



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten Triazol-Derivats (MGtr7) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von / submitted by

Konstantinos Anastasiou

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

Wien, 2017 / Vienna, 2017

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:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer dieser Diplomarbeit Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für die fachliche und persönliche Unterstützung bedanken. Ich danke dir aus der Tiefe meines Herzens, dass du immer an meiner Seite gewesen bist.

Darüber hinaus geht ein großes Dankeschön an den Herrn Dipl. Ing. (FH) Mario Gabriel für die Synthese meiner Untersuchungssubstanz, sowie an Herrn Peter Höfflich für die Beratung bei technischen Problemen.

Außerdem bin ich meinen Studienkolleginnen und -kollegen für die Erfahrungen dankbar, die sie mir im Laufe meines Studiums geschenkt haben.

Nicht zuletzt will ich mich bei meinem Bruder, meinem Vater und meiner Mutter sowie bei meiner Freundin Georgia herzlich bedanken, dass sie immer an mich geglaubt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	DIAGNOSE DES REIZDARMSYNDROMS	1
1.2	REIZDARMSYNDROM VON DIARRHOETYP	2
1.3	AKTUELLE THERAPIE VON REIZDARMSYNDROM-DIARRHOETYP	2
1.3.1	KONVENTIONELLE BEHANDLUNG VON DIARRHOE BEI RDS-D	2
1.3.2	KONVENTIONELLE BEHANDLUNG VON UNTERLEIBSSCHMERZEN BEI RDS-D	3
1.4	NEUE MEDIKAMENTE BEI DER THERAPIE VON RDS-D	4
1.5	MODIFIZIERTE ERNÄHRUNG BEI RDS-D	5
<u>2</u>	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>6</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	<u>7</u>
3.1	VERSUCHSTIERE	7
3.2	PRÄPARATION DER ISOLIERTEN ORGANE	8
3.2.1	ATRIUM CORDIS DEXTRUM	9
3.2.2	MUSCULUS PAPILLARIS	10
3.2.3	ARTERIA PULMONALIS	12
3.2.4	AORTA DESCENDENS	13
3.2.5	ILEUM TERMINALE	14
3.3	PHYSIOLOGISCHE ELEKTROLYTLÖSUNG – TYRODE	15
3.4	KALIUMCHLORIDLÖSUNG	17
3.5	TESTSUBSTANZ	17
3.5.1	MGTr7	17
3.5.2	LÖSUNGSMITTEL	18
3.6	VERSUCHSAPPARATUREN	19
3.6.1	APPARATUR I	19
3.6.2	APPARATUR II	22
3.6.3	APPARATUR III	24
3.6.4	MESSPRINZIP	24
3.7	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	26

3.7.1	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AUF DAS ATRIUM CORDIS DEXTRUM	27
3.7.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AUF DEN MUSKULUS PAPILLARIS	28
3.7.3	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AUF DIE ARTERIA PULMONALIS	29
3.7.4	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AUF DIE AORTA DESCENDENS	29
3.7.5	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AUF DAS ILEUM TERMINALE	30
3.8	UNTERSUCHUNG DES WIRKMECHANISMUS	31
3.8.1	NITRO-L-ARGININ ALS ANTAGONIST	31
3.8.2	VERSUCHSABLAUF DES WIRKMECHANISMUS	32
3.9	DATENAUSWERTUNG	32
3.9.1	GLATTE MUSKULATUR	32
3.9.2	QUERGESTREIFTE MUSKULATUR	33
3.10	STATISTIK	34
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>35</u>
4.1	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DAS ATRIUM CORDIS DEXTRUM	35
4.2	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DEN MUSCULUS PAPILLARIS	39
4.3	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DIE ARTERIA PULMONALIS	42
4.4	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DIE AORTA DESCENDENS	45
4.5	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DAS ILEUM TERMINALE	48
4.6	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DAS ILEUM TERMINALE IN ANWESENHEIT DES ANTAGONISTEN NITRO-L-ARGININ	51
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>54</u>
5.1	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DIE QUERGESTREIFTEN HERZPRÄPARATE	54
5.2	WIRKUNG VON MGTr7 AUF DIE GLATTMUSKULÄREN PRÄPARATE	55
5.3	WIRKMECHANISMUS VON MGTr7 AUF DEN DÜNNDARM	56
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>57</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>58</u>

1 EINLEITUNG

Das Reizdarmsyndrom (RDS, Colon irritabile, spastisches Kolon, Reizkolon) gehört zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen. Es handelt sich um Schmerzen und Funktionsstörungen des Dickdarms ohne erkennbare organische Darmerkrankung. Hauptsymptome sind Obstipation und Diarrhoe bzw. Stuhlnunregelmäßigkeit, Vollegefühl, Blähungen und abdominale Schmerzen. Das Reizdarmsyndrom (RDS) wird in vier Typen unterteilt: Diarrhoetyp, Obstipationstyp, Blähtyp und Schmerztyp. Die Ursache der Entstehung von RDS ist unbekannt. Außerdem leiden die Patienten oft auch unter Schlaf- oder Angststörungen. Zur Bekämpfung der Obstipation können Ballaststoffe oder Laxanzien eingesetzt werden, gegen der Diarrhoe hat sich eine kurzfristige Gabe von Loperamid vorteilhaft erwiesen. Die Therapie mit Spasmolytika, Anticholinergika, Antidepressiva, Dopamin-Antagonisten, Tranquilizern und Opioiden wird noch kontrovers diskutiert. Ein große Rolle zur Behandlung der Erkrankung spielen auch eine entsprechende Diät, Psychotherapie sowie Entspannungsübungen (Mutschler et al. 2012).

1.1 Diagnose des Reizdarmsyndroms

Die Diagnose vom Reizdarmsyndrom (RDS) erfolgt bei Patienten, deren Symptome die Rom III-Kriterien erfüllen: rezidivierende Bauchschmerzen oder Beschwerden mindestens 3 Tage pro Monat in den letzten 3 Monaten in Zusammenhang mit zwei oder mehreren der folgenden: (1) Verbesserung der Beschwerden mit Defäkation, (2) Änderung der Stuhlhäufigkeit bei Beginn der Erkrankung und (3) Änderung der Form bzw. des Aussehens von Stuhl bei Beginn der Erkrankung. Die Symptome sollten länger als 6 Monate vor der Diagnose vorliegen. Der RDS-D-Subtyp erfordert die Anwesenheit von weichem Stuhl in mehr als 25% der Darmbewegungen und von hartem Stuhl in weniger als 25% der Stuhlgänge (Brandt et al. 2009).

1.2 Reizdarmsyndrom von Diarrhoetyp

Die Untergruppe des RDS vom Diarrhoetyp (RDS-D) umfasst fast 33% der RDS-Fälle (Guilera et al. 2005) und ist häufig assoziiert mit rektaler Dringlichkeit, erhöhtem Stuhlgang, wässrigen Stühle und Bauchblähungen (Nee et al. 2015). RDS-D hat größere Auswirkungen auf die täglichen Aktivitäten der Patienten und führt zu einer allgemeinen Verschlechterung deren Lebensqualität in Vergleich zu den anderen Subtypen (Singh et al. 2015). Die Erkrankung wird durch multiple pathophysiologische Mechanismen verursacht und variiert von einem Patienten zum anderen. Es wird aber angenommen, dass eine Änderung der Mikrobiome, eine veränderte Motilität oder eine Überempfindlichkeit die Gründe der Entstehung sind (Crowell et al. 2005). Der genetische Hintergrund kann aber auch eine Rolle spielen, da das RDS innerhalb von Familien oft vorkommt und ist eher bei monozygotischen als bei heterozygotischen Zwillingen vorhanden (Talley 2006).

Wegen der Komplexität der Erkrankung sind mehrere Behandlungsmöglichkeiten erforderlich. Während die meisten älteren Behandlungsmethoden auf individuelle Symptome (Durchfall oder Bauchschmerzen) zielen, behandeln neuere Medikamente mehrere Symptome (Nee et al. 2015).

1.3 Aktuelle Therapie von Reizdarmsyndrom-Diarrhoetyp

1.3.1 Konventionelle Behandlung von Diarrhoe bei RDS-D

Loperamid ist ein synthetischer μ -Opioid-Rezeptor-Agonist, der die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert. Loperamid ist relativ preisgünstig, im Allgemeinen gut verträglich und weit verfügbar (OTC). Es wird in der Regel zur Verringerung der Kolonperistaltik und zu Erhöhung der Fluidabsorption eingesetzt (Manabe et al. 2010). Loperamid verbessert die Stuhlkonsistenz aber nicht die Stärke der Bauchschmerzen. Patienten sollen daher gefördert werden, Loperamid nur prophylaktisch zu nehmen (Lavö et al. 1987).

Trotz der normalen ilealen Struktur und Histologie zeigen bis zu 50 % der RDS-D-Patienten (Wedlake et al. 2009) eine Gallensäure-Malabsorption, welche zur erhöhten Kolon-Schleimhaut-Durchlässigkeit, Motilität und Schleimsekretion führt (Chadwick et

al. 1979). Gallensäure-Komplexbildner wie **Cholestyramin**, **Colestipol** und **Colesevelam** verbessern die Stuhlkonsistenz und verringern die Stuhlhäufigkeit durch Verlangsamung der Kolontransitzeit und können daher vorteilhaft bei der Behandlung des RDS-D sein (Odunsi-Shiyanbade et al. 2010). Cholestyramin, der am häufigsten verwendete Gallensäure-Binder, ist begrenzt durch mehrere Probleme: Es ist geschmacklos, stört die Aufnahme anderer Medikamente und kann oft zu Nebenwirkungen wie Blähungen, Übelkeit und Bauchschmerzen führen. Aus diesem Grund kann die langfristige Compliance sehr schlecht sein. Für Patienten, welche Cholestyramin nicht vertragen können, stellt Colesevelam eine gute Alternative dar (Orekoya et al. 2015).

1.3.2 Konventionelle Behandlung von Unterleibsschmerzen bei RDS-D

Spasmolytika sind eine heterogene Gruppe von Medikamenten, die den gemeinsamen Mechanismus besitzen, die Kontraktionen der glatten Muskulatur zu entspannen oder die exzitatorischen Neurotransmission zu verringern. **Dicyclomin** (Dicycloverin) und **Hyoscyamin** sind Anticholinergika und können somit Durchfälle und Dringlichkeit verringern (Nee et al. 2015).

Pfefferminzöl entspannt die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Trakts durch die Verringerung des Kalzium-Zustroms. Bei der Verwendung von Pfefferminzöl wurde eine deutlich stärkere Verbesserung der allgemeinen Symptome und der Schmerzen im Unterleib bei Patienten mit RDS beobachtet (Khanna et al. 2014). Pfefferminzpräparate führen außerdem zur Reduzierung der einzelnen Symptome wie Bauchschmerzen, Blähungen und Dringlichkeit. Trotzdem gab es keine signifikante Veränderung bezüglich Durchfall, Gefühl der unvollständigen Evakuierung oder Gase (Cash 2015).

Trizyklische Antidepressiva (TCA) haben gezeigt, wirksam gegen die allgemeinen Symptome von RDS unabhängig von ihrer antidepressiven Wirkung zu sein. Bei IBS-D haben TCAs eventuell einen zusätzlichen Vorteil der Verlängerung von Kolontransitzeit durch ihre anticholinerge Effekte (Gorard et al. 1994). Niedrigdosiertes **Amitriptylin** führt zur Beseitigung aller allgemeinen Symptome nach einer Therapiedauer von zwei Monaten. Dabei werden auch wenige Nebenwirkungen beobachtet (Vahedi et al. 2008).

Aus der Gruppe der selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) zeigt **Tianeptin** eine ähnliche Wirksamkeit gegenüber Amitriptylin zur Bekämpfung der Symptome von RDS. Trotzdem führt Tianeptin zu weniger Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit oder Schläfrigkeit (Sohn et al. 2012).

1.4 Neue Medikamente bei der Therapie von RDS-D

Alosetron war das erste Medikament, das von der FDA für den Einsatz gegen Irritable Bowel Syndrom (IBS) vom Diarrhoeotyp zugelassen war. Alosetron ist ein 5-HT₃-Antagonist, der die Kolontransitzeit verlangsamt (Houghton et al. 2000), die Flüssigkeitsresorption erhöht und die viszerale Überempfindlichkeit verringert, möglicherweise aufgrund des verminderten Blutflusses zu bestimmten Regionen des limbischen Systems (Mayer et al. 2002). Alosetron verbessert nachweislich die Bauchschmerzen, verringert die Stuhlfrequenz und erhöht die Stuhlkonsistenz bei RDS-D Patienten (Bardhan et al. 2000). Darüberhinaus führt es zur Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Personen. Patienten, die Alosetron bekommen haben, waren wahrscheinlicher über eine Zufriedenheit mit ihrer Behandlung zu berichten, von der Arbeit immer weniger abwesend und erlebten weniger Einschränkungen in ihrem Alltag durch die RDS-Symptome (Watson et al. 2001). Nach seiner ersten FDA-Zulassung im Jahr 2000 wurde Alosetron vom Markt aufgrund von Komplikationen im Zusammenhang mit ischämische Kolitis und Verstopfung entfernt. Es wurde in 2002 im Rahmen von neuen Indikationsbeschränkungen wieder eingeführt, und zwar war nur bei Frauen mit schwerer RDS-D zugelassen, bei denen konventionelle Therapien versagt haben (Nee et al. 2015).

Eluxadolin, eine gemischter μ -Opioid-Agonist und δ -Opioid-Antagonist, ist eines der zwei Medikamente, welche von der FDA im Jahr 2015 für die Behandlung von IBS-D zugelassen sind. Während Wirkstoffe wie Loperamid hauptsächlich auf die μ -Opioid-Rezeptoren wirken und die GI-Motilität verlangsamen, kann die zusätzliche Antagonisierung der δ -Opioid-Rezeptoren von Eluxadolin auch die viszerale Analgesie potenzieren (Ananthan 2006). Der Wirkstoff verbessert deutlich die Stuhlkonsistenz, die Dringlichkeit und die Stuhlfrequenz und ebenso ist dessen Wirkung gegen Blähungen positiv (Nee et al. 2015).

Die häufigsten Nebenwirkungen sind Verstopfung und Übelkeit. In seltenen Fällen kann es aber auch zu starken unerwünschten Wirkungen führen wie z. B. akute Pankreatitis oder Steigerung der Leberenzymen. Erhöhter Konsum von Alkohol oder eine vorherige Cholezystektomie scheinen Risikofaktoren für die Entwicklung dieser Komplikationen zu sein. Die häufigste Nebenwirkung unter denjenigen, die eine Cholezystektomie hatten, sind Übelkeit, Verstopfung und Bronchitis. Daher sollte Eluxadolin nicht bei Patienten mit einer Vorgeschichte von Gallengangsobstruktion, Sphincter Oddi-Dysfunktion, Pankreatitis, Alkoholismus oder Alkoholabusus verabreicht werden (Lembo et al. 2014).

Rifaximin ist ein Darm-spezifisches Antibiotikum, welches vorher zur Behandlung von Reisedurchfall durch *Escherichia coli* und zur Verhinderung der Rezidivierung der hepatischen Enzephalopathie genehmigt war. Rifaximin war vor kürzer Zeit für die Behandlung von RDS-D in einer Dosis von 550 mg dreimal täglich für 14 Tage zugelassen. Es führt sowohl zur Beseitigung der allgemeinen Symptome von RDS-D als auch zur Verminderung der Blähungen. Als Nebenwirkung kann in seltenen Fällen Obstipation beobachtet werden (Nee et al. 2015).

1.5 Modifizierte Ernährung bei RDS-D

Viele Patienten mit RDS berichten oft, dass der Anfang der GI-Symptome nach dem Konsum von bestimmten Futtersorten zustande gekommen ist, wie z. B. gebratene oder fetthaltige Lebensmittel (Böhn et al. 2013). Potenzielle Vorteile sind mit einigen diätetische Änderungen beobachtet worden. Eine Diät arm an vergärbaren Oligosacchariden, Monosacchariden, Disacchariden und Polyolen kann die Symptome bei Patienten mit RDS verringern und insbesondere bei solchen mit RDS-D (Halmos et al. 2014). Außerdem zeigt eine glutenfreie oder eine kohlenhydratarme Diät eine verbesserte Stuhlfrequenz, eine erhöhte Stuhlkonsistenz und eine Abnahme von abdominalen Schmerzen bei Patienten mit RDS-D (Austin et al. 2009).

2 ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ausgehend von Experimenten an isolierten Meerschweinchenorganen die Wirkungen sowie der potentielle Wirkmechanismus des Triazol-Derivates MGtr7 erforscht. Die Synthese der Testsubstanz wurde vom Dipl. Ing. (FH) Mario Gabriel am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien durchgeführt.

Der Effekt der Substanz wurde an fünf unterschiedlichen Organen untersucht. Diese Organe waren der rechte Herzvorhof, die Papillarmuskeln des Herzen, die Pulmonalarterie, der absteigende Teil der Hauptschlagader und der terminale Dünndarm.

An den quergestreiften Organen des Vorhofs und der Papillarmuskeln wurden die Schlagfrequenz (Chronotropie) und die Kontraktionskraft (Inotropie) entsprechend getestet. Die restlichen drei glattmuskulären Organe dienten zur Messung einer potentiellen vasodilatierenden bzw. spasmolytischen Aktivität des Wirkstoffes.

Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Experimente sowohl miteinander als auch mit denen von anderen Diplomanten zu gewährleisten, mussten ganz strenge Bedingungen erhalten werden, ausgehend von der Isolierung der Organe bis zur Durchführung und Auswertung der Versuche.

Der Wirkmechanismus wurde am jenen Organ durchgeführt, bei welchem die Testsubstanz die höchste Aktivität aufgewiesen hatte. Nach Erstellen von Konzentrations-Wirkungskurven und Ermittlung der EC_{50} -Werte konnte man sich entschließen, dass dieses Organ der terminale Darm war. Bei der Untersuchung des Wirkmechanismus diente der Antagonist Nitro-L-Arginin, wessen Wirkung schon bekannt war, zur NO-Synthase-Hemmung und dadurch konnte genauer die Wirkstärke des Triazol-Derivates in Anwesenheit des Enzyminhibitors erforscht werden.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen verwendet. Sie waren 4 bis 8 Wochen alt, vom männlichen oder weiblichen Geschlecht und wiegten ca. 500 Gramm. Darüber hinaus gehörten sie zur Gattung TRIK. Dieser Punkt ist ganz wichtig, da dieser Stamm spezifisch für Laborversuchen optimiert ist und stellt keine Wildform dar.

Die Gründe, wieso diese Tiere verwendet wurden, waren einerseits dass sich die Ionenkanäle der Gefäße zwischen Mensch und Meerschweinchen minimal unterscheiden, was optimal für die Testung der Substanz ist, um einen potentiellen Arzneistoff für den menschlichen Organismus daraus entwickeln zu können, und andererseits dass deren Organe von einer erwünschten Größe sind, was der praktischen Handhabung im Laufe der Versuche diene.

Durch gezielten Genickbruch wurde am Anfang von jedem Labortag ein Versuchstier getötet. Diese Methode garantiert, dass das Tier möglichst schnell und schmerzfrei getötet wird und dass seine Organe möglichst wenig belastet werden. Danach wurden der Thorax und das Abdomen mittels Operationsschere geöffnet. Zum Schluss wurden Herz, Aorta und Dünndarm mithilfe von Schere und Pinzette isoliert. Da die Versuche an isolierten Organen durchgeführt wurden, und nicht an lebenden Tieren, handelte es sich um ex vivo-Experimente.



Abbildung 1: Präparierbesteck

3.2 Präparation der isolierten Organe

Nach der Isolierung wurde das Herz, beim dem ein kleiner Teil der Lungenarterie beibehalten war, in ein Becherglas mit frisch hergestellter Elektolytlösung aufbewahrt. Ebenso wurden die ca. 4 cm lange herauspräparierte Aorta descendens und das ca. 25 cm lange Ileum terminale getrennt in unterschiedlichen, mit Elektolytlösung-befüllten Gefäßen gelegt. Der Dünndarm wurde davor zusätzlich am oberen Ende mit ein Stück Faden gebunden, um die beiden Ende im Laufe der Versuche unterscheiden zu können.

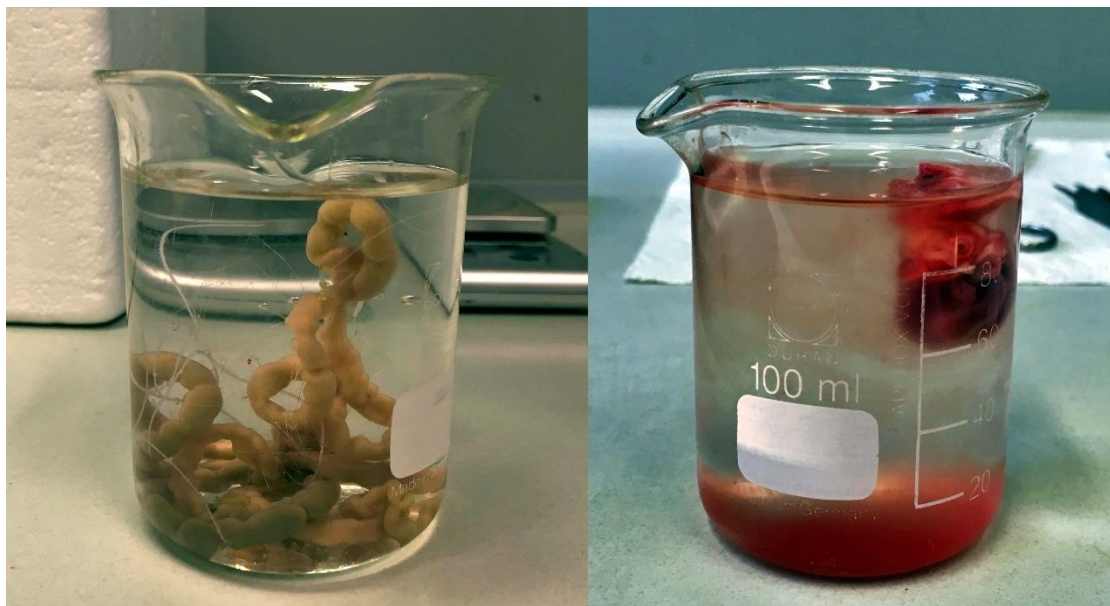


Abbildung 2: Isolierter Darm (links) und isoliertes Herz (rechts)

Nun erfolgte die Präparation der isolierten Organe. Dabei wurde das benötigte Organ von der Nährlösung entfernt und in eine Petrischale aus Glas übergeführt, welche ebenfalls mit Nährlösung befüllt war, um das Absterben von dem Gewebe möglichst zu verzögern. Die Petrischale war am Boden mit einer dünnen Scheibe Kork versehen. Das diente der Befestigung des Organs während der Präparation mithilfe von Präpariernadeln. Zusätzlich wurde die Innenwand der Petrischale mit ein Stück von dünnem Gummischlauch ausgekleidet, um die Korkscheibe am Schalenboden zu fixieren.

Die weitere Aufarbeitung des Organs erfolgte unter dem Auflichtmikroskop mittels Präparierbesteck wie Pinzetten, Spitzscheren und Federscheren, um es von

überschüssigem Fett- und Muskelgewebe zu befreien, sowie Saugpipetten, um unerwünschte Flüssigkeitsbestandteile zu entfernen.

Während des Präparationsprozesses war ganz wichtig, auf der einen Seite die Organe nicht zu verletzen oder zu überdehnen und auf der anderen Seite so schnell wie möglich zu arbeiten. Die Einhaltung dieser zwei Punkte diente der Verlängerung der Lebensdauer des isolierten Präparats.

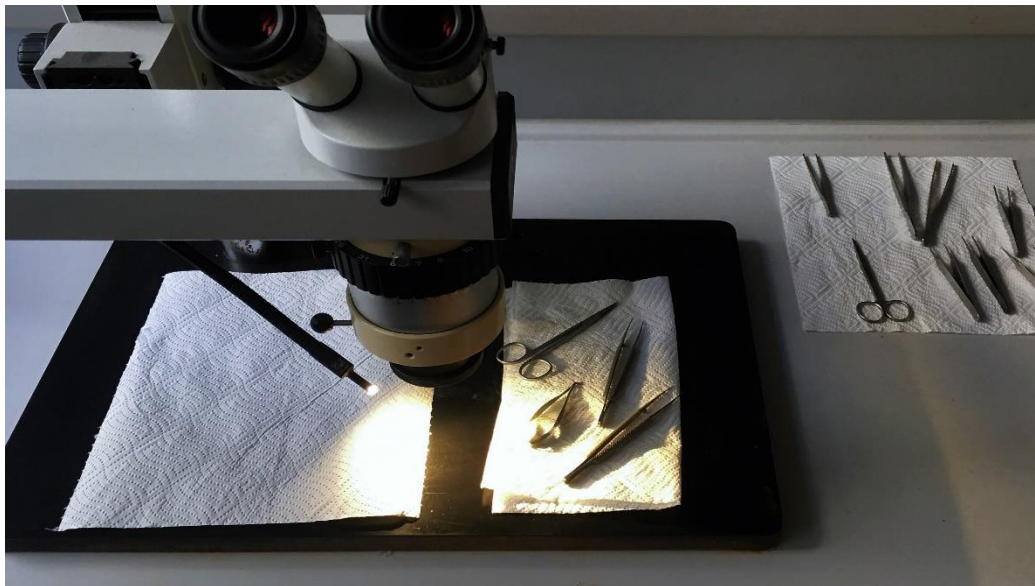


Abbildung 3: Präparationsplatz

3.2.1 Atrium cordis dextrum

„Das Herz gehört zu den rhythmisch arbeitenden Organen, die unter Bedingungen auch außerhalb des Körpers ihre Tätigkeit fortsetzen. Es ist dazu durch sein Reizbildungs- und Erregungsleitungssystem befähigt (Automatie des Herzens). (...) Normalerweise werden die Erregungen im Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, der an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene in den rechten Vorhof liegt, gebildet und durch die Vorhofmuskulatur auf den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten, Aschoff-Tawara-Knoten) übergeleitet“ (Mutschler et al. 2012).

Wie bereits erwähnt wurde der rechte Vorhof zur Messung der Auswirkung der Testsubstanz auf die Chronotropie verwendet. Der eigentliche Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten. Wegen seiner anatomischen Lage war seine Isolierung nicht möglich und daher wurde der ganze Vorhof zur Herzfrequenzmessung präpariert.

Für diesen Zweck wurde zunächst das ca. 3 cm große Herz mehrmals in der Nährstofflösung geschwenkt, um das überschüssige Blut zu entfernen. Nach Auflegen des Organs in der Petrischale wurde es an Basis und Spitze mit zwei Präpariernadeln unter Betrachtung durch das Lichtmikroskop auf der Korkscheibe befestigt. Anschließend wurden Perikard, Lungengewebe und Fettgewebe mittels Federschere entfernt. Durch einen Schnitt entlang der Herzkranzfurche wurde der Vorhof von dem restlichen Herzen abgetrennt. Dabei sollte geachtet werden, dass die Schrittmacherzellen nicht verletzt werden dürfen. Zum Schluss wurden an beiden Ende des abgetrennten Vorhofs Silberdrahthäkchen fixiert. Diese Fixierung erfolgte über zwei Faden, die zur sicheren Zugfestigkeit doppelt verknotet wurden. Nach dem fertigen Präparieren des Vorhofs wurde er in ein Becherglas mit frischer Elektrolytlösung eingelegt, zur Versuchsanordnung gebracht und eingespannt.

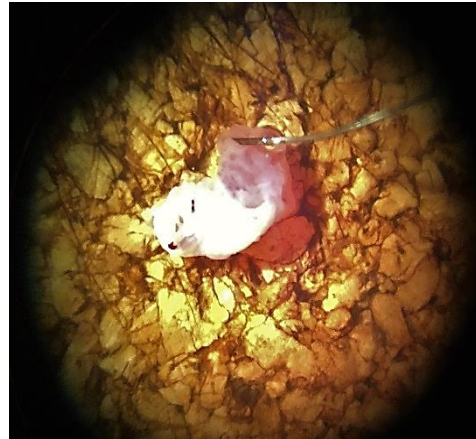


Abbildung 4: Vorhof unter Mikroskop

3.2.2 Musculus papillaris

Der Papillarmuskel ist oft primär zur Testung von Wirkungseffekten auf das Aktionspotential verwendet. Seine Präparation ist ideal für die Untersuchung der elektromechanischen Kopplung des Herzens unter Einfluss von Wirkstoffen (Wallis et al. 2015).

Nach dem Abtrennen des rechten Vorhofs wurde das Herz weiterpräpariert, um die Papillarmuskeln aus dem Endokard abzutrennen. Dabei wurde das Herz geöffnet, indem der rechte Ventrikel entlang des Septums von der Pulmonalarterie bis zur Herzbasis geschnitten wurde. Nach Aufklappen vom Herzen wurde das Präparat mit Präpariernadeln auf dem Kork befestigt. Das überschüssige Blut wurde durch mehrmaliges Austauschen der Nährstofflösung in der Petrischale entfernt.

Zu Beginn wurden die Purkinje-Fasern entfernt, da sie eine Herzschrittmacheraktivität aufweisen und Katecholaminen freisetzen, was die Systole der Papillarmuskeln beeinflussen könnte und einen negativen Einfluss auf die Versuche haben könnte.

Anschließend wurde jeder Papillarmuskel weiterpräpariert, indem an seinem oberen Ende ein Silberdrahthäkchen mittels Faden angebracht wurde. Letztens wurde der Muskel mit einem Schnitt vom Endokard entfernt und in begaster Elektrolytlösung bis zum Versuch eingelegt. Abhängig von Länge und Durchmesser der Papillarmuskeln wurden auf dieser Weise pro Herz 4 bis 5 Präparate isoliert.



Abbildung 5: Papillarmuskel mit Häkchen

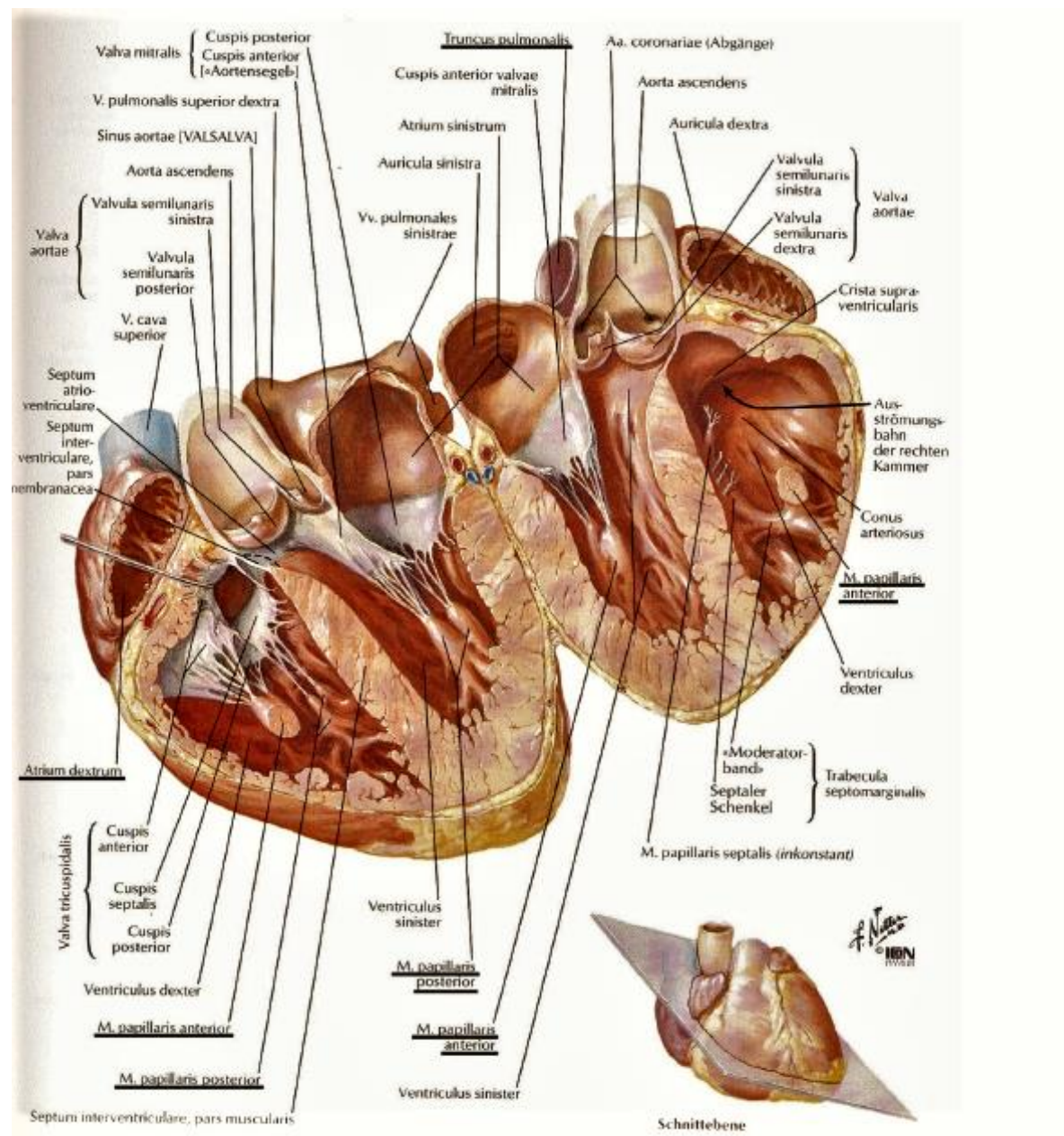


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Herzens (Netter 2003)

3.2.3 Arteria pulmonalis

Das auf dem Kork in der Petrischale fixierte Herz diente sowohl für die Isolierung der Papillarmuskeln, als auch für die Isolierung der Pulmonalarterie. Dabei wurde nur der ca. 1 cm lange Lungenstamm (Truncus pulmonalis) herauspräpariert. Dabei handelt es sich um das kurze Stück der Pulmonalarterie ausgehend vom rechten Ventrikel bis zur Verzweigung zwischen rechte und linke Lungenarterie. Das isolierte Stück wurde nun an der Korkschrift befestigt und danach wurden Fett- und Muskelgewebe sowie übrig gebliebenen Blutzellen entfernt. An letzter Stelle wurde das fertig präparierte Gefäß in 2 mm breite Ringe geschnitten, welche dann in einem begasten, mit Tyrode-Lösung befüllten Becherglas bis zum Anfang der Experimente aufbewahrt worden sind. Da der Lungenstamm kurz ist, war es möglich nur 1 bis maximal 3 Pulmonalis-Stücke pro Versuchstier zu präparieren. Diese Präparate wurden mit keinen Silberdrahthäkchen fixiert, da es möglich war, sie direkt in die Versuchsaapparaturen einzuspannen.

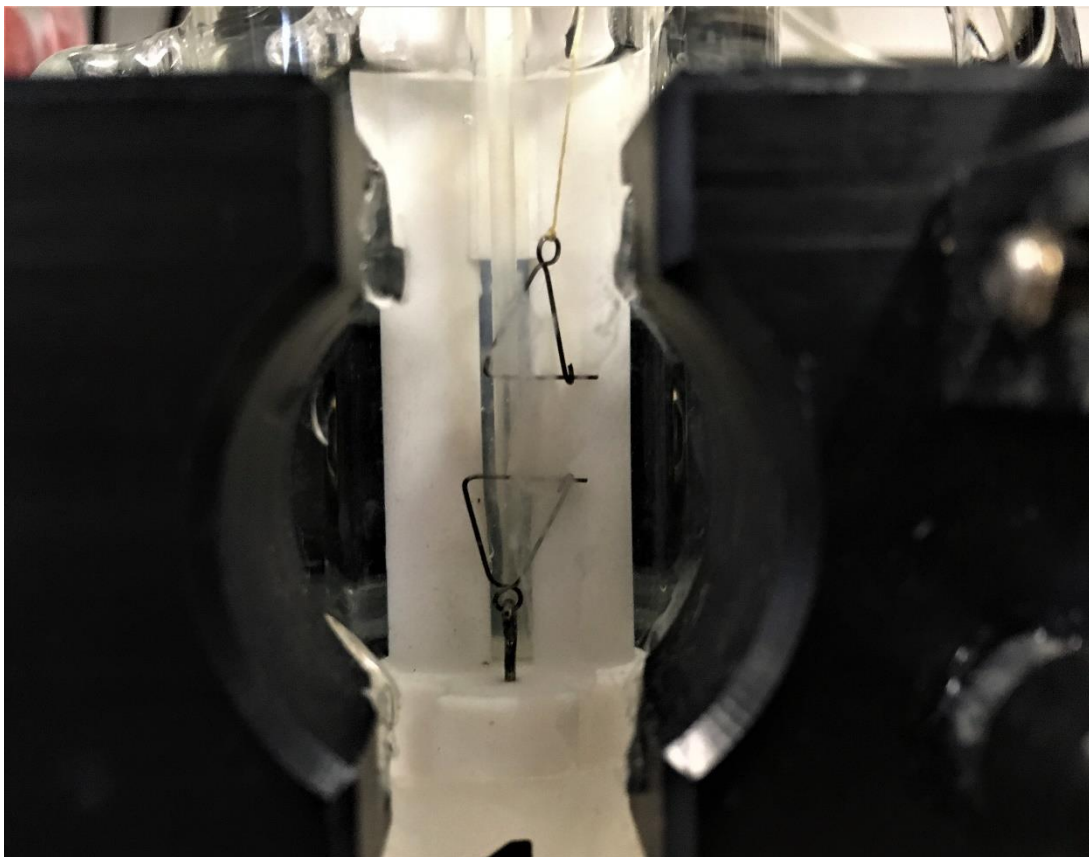


Abbildung 7: Stück der Pulmonalarterie, eingespannt im Organbad

3.2.4 Aorta descendens

Nachdem die Lunge und das Herz vom Meerschweinchen entfernt wurden, war erst der absteigende Teil der Hauptschlagader sichtbar. Diese läuft entlang der Wirbelsäule des Tiers. Aus praktischen Gründen und zur besseren Handhabung der Aorta wurde gleich auch der Darm entfernt.

Zur Isolierung wurde das obere Ende der Aorta descendens mit Pinzette in die Höhe gehalten und mittels Spitzschere wurde ein ca. 4 cm langes Stück entlang der Wirbelsäule herausgeschnitten. Ganz wichtig war hier, dass das Gefäß nicht überdehnt wurde, sonst könnte dessen vasokonstriktorische bzw. vasodilatierende Aktivität beeinträchtigt werden, was einen negativen Einfluss auf die folgenden Versuche ausüben würde. Dann wurde das isolierte Präparat mit Nadeln auf der Oberfläche der Petrischale fixiert und genau so wie bei der Arteria pulmonalis von Fett- und Muskelmasse sowie Blutgerinnsel befreit. Zum Schluss wurde die Aorta in ca. 2 mm breite Ringe geschnitten, welche bis zur weiteren Verwendung unter Gasversorgung in ein Gefäß mit Elektrolytlösung aufbewahrt wurden. Aus dem gleichen Grund wie bei der Lungenarterie war das Anbringen von Häkchen nicht notwendig.



Abbildung 8: Aufgeschnittene Aorta descendens unter dem Mikroskop

3.2.5 Ileum terminale

Wie bereits erwähnt, wurde ein ca. 25 cm langes Stück vom Ileum terminale aus dem Bauchbereich isoliert. Es ist der terminale Teil des Dünndarms und befindet sich zwischen Jejunum (Leerdarm) und Caecum (Blinddarm). Danach wurde der Dünndarm an seinem oberen, dem Jejunum zugehörigen Ende mit ein Stück Faden zugebunden, um beide Ende voneinander unterscheiden zu können. Wie bei den anderen Präparaten war auch hier wichtig am Organ keinen starken Zug auszuüben, um dessen störungsfreien funktionalen Beschaffenheit zu gewährleisten. Anschließend wurde das Organ in Nährstofflösung eingetaucht und mit Carbogen reichlich versorgt.

Für die Zwecke der Versuche wurde nun ein ca. 1 cm langes Stück vom Dünndarm geschnitten. Dabei wurde versucht so schräg wie möglich zu schneiden, da die spitzen Ende für das spätere Anbringen von Häkchen dienten. Dieses Stück wurde dann in eine mit Nährstofflösung befüllten Petrischale gelegt und mit zwei Präpariernadeln wurden die beiden Akren am Kork fixiert. Mithilfe von einer Saugpipette wurde das Darmlumen durchgespült, um Darminhalt zu entfernen. Schließlich wurden an beiden Ende Silberdrahthacken mittels doppeltem Fadenknoten angebracht und das fertige Präparat wurde entweder bis zum Versuchsbeginn in Elektolytlösung aufbewahrt oder gleich in die Versuchsanordnung eingespannt.

Beim Präparieren des Organs war wichtig, sowohl es nicht zu überdehnen, als auch das Darmlumen nicht zu verschließen, um einen aufwandfreien Durchfluss zu garantieren.

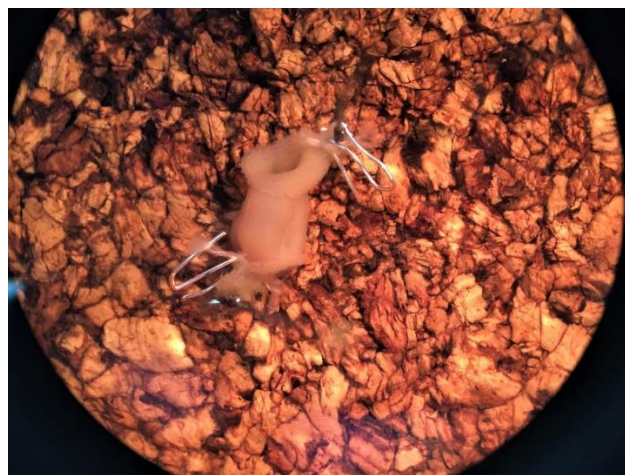


Abbildung 9: Präparierter Darm unter der Lupe

3.3 Physiologische Elektrolytlösung – Tyrode

Die physiologische Elektrolytlösung hat die Aufgabe, die isolierten Organe während der Präparation und der Versuchsdurchführung aufrechtzuhalten und aufzubewahren. Das ist möglich, da sie ein physiologisches Nährstoffmilieu für die Organe darstellt.

Diese Lösung, die von Maurice Vejux als Tyrode bezeichnet wurde, entspricht einer Krebs-Henseleit-Lösung. Am Beginn von jedem Labortag müsste die Tyrode frisch nach der Vorschrift von Reiter (Reiter 1967) hergestellt werden. Dabei wurden bidestilliertes Wasser sowie zuvor bereitete Stammlösungen für diesen Zweck verwendet.

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	Konzentration in mmol/l
NaCl	1000,25 g/5l	33,60	115,01
KCl	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO₃	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO₄	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH₂PO₄	62,00 g/0,25l	1,18	2,15
CaCl₂	34,00 g/0,25l	3,20	3,92
Glucose	Reinsubstanz	1,98 g	-

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode

Aus praktischen Gründen, da oft mehrere Studenten gleichzeitig zusammen arbeiten mussten, wurden gleich 2 Liter der Nährstofflösung hergestellt. Zunächst wurde die Glucose mithilfe einer Oberschalenwaage genau eingewogen und vorsichtig in einen 2 Liter Messkolben übergeführt. Danach wurden nacheinander Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Natriumhydrogencarbonat über Büretten und Magnesiumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat mittels Kolbenhubpipetten in den Kolben hinzugefügt. Der Kolben wurde dann mit Aqua bidestillata bis knapp unter dem Kolbenhals aufgefüllt,

die Kolbenöffnung mit einem Stopfen verschlossen und kräftig geschüttelt, um die Auflösung der Glucose zu beschleunigen.

Nun wurde der pH-Wert der Lösung eingestellt. Er müsste zwischen 7,2 und 7,4 liegen, um das zelluläre Milieu der isolierten Organe zu entsprechen. Dabei wurde der Kolbeninhalt 20 Minuten lang mit Carbogen (auch Oxymix genannt) begast. Oxymix ist eine Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂ und dient der Aufrechterhaltung der Organe sowie des pH-Wertes im Laufe der Versuche.

Sobald die 20 Minuten vorbei waren, wurde letztendlich die Calciumchlorid-Lösung dem Kolben hinzugefügt. Diese Lösung wird im Kühlschrank gelagert und auf 6°C vorgekühlt. Deren Zugabe müsste tropfenweise und möglichst langsam erfolgen, sonst bilden sich schwerlösliche Calciumsalze, welche zur Trübung der Tyrode und zur Unterversorgung der Organe mit Calcium führen.

Zum Schluss wurde der Messkolben mit bidestilliertem Wasser bis zur Eichmarke gefüllt, sein Inhalt durch Schütteln gut durchgemischt und durch Schließen mit Stopfen bei Raumtemperatur gelagert. Die Nährstofflösung enthält nun alle notwendigen Elektrolyten und Ionen sowie Sauerstoff und Kohlendioxid und deswegen könnten die Versuche für die nächsten 8 Stunden durchgeführt werden.

Substanz	Volumen bzw. Menge
NaCl	67,20 ml
KCl	70,00 ml
NaHCO ₃	167,40 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ PO ₄	2,36 ml
CaCl ₂	6,40 ml
Glucose	3,96 g

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

3.4 Kaliumchloridlösung

Eine potentiell vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die glattnuskulären Präparate von Arteria pulmonalis, Aorta descendens und Ileum terminale könnte nur dann untersucht werden, wenn diese Präparate im Vorhinein maximal kontrahiert waren. Diese Vorkontraktion wurde durch Zugabe einer KCl-Lösung erreicht.

Dabei wurden zwei Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt: Eine für die Vorkontraktion der Blutgefäße und eine für den terminalen Dünndarm. Die erste war eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung, während die zweite eine 60 mmolare Lösung war. Das KCl wurde auf einer Waage eingewogen, in einen 100 ml Messkolben übergeführt und schließlich wurde der Kolben mit Tyrode bis zur Markierung aufgefüllt.

Organpräparat	KCl in g	Tyrode-Lösung in ml
Arteria pulmonalis	0,67	100
Aorta descendens	0,67	100
Ileum terminale	0,45	100

Tabelle 3: Zusammensetzung der KCl-Lösung für jedes Organpräparat

3.5 Testsubstanz

3.5.1 MGtr7

Die Testsubstanz MGtr7 ist ein Triazol-Derivat und wurde am Department für Pharmazeutische Chemie in Wien synthetisiert. Es ist ein weißes, geruchloses Pulver mit kristalliner Gestalt. Das Pulver ist schlecht löslich in hydrophilem Milieu, wie H₂O, H₂O/EtOH oder EtOH. Dagegen weist es eine sehr gute Löslichkeit in lipophilen Flüssigkeiten auf, wie z. B. in DMSO.

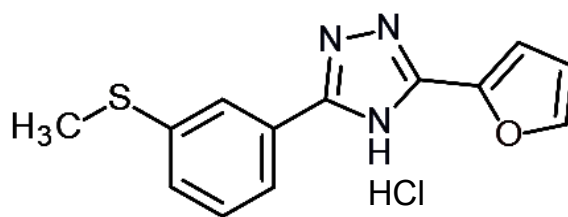


Abbildung 10: Strukturformel von MGtr7

Nomenklatur: 3-(2-Furyl)-5-(3-methylsulfonylphenyl)-4H-1,2,4-triazol Hydrochlorid

Molekulargewicht: 293,77 g/mol

3.5.2 Lösungsmittel

Als Lösungsmittel für die Testsubstanz wurde das organische Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt.

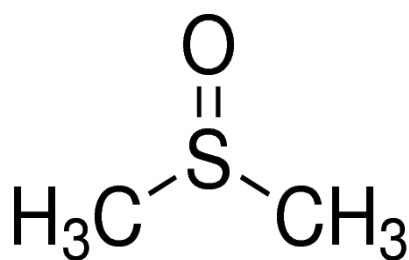


Abbildung 11: Strukturformel von DMSO

Dimethylsulfoxid ist ein polares Solvent, der oft als Lösungsvermittler hydrophober Substanzen im Rahmen von in vivo und in vitro Studien verwendet wird (Roldán-Fidalgo et al. 2014).

DMSO führt zur Relaxation der Gefäße durch Erhöhung von cGMP in Zusammenhang mit der Freisetzung von endotheliale NO und durch Verringerung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Elemente (Kaneda et al. 2016).

Da DMSO eine Eigenwirkung besitzt, wurden die Ergebnisse nach Beendigung der Versuche mit einem Korrekturfaktor multipliziert, um nur die Wirkung der Testsubstanz zu untersuchen.

3.6 Versuchsaapparaturen

Für die Zwecke der Versuche standen je nach Organpräparat 3 Apparaturen zur Verfügung. In der Versuchsaapparatur I wurde der Papillarmuskel eingespannt und auf Änderungen seiner inotropen Aktivität untersucht. Die Apparaturen II und III dienten zur Versuchsdurchführung an die Pulmonalarterie, den absteigenden Teil der Aorta, den rechten Vorhof und den terminalen Dünndarm. Das Funktionsprinzip aller drei Apparaturen war identisch. Unterschiede gab es in der Art der technischen Ausrüstung der Geräte.

Von großer Bedeutung war die Konstanzhaltung aller Versuchsparameter wie z. B. Empfindlichkeit und Sauberkeit der Geräte, richtiges Einspannen, Temperatur, Gaszufuhr, pH-Wert und frische Herstellung der Nährstofflösungen. Nur dann war die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse garantiert.

3.6.1 Apparatur I

Die Apparatur I wurde zum Durchführen der Versuche am Papillarmuskel verwendet. Sie besteht aus einem einzelwandigen Organbad aus Glas oder Kunststoff mit einem Fassungsvermögen von 25 ml, welches am Boden mit einer Fritte versehen ist, wodurch das Organbad über einen dünnen Gummischlauch mit Carbogen versorgt wird. Dieses Organbad wurde direkt in einem Wasserbad aus Acrylglas mit konstanter Temperatur montiert. Für die Konstanzhaltung der Temperatur sorgte ein Thermostat, der ebenfalls

im Wasserbad fixiert wurde. Für die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel war eine Temperatur von $35 \pm 1^\circ\text{C}$ erforderlich.

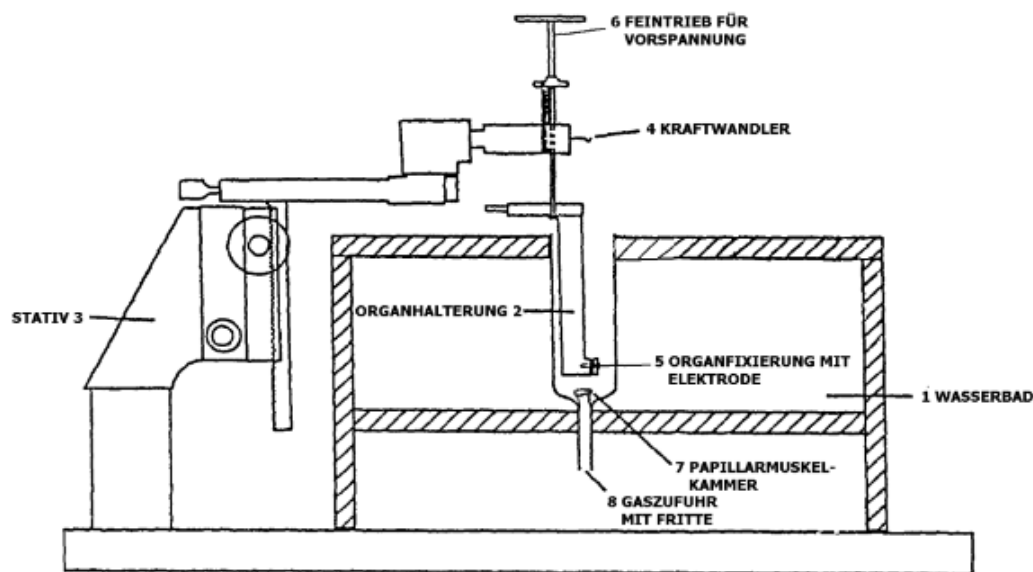


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Apparatur I

Am Anfang wurde die Organkammer mit Aqua bidestillata und Nährstofflösung gereinigt. Dann wurde sie mit 25 ml Tyrode gefüllt und es wurde abgewartet, bis die Temperatur der Lösung die 35°C erreicht hatte.

Nun wurde der Papillarmuskel von seinem Aufbewahrungsgefäß entnommen und in die Apparatur eingespannt. Dabei wurde sein mit Hacken ausgerüstetes Ende am Kraftwandler (4) mittels Silberdraht gehängt. Das andere Ende wurde zwischen eine Platinelektrode und eine Plexiglasscheibe (5) fixiert. Mittels Feintrieb (6) wurde der Muskel gespannt, bis er senkrecht entlang der Organhalterung (2) hängt. Anschließend wurde die Organhalterung mit dem Organ unter Drehung des Grobtriebs vom Stativ (3) in das Organbad eingetaucht, bis der Muskel komplett von Tyrode überdeckt wurde. Dieser Prozess musste schnell stattfinden, sonst könnte die Qualität des Präparats durch Umgebungsluft und Nährstoffmangel verschlechtert werden. Zum Schluss wurde das Organ mittels Feintrieb vorgespannt.

Da der Papillarmuskel nicht von selber spontan aktiv ist, wurde er durch einen Accupulser A310 Stimulator (World Precision Instruments, USA) in unterschiedlichen Hz-Stärken gereizt, bis eine Erregung des Muskels erreicht wurde. Die Aktivität des

Organs wurde vom Kraftwandler registriert. Dieses Signal wurde einem Verstärker (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, USA) weitergeleitet und letztendlich auf Millimeterpapier über einen Schreiber (Flatbed Recorder BD112, Dual Channel, Kipp & Zonen,NL) übersetzt.

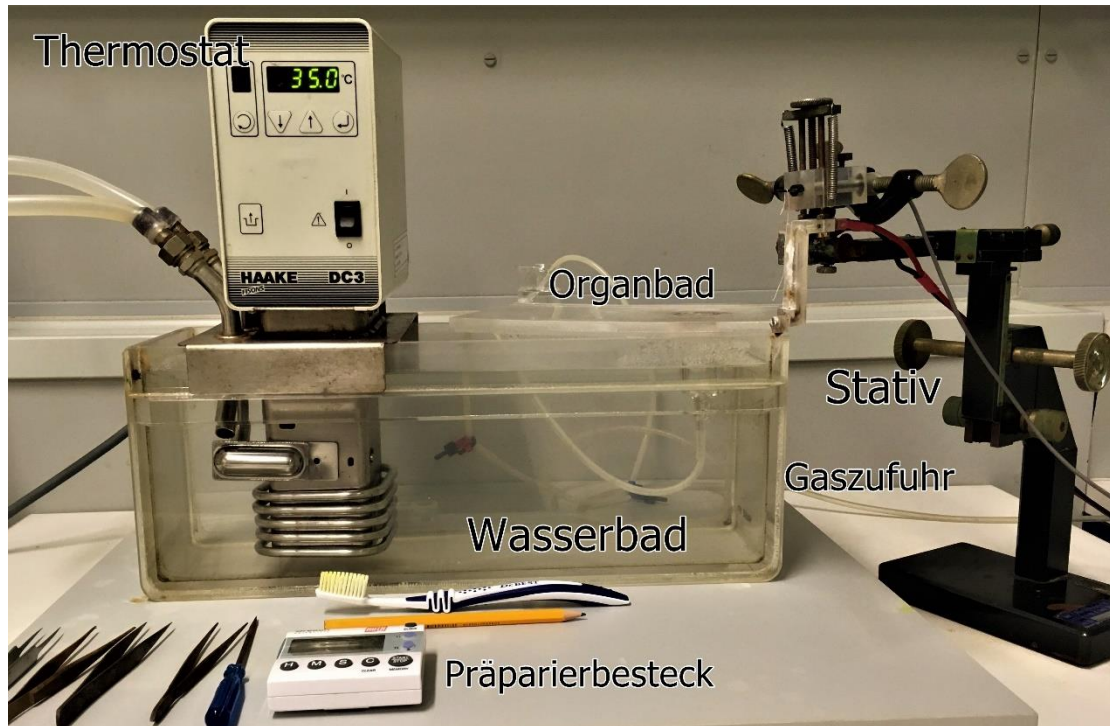


Abbildung 13: Apparatur I



Abbildung 14: Stimulator, Verstärker, Schreiber

3.6.2 Apparatur II

Unter Anwendung der Versuchsapparatur II wurden die restlichen isolierten Organe untersucht.

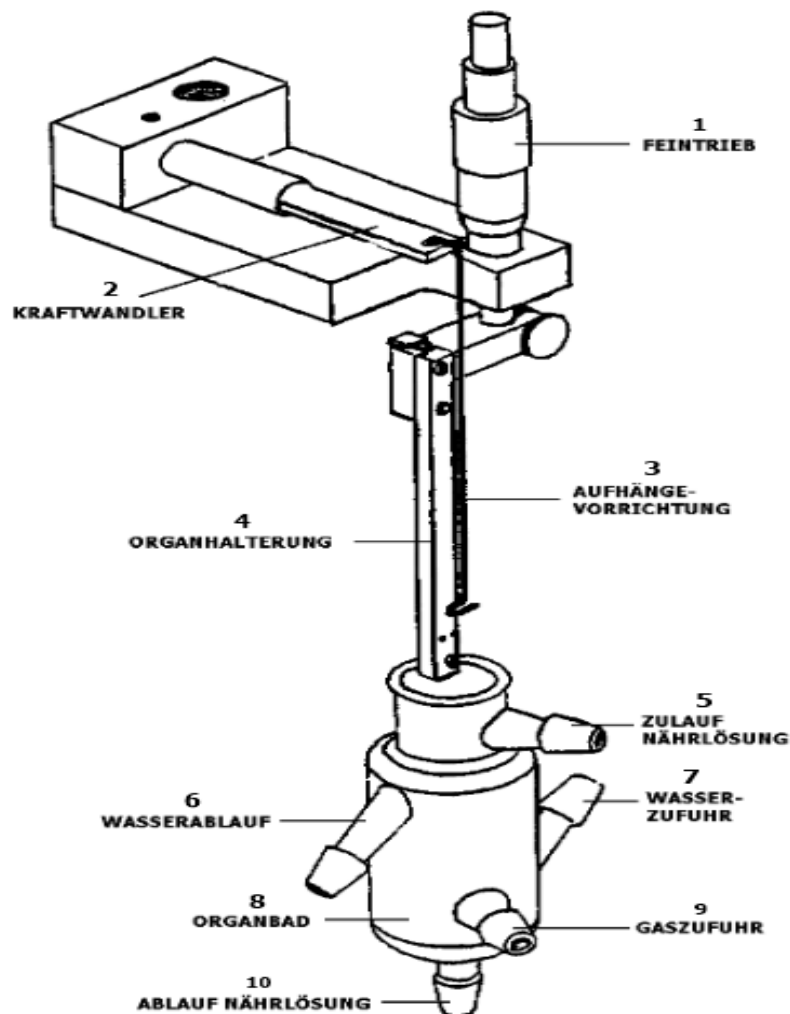


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Apparatur II

Die Unterschiede zwischen dieser Apparatur und Apparatur I sind, dass hier das Wasserbad auf 37°C aufgewärmt wird (im Unterschied zu 35°C), das Organbad (8) aus einer doppelschichtigen Glaswand besteht (im Unterschied zum einschichtigen Organbad) und die Organe nicht mittels Stimulator gereizt werden. Ihr Funktionsprinzip, vom Kraftwandler bis zum Schreiber, ist aber identisch.

Über einen Wasserzulauf (7) fließt das aufgewärmte Wasser mittels Schlauch durch das doppelwandige Präparatbad und daher muss das Organbad nicht im Wasserbad

eingetaucht werden. Über einen Ablauf (6) wurde das Wasser zirkuliert. Der Ablauf am Boden des Organbads diente zur Entfernung dessen Inhalts. Die Gasversorgung der Organe war über eine Gaszufuhr (9) gewährleistet.

Vor Versuchsbeginn wurde die Präparatkammer mit verdünnter HCl-Lösung und anschließend mit bidestilliertem Wasser gereinigt. Dann wurde sie mit 25 ml Elektrolytlösung aufgefüllt. Über eine Wartezeit von ca. 10 Minuten wurde die Temperatur der Nährstofflösung mit der Temperatur des Wasserbads ausgeglichen.

Die isolierten Präparate wurden zwischen Aufhängevorrichtung (3) und der mit Silberdraht versehenen Organhalterung (4) eingespannt. Die Aufhängevorrichtung stellt die Verbindung zum Kraftwandler dar. Darm und Vorhof wurden über ihre angebrachten Haken fixiert. Dagegen wurden Aorta und Pulmonalarterie direkt eingehängt, indem Aufhängevorrichtung und Silberdraht der Organhalterung durch das Lumen der Gefäße eingeführt wurden. Mittels Feintrieb (1) wurden die Präparate in einer senkrechten Position gebracht und die Organhalterung konnte nun in das Organbad eingetaucht werden. Das Einspannen sollte möglichst schnell und unter Vermeidung vom Ausdehnen der Organe vorangehen.

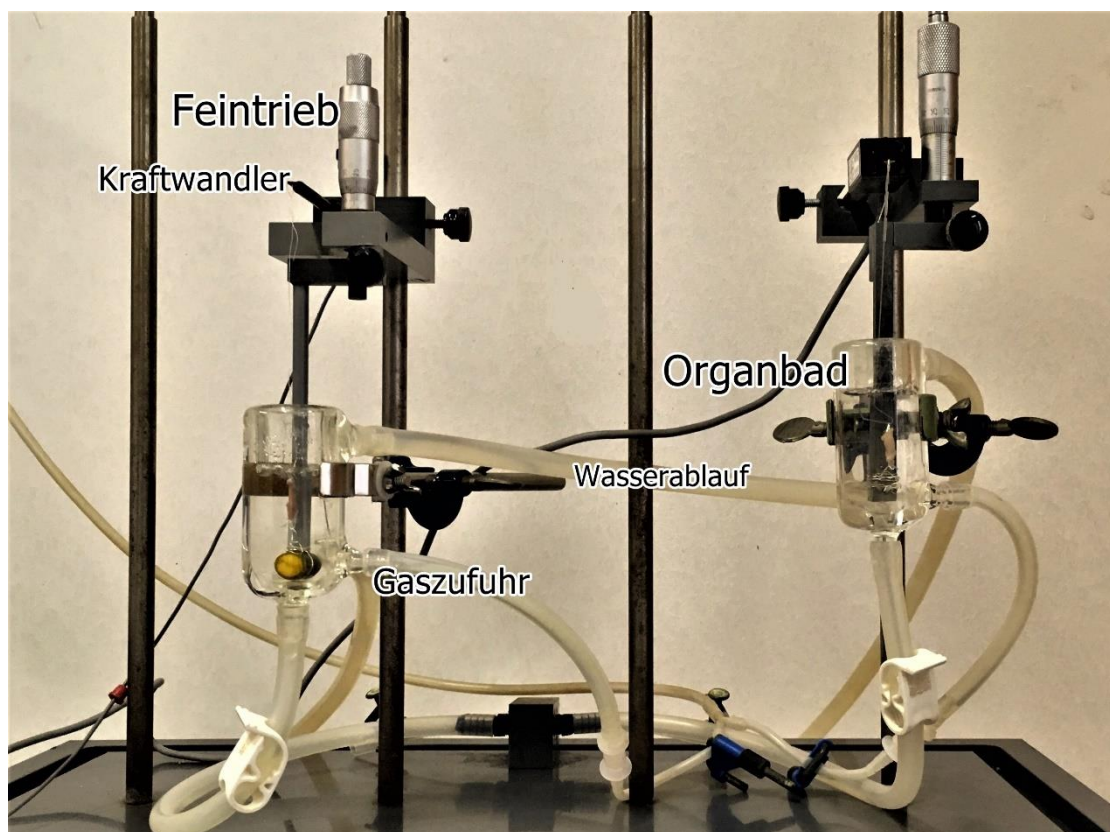


Abbildung 16: Apparatur II

3.6.3 Apparatur III

Die Versuchsapparatur III unterscheidet sich von der Apparatur II nur in der Art der Kurvenzeichnung. Während bei der Letzteren das Signal des Kraftwandlers auf Millimeterpapier über einen Schreiber dokumentiert wird, wird es bei der Ersten digital über ein Computer-Programm (LabScribe2) aufgezeichnet. Mit der Apparatur III könnten daher Pulmonalarterie, Hauptschlagader und Dünndarm untersucht werden.

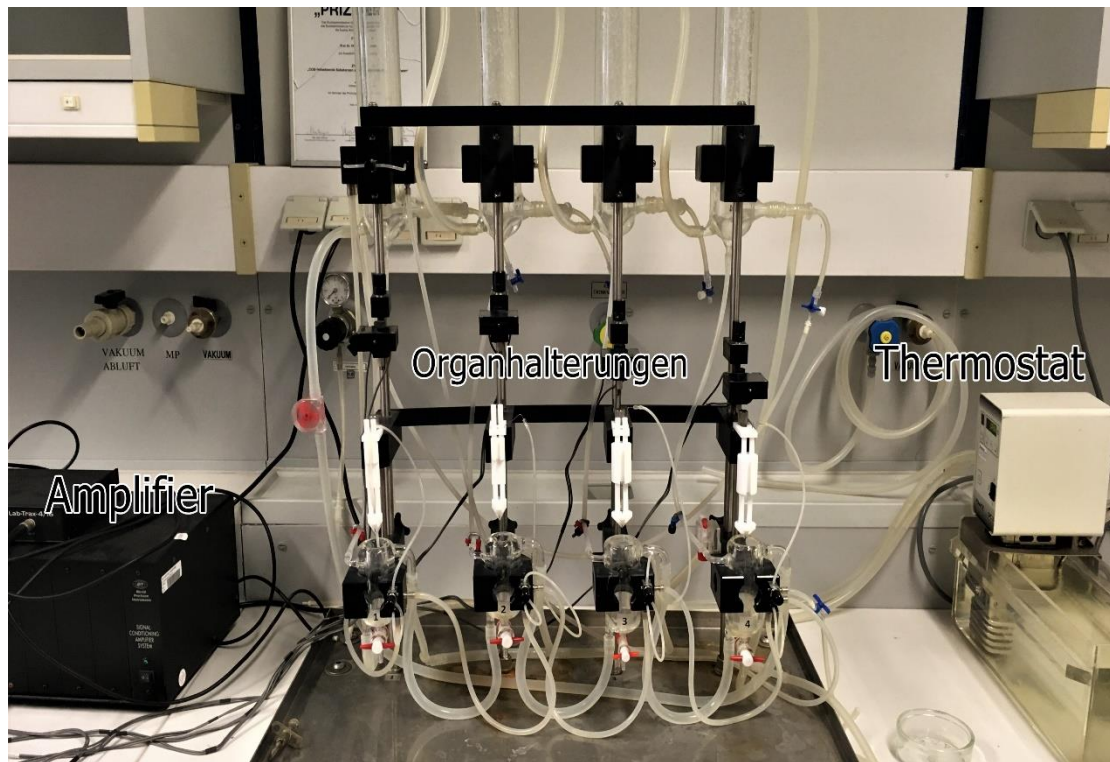


Abbildung 17: Apparatur III

3.6.4 Messprinzip

Die Aktivität der Organe im Laufe der Versuche war minimal und daher war deren direkte Dokumentierung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde sie mit einer Reihe von Geräten registriert und verstärkt und als elektrisches Signal in Form von Kurven übersetzt.

Wie schon erwähnt, wurden die Präparate zwischen Organhalterung und Kraftwandler eingespannt. Der Kraftwandler ist aus Dehnungsstreifen aufgebaut. Diese Streifen sind sehr empfindlich auf mechanische Auslenkungen, welche durch die Organe ausgelöst

werden, und ändern dabei ihren Widerstand. Laut dem Ohm'schen Gesetz sind, bei konstanter Spannung, Widerstand und Stromstärke zueinander indirekt proportional. Das heißt, dass wenn der Widerstand durch Dehnung zunimmt, dann nimmt die Stromstärke um den gleichen Ausmaß ab. Die Veränderungen der Stromstärke werden in Form von elektrischen Impulse vom Kraftwandler an den Verstärker weitergeleitet. Der Verstärker hat dann die Aufgabe, die Intensität dieses Signals zu vervielfältigen. Nun kann das Signal auf Millimeterpapier bzw. über Computer-Programm als Kurve aufgezeichnet werden.

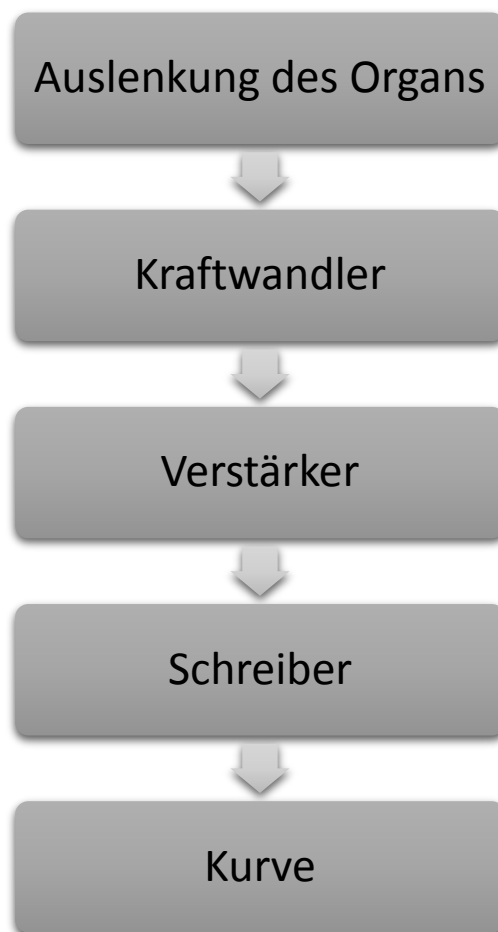


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Impulsleitung

3.7 Versuchsdurchführung

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, mussten pro Organpräparat mindestens 5 Versuche durchgeführt werden. Nur dann waren die Resultate aller Laboranten miteinander vergleichbar, was dazu führte, dass eine möglichst objektive Aussage über die Ergebnisse der Experimente getroffen wurde.

Zu Beginn wurde die Testsubstanz in eine Lösung mittels DMSO übergeführt. Die Organe mussten durch Einspritzen der Substanz in festgestellten Zeitintervallen mit steigenden Mengen der Substanzlösung bis Ende der Versuche mit 100 µmol/l Substanz versetzt werden.

Zugegebene Substanzlösung alle 45 Minuten (µl)	Substanzkonzentration im Organbad (µmol/l)
3	3
7	10
20	30
70	100

Tabelle 4: Pipettierschema

Die Berechnung der erforderlichen Einwaage erfolgte aus dem Molekulargewicht von MGtr7, welches durch 100 (Volumen von DMSO pro Substanzlösung in µl) und folglich durch 4 (Fassungsvolumen des Organbads als Anteil von 100 ml) dividiert wurde.

$$293,77 \text{ g/mol} : 100 : 4 = 0,734425 \text{ mg Testsubstanz/100 µl DMSO}$$

Die Substanz dürfte im Organbad erst dann eingespritzt werden, wenn ein steady state des Präparats in seine neue Umgebung erreicht wurde. Diese Kontrollphase betrug im Durchschnitt 45 Minuten. Wichtig war noch das Präparat oder den Kraftwandler während des Einspritzens wegen der hohen Empfindlichkeit von Organ und Apparatur nicht zu berühren, sonst könnten die Ergebnisse verfälscht werden.

3.7.1 Versuchsdurchführung auf das Atrium cordis dextrum

Der präparierte Vorhof (siehe Kapitel 3.2.1) wurde nun über seine Silberdrahthäkchen – mit Haken am Fettgewebe nach oben – in die Versuchsanordnung II eingespannt und in das Organbad eingesenkt. Damit erstens seine Spontanaktivität und zweitens seine Lebensdauer nicht beeinträchtigt werden, wurde möglichst schnell und achtsam vorgegangen. Die Gaszufuhr wurde auf 1,5 bar eingestellt und Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet. Am Vorhof wurde die Chronotropie (Schlagfrequenz) des Herzens untersucht.

Um die Vergleichbarkeit der Versuche miteinander zu garantieren, wurde der Vorhof vorgespannt. Dabei wurde der Schreiber auf 5 mV Sensitivität, auf 5 mm/sec Aufzeichnungs- und schließlich mittels Regelrad auf Null gestellt. Mittels Feintrieb wurde auf 10,4 cm vorgespannt, was 10,4 mN Vorspannung entspricht. Danach wurde im Rahmen der Kontrollphase mindestens 45 Minuten abgewartet, bis sich der Vorhof an die Umgebung der Tyrode angepasst hatte. Während dieser Phase wurde alle 5 Minuten für 12 Sekunden aufgezeichnet (entspricht 6 Kästen Millimeterpapier = 6 cm). Die Kontrollphase wurde abgeschlossen, erst wenn sich die letzten 3 Messungen nur um ± 1 Schlag voneinander unterschieden haben. Danach erfolgte der eigentliche Versuch, während dessen die Substanzlösung mithilfe von Kolbenhubpipetten dem Organbad kumulativ zugegeben wurde (siehe Kapitel 3.7, Tabelle 4), bis 100 $\mu\text{mol/l}$ Substanz im Organbad erreicht wurden.



Abbildung 19: Vorhof im Organbad

3.7.2 Versuchsdurchführung auf den Muskulus papillaris

Der wie im Kapitel 3.2.2 präparierte Papillarmuskel wurde in der Versuchsschaltung I eingespannt (siehe Kapitel 3.6.1) und in das Organbad eingetaucht. Genau so wie beim Vorhof sollte dieser Prozess schnell und sorgfältig stattfinden. Stimulator, Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet und das Präparat über Schlauchsystem mit Oxygymix versorgt. Durch Untersuchungen am Papillarmuskel wurde die Inotropie (Kontraktionskraft) des Herzens festgestellt.

Zu Beginn wurde der Schreiber auf 5 mV und 5 mm/sec Geschwindigkeit eingestellt. Mittels Feintrieb wurde der Muskel auf 3,90 mN vorgespannt (entspricht ca. 4 cm Millimeterpapier des Schreibers) und unter Anwendung des Stimulators stimuliert. Dabei wurde die Stromstärke individuell für jeden Versuch angepasst. Diese sollte 10% über der Reizschwelle des Papillarmuskels liegen, um eine Frequenz von einer Kontraktion pro Sekunde zu erreichen.

Nun wurde die Kontrollphase für mindestens 45 Minuten durchgeführt. Dabei wurden alle 5 Minuten 5 Amplituden aufgezeichnet und deren Länge wurde mittels Lineal gemessen. Zu beachten war, dass die Amplituden eine Länge von ≥ 2 cm aufgewiesen hatten und dass sich die letzten 3 Amplituden voneinander max. um ± 1 mm unterschieden hatten. Wenn diese Voraussetzungen getroffen wurden, wurde die Testsubstanz laut dem bekannten Pipettierschema (siehe Kapitel 3.7, Tabelle 4) dem Organbad zugespritzt. Dabei wurden 5 Amplituden im Abstand von 5 Minuten aufgezeichnet.

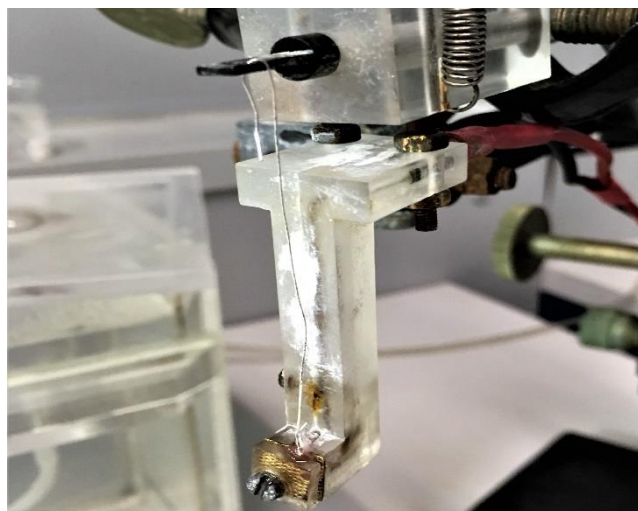


Abbildung 20: Eingespannter Papillarmuskel

3.7.3 Versuchsdurchführung auf die Arteria pulmonalis

Für die Versuchsvorbereitung der Pulmonalarterie siehe Kapitel 3.2.3. Das gefertigte Präparat könnte sowohl in Apparatur II als auch in Apparatur III eingespannt werden. Aufhängevorrichtung und Silberdraht der Organhalterung wurden durch ihr Lumen geführt, mittels Feintrieb wurde leicht gespannt und das Organ wurde dann in das Organbad eingebracht. Nach Aktivierung von Schreiber und Verstärker, wurde der Schreiber auf 10 mV mit einem Speed von 1 mm/min eingestellt. Danach wurde das Gefäß auf 10 cm Millimeterpapier vorgespannt. Im Laufe des Versuchs wurde die vasodilatierende Aktivität der Testsubstanz auf die Pulmonalarterie untersucht.

Nach einer Anpassungsphase von 20 Minuten wurde die Sensitivität des Schreibers auf 5 mV gestellt, der Nullpunkt mittels Regelrad nachjustiert und die Elektrolytlösung über den Ablauf entfernt. Nun wurde das Organbad mit 25 ml einer 90 mmolaren KCl-Lösung (siehe Kapitel 3.4) versetzt, wodurch die Kontrollphase eingeführt wurde. Über eine Laufzeit von mindestens 45 Minuten müsste die aufgezeichnete Kurve über 5 cm auf das Millimeterpapier bzw. im Computer-Programm aufsteigen, sowie für min. 10 Minuten eine Konstanz aufweisen. Erst dann dürfte die Substanzlösung zugesetzt werden. Dabei wurden alle 45 Minuten aliquote Teile der Lösung (siehe Pipettierschema, Kapitel 3.7, Tabelle 4) bis zum Erreichen von einer Substanzkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ in das Organbad zugespritzt.

3.7.4 Versuchsdurchführung auf die Aorta descendens

Am isolierten Präparat der absteigenden Hauptschlagader wurde ebenfalls die vasodilatierende Wirkung von MGtr7 auf deren glatten Muskulatur untersucht. Der Ablauf des Versuchs war identisch wie bei der Arteria pulmonalis bis auf einem Punkt: Die Schreibersensitivität wurde vom Anfang gleich mit 5 mV eingestellt und wurde nach der Anpassungsphase nicht mehr verändert.

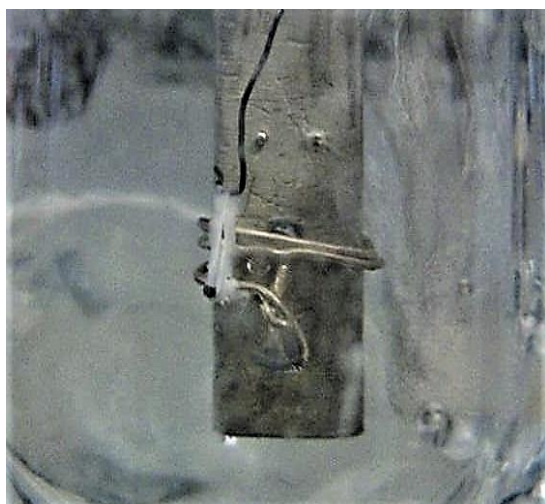


Abbildung 21: Aorta im Organbad

3.7.5 Versuchsdurchführung auf das Ileum terminale

Über die angebrachten Silberdrahthaken wurde der wie in Kapitel 3.2.5 präparierte Dünndarm entweder in die Apparatur II oder in die Apparatur III eingespannt und in das Präparatbad eingetaucht. Anhand des Dünndarms wurde der spasmolytische Effekt der Testsubstanz dokumentiert.

Nach Einschalten der Messgeräte und Versorgung des Präparats mit Carbogen, wurde der Schreiber auf 1 mm/min Aufzeichnungsgeschwindigkeit und 5 mV Stromstärke eingestellt. Danach wurde mittels Feintrieb auf 5 cm vorgespannt und unter Drehung der Regelrads auf den Nullpunkt des Schreibers gebracht.

Nach einer 20 minütigen Gewöhnungszeit wurde der Inhalt des Organbads durch den Ablauf entleert, der Schreiber auf Null gestellt und das Organ mit 25 ml einer 60 mmolaren KCl-Lösung (siehe Kapitel 3.4) versetzt. Dadurch wurde der Darm maximal kontrahiert. Diese Kontraktion markierte den Anfang der Kontrollphase, die mindestens 45 Minuten durchgeführt werden musste. Während dieser Zeit musste die aufgezeichnete Kurve mindestens über 5 cm steigen und die letzten 10 Minuten konstant bleiben. Erst dann dürfte die Testsubstanz laut dem bekannten Schema (siehe Kapitel 3.7, Tabelle 4) zugespritzt werden.

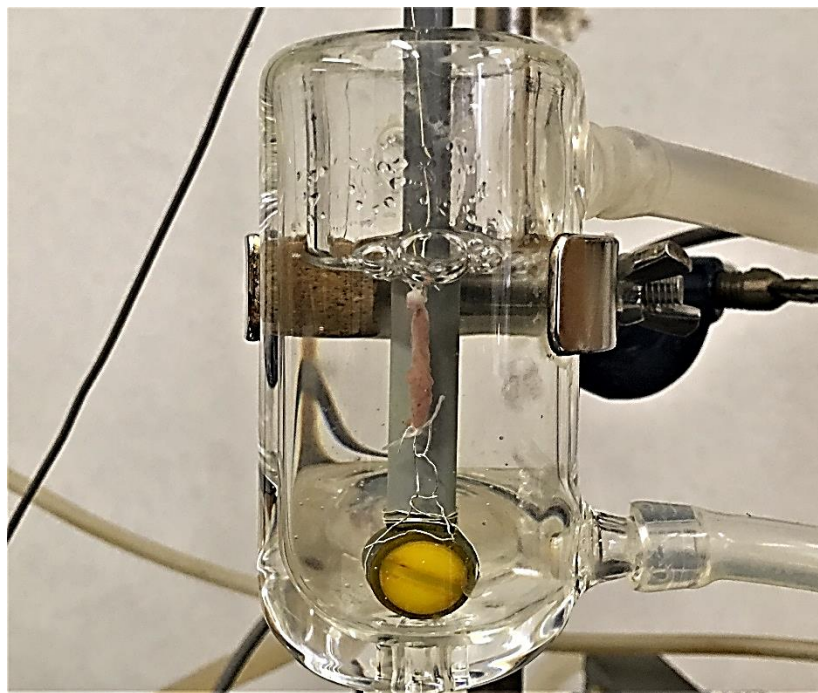


Abbildung 22: Darm im Organbad

3.8 Untersuchung des Wirkmechanismus

Im Rahmen der Untersuchungen auf alle Organe zeigte die Testsubstanz MGtr7 die stärkste Aktivität auf die Präparate des terminalen Dünndarms in Form einer Spasmolyse. Aus diesem Grund wurde weiter untersucht, um herauszufinden, ob die Wirkung der Substanz durch Stimulierung der endothelialen NO-Synthase ausgelöst wurde. Für diesen Zweck wurde ein bekannter eNOS-Antagonist zugesetzt, der die Wirkung von MGtr7 hemmen sollte. Der Verlauf des Versuchs wurde analog dem Kapitel 3.7.5 bis inklusive KCl-Zugabe durchgeführt.

3.8.1 Nitro-L-Arginin als Antagonist

Stickstoffmonoxid hat eine zentrale Rolle auf die Relaxation des koronaren Durchflusses. Im Rahmen einer Nitro-L-Arginin-Infusion (NLA) wurde nicht nur die Dilatation des koronaren Systems völlig gehemmt, sondern kam es auch zur Kontraktion der Gefäße. Das hat angedeutet, dass NLA eine erfolgreiche Hemmung der NO-Synthase verursachte, welche als Mediator der vasodilatierenden Wirkung von Acetylcholin fungiert. Diese Hemmung bezieht sich nicht nur auf die Hemmung der Koronargefäße, sondern auch auf die Hemmung anderer vaskulären Systeme (Brown et al. 1992).

Der Antagonist NLA kann verwendet werden, um die NOS des glattmuskulären Dünndarms von Meerschweinchen zu hemmen. Diese Hemmung ist aber viel signifikanter bei jungen Tieren in Vergleich zu Erwachsenen (Patel et al. 2010).

Da bei den Versuchen junge Meerschweinchen (4-8 Wochen alt) verwendet wurden, war die Auswahl von Nitro-L-Arginin als Hemmer der NO-Synthase ideal.

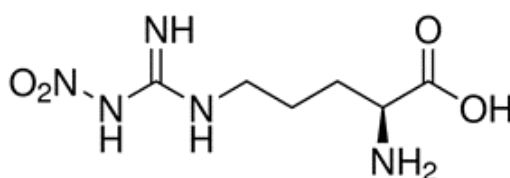


Abbildung 23: Strukturformel von Nitro-L-Arginin

3.8.2 Versuchsablauf des Wirkmechanismus

Nach der maximalen Vorkontraktion des Darms mit der 60 mmolaren KCl-Lösung wurde für die nächsten 45 Minuten abgewartet, bis das Präparat ein steady state erreicht hatte. Gleichzeitig wurde NLA-Lösung für die Blockade der NOS hergestellt.

Für die Nitro-L-Arginin-Lösung wurden 0,548 mg NO-L-Arg mittels Analysenwaage eingewogen. Die Auflösung von NLA erfolgte in 100 µl KCl-Lösung unter Anwendung vom Ultraschallbad. Diese Lösung mit der Konzentration von 100 µmol/l wurde nach Erreichen des steady state in das Organbad zugespritzt und hatte über die nächste $\frac{3}{4}$ Stunde auf das Organ gewirkt.

Nun wurde das Organbad mit einer 40 µmolaren Lösung der Testsubstanz versetzt. Diese Konzentration war etwas höher als der zuvor mit 31 µmol/l ermittelte EC₅₀-Wert (siehe Kapitel 4.5). Nach weiteren 45 Minuten wurde der Versuch beendet.

Die aufgezeichneten Kurven wurden mit den Kontraktionskraft-Zeit-Kurven der Kontrolle (Testsubstanz ohne Blocker, siehe Kapitel 4.5) verglichen, wodurch eine Aussage über die potentielle Verringerung der Spasmolyse von MGtr7 in Anwesenheit vom NO-Synthase-Hemmer getroffen werden könnte. Dadurch könnte festgestellt werden, ob der Wirkmechanismus der Testsubstanz auf die Stimulation der NOS basierte.

3.9 Datenauswertung

3.9.1 Glatte Muskulatur

Für die Auswirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur wurden die Präparate der Arteria pulmonalis, der Aorta descendens und des Ileum terminale getestet.

Auf die Gefäße wurde die potentielle Vasodilatation bzw. -konstriktion untersucht. Das terminale Ileum diente zur Untersuchung der spasmolytischen Eigenschaften der Substanz am gastrointestinalen Trakt.

Alle drei Präparate wurden mit eine KCl-Lösung vor Zugabe von MGtr7 versetzt, um sie maximal zu kontrahieren. Nur so war möglich eine potentielle Relaxation zu

untersuchen. Der Abstand der Kurve vom Nullpunkt am Zeitpunkt der Zugabe der ersten Substanzkonzentration wurde als die 100% Kontraktion des jeweiligen Versuchs festgestellt. Dieser Punkt wurde auf der Kurve markiert und stellte die Kontrolle dar. Bei der weiteren kumulativen Substanzgabe wurden die Zeitpunkte des Einspritzens ebenso markiert und als prozentueller Anteil der Kontrolle berechnet. Je nach verwendete Spannung des Schreibers wurden die gemessenen Längen (cm) mit einem Eichfaktor multipliziert, um sie in Kraft (mN) umzurechnen. Am Computer wurden die Kurven in Abhängigkeit von der Kraft gezeichnet und daher wurden die Messungen mit 1,02 multipliziert, um sie in Zentimeter umzuwandeln ($1\text{cm} = 0,98\text{mN}$).

Spannung (mV)	Eichfaktor
2	0,39
5	0,98
10	1,96

Tabelle 5: Eichfaktoren

3.9.2 Quergestreifte Muskulatur

Am Papillarmuskel wurde, wie schon erwähnt, die Inotropie gemessen. Bei den Versuchen wurde am Ende der Kontrollphase der Durchschnitt der letzten 5 aufgezeichneten Amplituden ermittelt und als Kontrolle eruiert. Die letzten gemessenen Amplituden der folgenden Versuchsreihen wurden prozentuell in Abhängigkeit von der Kontrolle dargestellt. Je nach verwendeten Spannung wurden die Ergebnisse mit dem richtigen Kalibrierfaktor multipliziert, um in Kraft umgerechnet zu werden.

Am rechten Vorhof wurde die Schlagfrequenz des Herzens untersucht. Alle 5 Minuten wurde 12 Sekunden lang die Aktivität des Vorhofs aufgezeichnet. Um die Schlagfrequenz pro Minute zu berechnen, wurden die ermittelten Schlagzahlen mit 5 multipliziert ($12\text{ sec} \times 5 = 60\text{ sec}$). Als Kontrollwert dienten hier die letzten gezählten Schläge am Ende der Kontrollphase. Die darauf folgenden Messungen wurde als Anteil

des Kontrollwerts berechnet. Die Messungen erfolgten bei einer Spannung von 2 mV oder 5 mV, selten aber auch bei 10 mV.

3.10 Statistik

Für die Auswertung der gemessenen Ergebnisse wurde das Computer-Programm Sigma-Plot 9.0 verwendet. Dabei wurden die Ergebnisse von mindestens 5 Versuchen, die zueinander gepasst hatten, in die Auswertung berücksichtigt. Mithilfe des Programms wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (SEM) ausgerechnet. Mit diesen Daten könnten dann Konzentrations-Wirkungskurven für jedes Organpräparat erstellt werden. Auf der x-Achse wurde die Substanzkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) und auf der y-Achse die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz (%) aufgetragen.

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO eine Eigenwirkung ausübte, wurde ein Korrekturfaktor in die berechneten Mittelwerte und SEM miteinbezogen.

Bei den Präparaten, wo der Wirkstoff einen genug starken Effekt ausübte, könnte über die Kurven der EC_{50} -Wert ermittelt werden.

Dieser Wert entspricht derjenigen Konzentration, bei der 50% des Maximaleffekts erreicht wird (Mutschler et al. 2012).

Die Signifikanz der gemessenen Ergebnisse wurde mithilfe von Student-t-Test berechnet. Als signifikant waren Messergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($P < 0,05$) bzw. kleiner als 1% ($P < 0,01$) zu klassifizieren. Hochsignifikant waren die Messergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% ($P < 0,001$).

4 ERGEBNISSE

In diesem Kapitel wird die Wirkung der Substanz MGtr7 auf die isolierten Organpräparate näher untersucht. Pro Organ wurden mindestens 5 Versuchsreihen durchgeführt und anhand der Resultate für jedes Präparat eine Tabelle mit den Ergebnissen, eine Konzentrations-Wirkungskurve und eine Originalaufzeichnung der Experimente dargestellt.

4.1 Wirkung von MGtr7 auf das Atrium cordis dextrum

Die Veränderung der Chronotropie des Herzens in Anwesenheit von MGtr7 wurde über 5 Versuchsreihen am rechten Vorhof untersucht (Für die Isolierung siehe Kapitel 3.2.1, für die Versuchsdurchführung Kapitel 3.7.1).

Im Rahmen der Auswertung wurde die Schlagfrequenz des Präparats am Ende der Kontrollphase als der Kontrollwert festgelegt, welcher als die 100%ige Chronotropie beschrieben wurde. Wie schon erwähnt, wurden die gezählten Schläge mit 5 multipliziert, um die Frequenz pro Minute auszurechnen.

Nach Zugabe der ersten Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ wurde das Präparat kaum beeinflusst. Bei der Zugabe der weiteren 7 und 20 μl , wodurch eine Konzentration von 10 bzw. 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde, wurde die Chronotropie positiv beeinflusst, mit einer Frequenzsteigerung von 3,90% und 2,80% entsprechend. Erst bei der letzten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine negative Wirkung der Substanz auf dem Vorhof beobachtet, wobei es zum Erlöschen der Schlagfrequenz kam. Anhand dieser Ergebnisse könnten festgestellt werden, dass die Veränderungen der Chronotropie durch MGtr7 konzentrationsabhängig sind.

In der folgenden Tabelle werden die statistischen Daten der Versuche zusammengefasst. Abhängig von der Irrtumswahrscheinlichkeit könnte die Signifikanz der durchgeführten Experimente beurteilt werden. Die Standardabweichung gibt die Unterschiede der Frequenz aller 5 Versuche an und wurde zusätzlich prozentuell in Abhängigkeit von der Kontrolle berechnet.

MGtr7 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (Schläge/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	263,00 $\pm$ 10,79	0,00 $\pm$ 0,00	5	-
3	264,00 $\pm$ 9,54	0,47 $\pm$ 0,96	5	n.s.
10	273,00 $\pm$ 10,44	3,90 $\pm$ 1,79	5	n.s.
30	270,00 $\pm$ 9,49	2,80 $\pm$ 1,60	5	n.s.
100	0,00 $\pm$ 0,00	-100,00 $\pm$ 0,00	5	0,01

Tabelle 6: Ergebnisse von MGtr7 am rechten Vorhof

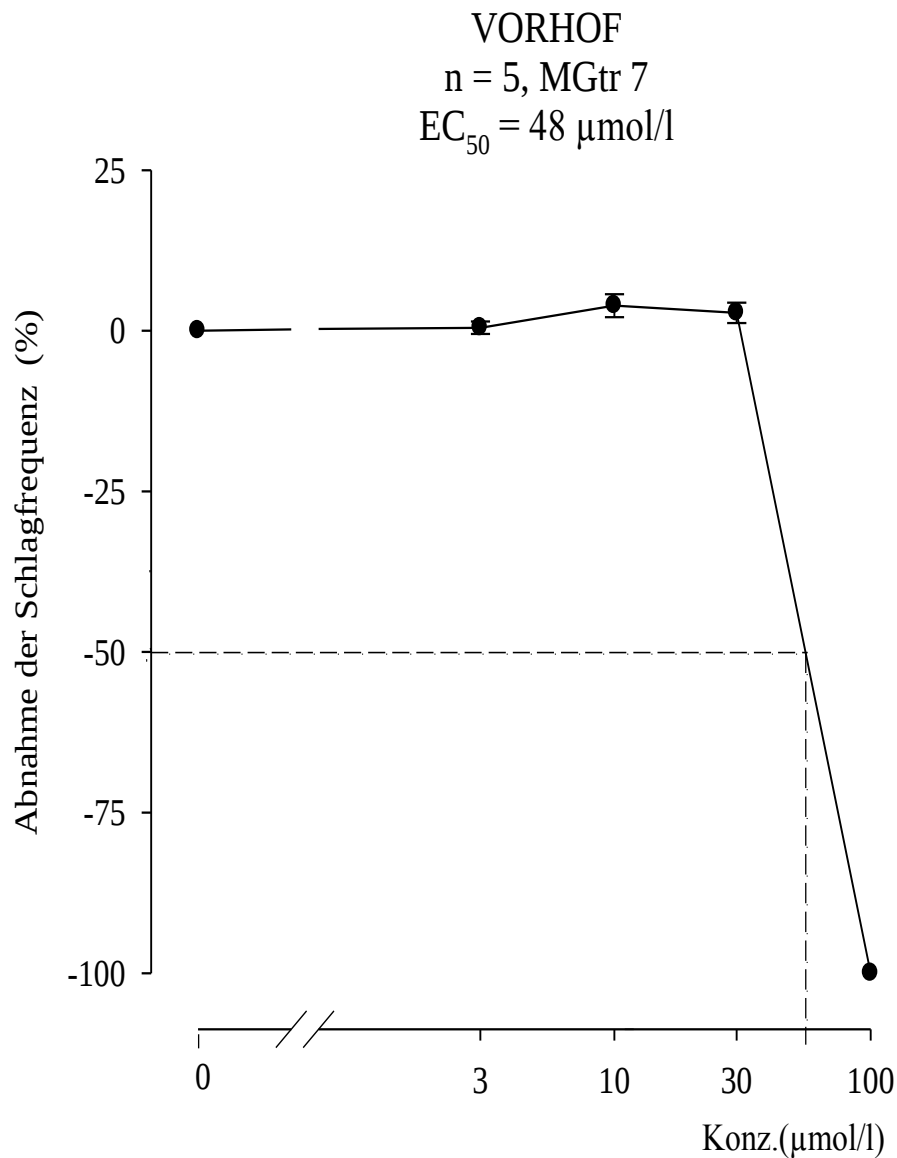


Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr7 am rechten Vorhof

Die Abbildung stellt die Konzentrations-Wirkungskurve in Abhängigkeit von der Substanz dar. Auf der Abszisse wurde die Konzentration von MGtr7 und auf der Ordinate die Schlagfrequenz des Organs aufgetragen. Die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsreihe wurden mit Punkten ausgedrückt. Durch diese Punkte laufen senkrechte Balken, welche den Standardfehler repräsentieren. Die Veränderungen der Chronotropie sind im Graphen gut ersichtlich. Schließlich konnte mithilfe vom Diagramm der EC₅₀-Wert berechnet werden, welcher bei 48 µmol/l liegt.

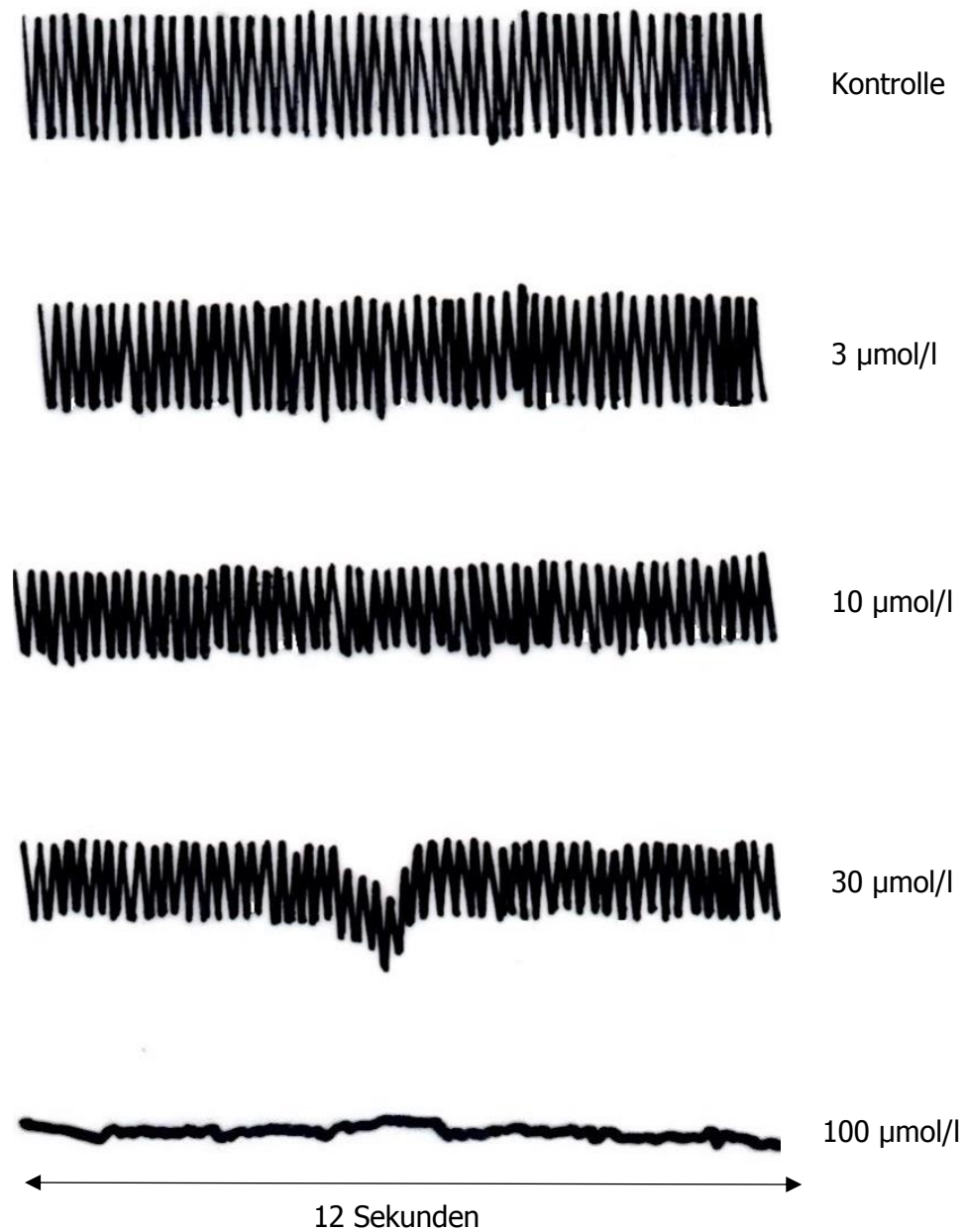


Abbildung 25: Originalaufzeichnung von MGtr7 am rechten Vorhof

Anhand der Originalaufzeichnung am Schreiber kann beobachtet werden, dass die Schlagfrequenz erst bei der höchsten Konzentration negativ beeinflusst wurde.

4.2 Wirkung von MGtr7 auf den Musculus papillaris

Um den Einfluss der Substanz auf die Inotropie zu untersuchen, wurden 5 unterschiedliche Versuche mit dem Papillarmuskel durchgeführt. Die Präparation des Organs und die Durchführung der Experimente wurden in Kapitel 3.2.2 bzw. 3.7.2 besprochen.

Als Referenz für die Auswertung der Ergebnisse wurde der Durchschnitt der Amplitudenhöhe der letzten 5 aufgezeichneten Amplituden am Ende der Kontrollphase festgestellt. Um diese Längen in Kraft umzuwandeln, wurden sie am Computer mit einem Korrekturfaktor ($1\text{cm} = 0,98\text{ mN}$) unter Eingabe der richtigen Spannung des Schreibers multipliziert. Bei der Erläuterung der Befunde wurde festgelegt, dass die Testsubstanz erst in der Endkonzentration zu einer leichten Minderung der Inotropie von 13,80% geführt hatte.

In der Tabelle 7 werden die Mittelwerte der Amplitudenlängen in mN und die Inotropieveränderungen in Prozent präsentiert. Dabei wurde auch der Standardfehler miteinbezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit spricht für die Signifikanz der ermittelten Werte.

MGtr7 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$0,95 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$0,89 \pm 0,08$	$-6,57 \pm 6,12$	5	n.s.
10	$0,96 \pm 0,07$	$1,63 \pm 7,58$	5	n.s.
30	$0,99 \pm 0,06$	$4,09 \pm 4,86$	5	n.s.
100	$0,82 \pm 0,05$	$-13,80 \pm 4,64$	5	0,05

Tabelle 7: Ergebnisse von MGtr7 am Papillarmuskel

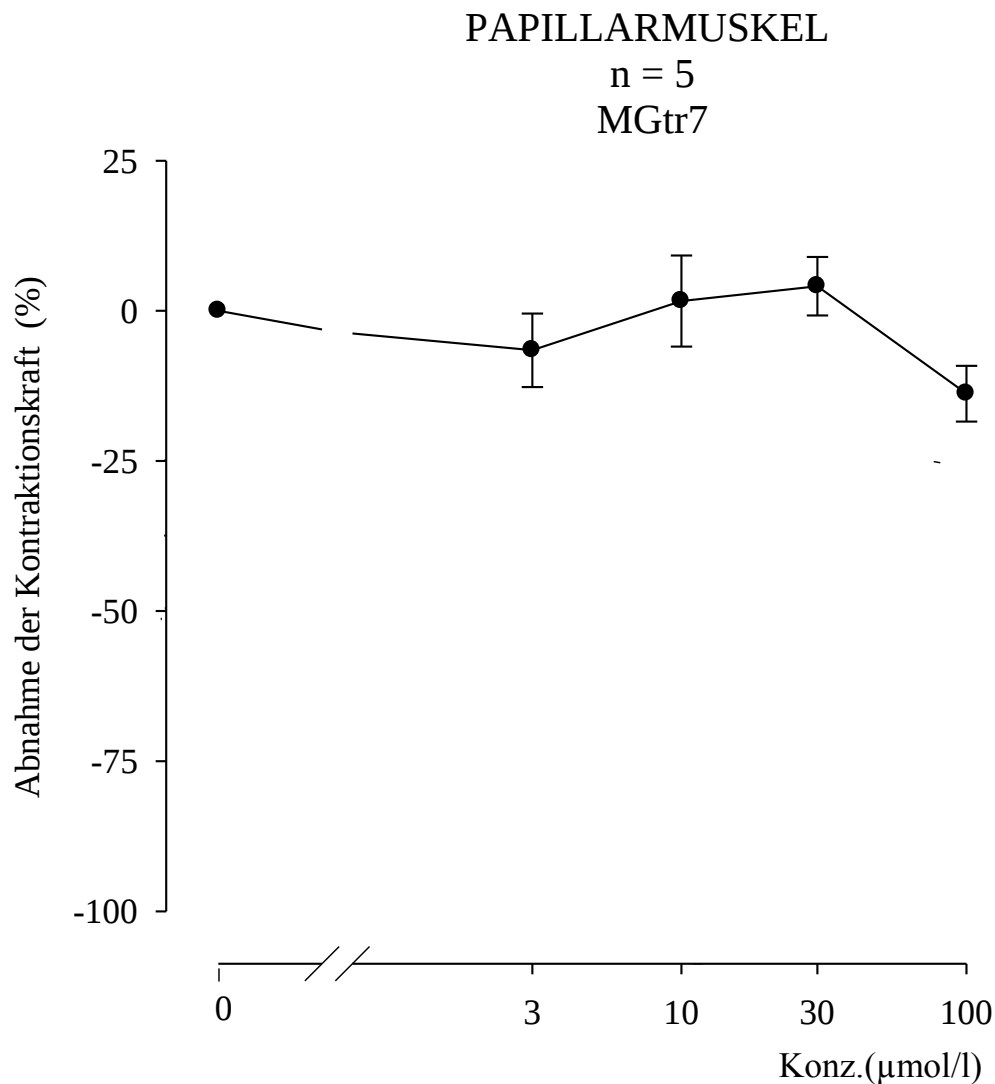


Abbildung 26: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr7 am Papillarmuskel

In der obigen Abbildung werden die Resultate im Form einer Konzentrations-Wirkungskurve präsentiert. Auf der x-Achse wurden die Konzentration des Triazol-Derivats und auf der y-Achse die Kontraktionskraft des Organs aufgetragen. Mittels Punkten auf dem Graphen wurden die Mittelwerte deutlich gemacht. Die Balken oberhalb und unterhalb dieser Punkte stellen die Standardabweichungen dar. Da der Effekt von MGtr7 auf den Muskel von keiner großen Bedeutung war, konnte die EC_{50} nicht ermittelt werden.

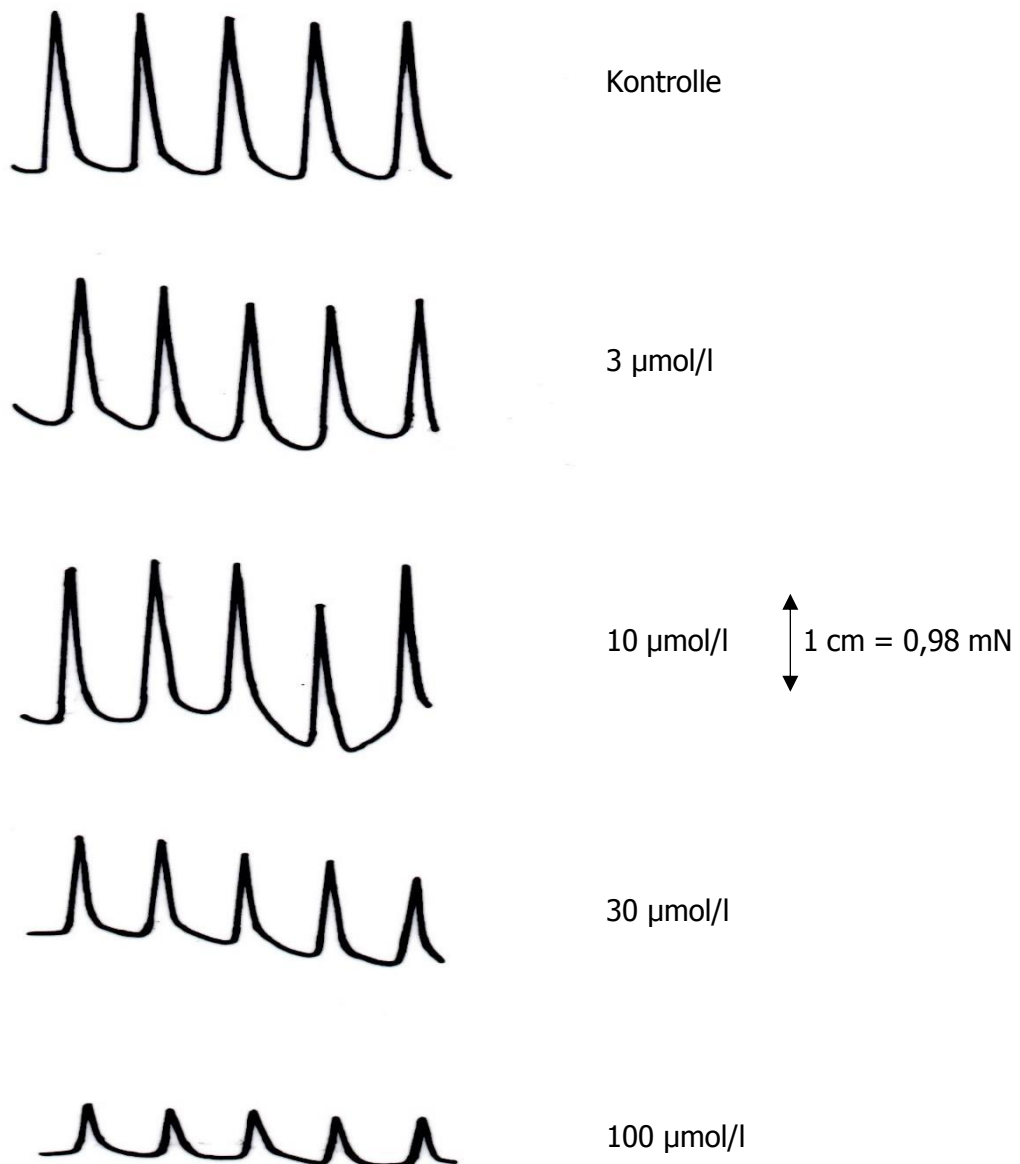


Abbildung 27: Originalaufzeichnung von MGtr7 am Papillarmuskel

Die Originalaufzeichnung bestätigt ebenfalls, dass die Testsubstanz einen leichten Einfluss auf die Kontraktionskraft des Muskels hat, und zwar erst nach Erreichen einer Substanzkonzentration von 100 µmol/l.

4.3 Wirkung von MGtr7 auf die Arteria pulmonalis

Auf die glatte Muskulatur der Pulmonalarterie wurde die vasodilatierende Aktivität der Testsubstanz untersucht. Nachdem die wie in Kapitel 3.2.3 und folgend 3.7.3 beschriebenen Schritte stattgefunden hatten, könnte dieser Mechanismus untersucht werden. Als Bezugspunkt wurde die Breite der Kurve nach Erreichen vom Plateau nach der KCl-Zugabe angenommen, welcher die 100%ige Kontraktion des Gefäßes repräsentierte. Eine starke Vasodilatation wurde gegen Versuchsende nach Versetzen des Präparats mit 100 µl Substanzlösung erreicht. Diese Wirkung war aber nicht stark genug, um einen EC_{50} -Wert berechnen zu können. Dabei wurde eine $37,13 \pm 8,83$ relaxierende Wirkung von MGtr7 bezogen auf die Maximalkontraktion gemessen.

In der folgenden Tabelle wurden die statistischen Daten, wie in Kapitel 4.1 und 4.2 beschrieben, eingetragen.

MGtr7 (µmol/l)	$f_c \pm SEM$ (mN)	$f_c \pm SEM$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,65 \pm 2,89$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$11,39 \pm 2,81$	$-2,14 \pm 0,69$	5	n.s.
10	$10,70 \pm 2,72$	$-9,01 \pm 1,60$	5	0,05
30	$9,80 \pm 2,70$	$-17,63 \pm 3,14$	5	0,05
100	$7,98 \pm 2,92$	$-37,13 \pm 8,83$	5	0,01

Tabelle 8: Ergebnisse von MGtr7 an der Pulmonalarterie

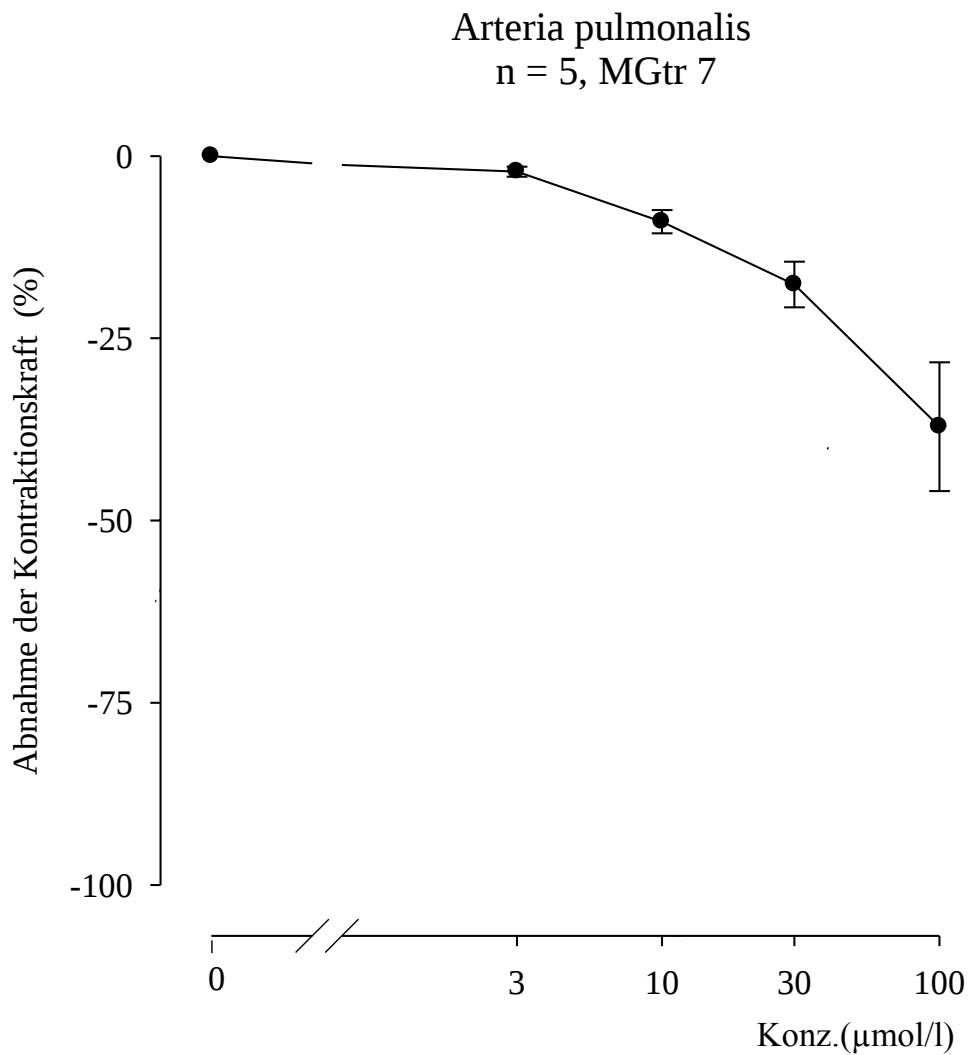


Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr7 an der Pulmonalarterie

Die Grafik stellt die Konzentrations-Wirkungskurve des Triazol-Derivats am Versuch der Pulmonalarterie dar. Die y-Achse repräsentiert die prozentuelle Abnahme der Kontraktion des Gefäßes und die x-Achse die steigende Substanzkonzentration. Mittels Punkten wurden die Mittelwerte der Konzentrationstufen im Laufe der Versuche und mittels Balken die jeweiligen Standardabweichungen gekennzeichnet.

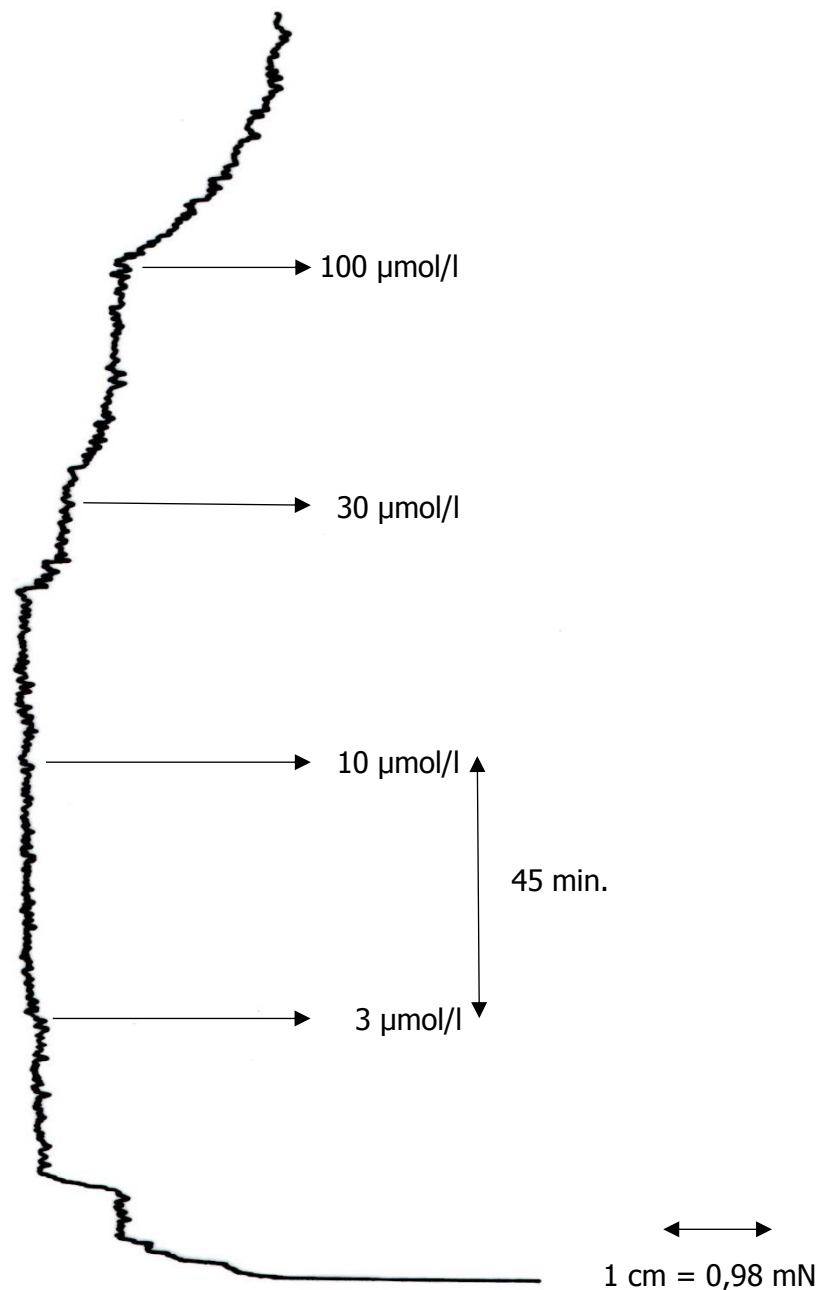


Abbildung 29: Originalaufzeichnung von MGtr7 an der Pulmonalarterie

Die dazugehörige Originalaufzeichnung zeigt wiederum, dass die Substanz eine stärkere Wirkung auf die Arteria pulmonalis in Vergleich zu den glattemuskulären Präparaten ausgeübt hatte, jedoch war dieser Effekt für die Ermittlung der EC_{50} gering.

4.4 Wirkung von MGtr7 auf die Aorta descendens

Genau wie beim Präparat der Arteria pulmonalis wurde die Aorta descendens nach Isolierung (Kapitel 3.2.4) verwendet, um 5 Versuchsreihen zur Bestimmung des vasodilatierenden Effekts von MGtr7 durchzuführen (Kapitel 3.7.4). Nach der Vorkontraktion des Präparats mittels KCl-Lösung wurde die erreichte Plateauphase als der 100%ige Kontrollwert definiert. Danach folgte die Substanzzugabe. Dabei wurde beobachtet, dass mit steigender Konzentration von MGtr7 die Stärke der Vasodilatation zugenommen hatte. So wurde in Bezug zur Kontrolle bei 3 $\mu\text{mol/l}$ eine Relaxation von $5,09 \pm 2,27\%$, bei 10 $\mu\text{mol/l}$ von $18,48 \pm 5,70\%$, bei 30 $\mu\text{mol/l}$ von $37,06 \pm 6,44\%$ und bei 100 $\mu\text{mol/l}$ von $47,71 \pm 0,78\%$ beobachtet. Hier war die Auswirkung der Substanz wiederum stärker in Vergleich zu der quergestreiften Muskulatur von Papillarmuskel und Vorhof, jedoch was diese knapp unter 50%, wodurch die Berechnung des EC_{50} -Wertes nicht möglich war.

In der nächsten Tabelle werden Standardfehler, Standardabweichung und Irrtumswahrscheinlichkeit jeder Versuchsreihe dargestellt. Letztere ist ein Maß für die statistische Signifikanz der gewonnenen Daten.

MGtr7 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,98 \pm 0,89$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$8,57 \pm 0,99$	$-5,09 \pm 2,27$	5	n.s.
10	$7,14 \pm 0,45$	$-18,48 \pm 5,70$	5	0,05
30	$5,49 \pm 0,47$	$-37,06 \pm 6,44$	5	0,01
100	$4,69 \pm 0,44$	$-47,71 \pm 0,78$	5	0,01

Tabelle 9: Ergebnisse von MGtr7 an der Hauptschlagader

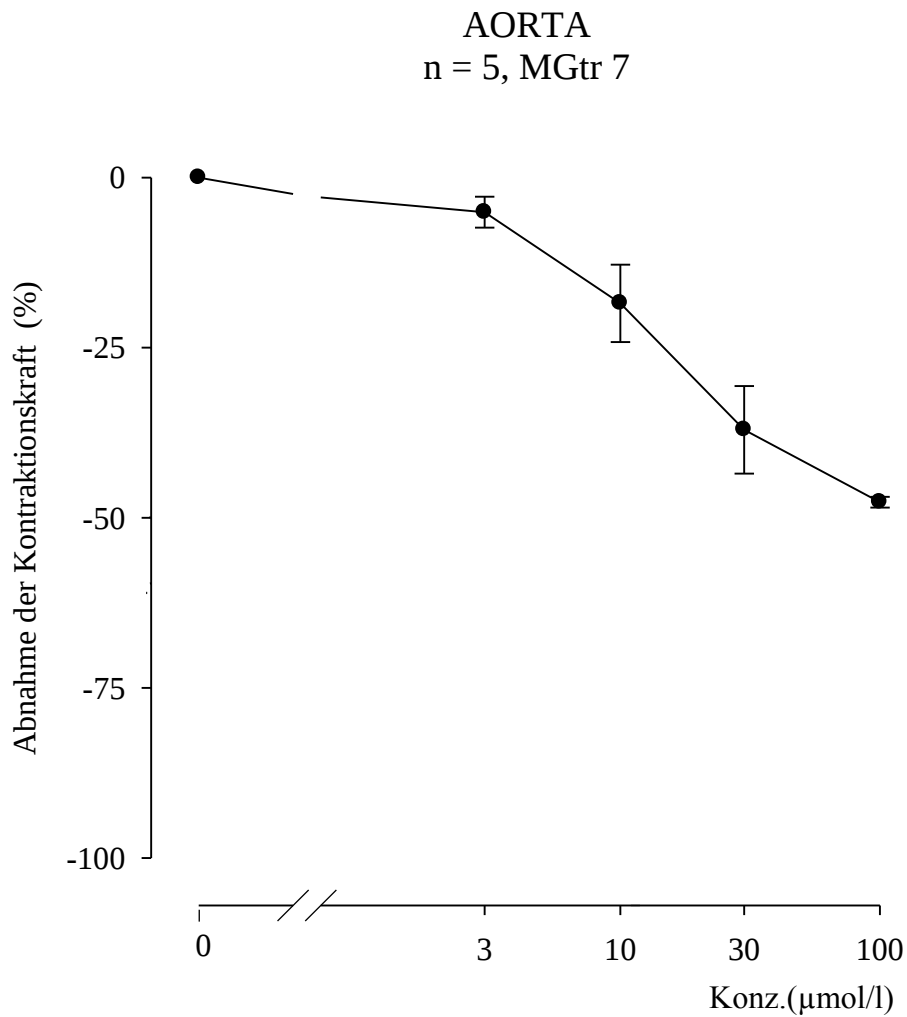


Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr7 an der Hauptschlagader

Auf der Konzentrations-Wirkungskurve wurde auf der y-Achse die Kontraktionskraft des Gefäßes und auf der x-Achse halblogarithmisch die steigende Substanzkonzentration aufgetragen. Die schwarzen Punkte auf der Kurve definieren das arithmetische Mittel der jeweiligen Versuchsreihe und deren Balken die Standardabweichungen.

Hier wurde die Abnahme der Kontraktion mit steigender Substanzmenge ersichtlich gemacht. Außerdem ist es erkennbar, dass wegen der knapp unter 50% ausgeübten Relaxation die 50%ige effektive Konzentration nicht ermittelt werden kann.

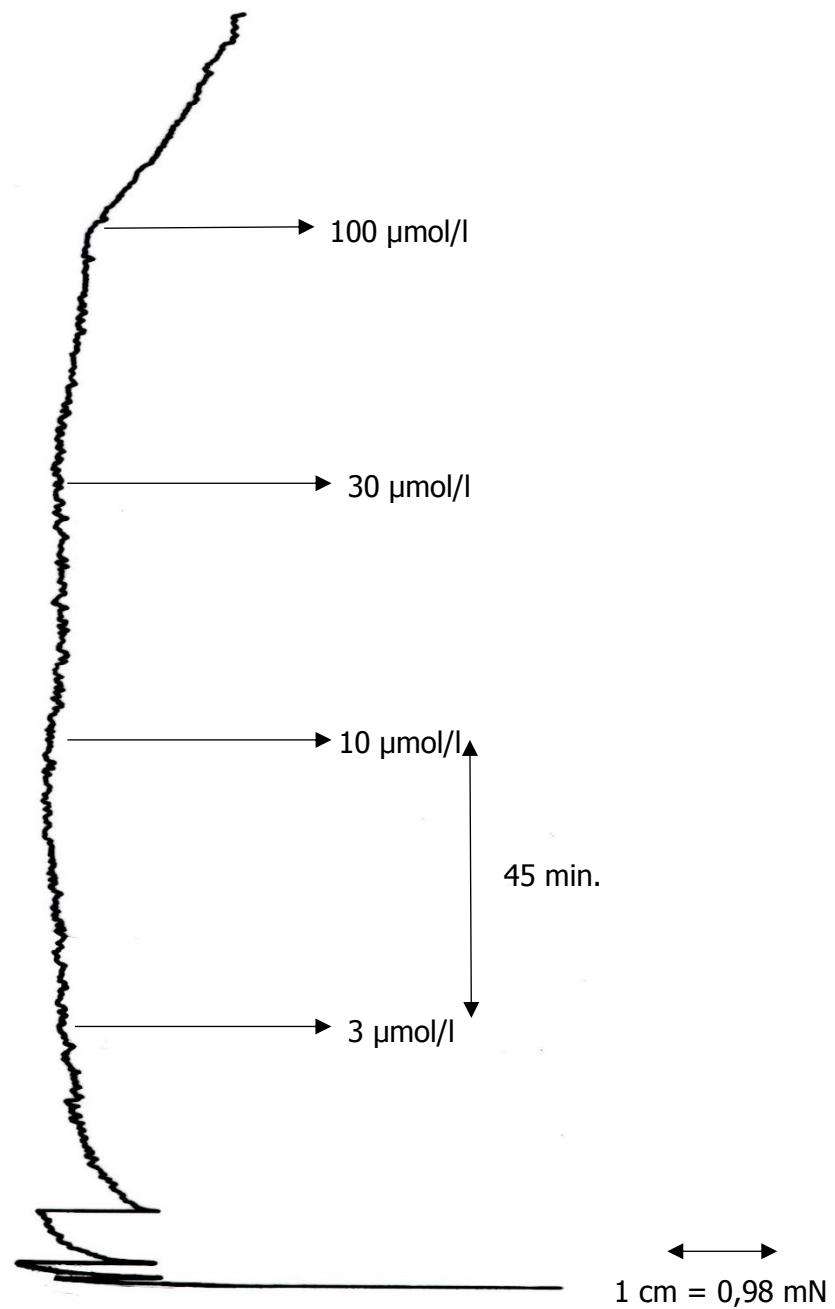


Abbildung 31: Originalaufzeichnung von MGtr7 an der Hauptschlagader

Die Abbildung präsentiert die Aufzeichnung eines kompletten Versuchs der Testung der Substanz an die Aorta descendens. Wie zu erkennen ist, nimmt die Kurve mit steigender Konzentration von MGtr7 ab.

4.5 Wirkung von MGtr7 auf das Ileum terminale

Der Wirkstoff hat am terminalen Dünndarm die stärkste Wirkung ausgeübt. Wie bei den anderen glattmuskulären Präparaten wurde auch hier eine Relaxation des Organs unter Einfluss der Testsubstanz untersucht. Die Präparation des Dünndarms wurde in Kapitel 3.2.5 und die Durchführung der Versuche in Kapitel 3.7.5 beschrieben. Die konstant gebliebene maximale Kontraktion des Organs nach KCl-Zugabe wurde als der 100%ige Bezugswert angenommen. In Relation zu diesem Wert wurde die zunehmende spasmolytische Wirkung von MGtr7 bei steigender Konzentration in Prozent berechnet. Außerdem wurde bei einer Konzentration von 31 $\mu\text{mol/l}$ der EC_{50} -Wert erreicht.

In der dazugehörigen Tabelle werden die erhaltenen Ergebnisse von 6 Versuchsreihen statistisch dargestellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gibt wiederum die statistische Signifikanz der Daten an.

MGtr7 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	12,01 $\pm$ 1,67	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	11,62 $\pm$ 1,79	-4,00 $\pm$ 2,32	6	n.s.
10	10,00 $\pm$ 1,83	-17,96 $\pm$ 5,81	6	0,05
30	6,21 $\pm$ 1,14	-49,19 $\pm$ 7,72	6	0,01
100	1,72 $\pm$ 0,89	-88,35 $\pm$ 6,17	6	0,01

Tabelle 10: Ergebnisse von MGtr7 am terminalen Darm

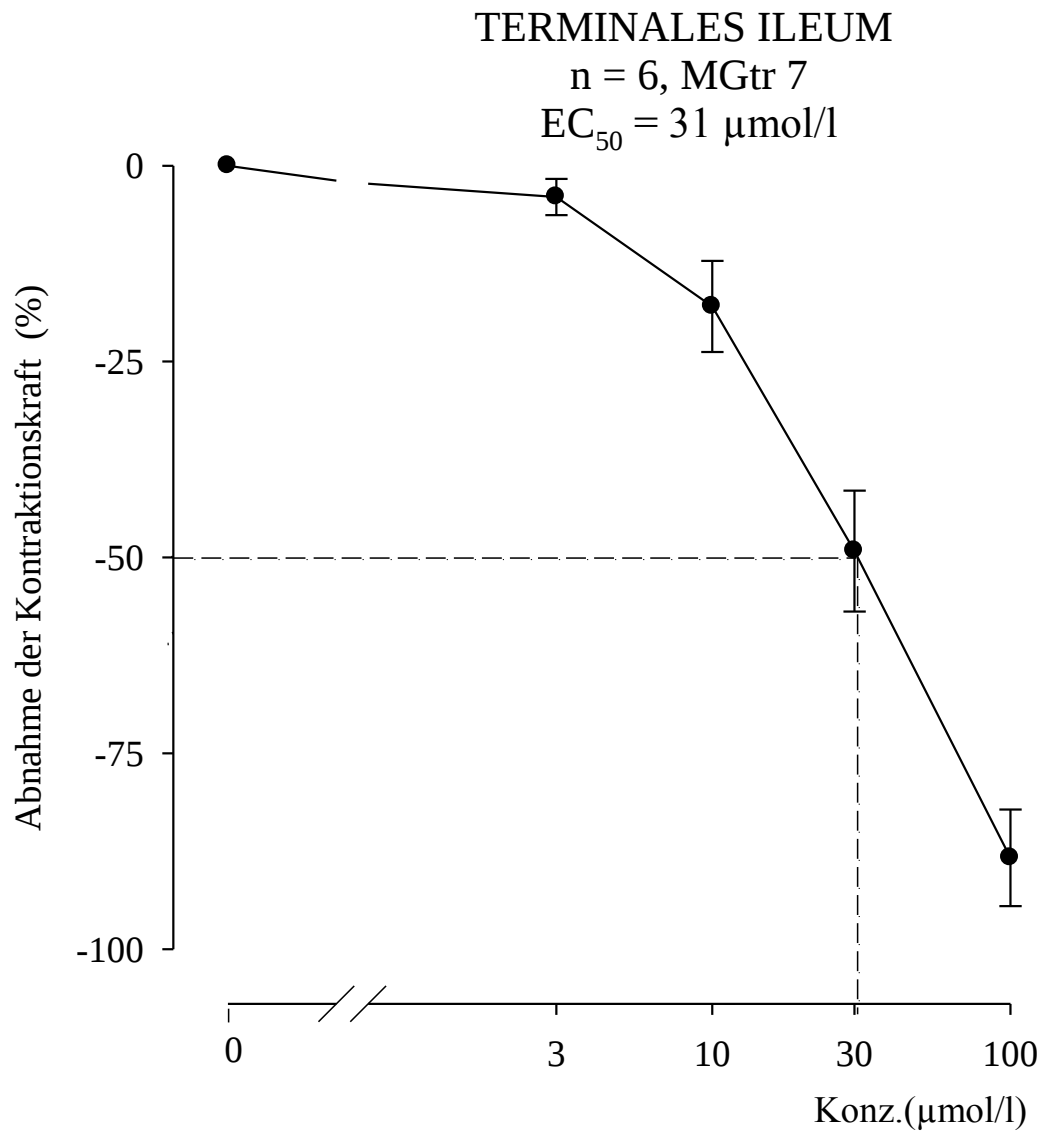


Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr7 am terminalen Darm

In der betreffenden Abbildung wird die Konzentrations-Wirkungskurve der Versuche am Ileum terminale dargestellt. Die Konzentration der Substanzlösung wurde in $\mu\text{mol/l}$ auf der x-Achse aufgetragen, die Abnahme der Kontraktionskraft in % auf der y-Achse. Die Punkte repräsentieren das arithmetische Mittel jeder Versuchsreihe und die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen. Zum Schluss wurde mit einer senkrechten gestrichelten Linie die EC_{50} definiert. Dieser Wert entspricht einer Konzentration von $31 \mu\text{mol/l}$.

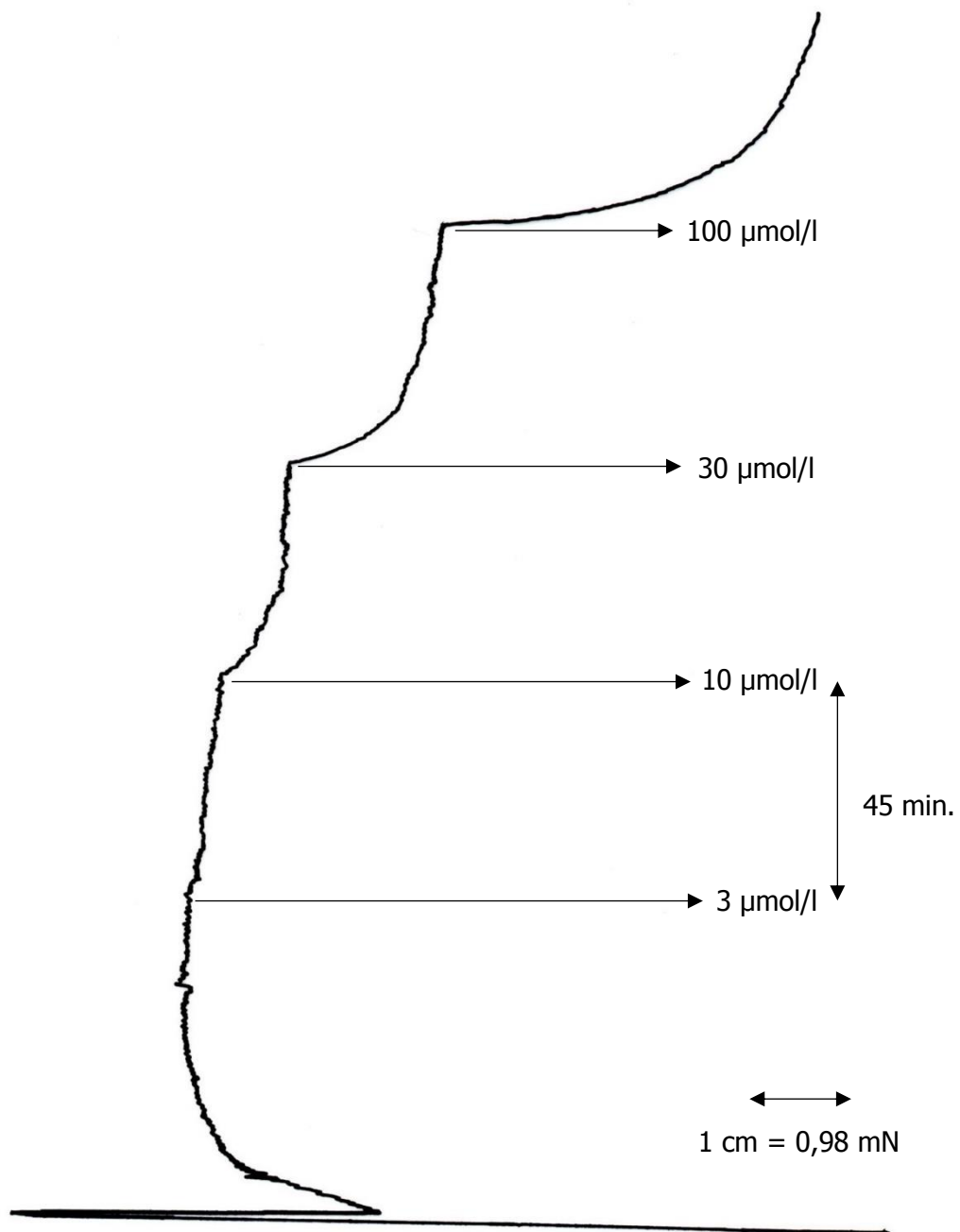


Abbildung 33: Originalaufzeichnung von MGtr7 am terminalen Dünndarm

Dargestellt ist hier die Originalaufzeichnung, welche im Laufe der Versuche mittels Schreiber generiert wurde. Hier wird noch einmal bestätigt, dass mit zunehmender Substanzkonzentration die Spasmolyse stärker wird.

4.6 Wirkung von MGtr7 auf das Ileum terminale in Anwesenheit des Antagonisten Nitro-L-Arginin

Nach Ablauf der Versuche an allen 5 Organpräparaten wurde ersichtlich gemacht, dass die Substanz MGtr7 die stärkste Wirkung an den terminalen Dünndarm ausgeübt hatte. Aus diesem Grund wurde dieses Organ für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus ausgewählt. Die Durchführung von diesem Versuch wurde bereits in Kapitel 3.8.2 beschrieben.

Dabei wurde untersucht, ob die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz auf die Stickstoffmonoxid-Freisetzung durch die eNO-Synthase basiert. Dafür wurde vor Substanzzugabe das Organ mit einem eNOS-Blocker versetzt, um dieses Enzym zuvor zu blockieren. Erst dann könnte festgelegt werden, ob der Wirkmechanismus von MGtr7 mit der Wirkung der Synthase gekoppelt ist.

Nach Zugabe der KCl-Lösung wurde abgewartet bis die maximale Vorkontraktion ein konstantes Niveau erreicht hatte (sog. Plateauphase). Anschließend wurde das Organbad mit der 100 μ molaren Nitro-L-Arginin-Lösung versetzt. Nach 45 Minuten wurde die Substanzlösung mit einer Konzentration von 40 μ mol/l zugespritzt. Der Versuch wurde beendet, nachdem die Testsubstanz für die nächsten 45 Minuten an das Organ einwirken gelassen wurde.

Die folgende Tabelle enthält die Daten der durchgeführten Versuche. Das arithmetische Mittel wurde in Kraft (mN) ausgedrückt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit P ist ein Maß für die statistische Signifikanz der Ergebnisse.

Konzentration (μ mol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuche (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	9,81 $\pm$ 1,15	5	-
100 NLA	9,16 $\pm$ 1,08	5	-
40 Mgtr7	5,86 $\pm$ 1,15	5	0,05

Tabelle 11: Ergebnisse von MGtr7 am terminalen Darm in Anwesenheit von NLA

**Darm, Nitro-L-Arginin (100 μ M)
MGtr 7, 40 μ mol/l
n=5**

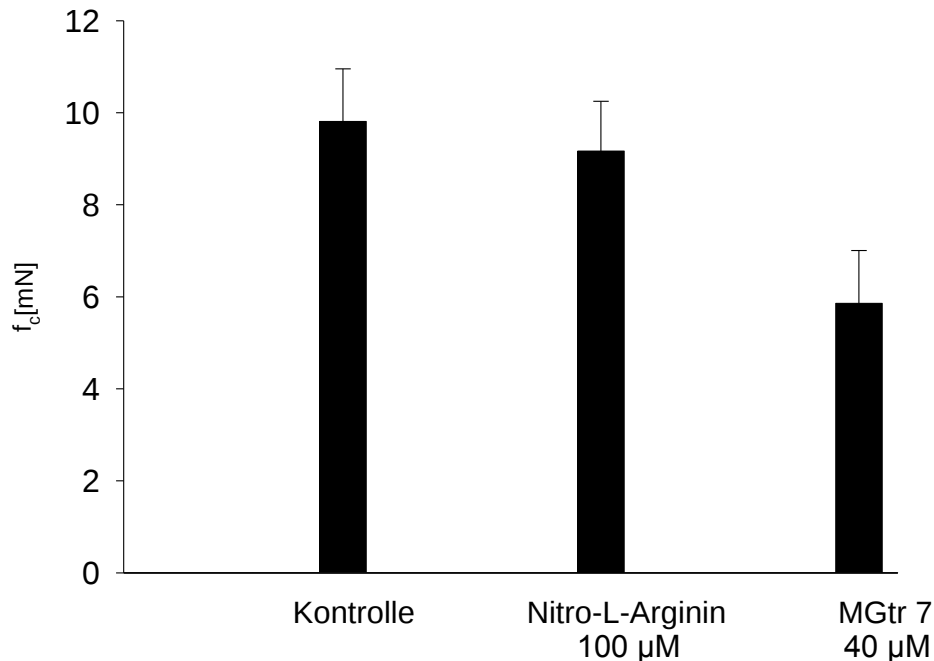


Abbildung 34: Balkendiagramm von MGtr7 am terminalen Darm in Anwesenheit von NLA

In der Grafik können die Veränderungen der Kontraktionskraft leichter erkannt werden. Auf der Abszisse wurden die unterschiedliche Versuchsreihen aufgetragen, und zwar die Kontrollphase, die zweite Versuchsphase mit Zugabe des Antagonisten und die letzte Phase mit der Zugabe von MGtr7. Auf der Ordinate wurde die Kontraktionskraft des Darms in mN angegeben. Die 3 drei Spalten repräsentieren die 3 unterschiedlichen Versuchsreihen und die darüberstehende Balken den jeweiligen Standardfehler.

Anhand der Abbildung kann festgestellt werden, dass nach Zugabe der Testsubstanz die Kontraktion des Präparats abnimmt, obwohl es zuvor mit Nitro-L-Arginin gehemmt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung von MGtr7 nicht auf die Stimulierung der eNOS basiert, da diese bereits blockiert ist. Mit anderen Worten kann der Antagonist Nitro-L-Arginin die spasmolytische Wirkung von MGtr7 nicht antagonisieren.

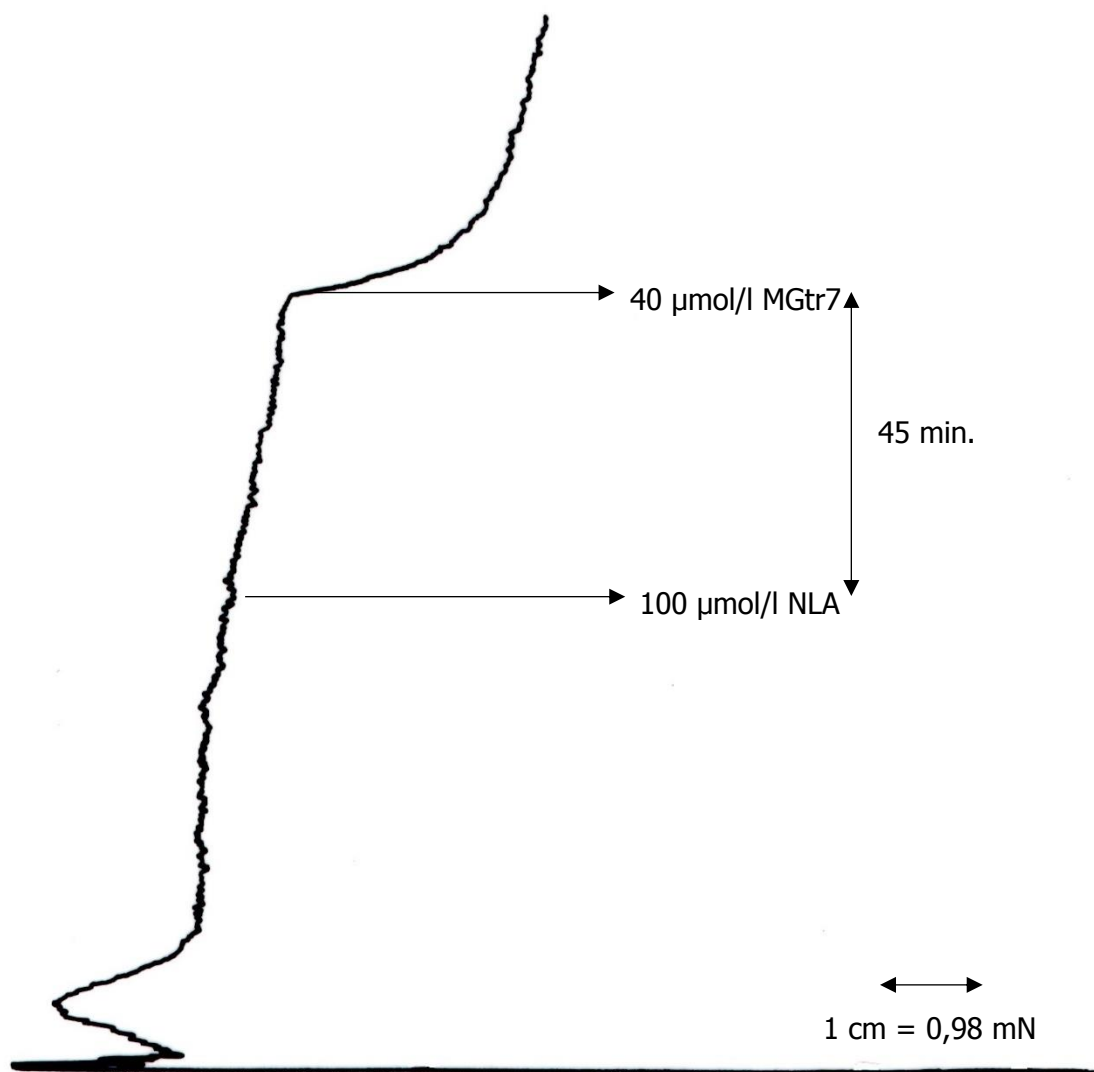


Abbildung 35: Originalaufzeichnung von MGtr7 am terminalen Darm in Anwesenheit von NLA

Ebenso wie bei der Grafik kann über die Originalaufzeichnung bestätigt werden, dass nach Zugabe der Testsubstanz eine Relaxation der Muskulatur vom terminalen Darm trotz Antagonistenanwesenheit stattfindet.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung des neu synthetisierten Triazol-Derivats MGtr7 an fünf unterschiedlichen Meerschweinchenorganen untersucht. Die Präparate des rechten Vorhofs und der Papillarmuskeln dienten zur Messung der Änderung der Chronotropie bzw. der Inotropie der Herzmuskulatur. Mithilfe der glattmuskulären Gefäße der Aorta und der Pulmonalarterie wurde der vasodilatierende Effekt der Substanz getestet. Eine spasmolytische Aktivität auf die Gastrointestinaltrakt wurde über Versuche an den terminalen Dünndarm untersucht.

Da die Testsubstanz die stärkste Wirkung auf die Präparate des Dünndarms ausgeübt hatte, wurde an diesen Präparaten zusätzlich der Wirkmechanismus von MGtr7 näher überprüft.

Der Verlauf der Versuche wurde bereits in Kapitel 3 und 4 genauer beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse werden nun zusammengefasst und analysiert.

5.1 Wirkung von MGtr7 auf die quergestreiften Herzpräparate

Wie schon erwähnt, wurden mithilfe der Papillarmuskeln die Kontraktionskraft und mithilfe des Vorhofs die Schlagfrequenz untersucht. Im ersten Fall war die Wirkung der Testsubstanz nicht sehr signifikant. Im zweiten Fall wurde der Stillstand des Herzens eingeführt, aber das erst in der höchsten Substanzkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$.

Isoliertes Organpräparat	f (f _c) $\pm$ SEM (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Atrium cordis dextrum	-100,00 $\pm$ 0,00	48
Musculus papillaris	-13,80 $\pm$ 4,64	> 100

Tabelle 12: Wirkung von MGtr7 auf die quergestreiften Herzpräparate

Die Tabelle 12 enthält die Abnahme der Chronotropie bzw. der Inotropie unter Einfluss der Substanz in Prozent inklusive Standardfehler. Als 100%iger Bezugspunkt wurde die Kontrollphase von jedem Versuch vor Zugabe des Triazols definiert. Ein EC₅₀-Wert könnte nur bei den Versuchen am Vorhof ermittelt werden. Da die Wirkung der Substanz am Papillarmuskel nicht sehr signifikant war, könnte hier die halbmaximale effektive Konzentration nicht berechnet werden. In Abhängigkeit von dieser Konzentration könnte die Wirksamkeit des Triazol-Derivats an den isolierten Organen bewertet werden.

5.2 Wirkung von MGtr7 auf die glattnuskulären Präparate

Um die Wirkung des Triazols auf die Gefäße und den GI-Trakt messen zu können, wurden die Präparate vor Versuchsbeginn mit KCl-Lösung maximal vorkontrahiert. Dann könnte durch kumulative Wirkstoffzugabe an der Aorta und an der Pulmonalarterie die vasodilatierende Aktivität der Substanz und am Dünndarm deren spasmolytische Wirkung gemessen werden. An den glattnuskulären Organen hat das Triazol-Derivat im Allgemeinen eine stärkere Wirksamkeit in Vergleich zu den Herzpräparaten aufgewiesen. Dabei war dessen Effekt an der Arteria pulmonalis weniger ausgeprägt, an der Aorta descendens etwas signifikanter und am Ileum terminale wurde die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet.

Isoliertes Organpräparat	f _c ± SEM (%) bei 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Arteria pulmonalis	-37,13 ± 8,83	> 100
Aorta descendens	-47,71 ± 0,78	> 100
Ileum terminale	-88,35 ± 6,17	31

Tabelle 13: Wirkung von MGtr7 auf die glattnuskulären Präparate

In der Tabelle 13 ist die Abnahme der Kontraktionskraft des jeweiligen Organpräparats unter Einfluss von MGtr7 in Prozent dargestellt. Der EC_{50} -Wert gibt die Wirksamkeit der Substanz auf die unterschiedlichen Organe an.

Am Präparat der Pulmonalarterie wurde deren Kontraktionskraft mit steigender Substanzkonzentration gesenkt. Trotzdem handelte es sich bei der Maximalkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ um eine $37,13 \pm 8,83$ %ige Abnahme, wodurch die EC_{50} nicht ermittelt werden konnte.

Obwohl die Substanz bei der absteigenden Aorta eine stärkere Wirkung ausgeübt hatte, war wie bei der Pulmonalarterie die Ermittlung von EC_{50} auch nicht möglich, da die Senkung der Kontraktionskraft um $47,71 \pm 0,78$ % knapp unter 50 Prozent war.

Am terminalen Dünndarm war die Änderung der Kontraktionskraft von der größten Bedeutung. Schon bei einer Substanzkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine Abnahme von $49,19 \pm 7,72$ % observiert. Bei der Endkonzentration war diese Abnahme sogar von $88,35 \pm 6,17$ %. Aus diesem Grund könnte mit 31 $\mu\text{mol/l}$ die halbmaximale effektive Konzentration festgestellt werden.

5.3 Wirkmechanismus von MGtr7 auf den Dünndarm

Da das Ileum terminale die stärkste Affinität zum Triazol-Derivat aufgewiesen hatte, wurde das Organ näher untersucht, um eine mögliche Aussage über den Wirkmechanismus von MGtr7 zu treffen.

Der Dünndarm wurde vor Zugabe der Substanz mit Nitro-L-Arginin (ein bekannter Antagonist der NO-Synthase) gehemmt. Dann wurde die Substanzlösung in einer Konzentration von 40 $\mu\text{mol/l}$ hinzugefügt. Dabei wurde beobachtet, dass die Kontraktionskraft des Organs von $9,16 \pm 1,08$ % auf $5,86 \pm 1,15$ % reduziert wurde. Diese Änderung zeigte, dass die spasmolytische Wirkung von MGtr7 nicht auf die Stimulierung der eNOS basiert, da diese bereits von einem Enzyminhibitor blockiert war. Das heißt, dass Nitro-L-Arginin den relaxierenden Effekt des Triazols nicht antagonisieren kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die pharmakologische Wirksamkeit des neu synthetisierten Triazol-Derivats MGtr7 an verschiedenen Meerschweinchenorganen untersucht.

An den isolierten Präparaten des rechten Vorhofs und der Papillarmuskeln wurde die Änderung der Chronotropie bzw. der Inotropie unter Einfluss der Testsubstanz getestet. Die glattemuskulären Präparate der absteigenden Aorta und der Pulmonalarterie dienten zur Messung des relaxierenden Effektes der Substanz. Deren spasmolytische Eigenschaften auf den GI-Trakt wurden mithilfe von Darmpräparaten erforscht.

Auf die Papillarmuskeln hat die Substanz eine mäßige Abnahme der Kontraktionskraft ausgeübt. Bei der gleichen Substanzkonzentration wurde aber der rechte Vorhof sehr stark beeinflusst, indem seine Schlagfähigkeit aufgehoben wurde. Auf die glattemuskulären Organe hat das Triazol eine signifikante relaxierende Wirkung aufgewiesen. Trotzdem war diese Wirkung nur am terminalen Dünndarm am bedeutendsten, wobei eine EC_{50} von 31 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt wurde. Bei den Präparaten der Aorta und der Pulmonalarterie war die Abnahme der Kontraktionskraft nicht so stark ausgeprägt und deswegen könnte der EC_{50} -Wert nicht ermittelt werden.

Die Experimente haben gezeigt, dass die Testsubstanz keine gewebsspezifischen Eigenschaften besitzt, da trotz der außergewöhnlichen spasmolytischen Aktivität am terminalen Dünndarm wurden auch die Eigenschaften der restlichen isolierten Präparate beeinflusst.

Außerdem wurde mithilfe eines bekannten NOS-Inhibitors bewiesen, dass der spasmolytische Effekt von MGtr7 nicht auf die Stimulierung der endothelialen NO-Synthese basiert. Aus diesem Grund müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um eine genauere Aussage über den Wirkmechanismus der Substanz treffen zu können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ananthan S (2006) Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. *AAPS J* 8: E118–E125

Austin GL, Dalton CB, Hu Y, et al. (2009) A very low-carbohydrate diet improves symptoms and quality of life in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7: 706–708

Bardhan, Bodemar, Geldof, et al. (2000) A double-blind, randomized, placebo-controlled dose-ranging study to evaluate the efficacy of alosetron in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 23–34

Böhn L, Störsrud S, Törnblom H, Bengtsson U, Simrén M (2013) Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am J Gastroenterol* 108: 634–641

Brandt LJ, Chey WD, et al. (2009) American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome. An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 104: 1–35

Brown IP, Thompson CI, Belloni FL (1992) Mechanisms of coronary vasodilatation produced by ATP in guinea-pig isolated perfused heart. *Br J Pharmacol* 105: 211–215

Cash BD (2015) IBgard®, a novel small intestine targeted delivery system of peppermint oil, results in significant improvement in severe and unbearable IBS symptom intensity. Results from a US based, 4-week, randomized, placebo-controlled, multi-center IBSREST™ trial. DDW, Abstract Su1373

Chadwick VS, Gaginella TS, Carlson GL, et al. (1979) Effect of molecular-structure on bile acid-induced alterations in absorptive function, permeability, and morphology in the perfused rabbit colon. *J Lab Clin Med* 94: 661–674

Crowell MD, Harris L, Jones MP, et al. (2005) New insights into the pathophysiology of irritable bowel syndrome: implications for future treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 7: 272–279

Gorard DA, Libb GW, Farthing M (1994) Influence of antidepressants on whole Gut and orocecal transit times in health and irritable-bowel-syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 8: 159–166

Guilera M, Balboa A, Mearin F (2005) Bowel habit subtypes and temporal patterns in irritable bowel syndrome: systematic review. *Am J Gastroenterol* 100: 1174–1184

Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG (2014) A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146: 67–75

Houghton LA, Foster JM, Whorwell PJ (2000) Alosetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, delays colonic transit in patients with irritable bowel syndrome and healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 775–782

Kaneda T, Sasaki N, Urakawa N, Shimizu K (2016) Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilator Effects of Dimethyl Sulfoxide in Rat Aorta. *Pharmacology* 97: 171–176

Khanna R, MacDonald JK, Levesque BG (2014) Peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 48: 505–512

Lavö B, Stenstam M, Nielsen AL (1987) Loperamide in treatment of irritable bowel syndrome—a double-blind placebo controlled study. *Scand J Gastroenterol Suppl* 130: 77–80

Lembo A, Pimentel M, Rao, et al. (2014) Efficacy and safety of repeat treatment with rifaximin for diarrheapredominant irritable bowel syndrome (IBS-D): results of the TARGET 3 Study. *Am J Gastroenterol* 109 abstract 2014

Manabe N, Wong BS, Camilleri M, et al. (2010) Lower functional gastrointestinal disorders: evidence of abnormal colonic transit in a 287 patient cohort. *Neurogastroenterol Motil* 22: 293–e82

Mayer EA, Berman S, Derbyshire SWG, et al. (2002) The effect of the 5-HT₃ receptor antagonist, alosetron, on brain responses to visceral stimulation in irritable bowel syndrome patients. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1357–1366

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2012) Mutzler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Nee J, Zakari M, Lembo AJ (2015) Novel therapies in IBS-D treatment. *Curr Treat Options Gastro* 13: 432–440

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

Odunsi-Shiyanbade ST, Camilleri M, McKinzie S, et al. (2010) Effects of chenodeoxycholate and a bile acid sequestrant, colestesvelam, on intestinal transit and bowel function. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: 159–165

Orekoya O, McLaughlin J, Leitao E, et al. (2015) Quantifying bile acid malabsorption helps predict response and tailor sequestrant therapy. *Clin Med* 15: 252–257

Patel BA, Dai X, Burda JE, Zhao H, Swain GM, Galligan JJ, Bian X (2010) Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. *Neurogastroenterol Motil* 22: 909–918

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

Roldan-Fidalgo A, Trinidad A, Rodriguez-Valiente A, Garcia-Berrocal JR, Coronado MJ, Ramirez-Camacho R (2014) Effect of intratympanic dimethyl sulphoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271: 3121–3126

Singh P, Staller K, Barshop K, et al. (2015) Patients with irritable bowel syndrome-diarrhea have lower diseasespecific quality of life than irritable bowel syndrome-constipation. *World J Gastroenterol* 21: 8103–8109

Sohn W, Lee OY, Kwon JG, et al. (2012) Tianeptine vs amitriptyline for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhea: a multicenter, open-label, non-inferiority, randomized controlled study. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc* 24: 860–e398

Talley NJ (2006) Genes and environment in irritable bowel syndrome: one step forward. *Gut* 55: 1694–1696

Vahedi H, Merat S, Momtahan S, et al. (2008) Clinical trial: the effect of amitriptyline in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 678–684

Wallis R, Gharanei M, Maddock H (2015) Predictivity of in vitro non-clinical cardiac contractility assays for inotropic effects in humans — A literature search. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 75: 62–69

Watson ME, Lacey L, Kong S, et al. (2001) Alosetron improves quality of life in women with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 96: 455–459

Wedlake L, A'Hern R, Russell D, et al. (2009) Systematic review: the prevalence of idiopathic bile acid malabsorption as diagnosed by SeHCAT scanning in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 30: 707–717