilfe von zwei Präpariernadeln auf einer dünnen Korkschicht fixiert, die sich in der Petrischale befand und wurde mit der physiologischen Nährlösung befüllt. Um einen darauffolgenden Auftrieb des Korkrings zu vermeiden, wurde dieser mit einem Gummischlauch beschwert. Bei der Präparation kamen weiters Spitzscheren, Federschere, Pinzetten und Pasteurpipetten zum Einsatz.



Abbildung 5: Präparation der Organe

3.10.1 Präparation Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)

Nachdem die Aorta descendens entnommen wurde, musste zuerst eine Reinigung dieser von jeglichen Muskel- und Geweberesten mit Hilfe einer Federschere erfolgen. Bei diesem Vorgang war höchste Vorsicht von Nöten, da die Aorta descendens nicht allzu stark gedehnt werden durfte und auch keine Einschnitte in das Gefäß entstehen durften. Die Aorta wurde an beiden Enden mit Hilfe von 2 Präpariernadeln befestigt und dann versuchte man entlang der Aorta die weißlichen Gewebereste oder Muskelreste zu entfernen. Danach wurde die gereinigte Aorta in ringförmige Stücke mit einer Länge von circa 2-3 mm geschnitten.

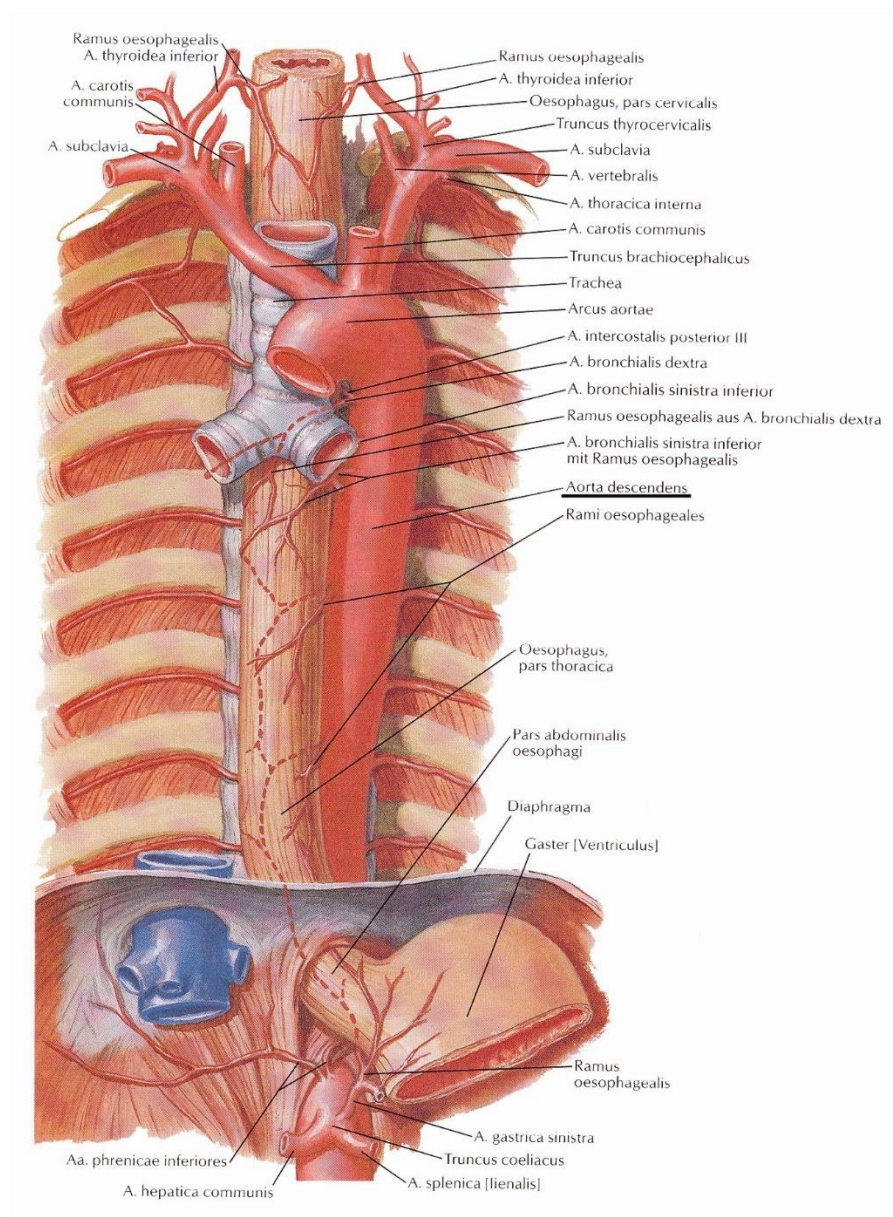


Abbildung 6: Verlauf der Aorta (Netter FH 2003)

3.10.2 Präparation Truncus pulmonalis (Pulmonalarterie)

Unter dem Lichtmikroskop wurde bei der Arteria pulmonalis ebenfalls eine Reinigung von Überresten an Lunge und Fettgewebe sowie von Perikardresten vorgenommen. Daraufhin wurde die Arteria pulmonalis abgeschnitten, wobei man darauf achtete diese möglichst herznah abzutrennen, da nur das kurze Stück bis zur Trennung in linke und rechte Arterie zur Versuchsdurchführung verwendet werden konnte. Anschließend wurde sie analog zur Aorta descendens aufgearbeitet und letztendlich in circa 3 mm lange Ringe geschnitten.

3.10.3 Präparation terminales Ileum (Darm)

Der Darm wurde nach der Entnahme in einem Becherglas mit Tyrode und ständiger Begasung aufbewahrt, da die Präparation erst unmittelbar vor dem Versuchsbeginn erfolgte. Zur Präparation wurden ein circa 0,5 cm großes Stück vom entnommenen Darm abgeschnitten, wobei man darauf achtete die beiden Enden gegengleich abzuschneiden. Mit einer Präpariernadel wurden dann jeweils die beiden Enden in einer mit einem Korkring ausgelegten und mit Tyrode befüllten Petrischale fixiert. Wichtig war, dass die Präpariernadeln dementsprechend angebracht wurden um ein Offenhalten des Darmlumens zu gewährleisten. Daraufhin konnte man mit einer Pipette vorsichtig den Darm durchspülen und diesen von Chymus-Resten entfernen. Anschließend versuchte man an jeweils beiden Enden einen kleinen Haken anzubringen, was notwendig war um das Präparat in die Apparatur einzubringen. Dies erfolgte mit Hilfe eines dünnen Fadens und zwei bis drei Knoten um einen sicheren Halt in der Apparatur zu gewährleisten. Beim Anbringen der kleinen Haken war wiederum oberste Priorität die beiden Darmlumen offen zu halten.

3.10.4 Präparation Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)

Direkt nach der Entnahme des Vorhofes, wurde dieser wieder sofort in ein Becherglas mit Nährlösung eingebracht, um eine Hypoxie oder Koagulation des Blutes im Organ zu verhindern. Durch die Kontraktion des Herzens wurde dieses sowohl innen als auch außen vom Blut befreit.

Bei der Präparation erfolgte wieder ein Reinigungsschritt unter dem Lichtmikroskop. Es wurde zunächst umgebendes Binde- und Fettgewebe sowie anhaftende Lungenteile mit Hilfe einer

Federschere entfernt. Daraufhin wurde der Vorhof wieder mit zwei Präpariernadeln an Basis und Spitze in einer mit Kork ausgelegten Petrischale fixiert. Entlang des Sulcus Coronarius wurde der rechte Vorhof vom Ventrikel abgetrennt. Der Sinusknoten, der den primären Schrittmacher des Herzens darstellt, befindet sich im rechten Vorhof und ist somit erheblich für die Schlagfrequenz des Herzens von Bedeutung. Genauer gesagt befindet sich dieser in der rechten Vorhofwand in der Nähe der Einmündung der Vena cava superior.

Auch bei diesem Organ werden wieder am oberen und unteren Ende zwei kleine Haken angebracht, um ein Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen. Die Haken werden wiederum mit einem dünnen Faden und zwei bis drei Knoten befestigt. Nach diesem Schritt wird das fertige Präparat dann bis zum Versuchsbeginn wieder in eine mit Sauerstoff gesättigte Nährlösung eingebracht.

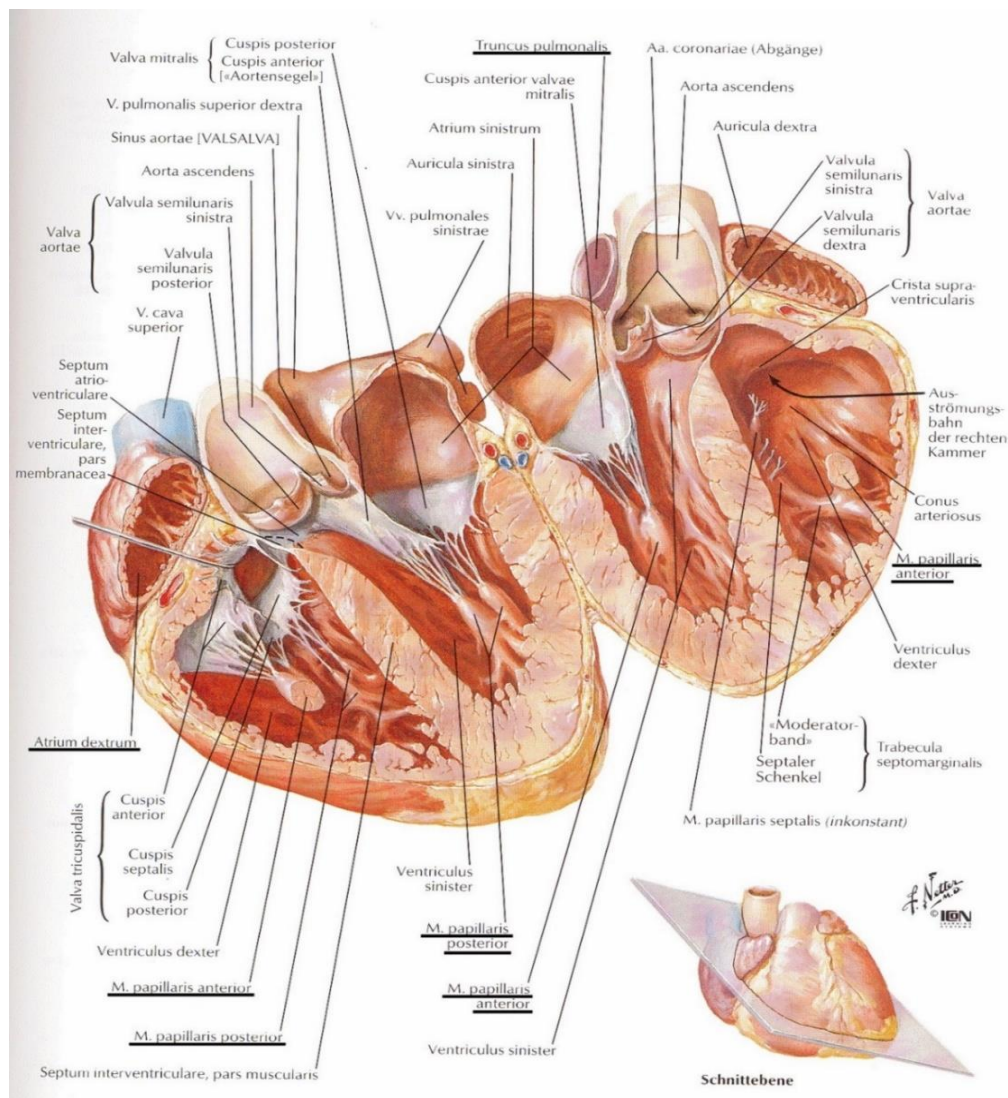


Abbildung 7: Querschnitt des Herzens (Netter FH 2003)

3.10.5 Präparation Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Sobald der rechte Vorhof entfernt wurde, schnitt man den rechten Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze auf, ebendieser Teil wurde aufgeklappt und mit Hilfe von Präpariernadeln am Kork fixiert. Durch diese Präpariertechnik waren die Papillarmuskeln zunächst freigelegt. Insgesamt befinden sich in der rechten Herzkammer drei und in der linken Herzkammer zwei kegelförmige Papillarmuskeln. Anschließend wurden dann noch die Purkinjefasern vorsichtig entfernt, um nicht durch deren Spontanaktivität den Versuch zu beeinflussen.

Zum Schluss wurde dann genau am Ansatz der Papillarmuskelsehne wieder mit Hilfe eines Fadens ein kleiner Silberhaken angebracht, dieser ist unabdinglich für den sicheren Halt in der Apparatur.

3.11 Geräte und Apparaturen

Mittels speziellen Geräten wurde die Kontraktionskraft der Organe ermittelt. Um diese zu erfassen wurde jeweils das untere Ende des Organs befestigt und das obere Ende mit einem Silberdraht verbunden. Dieser Silberdraht nimmt vor allem eine wichtige Funktion als Kraftwandler wahr, welcher das ausschlaggebende Element darstellt, um die mechanische Bewegung der Organe in elektrische Signale umzuwandeln.

Sobald eine Dehnung auftrat, traf der stetige Stromfluss durch den erhaltenen Dehnungsmessstreifen auf größeren Widerstand. Bei gleichbleibender Spannung änderte sich gemäß dem Ohm'schen Gesetzes die Stromstärke direkt proportional zur Widerstandsänderung. Mit Hilfe eines Verstärkers wurde dieses elektrische Signal amplifiziert und schließlich vom angeschlossenen Schreiber (Recorder BD- 112, Dual Channel, Kipp & Zonen, Niederlande) auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

3.11.1 Apparaturen

Für die Durchführung der Versuche wurden zwei verschiedene Apparaturen verwendet, die sich lediglich durch ihren Aufbau und das Fixierungsschema unterscheiden. An der Apparatur 1 wurde nur der Papillarmuskel eingespannt und die Substanz getestet, wohingegen die restlichen

Organe, sprich Aorta, Lungenarterie, Rechter Vorhof und Darm an Apparatur 2 untersucht wurden.

Unabdinglich waren auch gleichbleibende Bedingungen bei der Durchführung der Versuche, um eine gewisse Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zu den Rahmenbedingungen gehörten sowohl eine konstante Gaszufuhr und Temperatur sowie einen physiologischen und einheitlichen pH- Wert und eine kontinuierliche Handhabung.

3.11.1.1 Apparatur 1

Wie bereits erwähnt, fand diese Apparatur vor allem zur Untersuchung des Papillarmuskels Verwendung. Da der Papillarmuskel keine spontanen Erregungen aufzeigt, wurde dieser Muskel durch den unmittelbaren Kontakt mit der Elektrode mittels Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, World Precision Instruments (WPI), Hamden (CT, USA)) elektrisch stimuliert.

Die beiden Hauptkomponenten dieser Apparatur bestanden aus einem Wasserbad und einem Stativ. Das Wasserbad, das mit Aqua bidestillata befüllt wurde, wies in dessen Abdeckung ein Organbad auf, welches ein Fassungsvermögen von 27 ml hatte. Weiters das Stativ, das eine entsprechende Vorrichtung zum Einbringen des präparierten Organs anbot. Mit Hilfe eines Stativschlittens konnte dieses Stativ abgesenkt oder angehoben werden, um während des Versuches die Möglichkeit zu haben das Präparat vollständig in das mit Tyrode befüllte Organbad einzutauchen.

Im Rahmen des Versuches war die Einhaltung von physiologischen Bedingungen vorgeschrieben. Daher wurde einerseits das Wasserbad mittels Thermostat und Heizspirale auf eine konstante Temperatur von 35 ± 1 Grad Celsius eingestellt und andererseits das Organbad über eine Glasfritte ständig mit Oxymix (Carbogen) begast, was für eine ausreichende Sauerstoffversorgung also auch für einen physiologischen pH- Wert von 7,2- 7,4 von Nöten war.

Bei der Vorbereitung wurde zunächst die entsprechende Temperatur des Wasserbades abgewartet, darauf das Organbad mit Aqua bidestillata und Tyrode gespült und anschließend das Organbad mit 25 ml Tyrode befüllt und der Gashahn aufgedreht. Nach diesen Schritten konnte das präparierte Organ in die Apparatur eingebracht werden. Der angebrachte Silberhaken wurde am Silberdraht der Apparatur mit einem Kraftwandler verbunden und das

andere Ende des Präparats an einem verengten Steg aus Plexiglas eingezwickelt. Der Muskel wird zwischen der Platinelektrode, die als Kathode hier fungiert und der Plexiglasscheibe mit Hilfe einer Feststellschraube fixiert. Anschließend wird der Papillarmuskel durch Senken des Stativschlittens in das mit Tyrode befüllte Organbad eingebracht,.

Um wiederum gleichbleibende Versuchsbedingungen und damit die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde vor dem eigentlichen Versuchsbeginn eine Vorspannung mittels Feintrieb angelegt, die wiederum auch dazu diente eine maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Um diese Kontraktionskraft erfassen zu können, kam ein Kraftwandler zum Einsatz. Dieser Kraftwandler konnte die Muskelkontraktion in elektrische Impulse überführen, die darauf mittels Verstärker amplifiziert und dann durch einen Schreiber dokumentiert wurden.

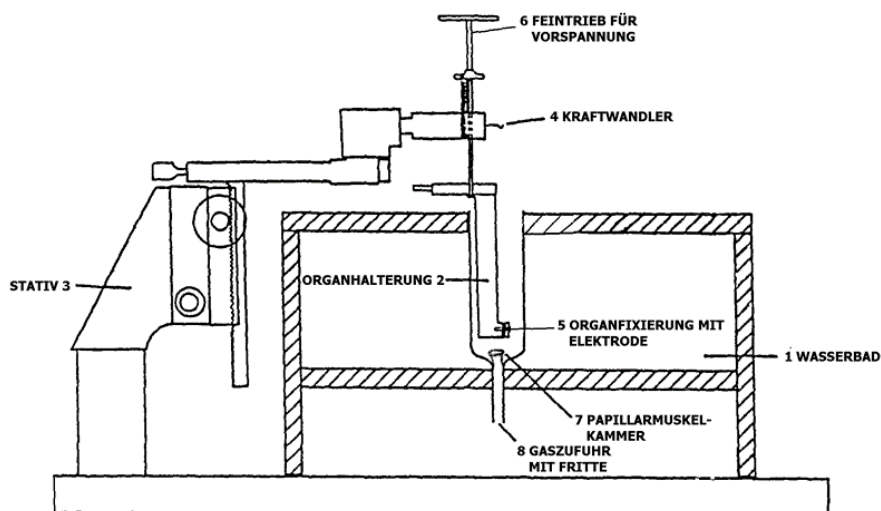


Abbildung 8: Versuchsanordnung 1

3.11.1.2 Apparatur 2

Diese Apparatur wurde für die Durchführung der Versuche an Aorta, Lungenarterie, rechtem Vorhof und am Darm verwendet. Hauptkomponenten dieser Apparatur waren zunächst ein Organbad, das je nach Fassungsvermögen entweder mit 8ml oder 25ml frisch zubereiteter Tyrode befüllt wurde, und ein Stativ das mit einer Halterung für das Präparat versehen war, sowie einem Kraftwandler und einem Feintrieb. Der Unterschied der beiden Apparaturen fand man darin, dass die Apparatur 2 ein Organbad aufwies, bei welchem es sich um ein doppelwandiges Glasgefäß handelte, wodurch das temperierte Wasser zwischen dieser Doppelwand hindurch fließen konnte und somit der Versuchsvorgang erleichtert wurde da man das Organbad nicht mehr ins Wasserbad eintauchen musste. Bei Versuchen am rechten Vorhof wurde die Temperatur konstant auf 35 ± 1 Grad Celsius gehalten und bei Versuchen an glattmuskulären Organen wiederum konstant auf $37 \pm$ Grad Celsius. Weiters wurde wie bei Apparatur 1 die physiologische Nährlösung, die sich im Organbad befand, ununterbrochen mit Oxymix (Carbogen) begast.

Je nach Versuchsorgan wurden die Präparate unterschiedlich eingebracht. Der rechte Vorhof sowie das terminale Ileum wurden mittels dem kleinem aufgebrachten Silberhaken in eine spezielle Einhängenvorrichtung in der Apparatur angebracht. Dagegen wurden die fertig präparierten Aorta- und Lungenarterienstücke direkt zwischen der Aufhängenvorrichtung und dem Drahtstück am unteren Ende des Stegs eingespannt.

Um wieder eine gewisse Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten wurde ebenfalls vor der Durchführung eine Vorspannung angelegt.

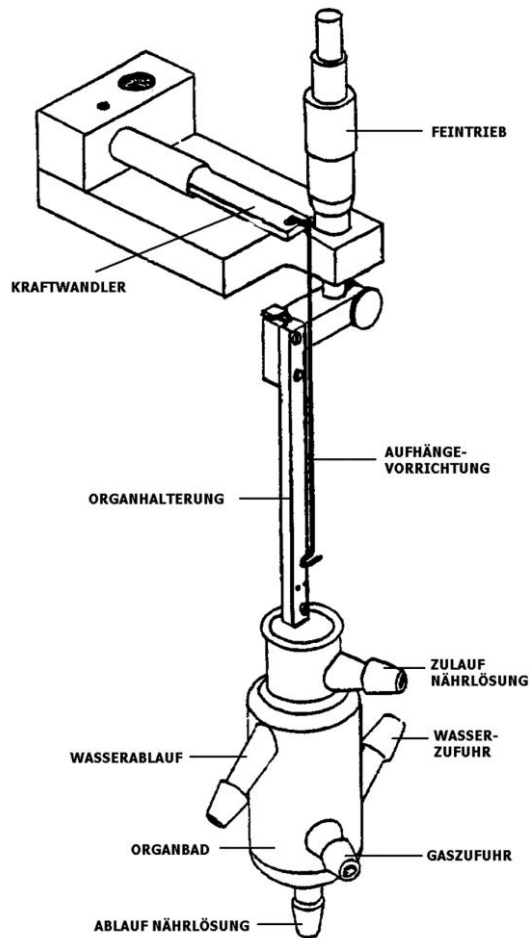


Abbildung 9: Versuchsanordnung 2

3.11.2 Wasserbad

Um eine möglichst konstante Temperatur während der Versuche zu gewährleisten wurden Wasserbäder mit integriertem Thermostat herangezogen. Für Versuche an Aorta, Pulmonalarterie, Darm und Vorhof waren Temperaturen von 37 ± 1 Grad Celsius erforderlich. Für die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel wurde die Temperatur auf 35 ± 1 Grad Celsius eingestellt. Um diese entsprechenden Wassertemperaturen schon beim Start der Versuche vorliegen zu haben, wurden die Wasserbäder jeweils circa eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn eingeschaltet.

3.11.3 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Besonders dem Kraftwandler kam eine große Bedeutung zu in der Apparatur, da dieser imstande war die mechanische Bewegung über einen Dehnungsmessstreifen in elektrische Impulse umzuwandeln. Sobald es zu einer Dehnungsänderung der Organe kam, wie Kontraktion oder Spasmolyse, änderte sich auch der Widerstand und damit der Stromfluss. Mit Hilfe eines Verstärkers oder Amplifiers wurden diese Änderungen nochmals verstärkt und darauf über einen Flachbrettschreiber auf Millimeterpapier übertragen. Die erhaltenen Aufzeichnungen wurden dann ausgewertet.

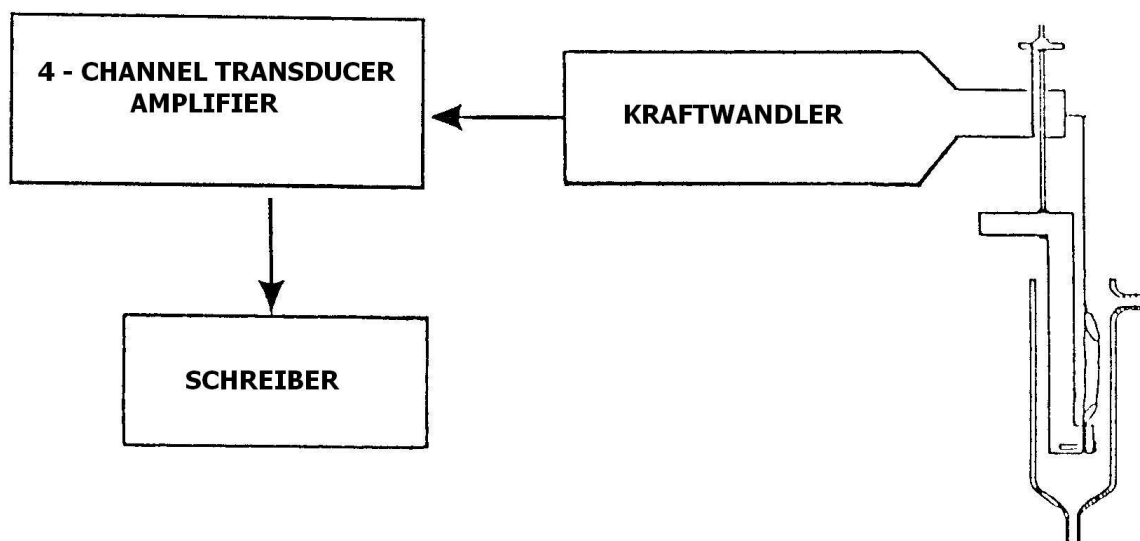


Abbildung 10: Kraftwandler

3.12 Versuchsdurchführung

Der alltägliche Versuchsablauf bei den verschiedenen Organpräparaten verlief jeden Tag nach dem gleichen Schema.

Sobald das Wasserbad die eingestellte Temperatur erreicht hatte, wurde das Organbad mit Aqua bidestillata und Tyrode gespült und die Kammer wiederum befüllt mit dem entsprechenden Volumen an Tyrode konnte das entsprechende Organ in die Apparatur eingebracht werden. Sobald die Vorspannung angelegt wurde und nach Abwarten von 20 min, welche nötig waren um das Präparat an die neuen Bedingungen zu gewöhnen, wurde die Kontraktionskraft zunächst ohne und dann mit der entsprechenden Testsubstanz gemessen. In der zuerst erfolgten Kontrollzeit wurde die Messung ohne die Substanz durchgeführt, dessen Dauer von der

Konstanz der Muskelfunktion abhing, die jedoch mindestens 45 Minuten beanspruchte. Nach diesem Abwarten erfolgte die Zugabe der Testsubstanz. Der Wirkstoff wurde kumulativ hinzugegeben, wobei wieder eine Zeitspanne von 45 Minuten abgewartet wurde, ehe die Konzentration gesteigert wurde. Sobald die Kontrollzeit beendet war, wurden daher zunächst 3 µl der Testsubstanz eingespritzt und dann erneut nach 45 Minuten 7 µl Testsubstanz, nach weiteren 45 Minuten 20 µl und nach erneutem Abwarten von 45 Minuten 70 µl Testsubstanz, wodurch die Messungen bei Konzentrationen von 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l erfolgten.

Tabelle 7: gemessener Effekt auf die Organe

<u>Organ</u>	<u>Gemessener Effekt</u>
Vorhof	Chronotropie
Papillarmuskel	Inotropie
Truncus pulmonalis	Vasodilatation
Terminales Ileum	Vasodilatation
Aorta descendens	Vasodilatation

3.12.1 Versuchsdurchführung Aorta descendens

Bei Versuchen an der Aorta kam die Apparatur 2 zum Einsatz. Das zuvor ringförmig geschnittene Aortenstück wurde direkt zwischen zwei gebogenen Silberdrähten in die Apparatur eingespannt. Besondere Vorsicht galt dem Einspannen, da das Präparat nicht übermäßig mechanisch beansprucht werden durfte und einer zu starken Dehnung ausgesetzt werden durfte. Weiters war ein zu langes Aufhalten des Präparats außerhalb der begasten physiologischen Nährlösung auch für eine Unbrauchbarkeit verantwortlich.

Nachdem die Aorta dann erfolgreich eingespannt wurde, konnte der Steg mit dem Präparat in die Nährlösung eingetaucht werden. Das Organbad wurde natürlich zuvor wieder mit Tyrode sowohl gereinigt als auch befüllt und auf 37 ± 1 Grad Celsius vorbeheizt.

Nach der Durchführung dieser Schritte wurden Schreiber und Amplifier eingeschaltet und dementsprechend eingestellt. Zuerst wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 19,6 mN bei 10 mV angelegt, und dann nach 20 minütigem Abwarten, um das Organ wieder auf die neuen Umgebungsbedingungen vorzubereiten, die Spannung auf 5 mV umgestellt. Bei einer etwaigen Abweichung des Nullpunktes konnte man diesen wieder mittels Feintrieb angleichen. Ein weiterer wichtiger Schritt war das Ablassen der Tyrode aus dem Organbad über einen Schlauchanschluss unmittelbar nach Beginn der Aufzeichnung. Das Organbad wurde darauf je nach Größe mit entweder 8 ml oder 25 ml 90 mmolarer KCl-Lösung, die eine maximale Konzentration des Aortenstücks bedingte befüllt.

Nach erfolgreicher Arbeit erfolgte nun die Kontrollzeit. Das hieß, dass man mindestens 45 Minuten abwarten musste beziehungsweise so lange, bis die auftretende Kontraktionskraft des Organs konstant war. Sobald eine konstante Auslenkung des Schreibers durch den Kontraktionsreiz von mindestens 5 cm erreicht wurde, konnte mit der Versuchsreihe begonnen werden und der Wirkstoff hinzugegeben werden.

Mit 100 % wurde das Plateau definiert, das bei konstanter Kontraktionskraft erreicht wurde. Durch die kontinuierlichen Aufzeichnungen erhielt man am Ende des Versuches darauf eine Kurve.

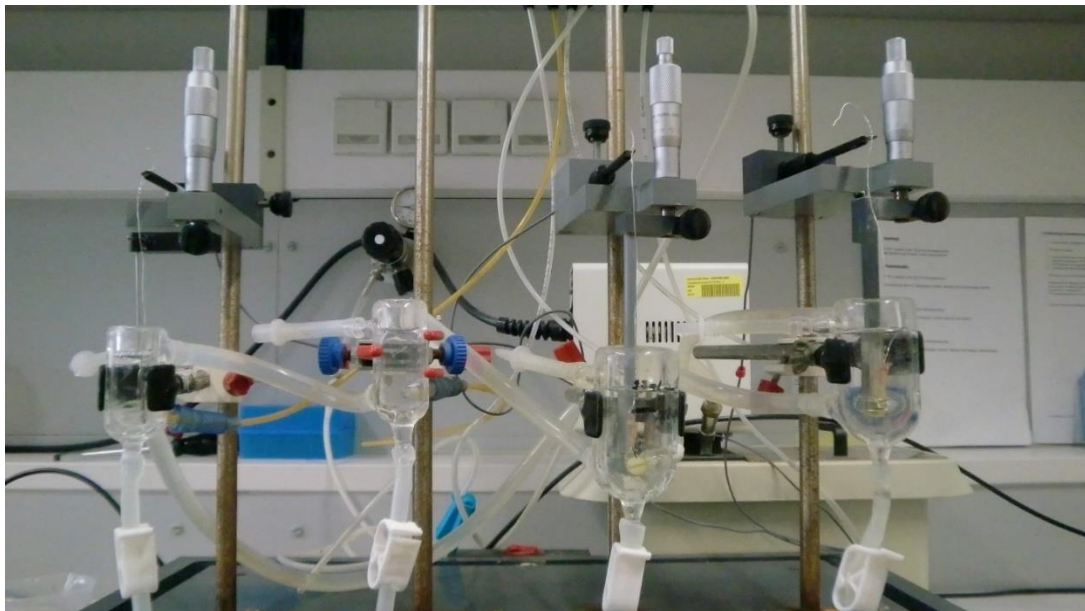


Abbildung 11: Versuchsdurchführung Aorta

3.12.2 Versuchsdurchführung Truncus pulmonalis

Der Versuchsablauf an der Lungenarterie erfolgt nach den gleichen Schritten wie bei der Aorta descendens. Ein einziger Unterschied besteht in der Einstellung der Spannung. Bei dieser Versuchsdurchführung stellt man bereits anfänglich eine Spannung von 5 mV ein und legt somit eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5 mV

3.12.3 Versuchsdurchführung Terminales Ileum

Zur Versuchsdurchführung am Darm wurde wiederum die Apparatur 2 benötigt. Zuerst versuchte man das fertigpräparierte Darmstück mit Hilfe der zwei angebrachten Silberhaken zwischen die beiden Silberdrähte entlang des Stegs an der Apparatur zu befestigen. Daraufhin wurde der Steg in das mit frisch zubereiteter Tyrode befüllte und begaste Organbad getaucht und der Schreiber sowie der Verstärker eingeschaltet und eingestellt. Bei Versuchen am terminalen Ileum wurde eine Vorspannung von 4,9 mN bei 5mV angelegt. Besondere zu beachten galt hier, die Vorspannung nicht zu rasch und zu stark anzulegen, um ein Überdehnen oder sogar ein Reißen des Präparates zu verhindern. Es wurde wiederum 20 min gewartet um dem Präparat Zeit zu geben sich an die neuen Bedingungen anzupassen. Danach wurde mittels Schreiber der Feintrieb auf den Nullpunkt nachjustiert und anschließend konnte die Aufzeichnung beginnen. Ein weiterer wichtiger Schritt war noch, ebenso wie bei Aorta und Lungenarterie, das Auslassen der Tyrode und das erneute Befüllen mit einer dementsprechenden KCl-Lösung. Mit einem Unterschied, dass hier nur eine 60 mmolare KCl-Lösung zum Einsatz kam.

Nach Abwarten der Kontrollzeit konnte dann mit dem eigentlichen Versuch gestartet werden sobald der Schreiber mindestens 5cm bei konstanter Kontraktion aufzeigte.

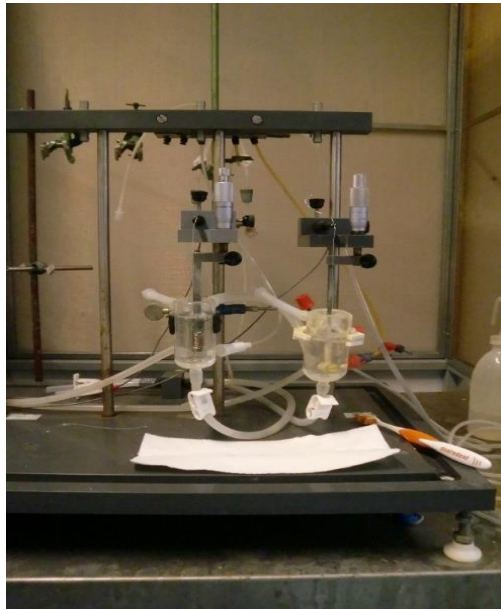


Abbildung 12: Versuchsdurchführung terminales Ileum

3.12.4 Versuchsdurchführung Atrium cordis dextrum

Sobald die Präparation des Vorhofes abgeschlossen war, wurde dieses Organ mit Hilfe der zuvor angebrachten Silberhaken in die Apparatur 2 eingespannt. Das Organbad wurde zunächst gereinigt, mit 25 ml Tyrode befüllt und mit Oxymix (Carbogen) begast. Sobald das Einspannen des Präparates gelang, wurde dieses vollständig in die Nährlösung getaucht. Besonders zu beachten war, die Begasung nicht zu stark zu wählen, da es sonst zu Verfälschungen der Ergebnisse kommen konnte, indem der Silberdraht durch den zu heftigen Gaseinstrom bewegt wurde.

Nach wiedermaligen Einschalten und Einstellen von Schreiber und Amplifier wurde auf den Nullpunkt genau justiert und darauf die Vorspannung bei 5mV auf 10,4 mN. Nach Abwarten von einer Anpassungszeit von circa 20 Minuten konnte die Kontrolle aufgenommen werden. Das erfolgte so, indem die Schläge alle 5 Minuten für jeweils 12 Sekunden, also genau 6 cm beziehungsweise 6 Kästchen am Papier, aufgezeichnet wurden. Hier waren vor allem die Anzahl der Schläge und somit die Schlagfrequenz von Interesse. Sobald eine konstante Schlagfrequenz erreicht wurde, also nach mindestens 45 Minuten, konnte die Testsubstanz im üblichen Pipettierschema einspritzt werden.

3.12.5 Versuchsdurchführung Musculus papillaris

Der präparierte Papillarmuskel, wurde wie schon oben beschrieben in die Apparatur 1 eingespannt und nach diesem Schritt der Steg in das mit 25 ml frisch zubereiteter Tyrode befüllte Organbad abgesenkt. Es wurde eine Vorspannung von 3,92 mN bei 5mV angelegt. Um mittels elektrischer Reize eine Stimulation dieses Muskel zu bewirken, da dieser über keine Spontanaktivität verfügte, war ein spezielles Reizgerät (Accupulser A310- Akkumulator Stimulus Asolator A360, World Precision Instruments (WPI), Hamden, USA) notwendig. Die durchgeführte Reizung erfolgte mit Hilfe sogenannter Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms.

Die Stromstärke lag circa 10 % über der muskelabhängigen Reizschwelle. Von Wichtigkeit war eine nicht zu hohe Stromstärke einzustellen, da sonst die Gefahr bestand durch vollständig ausgelöste Entleerung der Katecholaminspeicher eine Verfälschung der Resultate zu bewirken.

Nach wiedermaligen Abwarten von 20 min wurde darauf alle 5 Minuten lang eine Kontrollmessung durchgeführt, indem immer 6 Schläge aufgezeichnet wurden. Da bei diesem Versuch im Gegensatz zum Vorhof nicht die Schlagfrequenz, sondern die Kontraktionskraft ermittelt wurde, wurde bei dieser Versuchsreihe die Amplitude vermessen. Wenn die Amplitude nicht die 2 cm Marke übertraf, konnte im Laufe der Kontrollmessung die Einstellung der Spannung auf 2mV beziehungsweise auf 1mV geändert werden. Aber erreichte die Amplitude selbst bei so geringer Spannung wie 1 mV nicht die entsprechenden Anforderungen, musste das Präparat sofort verworfen werden. Nach dieser 45 minütigen Kontrollphase und Erreichen der Konstanz, konnte die erste Konzentration der Testsubstanz eingespritzt werden. Jeweils alle 45 Minuten wurde dann die Konzentration erhöht.

3.13 Wirkmechanismus

Sobald eine Versuchsreihe beendet wurde und bei diesem Präparat eine EC_{50} ermittelt werden konnte, wurde auf einen möglichen Wirkmechanismus getestet. Unter EC_{50} versteht man die mittlere effektive Konzentration, bei der eine halbmaximale Wirkung auftritt. Im Zuge meiner Diplomarbeit wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum ermittelt.

3.13.1 Versuchsdurchführung des Wirkmechanismus

Um den Wirkmechanismus von meiner Substanz genau zu untersuchen, wurde wieder ein Darmstück wie schon beschrieben präpariert und in die Apparatur II eingehängt und eine Vorspannung von 4,92 mN bei 5mV eingestellt. Nach einer 20 minütigen Akklimatisierungsphase, wurde die Tyrode abgelassen und durch eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung ersetzt, um maximale Kontraktion zu erreichen. Nach Erreichen einer konstanten Kontraktion, also sobald auf dem Millimeterpapier durch den Schreiber mindestens 5cm erreicht wurden, konnte die Versuchsreihe zur Untersuchung des Wirkmechanismus gestartet werden.

Je nach Versuchsreihe verwendete man 30 µl oder 100 µl Nitro-L-Arginin Lösung und ließ 45 Minuten verstreichen. In diesen 45 Minuten konnte man an der Kurve entweder keine Veränderung erkennen oder einen leichten Anstieg, was man darauf zurückführen konnte, dass durch die Blockade der eNOS der Darm noch leicht kontrahiert. Nach Abwarten dieser 45 Minuten wurden dann 70 µl Testsubstanz in das Organbad eingespritzt und wiederum 45 Minuten gemessen.

Da die untersuchte Testsubstanz MGtr6.HCl in DMSO löslich ist muss aufgrund einer eigenen spasmolytischen Wirkung des Lösungsmittels auf die glatte Muskulatur des Darms dies vor allem in der Auswertung beachtet werden. Zur Berechnung dieses Korrekturfaktors wurde parallel zu den Versuchsreihen auch noch weitere Versuche mit Nitro-L-Arginin und DMSO durchgeführt und erst nach Abzug der Spasmolyse, welche durch DMSO erfolgte, konnte der Datensatz ausgewertet werden.

3.14 Datenauswertung

Die vom Schreiber aufgezeichneten Versuchsabläufe auf Millimeterpapier wurden zur Auswertung herangezogen. Man ging dabei so vor, dass die Wirkung von der Testsubstanz MGtr6.HCl immer in Relation zu dem am Ende der Kontrollphase erhaltenen Wert (100%) gesetzt wurde. Das heißt, alle Werte, die bei einer Spannung von 5mV gehalten wurden, mussten mit 0,98 multipliziert werden, damit die Ergebnisse auf mN umgerechnet werden konnten.

3.14.1 Manuelle Auswertung

3.14.1.1 Auswertung *Truncus pulmonalis*, *Aorta* und *terminales Ileum*

Durch den Einsatz der entsprechenden Kaliumchlorid- Lösung am terminalen Ileum, an der Aorta und am Truncus pulmonalis, kam es zu einer maximalen Kontraktion am jeweiligen Präparat, wodurch dann die Konzentration der zu testenden Substanz erhöht wurde. Bei den Organen der glatten Muskulatur wurde daher untersucht, ob durch die Testsubstanz eine Abnahme der Kontraktionskraft resultierte, sprich ob eine Gefäßrelaxation beziehungsweise Spasmolyse eintritt. Mit Hilfe eines Schreibers wurden die bedingten Änderungen der Kontraktionskraft der Präparate aufgezeichnet und diese in Form einer Kontraktionskurve angefertigt. Nach der Kontrollphase und bevor die erste Substanzkonzentration ins Organbad pipettiert wurde markierte man die Position des Schreibers auf dem Millimeterpapier mit Bleistift, um den exakten Zeitpunkt der Wirkstofferrhöhung zu erkennen. Nach Beendigung des Versuches ging man so vor, dass man den Abstand vom Nullpunkt zur Plateauphase, welche am Ende der Kontrollzeit entstand, mit Hilfe eines Lineals vermaß. Die erste Markierung, die eben das Ende der Kontrollphase kennzeichnete stellte daher den 100% Wert dar. Daher lieferte das Ende der zweiten Markierung den Wert bei einer Konzentration von 3 μM , die dritte Markierung eben den Wert von 10 μM und die vierte Markierung den Wert von 100 μM .

Die ermittelnden Werte multiplizierte man darauf mit dem Eichfaktor 0,98. Dieser Wert ergab sich daraus, dass 1cm am Papier bei 5mV 0,98 mN entsprach.

3.14.1.2 Auswertung *Atrium cordis dextrum*

Am rechten Vorhof wurde die mögliche beeinflussende Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz des Herzens, also die Chronotropie bestimmt. Positiv chronotrope Pharmaka wie zum Beispiel Sympathomimetika führen daher zu einer Steigerung der Herzfrequenz und negativ chronotrope wie herzwirksame Glykoside zu einer Verminderung (Hunnius 2004).

Für die Auswertung wurde mit Hilfe eines Schreibers alle 5 Minuten über eine Zeitspanne von 12 Sekunden auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet. Um die Herzschläge pro Minuten ermitteln zu können, wurde die entsprechende Anzahl der Peaks bestimmt und dann mit 5 multipliziert. Für die Auswertung wurden nur die letzten Werte nach 45- minütiger Einwirkzeit

herangezogen. Da der Wert der Kontrollphase 100 % entspricht, wurde bei den Konzentrationen von 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM eine Zunahme oder Abnahme der Chronotropie in Bezug auf den Kontrollwert errechnet.

3.14.1.3 Auswertung *Musculus papillaris*

Bei den Versuchen am Papillarmuskel wurde die Änderung der Kontraktionskraft, sprich die Inotropie ermittelt. Genauer erklärt führen daher positiv inotrope Pharmaka wie herzwirksame Glykoside zu einer Steigerung der Schlagfrequenz des Herzens und negativ inotrope wie Betarezeptorenblocker zu einer Abnahme der Kontraktionskraft des Herzens (Hunnius 2004). Bei diesem Versuch wurde wieder mit einer Geschwindigkeit von 5mm/sec alle 5 Minuten eine Messung durchgeführt. Für die Auswertung wurden die letzten Aufzeichnungen der jeweiligen Messungen von 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM benutzt und in Relation zum letzten Wert der Kontrollphase, der 100% betrug, gesetzt. Die entsprechenden Messwerte wurden mit Hilfe eines Lineals ermittelt, indem die Länge der Amplitude abgemessen wurde. Da die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel mit Hilfe von unterschiedlichen Spannungen durchgeführt wurde, mussten daraufhin die Ergebnisse je nach Spannung mit einem bestimmten Faktor multipliziert werden, um wiederum einheitliche Werte in der Einheit mN zu erzielen.

Tabelle 8: Multiplikationsfaktor für Papillarmuskel

<u>Spannung</u>	<u>Multiplikationsfaktor</u>
5mV	0,98
2mV	0,39
1mV	0,39

3.14.1.4 Auswertung Wirkmechanismus

Auch bei der Auswertung des Wirkmechanismus wird das Ende der Kontrollphase mit Bleistift markiert, bevor 30 μM oder 100 μM Nitro-L-Arginin dazu pipettiert werden. Es wird auch die

Stelle vor der Zugabe von 100 μM von MGtr6.HCl markiert. Die beiden Werte werden daraufhin mit einem Lineal abgemessen. Der Wert, der am Ende der Kontrollphase im Rahmen dieser Versuche erreicht wurde, entspricht wiederum 100 % und alle anderen Werte werden hierzu in Relation gesetzt.

3.14.2 Auswertung am Computer

Um die Auswertung statistisch zu ermöglichen, wurden die erforschten Ergebnisse bei der manuellen Auswertung in eine spezielle Excel-Tabelle eingefügt und mit Hilfe derer Mittelwerte und auch Standardfehler dieser Mittelwerte errechnet.

Durch Unterstützung des Programmes Sigmaplot 9.0 konnte eine graphische Darstellung erfolgen. Dieses Programm erlaubt eine Konzentrations-Wirkungskurve für jede Versuchsreihe der entsprechenden Organe zu erstellen und ermöglicht auch die Ermittlung des EC_{50} Wertes. Die Konzentration der Testsubstanz MGtr6.HCl wurde auf der x- Achse aufgetragen und die y- Achse beinhaltete Werte, die bei der manuellen Auswertung erhalten wurden.

Um die Ergebnisse des Wirkmechanismus graphisch darzustellen, wurde nicht eine Konzentrations- Wirkungskurve gewählt, sondern ein Balkendiagramm

4 Ergebnisse

Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurde für jede Versuchsreihe eine Tabelle erstellt, aus dieser dann die Anzahl der Versuche, die arithmetischen Mittelwerte in mN und auch die Prozente, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit bei entsprechenden Konzentrationen gut ersichtlich waren.

Zu jeder Versuchsreihe wurde abschließend eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von MGtr6.HCl in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Eine Ausnahme stellte der Vorhof dar, bei dem auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz angegeben wurde. Zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven wurden die erforschten Mittelwerte aus den jeweiligen Versuchsreihen verwendet. Sobald es zu einer 50%-igen Abnahme der Kontraktionskraft beziehungsweise der Schlagfrequenz in den Versuchen gekommen war, wurde dies durch eine gestrichelte Linie angezeigt.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Ergebnisse Aorta descendens

Es wurden 7 Versuche durchgeführt, um zu überprüfen ob die Testsubstanz MGtr6.HCl eine mögliche vasodilatative Wirkung auf das Aortenpräparat ausübte. Diese Tabelle gibt die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche wider.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse der Aorta

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (mN)	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (%)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	7	$8,18 \pm 1$	0 ± 0	-
3	7	$7,84 \pm 0,94$	$-4,01 \pm 0,62$	n.s.
10	7	$7,61 \pm 0,92$	$-6,75 \pm 1,37$	n.s.
30	7	$6,72 \pm 1,03$	$-18,0 \pm 5,24$	0,05
100	7	$6,21 \pm 1,03$	$-24,84 \pm 4,82$	0,05

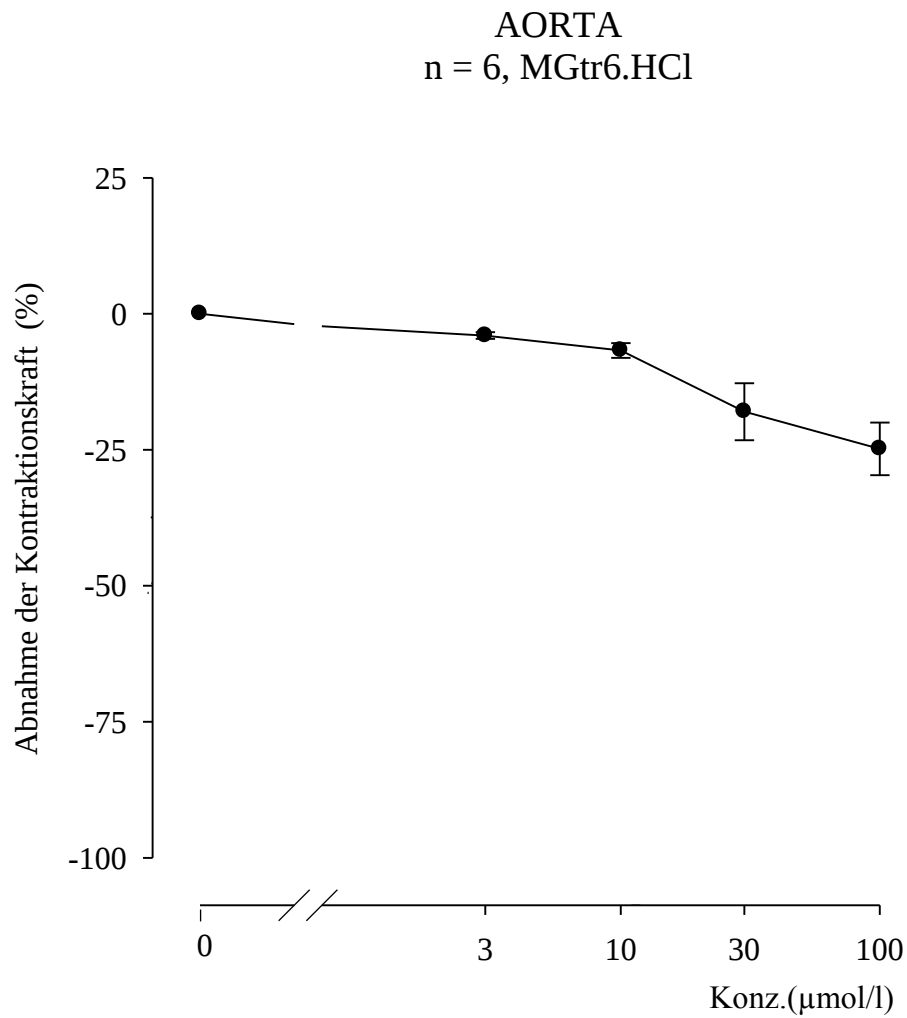


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta

Auf der x-Achse befindet sich die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stehen für die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal laufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

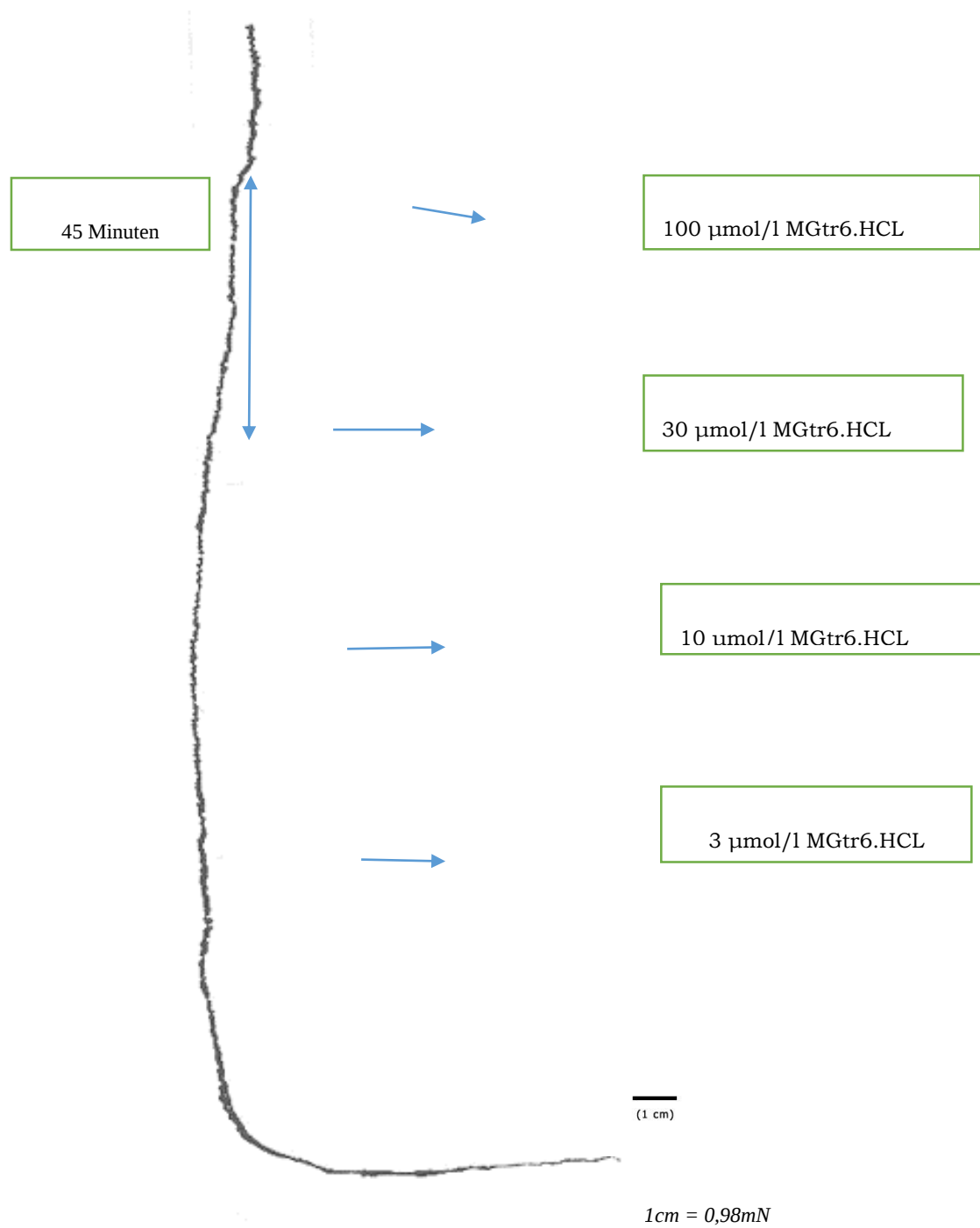


Abbildung 14: Originalabbildung der Kontraktionskurve der Aorta

4.1.2 Ergebnisse Truncus pulmonalis

Bei diesem Präparat wurde die eventuelle kontrahierende Wirkung der Substanz MGtr6.HCl auf die glatte Gefäßmuskulatur untersucht. Mit Hilfe der Tabelle ist es möglich die arithmetischen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler der Zu bzw. Abnahme der Kontraktion in mN aus allen 7 Versuchen abzulesen. Weiters bietet diese Tabelle noch die Veränderung der Kontraktion in Prozent, bezogen auf den Kontrollwert.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse Truncus Pulmonalis

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (mN)	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (%)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	7	$13,12 \pm 2,18$	0 ± 0	-
3	7	$10,82 \pm 1,70$	$-16,25 \pm 3,98$	0,05
10	7	$8,33 \pm 1,08$	$-33,61 \pm 5,35$	0,01
30	7	$3,82 \pm 0,63$	$-69,11 \pm 4,45$	0,001
100	7	$0,54 \pm 0,44$	$-95,91 \pm 2,94$	0,001

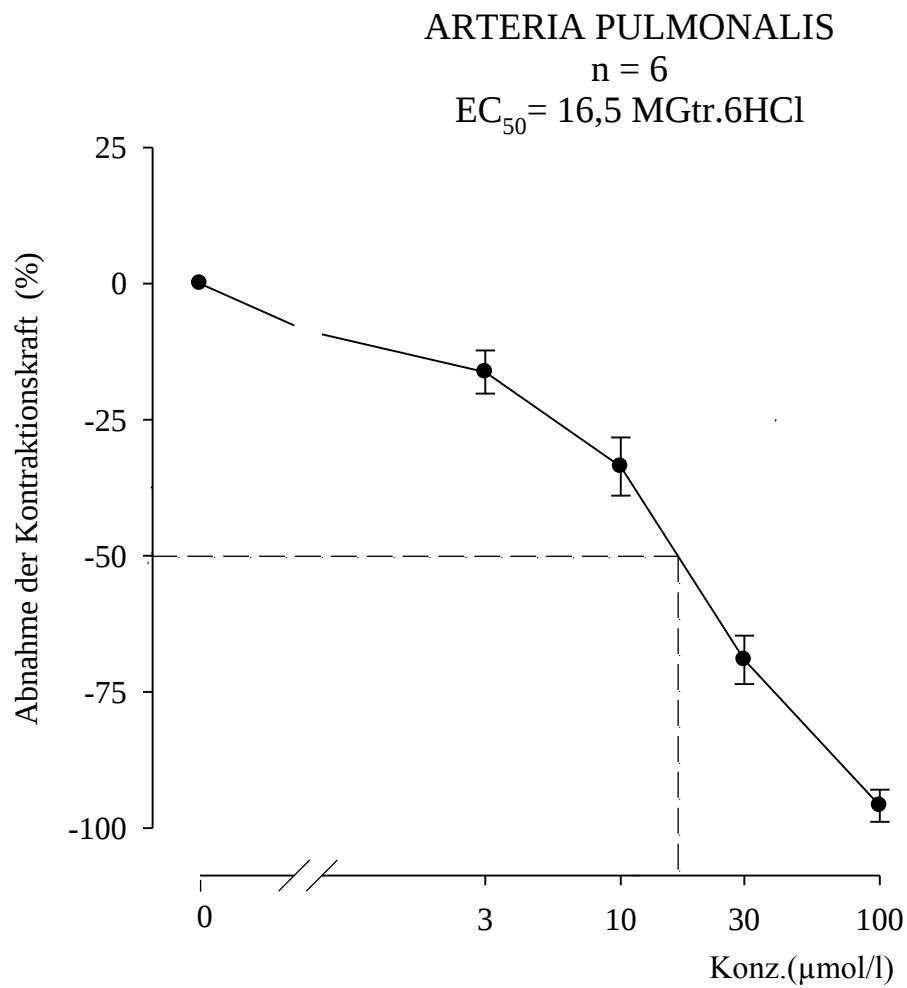


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve des Truncus Pulmonalis

Auf der x-Achse befindet sich die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stehen für die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal laufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

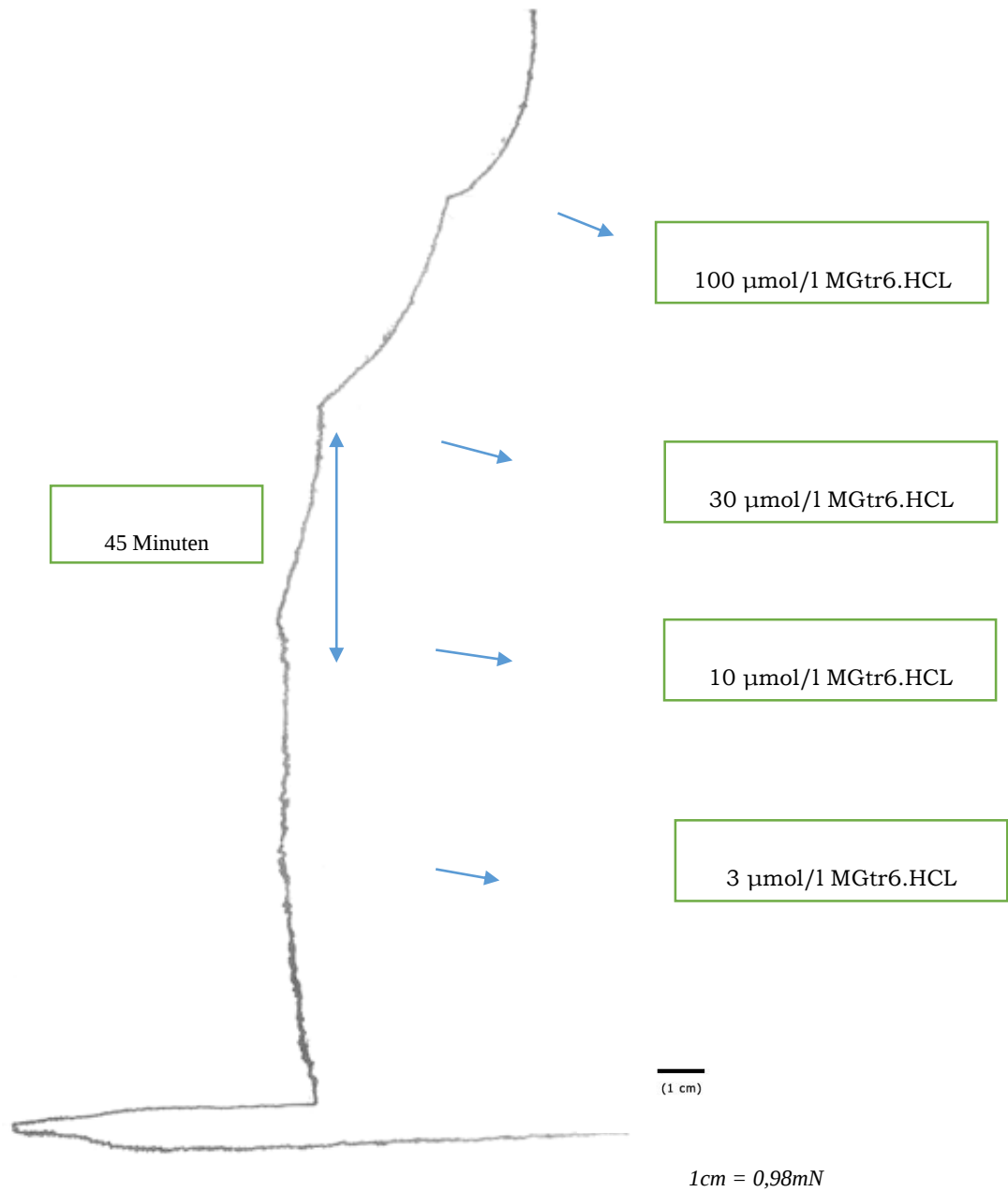


Abbildung 16: Originalabbildung der Kontraktionskurve des Truncus Pulmonalis

4.1.3 Ergebnisse terminales Ileum

Am terminalen Ileum wurden mithilfe von 6 Versuchen die Abnahme der Kontraktion durch die Testsubstanz MGtr6.HCl im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit genauer untersucht. Aus der Tabelle ist es wieder möglich die Mittelwerte sowie Standardabweichungen zu ermitteln. Die arithmetischen Mittelwerte sind in mN angegeben, hingegen die Abnahme der Kontraktion in Prozent dargestellt.

Tabelle 11: Versuchsergebnisse terminales Ileum

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (mN)	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (%)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	6	$7,21 \pm 0,62$	0 ± 0	-
3	6	$6,06 \pm 0,70$	$-16,97 \pm 3,17$	0,05
10	6	$4,41 \pm 0,63$	$-40,12 \pm 4,53$	0,01
30	6	$0,84 \pm 0,07$	$-88,41 \pm 0$	0,001

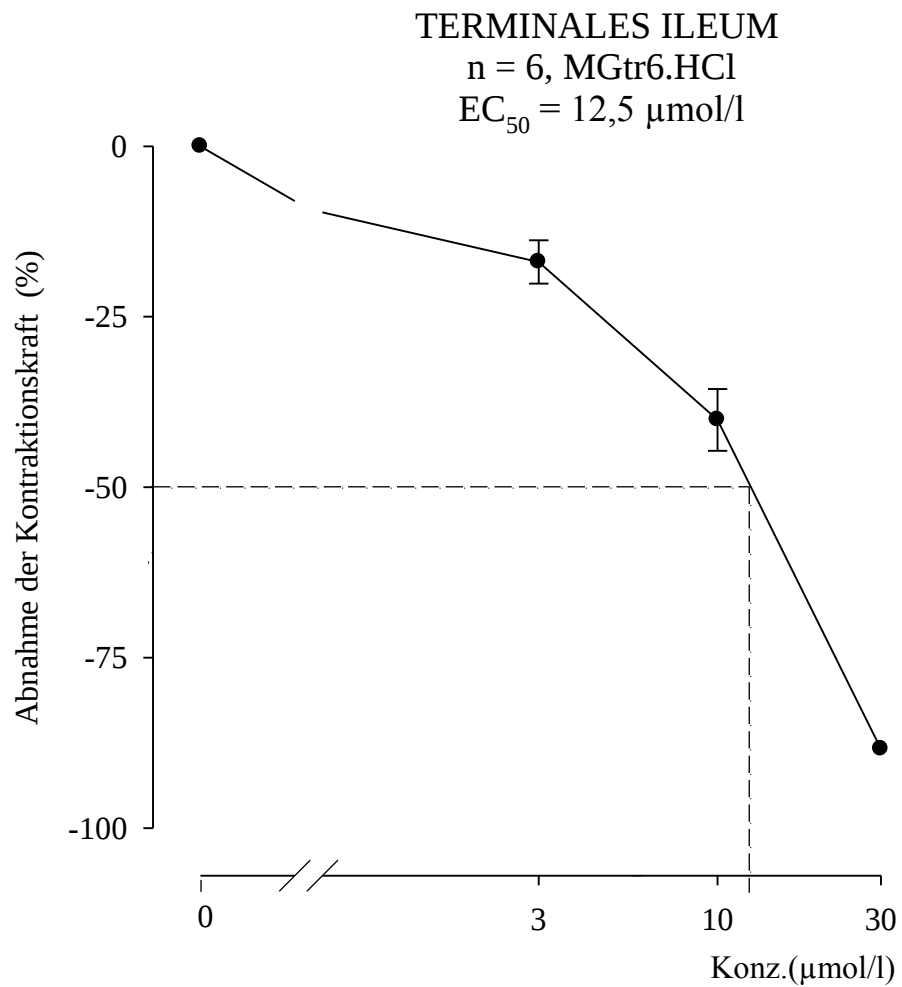


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve des Darms

Auf der x-Achse befindet sich die Konzentration in µmol/l und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stehen für die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal laufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

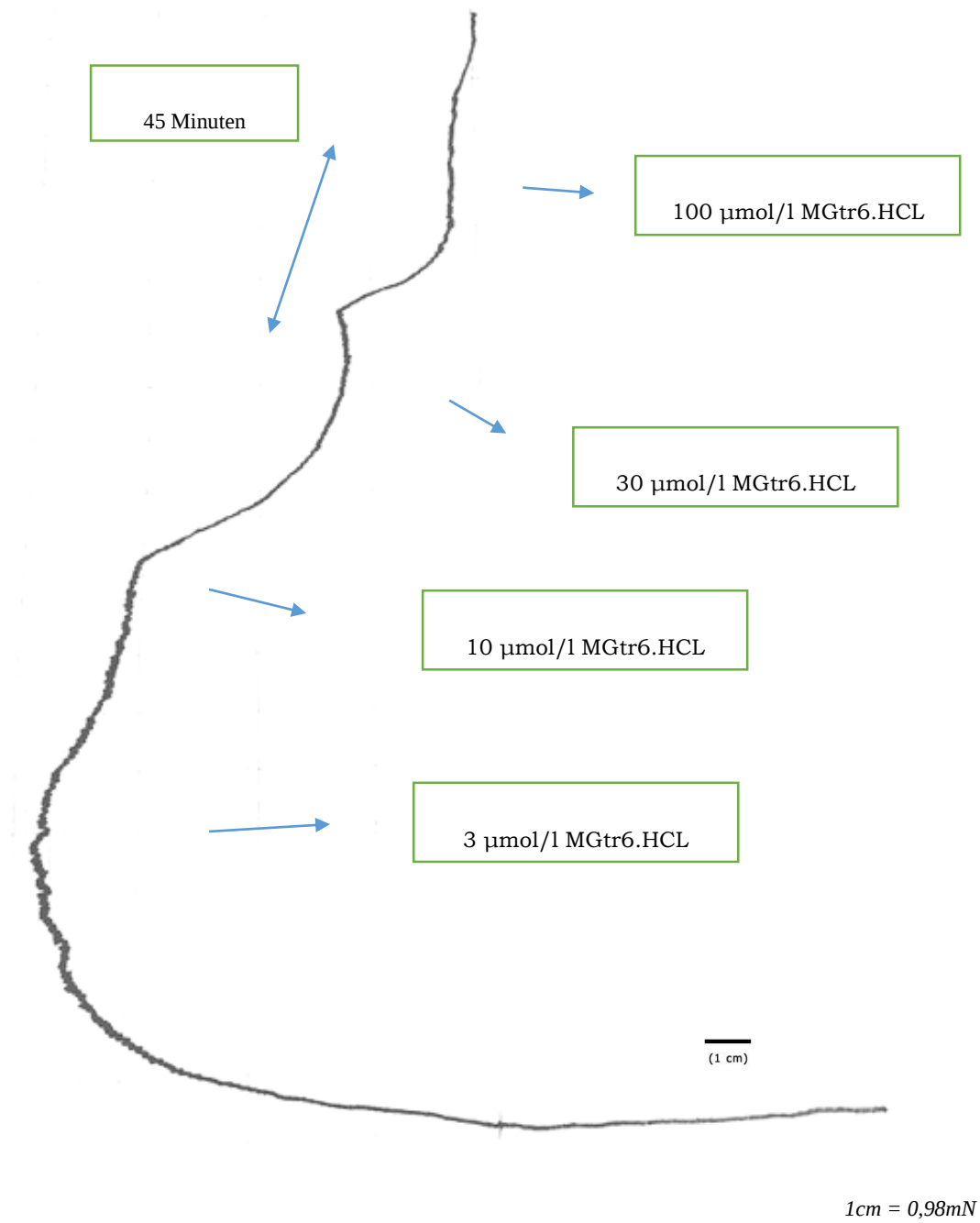


Abbildung 18: Originalabbildung der Kontraktionskurve des Darms

4.1.4 Ergebnisse Atrium cordis dextrum

Am rechten Vorhof wurde mit Hilfe der Testsubstanz in Folge von 6 Versuchen die Chronotropie erforscht. Anhand der Tabelle geht hervor, dass durchschnittlich nach Zugabe der ersten Substanzkonzentration eine leichte Zunahme der Schlagfrequenz resultierte aber im weiteren Verlauf doch eine stetige Abnahme der Chronotropie zu erkennen ist. Nach Durchführung dieser 6 Versuche wurden sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung berechnet und in der Tabelle dargestellt. Die prozentuelle Zu- bzw. Abnahme der Schlagfrequenz wird immer in Relation zur Kontrolle (0%) gesetzt.

Tabelle 12: Versuchsergebnisse Atrium dextrum

<u>MGTr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>f $\pm$ SEM</u> (Schläge/min)	<u>f $\pm$ SEM</u> (%)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	6	219,17 $\pm$ 8,89	0 $\pm$ 0	-
3	6	221,67 $\pm$ 10,14	1,13 $\pm$ 1,86	n.s.
10	6	216,67 $\pm$ 12,22	-1,22 $\pm$ 3,23	n.s.
30	6	194,17 $\pm$ 18,28	-12,01 $\pm$ 6,08	0,05
100	6	60,0 $\pm$ 39,01	-73,27 $\pm$ 16,97	0,01

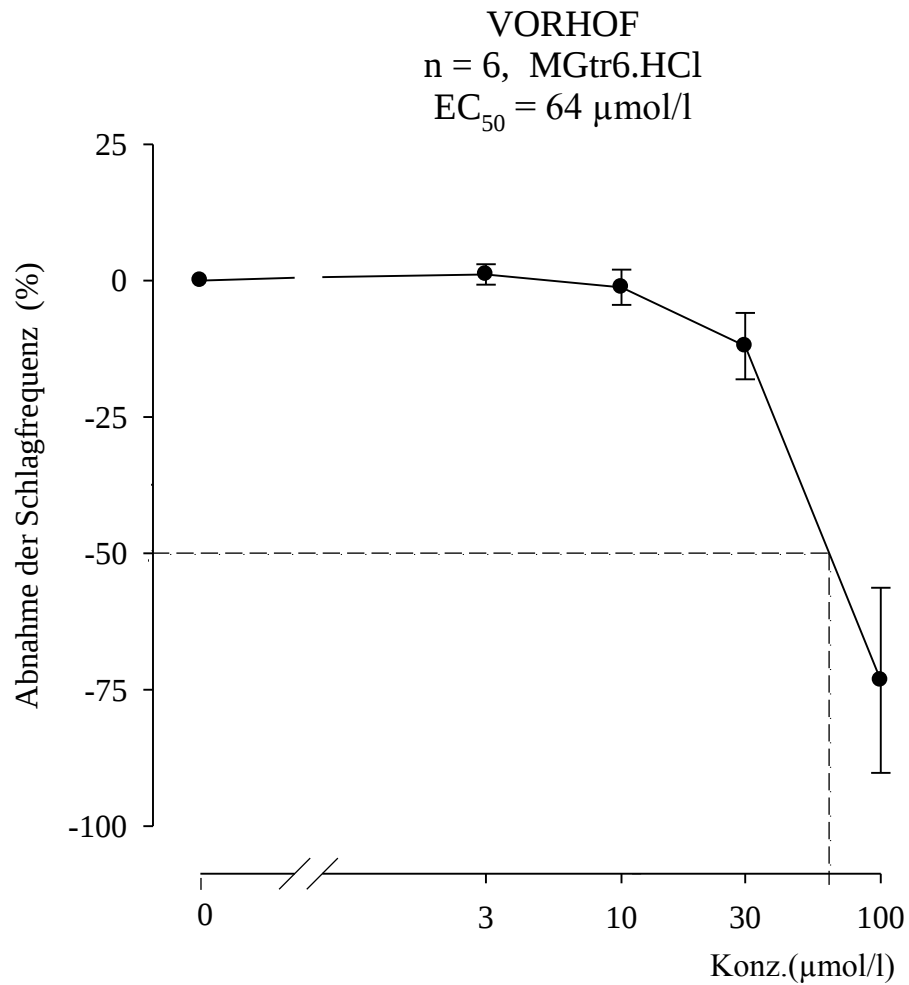


Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve des Vorhofs

Auf der x-Achse befindet sich die Konzentration in µmol/l und auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent.

Die Punkte stehen für die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal laufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

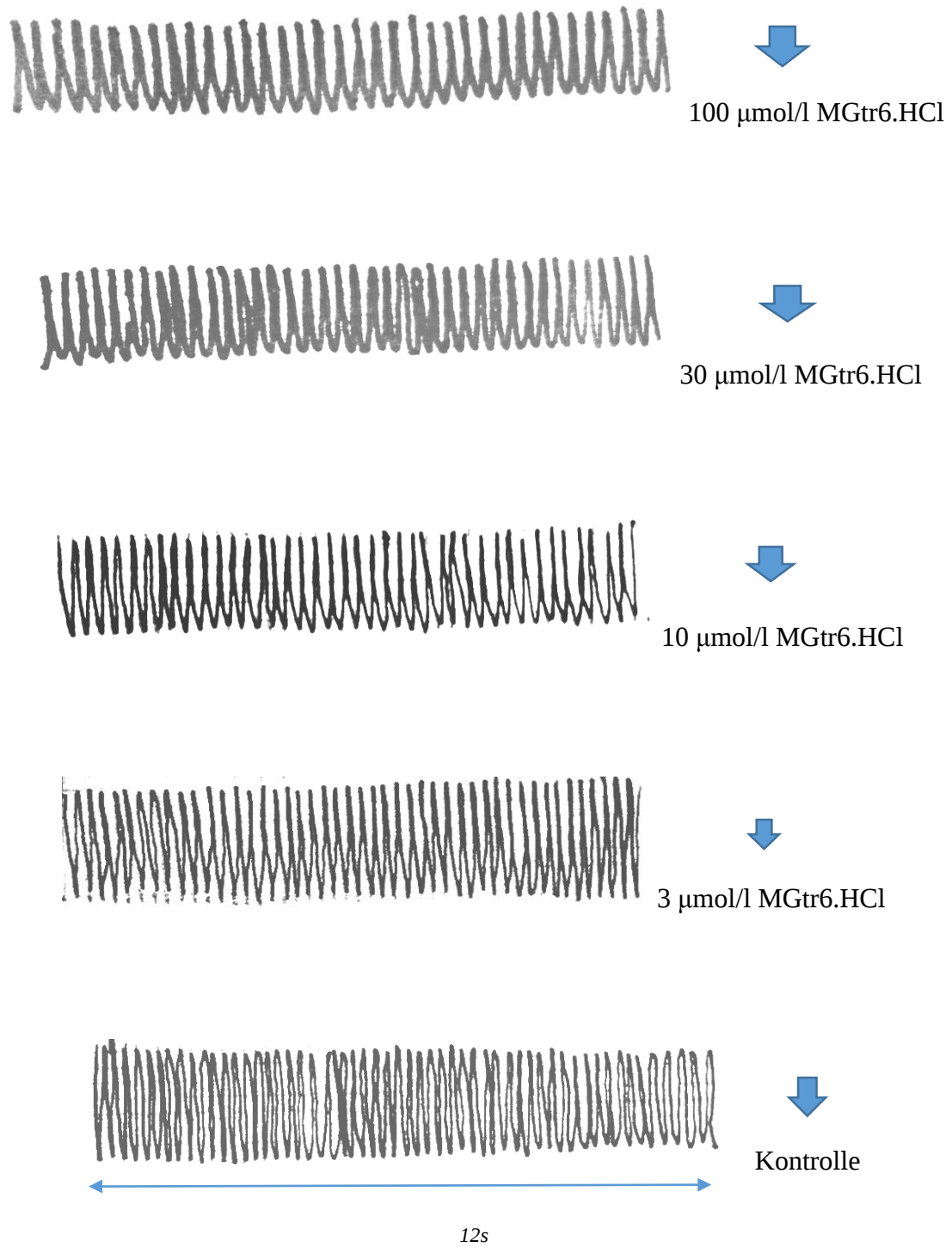


Abbildung 20: Originalabbildung der Frequenz des Vorhofs

4.1.5 Ergebnisse Musculus papillaris

In 5 Versuchsreihen wurde die Inotropie, also näher die Kontraktionskraft des Herzens, mit Hilfe der Testsubstanz am Papillarmuskel bestimmt.

Die Tabelle gibt die arithmetischen Mittelwerte sowie Standardabweichungen wieder und sowie bei den anderen Versuchsreihen wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent, bezogen auf die Kontrolle angegeben.

Bei Testung dieser Substanz kann man anhand der Tabelle auf eine negative inotrope Wirkung schließen.

Tabelle 13: Versuchsauswertung Musculus papillaris

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (mN)	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (%)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	5	$1,24 \pm 0,18$	0 ± 0	-
3	5	$1,16 \pm 0,20$	$-7,25 \pm 7,38$	n.s.
10	5	$1,13 \pm 0,19$	$-9,33 \pm 5,04$	n.s.
30	5	$1,02 \pm 0,12$	$-15,60 \pm 5,67$	0,05
100	5	$0,95 \pm 0,11$	$-21,53 \pm 5,56$	0,05

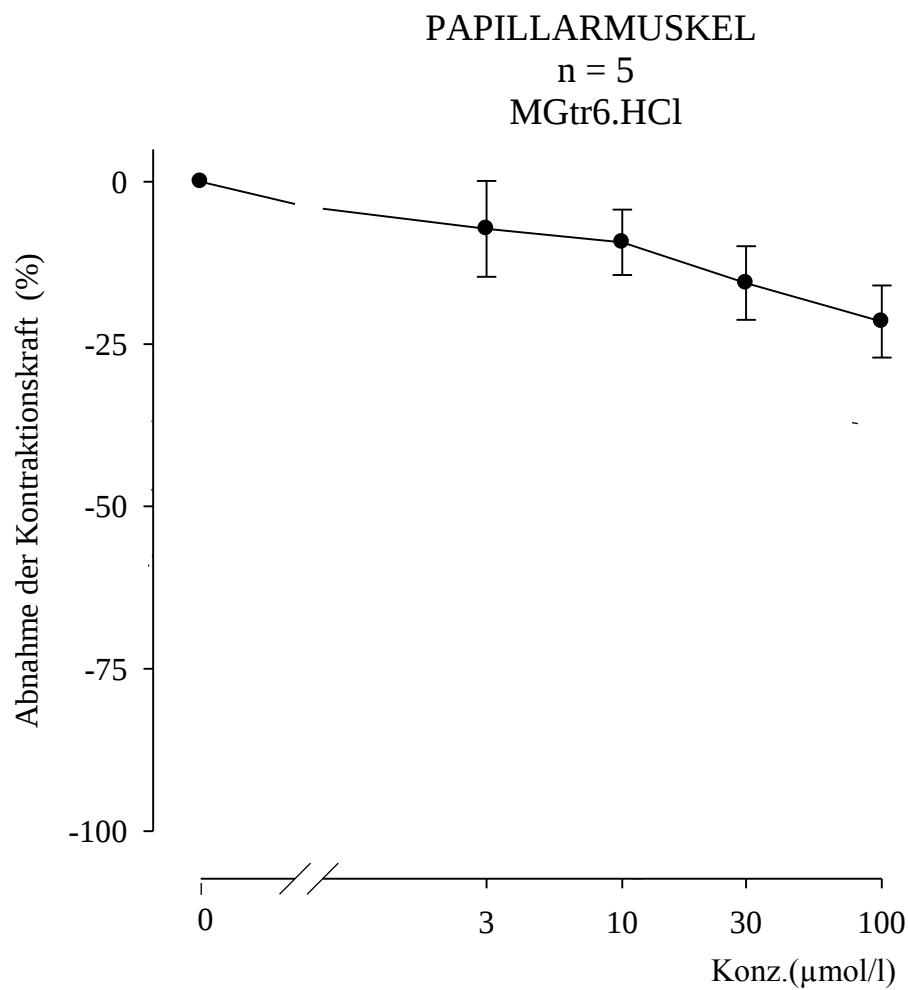


Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve des Papillarmuskels

Auf der x-Achse befindet sich die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stehen für die arithmetischen Mittelwerte und die vertikal laufenden Balken zeigen den Standardfehler (SEM).

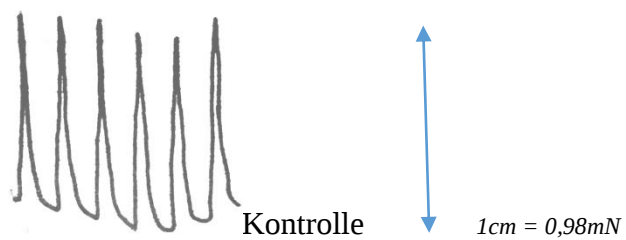
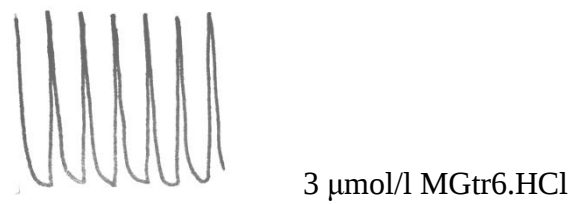
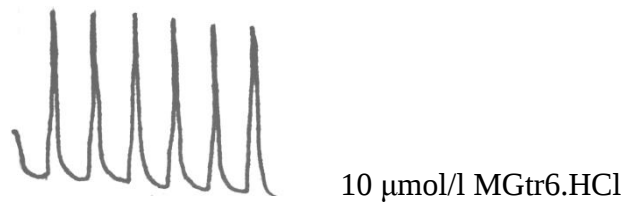
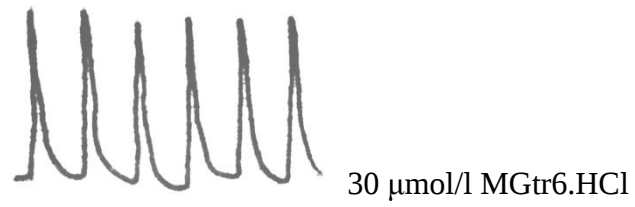
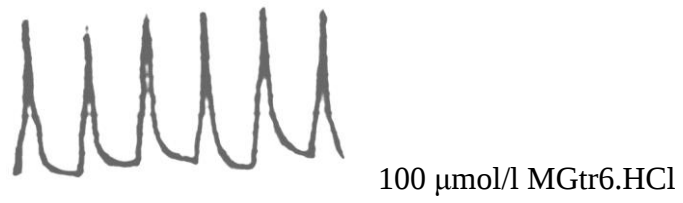


Abbildung 22: Originalabbildung der Amplituden des Papillarmuskels

4.2 Ergebnisse des Wirkmechanismus terminales Ileum

Nach Abschluss und Auswertung der Versuchsreihen am terminalen Ileum konnte an diesem Präparat eine EC_{50} ermittelt werden, daher wurde an diesem Organ noch zusätzlich ein potentieller Wirkmechanismus untersucht.

Um diese Theorie auch zu belegen wurde, sobald eine konstante Kontraktion des Präparates erreicht wurde, in einer Versuchsreihe 30 $\mu\text{mol/l}$ und in der anderen Versuchsreihe 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin für je 45 Minuten eingespritzt.

Mithilfe der Literatur konnte man die Menge an Nitro-L-Arginin genau bestimmen, welche über der von der Testsubstanz erreichten EC_{50} liegen musste. Sobald Nitro-L-Arginin hinzugespritzt wurde, entfaltet es seine Wirkung, was in der teilweisen, beziehungsweisen gänzlichen Blockade der Stickstoffmonoxidfreigabe resultierte. Sofern es nach dem Hinzufügen dieser Substanz zu einer Spasmolyse kam, erfolgte dies nicht über den Wirkmechanismus der endothelialen NO-Synthase. Nach Auswertung dieser Versuchsreihe geht hervor, dass die Testsubstanz MGtr6.HCl nicht über die eNO- Synthase spasmolytisch am Darm wirkt.

4.2.1 Ergebnisse des Wirkmechanismus von 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

Nach Präparieren und einspannen des Präparates und nach Erreichen einer konstanten Kontraktion des Darmes, wurden 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin dem Organbad hinzugefügt. Nach 45 Minuten Wartezeit wurden wiederum 30 $\mu\text{mol/l}$ der zu untersuchenden Testsubstanz MGtr6.HCl eingespritzt. Sobald wiederum 45 Minuten vergangen waren, wurde der Versuch beendet.

Sowohl Mittelwerte der Kontraktionsabnahme und Standardfehler, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit können mit Hilfe der Tabelle ermittelt werden.

Es wurden 4 Versuchsreihen am Darm durchgeführt.

Tabelle 14: Wirkmechanismus von MGtr6.HCl mit einer Konzentration von 30 μ M Nitro-L-Arginin

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> (μ mol/l)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>$f_c \pm \text{SEM}$</u> (mN)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	4	6,79 $\pm$ 0,41	-
30 μ mol/l Nitro-L-Arginin	4	6,37 $\pm$ 0,30	-
100 μ mol/l MGtr6.HCL	4	2,25 $\pm$ 0,20	0,05

**Terminales Ileum, L-Nitro-Arginin (30 μ M)
MGtr6.HCl, 15 μ mol/l
n=4**

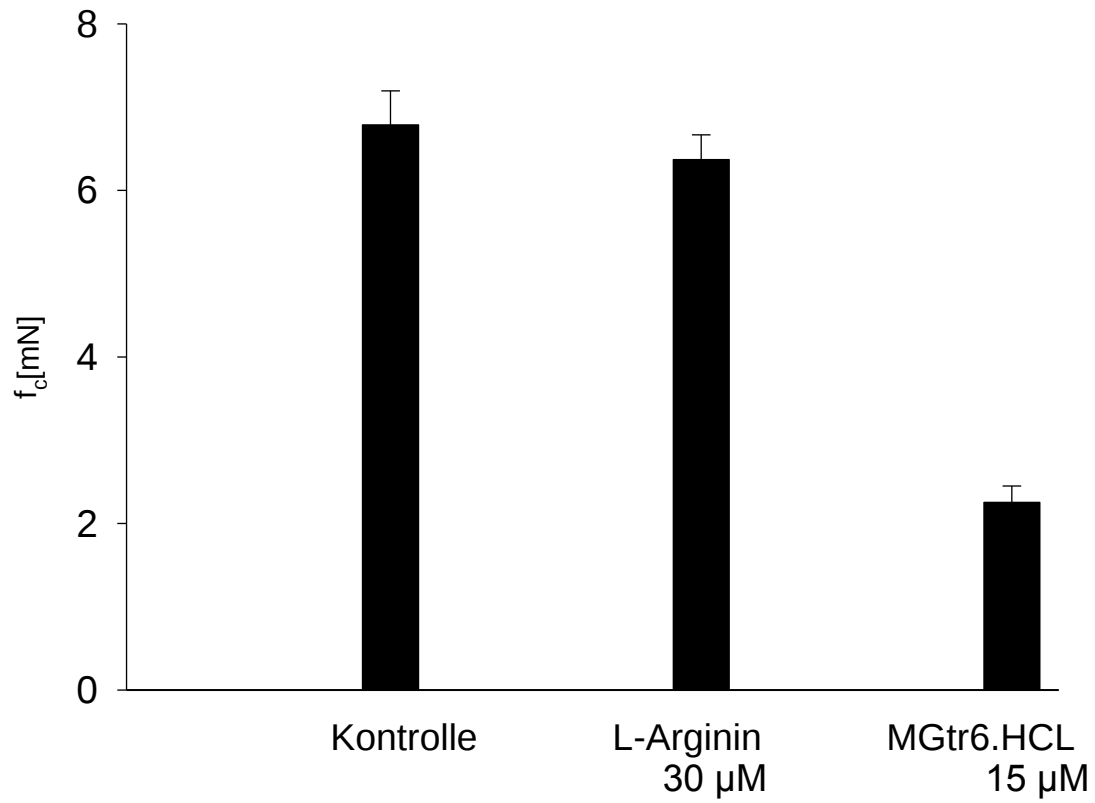


Abbildung 23: Balkendiagramm Wirkmechanismus am Darm mit 30 μ M Nitro-L-Arginin

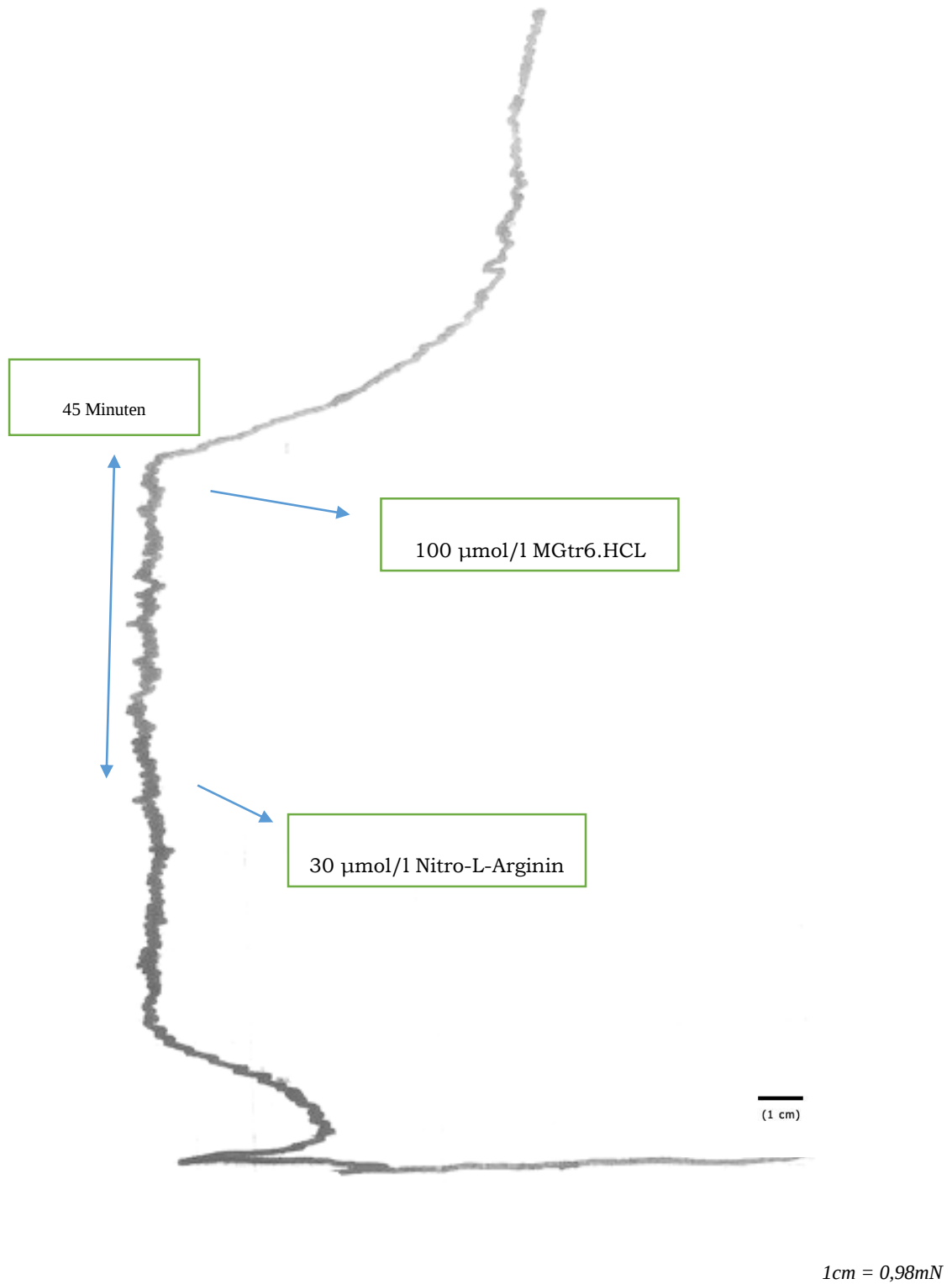


Abbildung 24: Originalabbildung Wirkmechanismus am Darm mit 30 μM Nitro-L-Arginin

4.2.2 Ergebnisse des Wirkmechanismus von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin

Mit Hilfe von 4 Versuchsreihen wurde die spasmolytische Wirkung von Nitro-L-Arginin und der Testsubstanz MGtr6.HCl genauer untersucht.

Sobald eine konstante Kontraktion erreicht wurde, wurden infolge dieser Versuchsreihe 100 µmol/l Nitro-L-Arginin hinzugefügt und nach 45 Minuten dann wieder 30 µmol/l der Testsubstanz MGtr6.HCl.

Tabelle 15: Wirkmechanismus von MGtr6.HCl mit einer Konzentration von 100µM Nitro-L-Arginin

<u>MGtr6.HCl</u> <u>Konzentration</u> (µmol/l)	<u>Anzahl der</u> <u>Versuche</u>	<u>f_c ± SEM</u> (mN)	<u>Irrtumswahrscheinlichkeit</u> (P)
Kontrolle	4	8,23 ± 0,77	-
100µmol/l Nitro-L-Arginin	4	7,20 ± 0,72	-
30µmol/l MGtr6.HCL	4	3,33 ± 0,72	0,05

**Darm, Nitro- L- Arginin (100 μ M)
MGtr6.HCl, 15 μ mol/l
n=4**

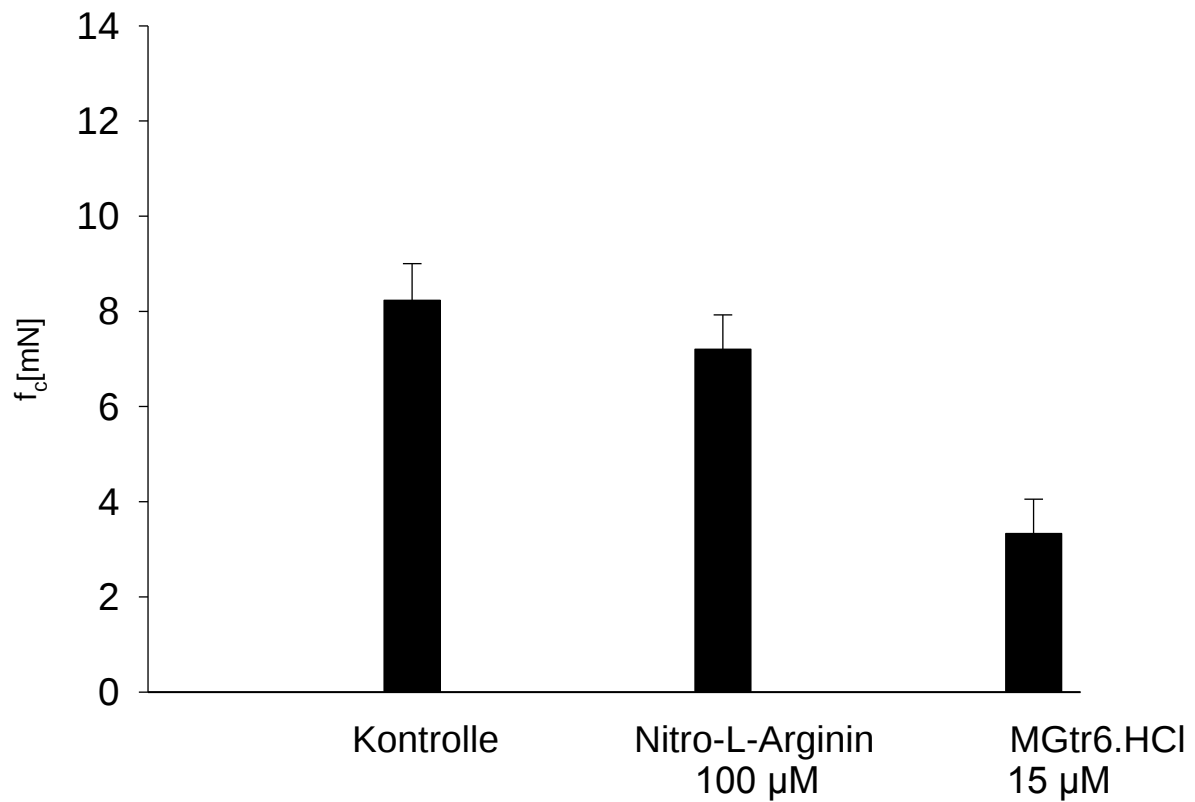


Abbildung 25: Balkendiagramm Wirkmechanismus Darm mit 100 μ M Nitro-L-Arginin

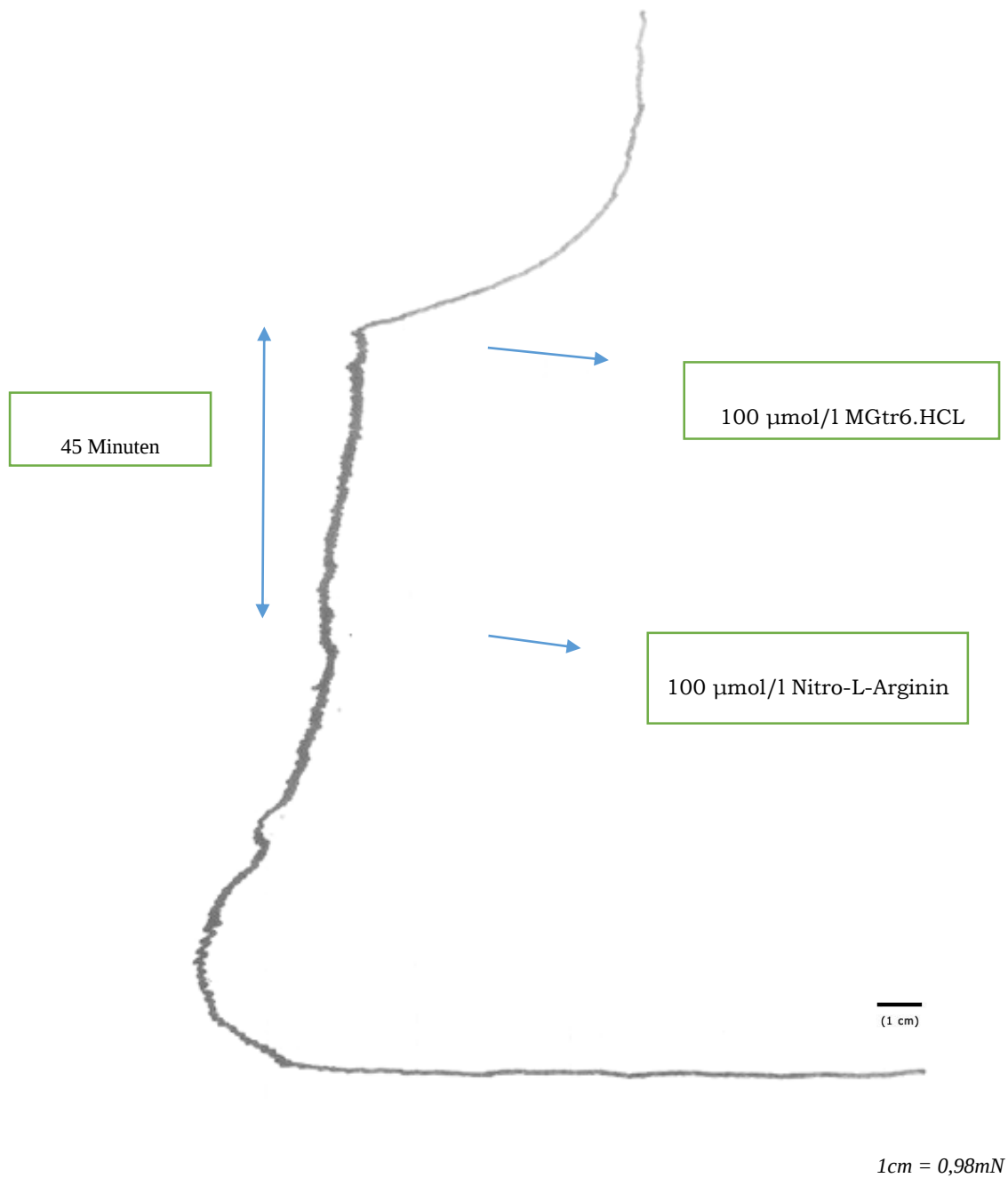


Abbildung 26: Originalabbildung Wirkmechanismus am Darm mit 100 μM Nitro-L-Arginin

5 Diskussion

In diesem Abschnitt möchte ich näher auf die Ergebnisse meiner wissenschaftlichen Arbeit eingehen und diese diskutieren.

5.1 Wirkung von MGtr6.HCl auf die glatte Muskulatur

Die mögliche Wirkung der Testsubstanz MGtr6.HCl wurde an verschiedenen Präparaten der glatten Muskulatur erforscht. Zum einen wurde die mögliche Vasodilatation an der Aorta descendens sowie an der Arteria pulmonalis genauer erforscht. Zum anderen wurde die mögliche spasmolytische Wirkung der Testsubstanz am terminalen Ileum genauer unter die Lupe genommen. Nach Auswertung der Versuche konnte man anhand der Grafiken ablesen, dass die Substanz MGtr6.HCl kaum eine Wirkung auf die Aorta ausübte und somit nicht mal eine EC₅₀ ermittelt werden konnte.

Hingegen lässt sich eine Wirkung der Substanz am Darm und an der Pulmonalarterie feststellen. Der EC₅₀-Wert am terminalen Ileum beträgt 12,5 µmol/l und an der Arteria pulmonalis 16,5 µmol/l.

Tabelle 16: Wirkung von MGtr6.HCl auf Vasodilatation und Spasmolyse

<u>Präparat</u>	<u>Veränderung der Kontraktion in % bei 3 µmol MGtr6.HCl</u>	<u>Veränderung der Kontraktion in % bei 100 µmol MGtr6.HCl</u>
Truncus pulmonalis	-16,25 ± 3,98	-95,91 ± 2,94
Aorta descendens	-4,01 ± 0,62	-24,84 ± 4,82
Terminales Ileum	-16,97 ± 3,17	-80,65 ± 0

5.1.1 Wirkung von MGtr6.HCl auf die Aorta descendens

Durch genau Versuchsdurchführung konnte an der Aorta kaum eine vasokonstriktorische Wirkung erforscht werden. Bereits nach dem Erreichen der konstanten Plateauphase fiel die Kontraktion ab um $4,01 \% \pm 0,62$ des Ausgangswertes bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$. nach der Zugabe der zweiten Substanzkonzentration konnte wiederum eine Abnahme beobachtet werden von $6,75 \% \pm 1,37$. Nachdem weitere $20 \mu\text{mol/l}$ von MGtr6.HCl in das Organbad pipettiert wurden, kam es zu einer stärkeren Dilatation der Gefäßmuskulatur um $18 \% \pm 5,24$. Sobald der Versuch beendet wurde, konnte eine zunehmende Abnahme der Kontraktion von $24,84 \% \pm 4,82$ festgestellt werden. Zur Erstellung einer EC_{50} Konzentrations-Wirkungskurve reichte dieser Effekt der Substanz auf das Präparat aber leider nicht aus.

5.1.2 Wirkung von MGtr6.HCl auf den Truncus pulmonalis

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse an diesem Präparat kann man eine erheblich stärkere Wirkung der Testsubstanz an der Pulmonalarterie feststellen als an der Aorta. Bereits anfänglich kommt es zu einer Abnahme der Kontraktion von $16,25 \% \pm 3,98$ im Vergleich zur Kontrollphase. Die Kontraktionsabnahme schreitet nach Zugabe der nächsten Konzentrationen weiter voran und beträgt am Ende des Versuches bereits $95,91 \% \pm 2,94$. Die Testsubstanz übt daher auf den Truncus pulmonalis eine starke Vasodilatation aus. Daher konnte auch ein EC_{50} -Wert von $16,5 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

5.1.3 Wirkung von MGtr6.HCl auf das terminale Ileum

Nach den Auswertungen dieser Versuchsreihen lässt sich auch eine deutliche Wirkung auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums feststellen. Schon nach der ersten Substanzzugabe resultiert eine deutliche spasmolytische Wirkung von $16,97 \% \pm 3,17$ bezogen auf den Kontrollwert des Dünndarmpräparats. Im weiteren Verlauf des Versuches und nach stetiger Substanzzugabe kommt es zu einer weiteren starken spasmolytischen Wirkung, die am Ende des Versuches $80,65 \% \pm 0,0$ beträgt. Da die Wirkung von MGtr6.HCl auf das Darmpräparat stark genug war konnte man auch einen EC_{50} -Wert von $12,5 \mu\text{mol/l}$ ermitteln.

5.2 Wirkung von MGtr6.HCl auf die Herzmuskulatur

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden auch die möglichen Effekte der Testsubstanz MGtr6.HCl auf die quergestreifte Muskulatur, näher auf die Herzmuskulatur unter die Lupe genommen. Einerseits erforschte man die mögliche Chronotropie am Atrium dextrum und andererseits eine Wirkung der Testsubstanz auf die Inotropie am Musculus papillaris.

Da der Vorhof imstande war sich auf Grund des Sinusknotens selbstständig zu kontrahieren, musste dieser nicht zusätzlich gereizt werden, was eben beim Papillarmuskel der Fall war. Dem Papillarmuskel fehlen physiologische Schrittmacherzellen, so war die elektrische Stimulation mithilfe einer Elektrode unabdinglich.

Die Testsubstanz übte auf den Papillarmuskel eine leicht negativ inotrope Wirkung aus, hingegen auf den Vorhof eine starke negativ chronotrope Wirkung.

Tabelle 17: Wirkung von MGtr6.HCl auf die quergestreifte Herzmuskulatur

<u>Präparat</u>	<u>Abnahme der Kontraktilität</u> ($f_c \pm \text{SEM}$) bei 100 $\mu\text{mol/l}$	<u>EC₅₀</u> ($\mu\text{mol/l}$)
Atrium dextrum	-73,27 $\pm$ 16,97	64
Musculus papillaris	-21,53 $\pm$ 5,56	>100

5.2.1 Wirkung von MGtr6.HCl auf Atrium cordis dextrum

Um die chronotrope Wirkung beurteilen zu können, wurden am Vorhof die Schläge pro Minute gemessen. Wie bereits schon in Kapitel drei beschrieben wurde die Testsubstanz, nach Erreichen einer konstanten Phase kumulativ in bestimmten Konzentrationen eingespritzt. Der Kontrollwert, welcher aus allen 6 Versuchen berechnet wurde betrug durchschnittlich 219,17 $\pm$ 8,89 Schläge pro Minute. Bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ MGtr6.HCl konnte man noch

eine Zunahme der Schläge pro Minute um $1,13\% \pm 1,86$ feststellen. Nach der weiteren Substanzzugabe und nach Erreichen einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ resultierte bereits ein moderater negativ chronotroper Effekt der Testsubstanz von $1,22\% \pm 3,23$ bezogen auf den Kontrollwert. Am Ende des Versuchsverlaufs verstärkte sich dieser Effekt deutlich. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ MGtr6.HCl ergab sich eine durchschnittliche Abnahme der Schlagfrequenz auf $60,00 \pm 39,1$ Schläge pro Minute. Dies entspricht eine Abnahme von $73,27\% \pm 16,97$ vom Kontrollwert. Nach Auswertung dieser Ergebnisse ist ein negativ chronotroper Effekt der Testsubstanz auf den Vorhof deutlich ersichtlich. Dank der starken Wirkung ließ sich auch ein EC_{50} -Wert von $64 \mu\text{mol/l}$ ermitteln.

5.2.2 Wirkung von MGtr6.HCl auf Musculus papillaris

Mithilfe von 5 Versuchsreihen wurde die mögliche Wirkung der Testsubstanz MGtr6.HCl auf die Kontraktionskraft am Papillarmuskel untersucht. Bei näherer Betrachtung der Mittelwerte dieser Versuche kann man auf eine moderate negativ inotrope Wirkung von MGtr6.HCl auf dieses Organpräparat schließen. Bereits nach Zugabe von $3 \mu\text{mol/l}$ lässt sich eine Abnahme der Kontraktionskraft um $7,25\% \pm 7,38$ bezogen auf den Kontrollwert ermitteln. Auch bei weiterer Substanzzugabe resultiert eine abnehmende Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ im Organbad betrug die Abnahme der Kontraktion $21,53\% \pm 5,56$ bezogen auf den Kontrollwert. Durch diese nicht allzu starke Wirkung lässt sich leider kein EC_{50} -Wert eruieren.

5.3 Wirkmechanismus

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse im Rahmen des Wirkmechanismus kann man erkennen, dass die spasmolytische Wirkung nicht durch die NO Freisetzung resultiert, sondern andere Wirkmechanismen dafür in Frage kommen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit am Department der Pharmakologie und Toxikologie wurde die neu synthetisierte Substanz MGtr6.HCl in verschiedenen Versuchsreihen auf eine mögliche Wirkung auf die isolierten Organe von Meerschweinchen untersucht.

In den Versuchen wurden Organe wie Aorta, Pulmonalarterie, Dünndarm, Vorhof und Papillarmuskel verwendet.

Es wurde eine mögliche vasodilatative Wirkung an den Organen wie der Aorta, der Pulmonalarterie und dem Dünndarm getestet. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde auch am Vorhof eine mögliche Beeinflussung der Schlagfrequenz pro Minute erforscht und am Papillarmuskel die Kontraktionskraft untersucht.

Während der Versuche wurde die Testsubstanz kumulativ zuerst in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben und nach jeweils 45 Minuten wurde diese erhöht auf 10 $\mu\text{mol/l}$, dann auf 30 $\mu\text{mol/l}$ und am Ende des Versuches betrug die Konzentration von MGtr6.HCl im Organbad dann 100 $\mu\text{mol/l}$.

An jedem Präparat wurden mindestens 4 Versuchsreihen durchgeführt.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Ergebnisse ausgewertet und die Mittelwerte mit den Standardabweichungen berechnet. Auch die Änderungen der Kontraktion wurde in Prozent hinzugefügt.

Mit Hilfe eines Speziellen Computerprogramms erstellte man auch eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve und ermittelte sofern möglich die EC_{50} Konzentration.

Nach der Auswertung und näherem Betrachten der Ergebnisse kann man zusammenfassen, dass die Testsubstanz auf das Präparat Aorta nur eine geringe vasodilatative Wirkung gezeigt hat. Sowie auf den Papillarmuskel. Die Abnahme der Kontraktion war so gering, dass man zu keinem EC_{50} -Wert kam.

Eine besonders ausgeprägte starke chronotrope Wirkung konnte beim Vorhof erzielt werden mit einem EC₅₀-Wert von 64 µmol/l.

An der Pulmonalarterie wurde ebenfalls eine Wirkung beobachtet mit einem EC₅₀-Wert von 16,5 µmol/l.

Der EC₅₀-Wert am terminalen Ileum ergab 12,5 µmol/l. Dieses Organ wurde auch zur Untersuchung des Wirkmechanismus herangezogen. Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurde die Substanz Nitro-L-Arginin als eNOS-Blocker eingesetzt. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bei dieser Versuchsreihe zwei verschiedene Konzentrationen verwendet. Doch trotz dieser hohen Konzentrationen konnte keine genauere Beeinflussung auf die spasmolytische Wirkung durch Nitro-L-Arginin aufgezeigt werden. Es sind daher noch weitere Versuche von Nöten um den endgültigen Wirkmechanismus zu klären.

7 Literaturverzeichnis

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

Ammon HPT (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: 978-3-79452295-8.

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* 130:1480-1491

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: 142-151

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* 38:1761-1762

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* 20:2657-2663

Agreus L, Svardsudd K, Talley NJ, Jones MP, Tibblin G. (2001) Natural history of gastroesophageal reflux disease and functional abdominal disorders. *AM J Gastroenterol* 96:2905-2914

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* 56:1770-1798

Harvey RF, Pomare EW, Heaton KW. (1973) Effects of increased dietary fibre on intestinal transit. *Lancet* 301:1278-1280

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