



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Bioaktivität eines neu synthetisierten Kohlensäureamids
(STM2.HCl) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von / submitted by

Christoph Ladenbauer

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 dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich im Verlauf meines Pharmazie Studiums stets begleitet haben.

Besonderer Dank gilt hierbei meiner Familie, die mir nicht nur finanziellen, sondern vor allem auch moralischen Beistand geleistet hat. Dieser familiäre Rückhalt gab mir die Möglichkeit, aber vor allem die Kraft mein Studium erfolgreich abzuschließen.

Es ist mir ein Anliegen meiner Schwester Mag. pharm. Julia Ladenbauer-Wimmer ein großes Dankeschön auszusprechen. Sie stand mir während meiner Studienzeit nicht nur als Mentorin, sondern auch als große emotionale Stütze bereit.

Großer Dank gebührt unter anderem Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik. Nur durch seine rasche und kompetente Beratung und Hilfeleistung war es mir möglich diese Diplomarbeit zu verfassen.

An dieser Stelle möchte ich meine lieben Studienkollegen nicht unerwähnt lassen. Sie standen mir sowohl in fachlichen, als auch in freundschaftlichen Angelegenheiten immer zur Seite.

Wesentlichen Anteil an meinem Studienabschluss haben meine Freunde. Bei ihnen möchte ich mich für die große moralische Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Reizdarmsyndrom.....	3
2.2. Behandlung.....	4
2.3. Spasmolytika.....	5
2.3.1. neurotrope Spasmolytika.....	5
2.3.1.1. Parasympatholytika.....	6
2.3.1.2. Sympathomimetika.....	7
2.3.2. muskulutrope Spasmolytika.....	7
2.3.3. neurotrop muskulutrope Spasmolytika.....	8
3. Methoden.....	9
3.1. Testsubstanz.....	9
3.2. Einwaage und Herstellung der Versuchslösung.....	9
3.3. Herstellung der Nährlösung.....	10
3.4. Kaliumchloridlösung.....	12
3.5. Gasversorgung.....	12
3.6. Nitro-L-Arginin.....	13
3.7. Versuchstiere.....	14
3.8. Versuchszorgane.....	14
3.9. Präparation der Versuchszorgane.....	14
3.9.1. Isolierung und Präparation der Aorta descendens.....	15
3.9.2. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis.....	17
3.9.3. Isolierung und Präparation des terminalen Ileums.....	17
3.9.4. Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum.....	17
3.9.5. Isolierung und Präparation des Musculus papillaris.....	19
3.10. Geräte und Apparaturen.....	19
3.10.1. Apparatur 1.....	20
3.10.2. Apparatur 2.....	22
3.10.3. Kraftwandler, Verstärker und Schreiber.....	23
3.10.4. Wasserbad.....	25
3.10.5. Gaszufuhr.....	26
3.11. Versuchszablauf.....	27
3.11.1. Vorkontraktion mit Kaliumchlorid-Lösung.....	28
3.11.2. Versuchszablauf Aorta descendens.....	29
3.11.3. Versuchszablauf Truncus pulmonalis.....	30
3.11.4. Versuchszablauf Terminales Ileum.....	31
3.11.5. Versuchszablauf Atrium cordis dextrum.....	31
3.11.6. Versuchszablauf Musculus papillaris.....	32
3.11.7. Versuchszablauf Wirkmechanismus.....	34
3.12. Auswertung der Daten.....	35
3.12.1. Manuelle Auswertung.....	36
3.12.1.1. Auswertung Aorta, terminales Ileum und Truncus pulmonalis.....	36
3.12.1.2. Auswertung Atrium cordis dextrum.....	36
3.12.1.3. Auswertung Musculus papillaris.....	37
3.12.1.4. Auswertung Wirkmechanismus.....	38
3.12.2. Statistische Auswertung am Computer.....	38

4. Ergebnisse.....	40
4.1. Ergebnisse Aorta descendens.....	40
4.2. Ergebnisse Truncus pulmonalis.....	43
4.3. Ergebnisse terminales Ileum.....	46
4.4. Ergebnisse Atrium cordis dextrum.....	49
4.5. Ergebnisse Musculus papillaris.....	52
4.6. Ergebnisse Wirkmechanismus.....	55
4.6.1. Ergebnisse Wirkmechanismus 30 µmol/l Nitro-L-Arginin.....	55
4.6.2. Ergebnisse Wirkmechanismus 100 µmol/l Nitro-L-Arginin.....	59
5. Diskussion.....	62
5.1. Wirkung von STM2.HCl auf die glatte Muskulatur.....	62
5.2. Wirkung von STM2.HCL auf die Herzmuskulatur.....	63
5.3. Wirkmechanismus von STM2.HCl.....	65
6. Zusammenfassung.....	66
7. Literaturverzeichnis.....	68

1. Zielsetzung

Diese Diplomarbeit befasst sich mit dem Screening einer neuen chemischen Substanz, welche von der Arbeitsgruppe unter Ao. Univ. Prof. Dr. Professor Thomas Erker am Department für pharmazeutische/medizinische Chemie synthetisiert wurde. Durch dieses Screening soll geklärt werden, ob diese Testsubstanz einen vasodilatierenden und/oder spasmolytischen Effekt auf verschiedene Organe aufweist, als auch der Einfluss der Testsubstanz auf die Inotropie und die Chronotropie.

Hierfür wurden mehrere Versuchsreihen aufgestellt, bei denen der Effekt dieser Substanz an isolierten Organen von Meerschweinchen überprüft wurde. Dies war möglich durch isometrische Messungen von Kontraktionen der Meerschweinchenorgane in Organbädern.

Da im Zuge dieser Diplomarbeit verschiedene Organe verwendet wurden, war es auch möglich eine gewisse Organspezifität der Testsubstanz zu ermitteln. So wurde die Substanz einerseits an Organe der glatten Muskulatur wie der Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader), dem Truncus pulmonalis (Lungenstamm) und dem terminalen Ileum (Endabschnitt des Hüftarms), sowie an Organe der quergestreiften Muskulatur, wie dem Musculus papillaris (Papillarmuskel) und am Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof des Herzens) getestet.

Das primäre Ziel ist jedoch nicht die Entdeckung eines zukünftigen Arzneistoffes, vielmehr soll diese wissenschaftliche Arbeit Orientierung über die spezifische Wirkungsweise und Organselektivität geben, wodurch ermöglicht wird die Substanz mit der Wirkungsweise anderer Substanzen gleicher Grundstruktur zu vergleichen. Somit stellt dieses Screening die Grundlage für die Wirkstoffentwicklung künftiger Arzneistoffe dar.

Im Fokus dieser Arbeit steht das vasodilatatorische Potential der Substanz und somit die Möglichkeit bei der Behandlung der Arteriellen Hypertonie, der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie und bei Koronaren Herzkrankheiten zum Einsatz kommen zu können. Zusätzlich wurde die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz am terminalen Ileum genauer untersucht, wodurch geklärt werden sollte, ob die Substanz bei der Behandlung von Darmerkrankungen wie z.B. dem Reizdarmsyndrom zum Einsatz kommen könnte. Ein möglicher Einfluss auf die Chronotropie

wurde am rechten Vorhof des Herzens getestet. Potentieller Einfluss auf die Inotropie wurde am Papillarmuskel getestet.

Die Ergebnisse wurden anschließend in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve graphisch dargestellt, welche für jedes Organ einen unterschiedlichen Verlauf nahm. Anhand dieser Kurve war es möglich den jeweiligen EC_{50} -Wert zu ermitteln. Der EC_{50} -Wert gibt jene Konzentration an, bei der der halbmaximale Effekt erzielt wird. Potentielle Arzneistoffe sollten bei diesem Screening niedrige EC_{50} -Werte annehmen um bereits bei niedriger Dosierung einen pharmakologischen Effekt aufzuweisen und somit das Nebenwirkungsrisiko zu minimieren.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde der Wirkmechanismus der Testsubstanz am terminalen Ileum untersucht.

2. Einleitung

2.1. Reizdarmsyndrom

„Unter einem Reizdarmsyndrom wird eine Erkrankung verstanden, die charakterisiert ist durch abdominelle Schmerzen und Stuhlnunregelmäßigkeiten. Diese Symptome gehen gelegentlich mit einem Gefühl des Geblähtseins und mit Meteorismus einher. Die Zusammensetzung des Beschwerdebildes aus den einzelnen Symptomen kann variieren. Die Beschwerden werden von den Patienten als mittelschwer bis schwer empfunden. Sie treten chronisch-rezidivierend oder chronisch persistierend auf. Bei den meisten Betroffenen führt das Reizdarmsyndrom zu einer erheblichen und anhaltenden Einschränkung der Lebensqualität.“ (Kruis, 2001)

Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt etwa zwischen 5% und 20% (Agreus et al. 2000).

Die in Folge der Erkrankung eintretende Veränderung der Darmmotilität ist wohl ein Grund für die Verschlechterung der Stuhlgewohnheit (McKee et al. 1993).

Neben Stuhlnunregelmäßigkeiten und abdominellen Schmerzen klagen Patienten häufig über Völlegefühl, Aufstoßen, Refluxösophagitis, Übelkeit und Erbrechen. Als begleitende Symptome treten vor allem Migräne, Schlafstörungen, Konzentrationsschwäche, leichte Reizbarkeit und Ermüdbarkeit auf.

Das Reizdarmsyndrom wird auch irritables Darmsyndrom (IDS), oder irritable bowel syndrom (IBS) genannt, früher war der Begriff Colon irritabile geläufig. In Abhängigkeit der Stuhlgewohnheiten und der Schmerzcharakteristik wird auch der Begriff spastischer Colon verwendet.

Die Ursachen dieses Syndroms sind größtenteils ungeklärt. Veränderungen der Immunreaktion und der Darmmotilität, sowie Glutensensitivität, Stoffwechselstörungen, Antibiotika-Einsatz oder Dünndarmfehlbesiedelung sind nur einige der Faktoren, welche als Auslöser des irritablen Darmsyndroms diskutiert werden.

Frauen sind von der Prävalenz zweimal häufiger betroffen als Männer (Mutschler 2012). Die genauen Gründe hierfür sind noch nicht bekannt. Eine der möglichen Gründe könnte der Zusammenhang mit dem Einfluss der Sexualhormone auf den Gastrointestinaltrakt sein. Das Reizdarmsyndrom betrifft in großer Zahl Menschen im mittleren Lebensalter. Ungefähr 40% der Patienten sind zwischen 35 und 50 Jahren alt. (Kruis, 2001)

Das irritable Darmsyndrom kann aufgrund der unterschiedlichen Symptome in 3 Subtypen eingeteilt werden. Dem Durchfall-dominierten-IDS-Subtyp, dem Obstipations-dominierten-IDS-Subtyp und dem Abdominalschmerz-dominierten-IDS-Subtyp.

2.2 Behandlung

Bei der Behandlung des Reizdarmsyndroms steht vor allem eine Lebensstiländerung im Vordergrund. Diese beinhaltet ausreichende Bewegung, viel Flüssigkeit und ballaststoffreiche Kost. Dazu sollte Hektik, Stress und Ärger gemieden werden.

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).

„Die Behandlung des Abdominalschmerz-dominierten-IBS erfolgt traditionell mit Spasmolytika/Anticholinergika (Butylscopolaminiumbromid, Mebeverin, Dicyclomin), oder tricyclischen Antidepressiva (Amitryptilin, Despramin, Doxepin), die ebenfalls anticholinerge Eigenschaften besitzen. Das Obstipations-dominierte IBS wird mit Ballaststoffen oder osmotischen/salinischen Laxanzien und das Durchfall-dominierte IBS mit Antidiarrhoika (Loperamid) behandelt.“ (Lemmer und Brune 2004)

Unterstützend können pflanzliche Wirkstoffe verabreicht werden.

Zur Behandlung leichter gastrointestinaler Spasmen, Flatulenzen und Dyspepsien werden vor allem Kümmelfrüchte (Carvi fructus) und das daraus gewonnene ätherische Öl, welches als Hauptbestandteil Carvon enthält, verwendet. (Hänsel 2010).

Auch das OTC-Produkt Pfefferminzöl wird wegen seiner spasmolytischen Wirkung immer mehr zur Behandlung von Colon irritabile eingesetzt (Hills et al. 1991).

Die Blätter der Pfefferminze enthalten ätherisches Öl mit der Hauptkomponente Menthol sowie Gerbstoffe, Flavonoide und Triterpene. Der Tee oder das Extrakt werden besonders bei Krämpfen im Magen-Darm-Trakt sowie der Gallenwege verwendet (Wichtl 2008).

Ballaststoffreiche Nahrung hat in Kombination mit Flohsamen eine positive Auswirkung auf das Reizdarmsyndrom. Ausschlaggebend hierfür ist die Eigenschaft von Flohsamen bei Kontakt mit Flüssigkeiten stark zu quellen. Grund dafür sind die Schleimstoffe der Flohsamen. Durch die starke Quellung wird dem Darminhalt eine dickere Konsistenz verliehen. Außerdem verlängern Flohsamen die intestinale Durchgangszeit des Speisebreis, wodurch Nährstoffe besser aufgenommen werden.

2.3 Spasmolytika

Spasmolytika sind Pharmaka, welche den Tonus der glatten Muskulatur herabsetzen und dadurch krampflösend wirken (Psychrembel 2013). Sie werden daher hauptsächlich bei Spasmen der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, der Harn- und Gallenwege, der Gefäße und der Bronchien appliziert. Sie werden nach ihren Angriffspunkten in neurotrope, muskulotrope sowie neurotrop-muskulotrope Spasmolytika eingeteilt (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).

Neurotrope Spasmolytika können wiederum in Parasympatholytika (Anticholinergika) und Sympathomimetika eingeteilt werden.

2.3.1.1 Parasympatholytika

Parasympatholytika antagonisieren die muskarinische Wirkung von Acetylcholin durch kompetitive Verdrängung an den postganglionären parasympathischen Synapsen.

Dadurch lösen Parasympatholytika vielfältige Wirkungen auf verschiedene Organsystem aus, wie beispielsweise auf das Herz, die Lunge, den Magen-Darm-Trakt, die Harnwege und das Zentralnervensystem (Aktories 2009).

Die ersten Verbindungen die als Parasympatholytika registriert wurden sind die Belladonna-Alkaloide Atropin und Scopolamin (Estler 2007).

Atropin

Atropin ist ein 1:1 Racemat aus Hyoscyamin, welches zur Stoffgruppe der Tropan-Alkaloide gehört und hauptsächlich aus *Atropa belladonna* (Tollkirsche), *Datura stramonium* (Stechapfel), *Hyoscyamus niger* (schwarzes Bilsenkraut) oder *Mandragora officinarum* (Alraune) isoliert wird.

Der Tropasäureester wird als Mydriatikum, Spasmolytikum des Magen- und Darmtraktes und der ableitenden Harnwege, in der Narkosevorbereitung zur Verminderung der Speichelsekretion sowie bei Bradykardien angewendet (Oberdisse 2002)

Scopolamin und Butylscopolamin

Scopolamin ist ebenfalls ein Tropan-Alkaloid und kommt in der Natur vor allem in *Brugmansia* (Engelstrompete) vor. Es ist neben Atropin auch Inhaltsstoff von Stechapfel, Bilsenkraut und Alraune. Scopolamin ist der (S)-(-)-Tropasäureester des Scopins und neigt weniger zur Racemisierung als Hyoscyamin. Die Wirkung von Scopolamin ist in der Peripherie etwa 2fach stärker wie jene des Atropins.

Scopolamin blockiert die Muscarinrezeptoren in den Vestibulariskernen und im Brechzentrum. Es ist vor allem zur Prophylaxe von Übelkeit und Erbrechen bei Kinetosen wirksam (Aktories 2009).

Bei dem Arzneistoff Butylscopolamin wurde der Stickstoff des Scopolamins quartärisiert. Diese quartäre Ammoniumverbindung ist nicht mehr ZNS gängig und daher als Spasmolytikum besser geeignet.

Butylscopolamin wird bei Spasmen der glatten Muskulatur, vor allem im Gastrointestinaltrakt und die weiblichen Geschlechtsorgane betreffend, sowie zur Erleichterung endoskopischer Untersuchungen des Magen-Darm-Kanals indiziert (Mutschler 2012).

2.3.1.2 Sympathomimetika

Diese Stoffgruppe wirkt agonistisch auf den Sympathikus.

Als Sympathomimetika ahmen sie die Wirkung der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin nach, Catecholamine die in adrenergen Neuronen aus Tyrosin synthetisiert werden und agieren durch selektive Erregung der $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Rezeptoren (Oberdisse 2002).

Als Spasmolytikum werden nur selektive $\beta 2$ -Adrenozeptor-Agonisten eingesetzt. Einige Vertreter dieser Gruppe sind Salbutamol, Fenoterol, Terbutalin oder Clenbuterol. Diese Substanzen werden vor allem bei der Behandlung von Asthma Bronchiale eingesetzt, finden aber auch Anwendung als Tokolytikum.

2.3.2 Muskulotrope Spasmolytika

Muskulotrope Spasmolytika wirken unabhängig der vegetativen Innervation direkt an der glatten Muskulatur und führen zu deren Relaxierung (Oberdisse 2002). Ihr Wirkmechanismus ist nicht komplett aufgeklärt (Estler 2007).

Zu dieser Gruppe zählen zum Beispiel Papaverin, Flavoxat, Moxaverin und Hymecromon.

2.3.3 Neurotrop muskulotrope Spasmolytica

Diese Spasmolytika weisen sowohl eine anticholinerge, als auch eine myotrope spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur auf. Zu dieser Gruppe der Spasmolytika zählt Mebeverin. Das Hauptindikationsgebiet von Mebeverin ist die Behandlung des Colon irritabile.

Laut klinischen Studien ist es zwar in der Lage eine geringe Schmerzlinderung zu bewirken, aber die Motilitätsstörungen werden nicht gebessert (Aktories 2009).

3. Methoden

3.1 Testsubstanz

Die Testsubstanz wurde von der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert.

Die zu testende Substanz trägt den Namen STM2.HCL.

Der IUPAC Name lautet O-Octyl-N-[3-(dimethylamino)propyl]carbamat Hydrochlorid.

Das Molekulargewicht der Substanz beträgt: 294,9 g/mol

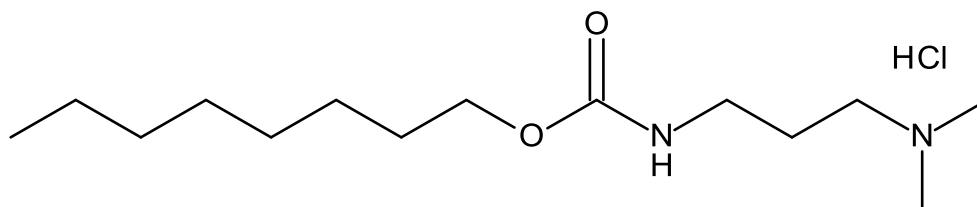


Abbildung 1: Strukturformel STM2.HCl

3.2 Einwaage und Herstellung der Versuchslösung

Für die Versuchsreihen wurde stets eine frisch zubereitete Lösung der Testsubstanz in Aqua bidestillata hergestellt. Ausgehend vom Molekulargewicht wurde die Einwaage berechnet. Diese konnte je nach verwendeten Organbad unterschiedliche Werte annehmen. So standen 2 verschiedene Organbäder mit dem Fassungsvermögen von 8 ml und 25 ml zur Verfügung. Um in diesen Organbädern jeweils eine maximale Wirkstoffkonzentration von 100 μmol zu erreichen wurde die Einwaage an das Organbadvolumen wie folgt angepasst:

Einwaage für 25 ml Organbad	Einwaage für 8 ml Organbad
$\frac{(MG \div 100)}{4}$	$\frac{(MG \div 100)}{12,5}$
$\frac{(294,9 \text{ g mol} \div 100)}{4} = 0,74 \text{ mg}$	$\frac{(294,9 \text{ g mol} \div 100)}{12,5} = 0,24 \text{ mg}$

Tabelle 1: Einwaage von STM2.HCl

Die eingewogene Substanz wurde anschließend in 100 μl Aqua bidestillata gelöst.

3.3 Herstellung der Nährlösung

Bei der Durchführung der Versuche wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung als Nährlösung verwendet. Diese wurde laut Vorschrift nach Reiter (1967) hergestellt.

Diese Nährlösung, auch Tyrode genannt, war eine unverzichtbare Komponente, da sie die isolierten Organe während der Präparation, sowie während den Versuchen und zwischen den Wartezeiten vor dem Austrocknen schützte.

Zusätzlich sorgte die Tyrode für einen physiologischen pH-Wert und physiologischen osmotischen Druck und sicherte außerdem die Versorgung der Organe mit Elektrolyten und Glucose.

Die Nährlösung wurde vor und während der Versuche mit der Gasmischung Oxymix durchströmt, um die Organe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen.

Wichtig war es die Tyrode jeden Tag frisch herzustellen, um eine zu hohe Keimbelastung auszuschließen.

Mit Ausnahme von CaCl_2 wurden alle Bestandteile, welche in Tabelle 2 „Zusammensetzung der Tyrode“ aufgelistet sind, in einem 2 Liter Messkolben gemischt. Danach wurde der Kolben mit Aqua bidestillata auf ca. $\frac{3}{4}$ des Kolbenvolumens aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde für 20 Minuten mit Oxymix begast und danach CaCl_2 zugesetzt. CaCl_2 wurde dem Gemisch als letzter Bestandteil zugefügt, um ein Ausfallen des schwerlöslichen Calciumsalzes und somit

eine Trübung der Tyrode zu verhindern. Dabei war zu beachten, dass die Zugabe langsam und tropfenweise erfolgte. Schließlich wurde der Messkolben mit Aqua bidestillata auf 2 Liter aufgefüllt.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	ml Stocklösung / L Tyrode	Mmol/L
<i>NaCl</i>	58,44	1000,25 g/5L	33,60	114,90
<i>KCl</i>	74,55	50,33 g/5L	35,00	4,73
<i>NaHCO₃</i>	84,01	125,00 g/5L	83,70	24,90
<i>MgSO₄</i>	120,37	147,02 g/5L	1,18	1,18
<i>KH₂PO₄</i>	136,09	62,00 g/250ml	1,18	1,18
<i>CaCl₂</i>	110,98	34 g/250ml	3,20	3,20
<i>Glucose</i>	180,16	Reinsubstanz	1,98	10

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Menge
<i>NaCl</i>	67,2 ml
<i>KCl</i>	70,0 ml
<i>NaHCO₃</i>	167,4 ml
<i>MgSO</i>	2,36 ml
<i>KH₂PO₄</i>	2,36 ml
<i>CaCl₂</i>	6,4 ml
<i>Glucose</i>	3,96 g

Tabelle 3: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

3.4. Kaliumchloridlösung

Kaliumchloridlösung wurde verwendet um eine maximale Kontraktion des terminalen Ileums, sowie der Gefäße der glatten Muskulatur, also der Aorta descendens und der Arteria pulmonalis zu induzieren.

Zuerst wurden die Organe im Organbad für 20 Minuten in der Tyrode akklimatisiert. Danach wurde die Tyrode aus dem Organbad abgelassen und mit Kaliumchloridlösung ausgetauscht. Es folgte eine sofortige Kontraktion der Gefäße, was zu einer Auslenkung am Schreiber führte.

Die Provokation der maximalen Kontraktion der Organe war erforderlich um auf eine potentielle vasodilatierende sowie spasmolytische Wirkung der Substanz zu testen.

Wie in der Tabelle 4 „Konzentration der Kaliumchlorid-Lösung“ ersichtlich, konnte in Abhängigkeit vom verwendeten Organ die KCl-Lösung von unterschiedlicher Konzentration sein. Diese Lösung wurde jeden Tag frisch zubereitet um übermäßigen Keimbefall auszuschließen.

Organ	$\frac{KCl \text{ in g}}{100 \text{ ml Tyrode}}$	Konzentration in mmol/L
Terminales Ileum	0,45	60
Aorta descendens	0,67	90
Arteria pulmonalis	0,67	90

Tabelle 4: Konzentration der Kaliumchlorid-Lösung

3.5 Gasversorgung

Während den Versuchen und bei der Herstellung der Tyrode musste man darauf achten, dass die Nährstofflösung ausreichend mit Gas durchströmt wurde.

Als Gas wurde das Sauerstoffgemisch Oxymix verwendet. Dieses Gasgemisch setzt sich aus 95% O_2 und 5% CO_2 zusammen. Dadurch wurde die notwendige Versorgung der Organe mit Sauerstoff, sowie die Stabilisierung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 gewährleistet.

Außerdem wurde dadurch eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanz im Organbad erreicht.

3.6 Nitro-L-Arginin (MG = 219,20 mg/mol)

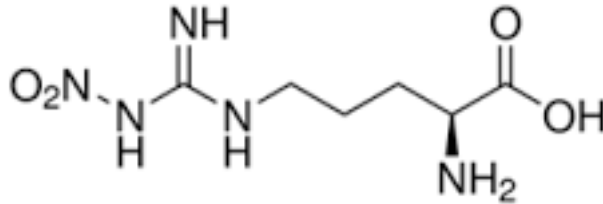


Abbildung 2: Strukturformel Nitro-L-Arginin

Nitro-L-Arginin ist eine Nitro-Verbindung der Aminosäure Arginin. Dieses kam als Hilfssubstanz bei der Aufklärung des Wirkmechanismus der Testsubstanz am terminalen Ileum zum Einsatz.

Diese Hilfssubstanz wurde direkt in die Tyrode in den Organbädern gespritzt, wodurch die eNOS der Dünndarmzellen blockiert wurde. Durch diese Blockade wurde der vasodilatatorische Effekt der endothelialen NO-Synthase inhibiert, wodurch es zur Vasokonstriktion des terminalen Ileums kam. Nach der Blockade der eNOS wurde die Testsubstanz zugegeben. Hatte die Testsubstanz trotz dieser Blockade einen spasmolytischen Effekt, so wurde dieser nicht durch die eNOS vermittelt.

Einwaage für 25 ml Organbad
$\frac{(MG \div 100)}{4}$
$\frac{(219,20 \div 100)}{4} = 0,55 \text{ mg}$

Tabelle 5: Einwaage Nitro-L-Arginin

Die eingewogene Menge an Nitro-L-Arginin wurde schließlich in 100 μ l 60 mmol KCl-Nährstofflösung gelöst.

3.7 Versuchstiere

Die für diese Arbeit verwendeten Organe stammten von Meerschweinchen. Die Tiere stammten aus einem Grazer Reptilien-Zoo und gehörten dem TRIK-Stamm an. Die Abstammung ist insofern von Bedeutung, als dass dadurch keine durch Inzucht hervorgegangenen Tiere als Versuchstiere herangezogen werden. Die Tiere wogen im Mittel 250-600 Gramm und das Geschlecht war nicht von Bedeutung. Meerschweinchen sind aufgrund von 2 Faktoren prädestiniert für diese Versuchsreihen. Ein Grund ist, dass die Rezeptoren und Ionenkanäle dieser Tiere denen des Menschen sehr ähnlich sind. Daher ist es möglich Rückschlüsse auf die Wirkung von Substanzen am Menschen zu ziehen. Ein weiterer Grund ist die begrenzte Größe der Organbäder. Es standen Organbäder mit dem Fassungsvermögen von 8 ml und 25 ml zur Verfügung. Die geringe Größe der Meerschweinchenorgane war daher von Vorteil.

3.8 Versuchsorgane

Die Meerschweinchen wurden vor der Entnahme der Organe durch einen gezielten Genickschlag getötet, wodurch der Tod sehr schnell und schmerzlos herbeigeführt wurde und wodurch die Tiere weder physischem noch psychischem Stress ausgesetzt wurden. Der Thorax der Tiere wurde anschließend mit Hilfe einer Schere geöffnet. Zunächst wurde das Herz entnommen, sowie im Anschluss die Aorta und das terminale Ileum. Die isolierten Organe wurden umgehend in Nährstofflösung eingelegt und mit Oxymix begast, um das Absterben dieser Organe zu verhindern. Im Anschluss wurden die Organe für die Versuche präpariert.

3.9 Präparation der Versuchsorgane

Hier ist hervorzuheben, dass bei den Versuchen Organsysteme verwendet wurden und nicht einzelne Organe. Diese Organsysteme erhält man durch spezielle Präparation der jeweiligen Organe. Die Präparation erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung, wobei die Organe zunächst mit Hilfe von Präparier-Nadeln auf einer Korkscheibe fixiert wurden. Diese

Korkschicht befand sich in einer Petrischale, welche mit Tyrode gefüllt war. Als Präparations-Werkzeug standen Federscheren, Spitzscheren, Pinzetten und Pasteurpipetten zur Verfügung.



Abbildung 3: Lichtmikroskop, Präparations-Werkzeug, Petrischale mit Korkschicht

3.9.1 Isolierung und Präparation der Aorta descendens (Absteigende Hauptschlagader)

Für die Versuchsreihen an der Aorta wurde nicht der Aortenbogen, sondern die thorakale Aorta benutzt. Hierzu wurde bei der Entnahme die Wirbelsäule nach vorne gedrückt um die thorakale Aorta, welche am Rückgrat entlangläuft, erreichen zu können. Daraufhin wurde die Aorta vorsichtig vom Rückgrat abgelöst. Das ca. 3 cm lange Stück wurde umgehend in Nährstofflösung gelegt und begast. Folgend wurde die Aorta unter dem Lichtmikroskop präpariert. Zuerst wurde das ca. 3 cm lange Aorten-Stück an beiden Enden mit 2 Präpariernadeln fixiert. Anschließend wurden die an der Außenwand der Aorta anhaftenden Gewebe- und Muskelreste mit Hilfe einer Federschere entfernt. Bei diesem Vorgang war Vorsicht geboten, um die Aorta nicht zu stark zu

dehnen, oder durch Einschnitte zu verletzen. Die gesäuberte Aorta wurde daraufhin in 2-3 mm große Ringe geschnitten und in der begasten Tyrode aufgehoben.

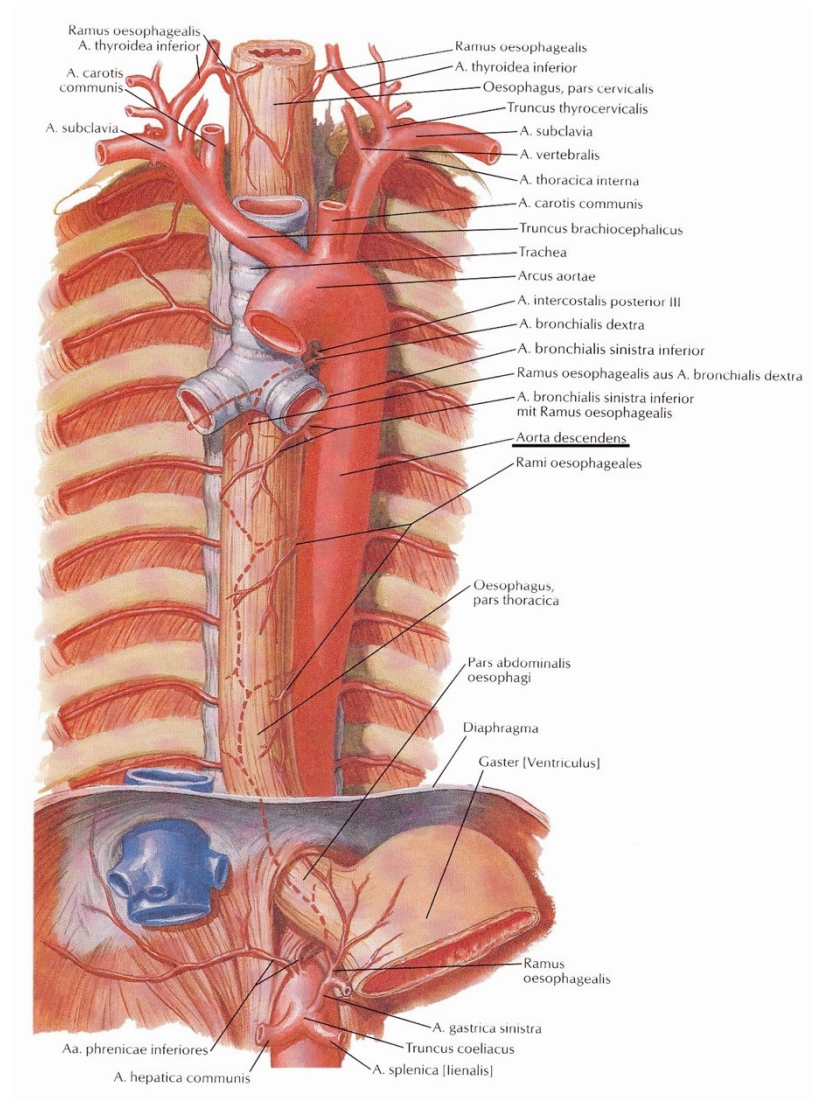


Abbildung 4: Verlauf der Aorta descendens (Netter FH 2003)

3.9.2 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis (Lungenschlagader)

Die Arteria pulmonalis wurde zunächst von Überresten an Lungengewebe, Fett und Perikard befreit. Schließlich wurde die Arteria pulmonalis sehr nahe am Herzen durchtrennt, da nur der gemeinsame Gefäßstamm der beiden Lungenarterien für die Versuche verwendet wurde. Die anschließende Präparation unter dem Lichtmikroskop erfolgte in den gleichen Schritten wie bei der Aorta descendens. Auch die Arteria pulmonalis wurde in ca. 3 mm große Stücke geschnitten und ohne weitere Hilfsmittel in die Versuchsanordnung 1 (siehe Kapitel 3.10.1) eingespannt.

3.9.3 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums

Zuerst wurde ein ca. 20 cm langes Stück des Dünndarms herausgezogen, wobei hierfür das Mesenterium stückweise eingeschnitten wurde. An einem Ende, dem caecalen Ende, wurde der Dünndarm abgeschnitten, am anderen Ende, dem jejunalen Ende, wurde der Darm mit einem Bindfaden abgebunden. Schließlich wurde der Darm in begaste Nährlösung eingelegt.

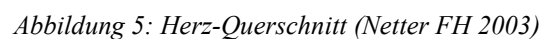
Ca. 1 cm lange Stücke wurden schräg und gegengleich vom Darm abgeschnitten und unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe von 2 Präpariernadeln fixiert.

Um eventuell vorhandene Chymusreste zu beseitigen wurde das Darmstück mittels einer Pasteurpipette durchgespült. Dabei sollte eine zu starke Dehnung des Darmes verhindert werden. Daraufhin wurden an beiden Enden des Darmstückes Silberhäkchen mit Hilfe eines Bindfadens angebracht, damit dieses Organsystem in Apparatur 1 eingespannt werden konnte. Hierbei war zu beachten, dass an beiden Enden des Darmstückes das Lumen ausreichend geöffnet blieb um eine Durchströmung des Darmes mit der Testsubstanz zu gewährleisten.

3.9.4 Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)

Zunächst wurde das ganze Herz aus dem geöffneten Meerschweinchen isoliert und in einer Petrischale mit 2 Präpariernadeln fixiert. Eine Nadel wurde an der Herz-Basis gesetzt, die andere

An der Spitze und am Herzohr des Vorhofes wurden wieder 2 kleine Silberhäkchen mit Hilfe eines Bindfadens angebracht und das Organsystem konnte in Apparatur 1 (siehe Kapitel 3.10.1) eingespannt werden. Die Präparation dieses Organsystems wurde jedoch durch die anhaltende Pump-Bewegung des Herzens zusätzlich erschwert.



3.9.5 Isolierung und Präparation des Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Nach der Trennung des rechten Vorhofes vom rechten Ventrikel wurde das Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten. Der Ventrikel wurde aufgeklappt, wodurch die Papillarmuskeln freigelegt wurden und mit Nadeln fixiert.

In der rechten Herzkammer befinden sich drei, in der linken Herzkammer zwei Papillarmuskeln. Schließlich war es noch erforderlich die Purkinje-Fasern zu entfernen um deren Spontanaktivität vorzubeugen, welche die Versuchsreihe beeinflussen würde. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde ein Silberhäkchen befestigt, daraufhin wurde die Sehne durchtrennt und der Papillarmuskel vorsichtig isoliert. Das Organsystem wurde in Versuchsapparatur 2 (siehe Kapitel 3.10.2) eingespannt.

3.10 Geräte und Apparaturen

Für die Durchführung der Versuche standen 3 verschiedene Apparaturen zur Verfügung. Die Funktion dieser Apparaturen war ident, sie unterschieden sich jedoch im Aufbau und im Fixierungsschema.

Die Apparatur 1 wurde für die Versuche an der Aorta, dem Atrium cordis dextrum, der Arteria pulmonalis, sowie dem terminalen Ileum verwendet.

Apparatur 2 wurde nur für den Musculus papillaris verwendet.

Apparatur 3 war im Aufbau, Funktion und Einsatzgebiet ident zur Apparatur 1, jedoch wurden die Daten nicht analog, sondern digital erhoben.

Das zugrundeliegende Prinzip aller Apparaturen war die Messung der Kontraktionskraft der Versuchsorgane. Hierfür war die spezielle Präparation der Organe notwendig.

Die Messung der Kontraktionskraft erfolgte mit Hilfe eines Kraftwandlers, an dem die Organe fixiert wurden. Die durch Kontraktion oder Relaxation der Organe auftretende mechanische Bewegung konnte durch den Kraftwandler in elektrische Signale umgewandelt werden. Dehnungsmesstreifen im Kraftwandler ermöglichten die Messung der Widerstandsänderung bei konstantem Stromfluss. Ein nachgeschalteter Verstärker amplifizierte diese Widerstandsänderung und diese konnte von einem Schreiber aufgezeichnet werden.

Um das Überleben der Organe in der Apparatur zu sichern war es erforderlich physiologische Bedingungen zu schaffen. Die Apparaturen waren mit einem beheizbaren Wasserbad verbunden, welches die Organbäder auf eine Temperatur von $37,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmte. Die Organbäder waren mit Nährlösung gefüllt und für die Sauerstoffversorgung wurden sie von einem Gasgemisch (Oxymix) durchströmt.

3.10.1 Apparatur 1

Die Apparatur 1 wurde für die Versuche an der Aorta, dem Atrium cordis dextrum, der Arteria pulmonalis, sowie dem terminalen Ileum verwendet.

Diese Apparatur umfasste Glasbehältnisse, auch Organbäder genannt, mit unterschiedlichem Fassungsvermögen. So standen für diese Apparatur Glasbehältnisse mit Volumina von 8 ml und 25 ml zur Verfügung. Dies musste bei der Einwaage der Testsubstanz berücksichtigt werden.

Die Organbäder hatten einen doppelwandigen Aufbau. Dadurch konnten sie von Wasser durchströmt werden, welches die Organbäder auf eine Temperatur von $37,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierte. Für diesen Zweck liegt ein Wasserkreislauf mit einem beheizbaren Wasserbad vor. Um die Gasversorgung zu gewährleisten verfügten die Organbäder über kleine Öffnungen.

An diesen Öffnungen wurde ein Schlauch befestigt durch den die Gaszufuhr mit Hilfe von Stellschrauben geregelt werden konnte.

Am Boden der Behältnisse befindet sich ein Ablauf für die Nährlösung, wodurch ein schneller Wechsel von Tyrode auf KCl-Lösung ermöglicht wurde.

Die Organbäder wurden an einem Metallgestell befestigt.

Apparatur 1 umfasste einen Steg, an dessen unterem Ende ein Drahtstück befestigt wurde und eine Aufhängevorrichtung. Diese Vorrichtung war direkt mit dem Kraftwandler verbunden.

Terminales Ileum und rechter Vorhof wurden so in der Apparatur eingebracht, dass das untere Ende der Organe an dem Drahtstück des Steges unbeweglich fixiert wurde, das obere Ende über kleine Haken mit der Aufhängevorrichtung verbunden wurde.

Aorta und Pulmonalarterie konnten aufgrund ihres ringförmigen Aufbaus direkt und ohne Verwendung von Häkchen zwischen dem Steg und der Aufhängevorrichtung eingebracht werden.

Kontraktionen oder Relaxationen konnten somit direkt auf den Kraftwandler übertragen werden. Der Kraftwandler konnte durch einen Grob- und Feintrieb in der Höhe verstellt werden. Dadurch ließ sich eine Vorspannung an das System anlegen. Diese war für die Reproduzierbarkeit der Versuche von Bedeutung.

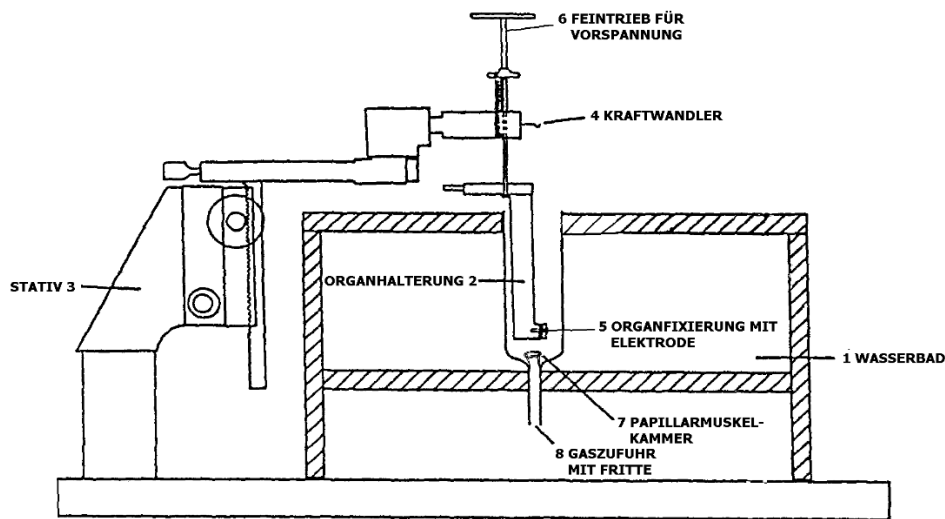


Abbildung 6: Versuchsanordnung 1

3.10.2 Apparatur 2

Apparatur 2 weist die gleichen grundlegenden Elemente und somit ähnliche Funktionsweise wie Apparatur 1 auf. Sie unterscheiden sich nur im Aufbau und im Fixierungsschema.

An dieser Apparatur wurden ausschließlich Versuche an Papillarmuskelpräparate durchgeführt.

Das Organbad war direkt in die Abdeckung des Wasserbades eingelassen und umfasste ein Volumen von 25 ml. Das Wasserbad wurde auf eine konstante Temperatur von 35 Grad Celsius gehalten.

Am Boden des Organbades befand sich eine Öffnung für die Gaszufuhr, durch die das Gas über eine Glasfritte in das Organbad eingeleitet wurde.

Eine Ablassvorrichtung war nicht gegeben, wodurch der Reinigungsvorgang dieser Apparatur erschwert wurde.

Papillarmuskelpräparate wurden nicht wie in Apparatur 1 fixiert, sondern an einem Ende durch Einklemmen zwischen einer Platinelektrode und einer Plexiglasscheibe. Das andere Ende wurde wieder mit Hilfe eines Metall-Häckchens an der Aufhängevorrichtung angebracht. Diese Aufhänge-Vorrichtung war direkt mit dem Kraftwandler verbunden.

Die gesamte Organhalterung war auf einem Stativschlitten befestigt und somit in der Höhe verstellbar.

Bei der Fixierung in der Apparatur durfte der Papillarmuskel nicht zu sehr gequetscht oder gedehnt werden.

Die Platinelektrode war mit einem elektrischen Impulsgeber gekoppelt. Ein elektrischer Reiz konnte somit auf den Papillarmuskel übertragen werden, wodurch dieser kontrahierte. Auch hier war es von großer Bedeutung über den Feintrieb eine Vorspannung anzulegen. Erst dadurch wurde der Papillarmuskel maximal kontrahiert und die Ergebnisse reproduzierbar.

Zwischen Kraftwandler und Schreiber wurde ein Verstärker zwischengekoppelt.

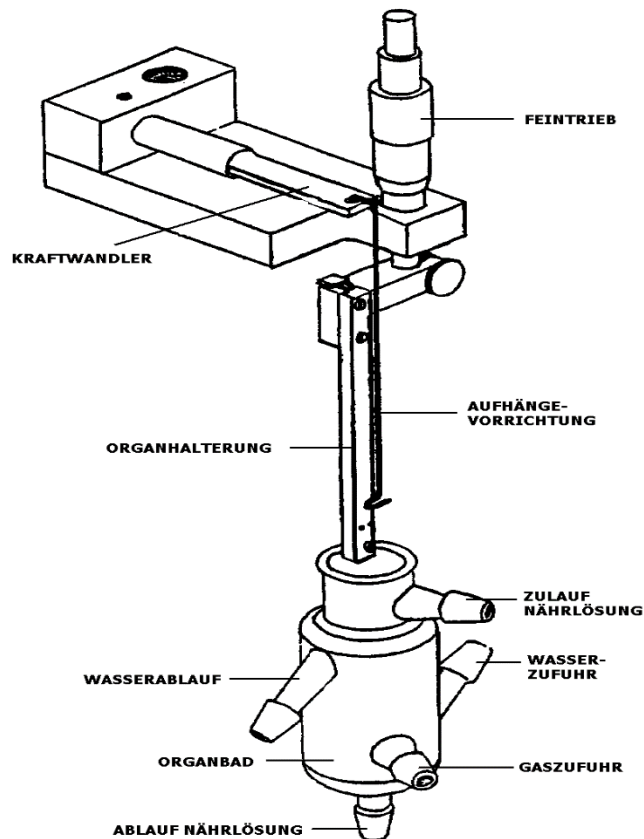


Abbildung 7: Versuchsanordnung 2

3.10.3 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Durch den Kraftwandler konnten die durch Kontraktion oder Dilatation ausgelösten mechanischen Signale in elektrische Signale umgewandelt werden.

Als Kraftwandler wurde ein Widerstandswandler verwendet. Dieser hatte einen Dehnungsmessstreifen eingebaut, welcher bei einer Änderung der mechanischen Reizung den elektrischen Widerstand eines konstanten Stromflusses änderte.

Ein nachgekoppelter Verstärker, auch Amplifier genannt, verstärkte die Signale des Kraftwandlers. Die somit verstärkten Signale wurden zum Schreiber weitergeleitet.

Dieser konnte die Signale auf einem Millimeterpapier festhalten. Der Schreiber konnte auf unterschiedliche Werte der elektrischen Spannung eingestellt werden. So war es möglich den

Schreiber auf 1mV, 2mV, 5mV und 10 mV einzustellen, wobei 1 mV einer Auslenkung des Schreibers von 1cm auf dem Millimeterpapier entspricht. Diese Schreibereinstellungen konnten während den Versuchen am Vorhof geändert werden, da hier nicht die Kontraktionskraft, also die Stärke der Auslenkung des Schreibers, sondern nur die Frequenz der Kontraktionen bedeutend war.

Millivolt (mV)	Auslenkung des Schreibers in Zentimeter (cm)	Kontraktionskraft des Organs in Millinewton (mN)
10	1	1,96
5	1	0,98
2	1	0,39
1	1	0,20

Tabelle 6: Einstellung der Sensibilität des Schreibers

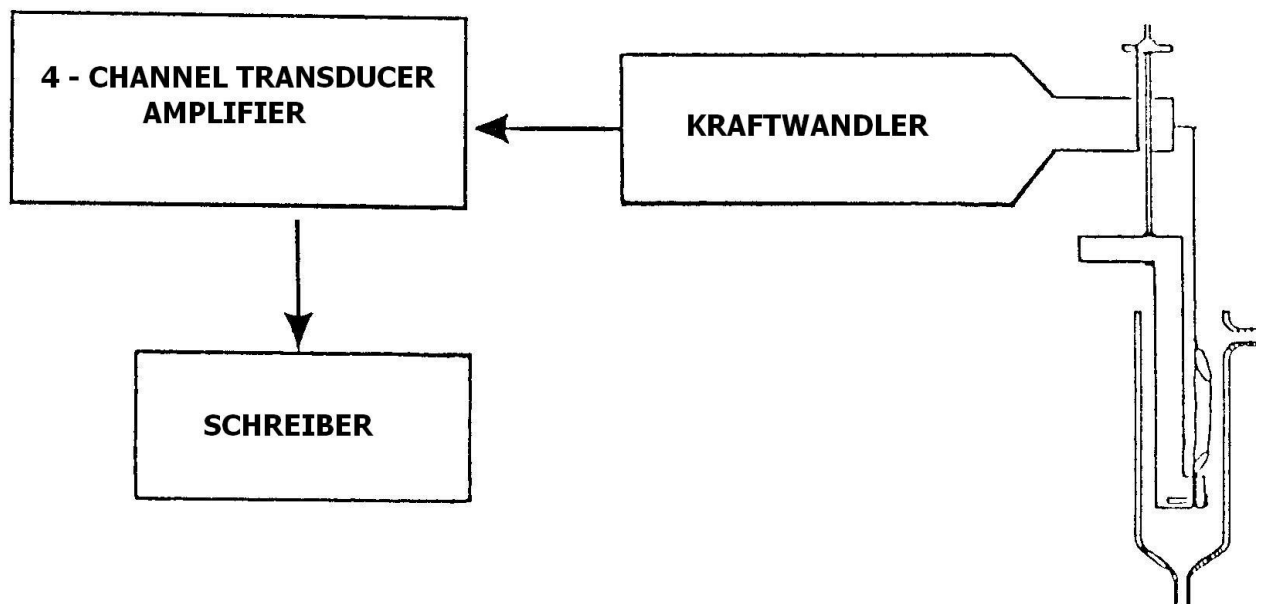


Abbildung 8: Kraftwandler

3.10.4 Wasserbad

Bei der Versuchsdurchführung war die Einhaltung physiologischer Bedingungen essentiell. So war es erforderlich die Organbäder auf physiologische Temperaturen zu erwärmen. Dies wurde mit Hilfe des Wasserbades ermöglicht. Durch Einbau eines Thermostates und einer Heizspirale konnten die Wasserbäder auf konstanter Temperatur gehalten werden. Das vom Wasserbad temperierte Wasser wurde über Plastikschläuche zu den Organbädern geleitet. Die Organbäder für die Versuche am terminalen Ileum, dem Vorhof, der Pulmonalarterie sowie der Aorta wurden auf 37 Grad Celsius temperiert. Versuche am Papillarmuskel wurden bei 35 Grad Celsius durchgeführt.



Abbildung 9: Wasserbad

3.10.5 Gaszufuhr

Das Gas wurde am unteren Ende des Organbades über Plastikschläuche eingeleitet und durchströmte beim Aufsteigen die Tyrode.

An der Verbindungsstelle von Plastikschauch und Organbad befanden sich Glasfritten. Dadurch konnte die Bildung großer Gasbläschen verhindert werden, da dies zu einer ungewollten Auslenkung des Schreibers geführt hätte.

Anhand eines Gashahnes konnte man die Gasversorgung grob regulieren. Durch Klammern am Plastikschauch wurde die Feinregulierung vorgenommen.

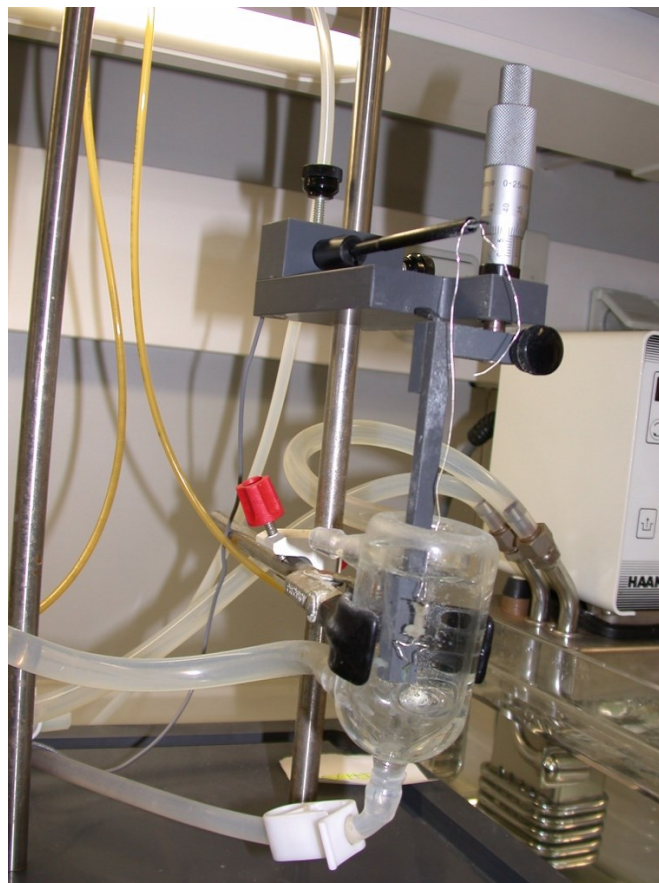


Abbildung 10: Organbad mit Gaszufuhr

3.11 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf war bei den verschiedenen Organsystemen sehr ähnlich.

Bevor die Versuche beginnen konnten, wurde die Testsubstanz STM2.HCl eingewogen und in Aqua bidestillata gelöst. Die Einwaage nahm, wie dem Kapitel „3.2 Einwaage und Herstellung der Versuchslösung“ zu entnehmen ist, je nach Fassungsvermögen des Organbades unterschiedliche Werte an.

Bevor das Organbad mit der Tyrode befüllt wurde, musste es zuerst mit Aqua bidestillata und dann mit Tyrode gespült werden.

Sobald das Organbad temperiert, sowie mit Gas versorgt und mit Tyrode befüllt war, konnte man die Organe einbringen. Bei diesem Schritt musste man sehr sorgfältig vorgehen, um die Muskelfasern der Organe nicht zu beschädigen, da dies keine brauchbaren Ergebnisse mehr zugelassen hätte.

Schließlich wurde die Vorspannung angelegt und danach 20 Minuten gewartet, um dem Organsystem Zeit für die Akklimatisierung zu geben.

Zuerst erfolgte die Messung der Muskelfunktion ohne Zugabe der Testsubstanz. War die Muskelfunktion nach einer Wartezeit von mindestens 45 Minuten konstant, so konnte man die Testsubstanz hinzufügen.

Die Wirkstoffzugabe erfolgte kumulativ. Zuerst wurden 3 µl, danach 7 µl, dann 20 µl und schließlich 70 µl Testsubstanz zugegeben. Zwischen den jeweiligen Konzentrationssteigerungen war eine Wartezeit von 45 Minuten einzuhalten, damit sich ein Fließgleichgewicht (steady-state) einstellen konnte. Somit wurde nach 180 Minuten die maximale Wirkstoffkonzentration von 100 µl erreicht. Dieser Vorgang ist in der Tabelle 7 „Schema der kumulativen Wirkstoffzugabe“ dargestellt.

Zeit in Minuten	Volumen der Testsubstanzlösung in µl	Konzentration im Organbad in µmol/l
45	3	1
90	7	3
135	20	10
180	70	100

Tabelle 7: Schema der kumulativen Wirkstoffzugabe

<u>Organsystem</u>	<u>Gemessener Effekt</u>
Aorta descendens	Vasodilatation
Truncus pulmonalis	Vasodilatation
Terminales Ileum	Vasodilatation
Musculus papillaris	Inotropie
Atrium cordis dextrum	Chronotropie

Tabelle 8: Gemessene Effekte der Organsysteme

3.11.1 Vorkontraktion mit Kaliumchlorid-Lösung

Um eine vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz an den Organen glatter Muskulatur, also Aorta descendens, Truncus pulmonalis und terminales Ileum nachzuweisen, war es zuerst erforderlich diese Organsysteme maximal zu kontrahieren. Hierfür wurde die Nährlösung durch eine Kaliumchlorid-Lösung ausgetauscht.

Die Konzentration der Kaliumchlorid-Lösung betrug für die Aorta descendens und Truncus pulmonalis 90mmol/l und für das terminale Ileum 60mmol/l. Die Lösung wurde erst kurz vor Versuchsbeginn hergestellt. Kaliumchlorid wurde eingewogen und mit 100 ml Nährlösung gelöst.

Organsystem	Konzentration von Kaliumchlorid in mmol/l	Einwaage in mg auf 100ml Nährlösung
Aorta descendens	90	670
Truncus pulmonalis	90	670
Terminales Ileum	60	450

Tabelle 9: Konzentration der Kaliumchlorid-Lösung

3.11.2 Versuchsablauf Aorta descendens

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Apparatur 1. Die Aorta wurde bei der Präparation in 2-3 mm große Ringe geschnitten.



Abbildung 11: Aorta in Ringe geschnitten

Diese Ringstücke konnten direkt, ohne weitere Hilfsmittel, zwischen dem am Metallsteg fixierten Draht und dem am Kraftwandler fixierten Draht eingespannt werden. Es war dabei zu beachten, dass die Aorta-Ringstücke nicht zu sehr gedehnt wurden, um Schädigungen zu vermeiden.

Nach der Fixierung der Aorta an der Organhalterung, wurde diese in das Organbad abgesenkt. Das Organbad wurde zuvor durch gründliches Spülen mit Aqua bidestillata und Tyrode gereinigt, anschließend mit 25 ml Tyrode befüllt, auf $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert und eine Gasversorgung angelegt.

Nach Einbringung der Aorta in das Organbad wurden der Verstärker und der Schreiber zugeschaltet.

Mittels Feintrieb wurde eine Vorspannung angebracht. Diese Vorspannung betrug bei der Aorta 19,6 mN und wurde bei 10mV angelegt. Es folgte eine Ruhezeit von 20 Minuten, in der sich das Organ akklimatisieren konnte.

Der Schreiber wurde auf den Nullpunkt gesetzt und auf 5mV umgestellt. Wurde hierbei der Schreiber vom Nullpunkt abgelenkt, so wurde dieser mittels Feintrieb erneut an den Nullpunkt justiert.

Der Schreiberkopf wurde abgesenkt und die Aufzeichnung startete.

Die Tyrode wurde über die Ablauföffnung des Organbades abgelassen und umgehend mit 90 mmolarer Kaliumchlorid-Lösung ersetzt. Dadurch wurde das Blutgefäß maximal kontrahiert, was zu einer intensiven Auslenkung des Schreibers führte. Es folgte eine Wartezeit von mindestens 45 Minuten, oder es musste so lange zugewartet werden, bis die Kontraktionskraft der Aorta konstant war. Konstante Kontraktionskraft bei maximaler Kontraktion drückte sich durch das Erreichen einer Plateauphase aus.

Wurde diese Phase erreicht und lag sie mindestens 5cm über dem Nullpunkt, konnte man mit der kumulativen Substanzzugabe beginnen. Erreichte das Plateau nicht diese 5cm Grenze, so wurde der Versuch abgebrochen und ein neues Präparat verwendet.

3.11.3 Versuchsablauf Truncus pulmonalis

Die Pulmonalarterie wurde genauso wie die Aorta descendens in Apparatur 1 eingebracht. Auch die Durchführung des Versuches erfolgte in gleicher Weise. Lediglich die angelegte Vorspannung unterschied sich und betrug bei der Lungenarterie 9,81 mN bei 5mV.

3.11.4 Versuchsablauf terminales Ileum

Das terminale Ileum wurde zuvor wie im Kapitel „3.9.3 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums“ präpariert und anschließend mit den beiden Häckchen zwischen Steg und Aufhängevorrichtung der Apparatur 1 fixiert.

Die an das Präparat angelegte Vorspannung betrug 4,9 mN bei einer Stromstärke von 5 mV. Das Anlegen der Vorspannung musste behutsam erfolgen, um das terminale Ileum nicht zu überdehnen, oder zu zerreißen.

Nach dem Anlegen der Vorspannung und dem Justieren des Schreibers auf den Nullpunkt, wurde für 20 Minuten gewartet, um dem Organsystem Zeit für die Akklimatisierung zu geben. Während dieser Zeit konnte aufgrund von Veränderungen der Darm-Kontraktionen der Schreiber vom Nullpunkt abweichen. Daher war es erforderlich den Schreiber mittels Feintrieb erneut auf den Nullpunkt zu setzen. Der Schreibkopf wurde herabgelassen und die Aufzeichnung konnte beginnen.

Als nächster Schritt wurde die Tyrode aus dem Organbad abgelassen und möglichst rasch durch eine 60 mmolare KCl-Lösung ersetzt. Dadurch wurde das terminale Ileum kontrahiert, wodurch ein Anstieg der Kurven-Aufzeichnung resultierte.

Kurz darauf erfolgte eine Dilatation des Organes und die aufgezeichnete Kurve fiel langsam ab. Wurde nach einer Wartezeit von 45 Minuten oder länger eine Plateauphase erreicht, welche sich durch eine konstante Auslenkung des Schreibers auf einer Strecke von 5cm charakterisierte, konnte mit dem Pipettierschema gestartet werden. Wurde solch eine Plateauphase nicht erreicht, musste das Organsystem ausgetauscht werden.

3.11.5 Versuchsablauf Atrium cordis dextrum

Wie im Kapitel „3.9.4 Isolierung und Präparation des Atrium cordis dextrum“ beschrieben, wurden zwei Silberhäckchen an der Spitze und am Herzohr des Vorhofes angebracht. Mit diesen Häckchen wurde das Organsystem wieder zwischen Steg und Aufhängevorrichtung der Apparatur 1 eingespannt und in das zuvor gereinigte, mit Tyrode befüllte und begaste Organbad eingebracht. Bei der Einstellung der Gasversorgung musste darauf geachtet werden, dass einerseits nicht zu

wenig begast wurde, andererseits durch einen zu starken Gaseinstrom der Silberdraht nicht in Bewegung gebracht wurde, wodurch es zu Verfälschungen der Messungen gekommen wäre.

Es war darauf zu achten das Einspannen des Vorhofes in Apparatur 1 rasch durchzuführen, um die Spontanaktivität der Sinuszellen nicht zu sehr zu beeinträchtigen. Eine Überdehnung des Organsystems sollte dabei vermieden werden.

Daraufhin wurden der Schreiber und der Verstärker eingeschalten und auf den Nullpunkt justiert. Mittels Feintrieb wurde dann eine Vorspannung von 10,4 mN bei 5 mV angelegt.

Die Aufzeichnungsgeschwindigkeit des Schreibers war auf 5 mm pro Sekunde einzustellen. Es folgte eine Akklimatisierungszeit von 20 Minuten.

Schließlich konnte mit der Kontrollmessung begonnen werden. Hierbei wurde die Schlagfrequenz alle 5 Minuten für 12 Sekunden gemessen. Da der Schreiber auf eine Geschwindigkeit von 5 mm pro Sekunde eingestellt wurde, entsprach diese Messung einer Länge von 6 cm auf dem Millimeterpapier. Diese Kontrollmessung war für mindestens 45 Minuten durchzuführen bzw. so lange bis die Schlagfrequenz konstant war.

Schließlich konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden.

3.11.6 Versuchsablauf *Musculus papillaris*

Der Papillarmuskel wurde wie im Kapitel „3.9.5 Isolierung und Präparation des *Musculus papillaris*“ vorbereitet.

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Apparatur 2.

Der Papillarmuskel wurde an einem Ende durch Einklemmen zwischen einer Platinelektrode und einer Plexiglasscheibe fixiert. Das andere Ende wurde mit Hilfe eines Metall-Häckchens an der Aufhängevorrichtung angebracht und schließlich in das begaste und mit Tyrode befüllte Organbad eingebracht.

Daraufhin wurden der Schreiber und der Verstärker eingeschalten. Die Aufzeichnungsgeschwindigkeit wurde mit 20 mm pro Sekunde gewählt.

Bei einer elektrischen Spannung von 5 mV wurde eine Vorspannung von 3,92 mN an das Organsystem angelegt.

Da der Papillarmuskel nicht mehr durch Sinuszellen stimuliert wurde, verfügte dieses Organsystem, im Gegensatz zum Vorhof, über keine Spontanaktivität. Wurde doch eine gewisse

Spontanaktivität beobachtet, so wurde diese von Purkinje-Fasern vermittelt. Diese konnten nachträglich entfernt werden, meistens jedoch gaben sie nur für eine kurze Zeitdauer Reize ab, wodurch der Versuch trotz des Vorhandenseins der Purkinje-Fasern nicht beeinträchtigt wurde. Die elektrische Reizung des Muskels erfolgte mit Hilfe eines Reizgerätes, auch Accupulser genannt. Dieser reizte das Organsystem in Form von Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms. Über die Platinelektrode wurde der elektrische Reiz auf den Papillarmuskel übertragen. Die Stromstärke konnte durch eine „Isolation Unit“ verändert werden und somit wurde die erforderliche Reizschwelle des Papillarmuskels ermittelt.

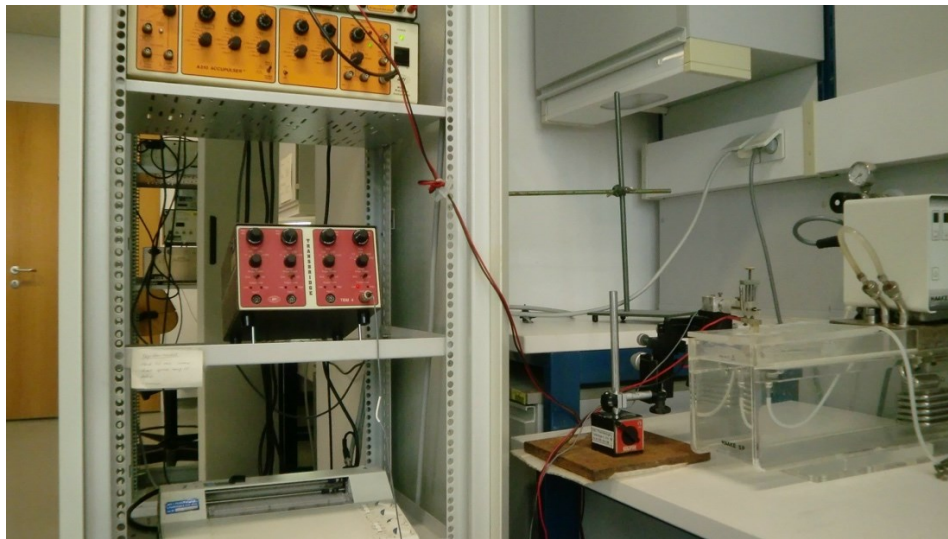


Abbildung 12: Reizgerät, Verstärker, Schreiber

Die Stromstärke welche die Reizschwelle darstellt, also die Mindeststromstärke, wurde um ca. 10% erhöht. Eine größere Stromstärke würde eine schnelle Entleerung des Catecholamin-Depots bewirken und somit einen Aktivitätsverlust zur Folge haben. Zu geringe Stromstärke würde gleichsam zu geringe Kontraktion bedeuten.

Wie auch bei allen anderen Organsystem wurde dem Papillarmuskel eine Akklimatisierungszeit von 20 Minuten gegeben.

Anschließend konnte die Kontrollmessung begonnen werden. Hierfür wurden alle 5 Minuten jeweils 6 Amplituden aufgezeichnet und vermessen.

Bei den Versuchen am Pappilarmuskel war nicht die Schlagfrequenz von Bedeutung, sondern die Kontraktionskraft, welche durch die Größe der Amplituden dargestellt wurde.

Waren nach mindestens 45 Minuten die Amplituden von 3 aufeinander folgenden Messungen ident, so wurde die Kontraktionskraft als konstant angesehen. Schließlich konnte mit dem Pipettierschema der Testsubstanz gestartet werden.

3.11.7 Versuchsablauf Wirkmechanismus

Nach der Durchführung der Versuchsreihen an den verschiedenen Organsystemen konnte durch die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von jedem Organ ein EC₅₀ Wert abgeleitet werden.

EC₅₀ wird als mittlere effektive Konzentration bezeichnet und entspricht jener Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.

Organsystem	EC ₅₀ Wert
Terminales Ileum	15 $\mu\text{mol/l}$
Musculus papillaris	3,45 $\mu\text{mol/l}$
Atrium cordis dextrum	13,8 $\mu\text{mol/l}$
Truncus pulmonalis	> 100
Aorta descendens	> 100

Tabelle 10: EC₅₀ Werte der Organsysteme

Bei der Untersuchung des Wirkmechanismus wurde der Versuchsablauf verändert. Ziel war es einen möglichen Wirkmechanismus der NO-Freisetzung zu eruieren.

Der EC₅₀ Wert der Testsubstanz am terminalen Ileum (15 $\mu\text{mol/l}$) war prädestiniert für die Durchführung der Untersuchung des Wirkmechanismus.

Hierfür wurde ein Darmstück wie im Kapitel „3.9.3 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums“ präpariert und schließlich in Apparatur 1 fixiert.

Eine Vorspannung von 4,94 mN bei 5 mV wurde angelegt.

Dem Organsystem wurde wieder eine Akklimatisierungszeit von 20 Minuten eingeräumt, woraufhin die Tyrode durch eine 60 mmolare KCl-Lösung ersetzt wurde, um das Organ maximal zu kontrahieren. Sobald die Kontraktion konstant war, konnte die Durchführung der Untersuchung des Wirkmechanismus beginnen.

Um den Wirkmechanismus festzustellen war zuerst eine Blockade der eNOS erforderlich. Hierfür wurde Nitro-L-Arginin verwendet, welches direkt in das Organbad pipettiert wurde.

Nitro-L-Arginin ist eine Nitro-Verbindung der Aminosäure Arginin und wirkt antagonistisch auf die eNOS.

Es wurden 2 Versuchsreihen zu 30 $\mu\text{mol/l}$ und zu 100 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt.

Nach der Zugabe von Nitro-L-Arginin in das Organbad wurde für 45 Minuten gewartet. Anschließend wurde die zu testende Substanz STM2.HCL in einer über dem EC_{50} Wert liegenden Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben und für weitere 45 Minuten gemessen.

Aus diesen Versuchsreihen wurde die Erkenntnis gewonnen, ob die eNOS an dem Wirkmechanismus der Testsubstanz beteiligt ist.

3.12 Auswertung der Daten

Die Kontraktionskurven wurden vom Schreiber auf Endlosmillimeterpapier aufgezeichnet.

Die Geschwindigkeit mit welcher das Millimeterpapier abgerollt wurde war je nach Organsystem unterschiedlich.

Da mit fortschreiten des Versuches die Konzentration der Testsubstanz im Organbad gesteigert wurde, konnten Kontraktionsänderungen durch eine zeitabhängige Wirkstoff-Konzentrations Kurve aufgezeichnet werden. Diese Kurven konnten mit Hilfe eines Lineals ausgemessen werden, wobei der Wert vor der ersten Wirkstoffzugabe ausgehend vom Nullpunkt als 100% angenommen wurde. Die anderen Werte wurden jeweils vor der nächsten Konzentrationssteigerung der Testsubstanz, also jeweils nach 45 Minuten, genommen. Nach statistischer Auswertung der Daten

konnten diese mit Hilfe des Programms „Sigma Plot“ in Konzentrations-Wirkungs-Kurven graphisch dargestellt werden.

3.12.1 Manuelle Auswertung

3.12.1.1 Auswertung Aorta, terminales Ileum und Truncus pulmonalis

Nach maximaler Kontraktion dieser Organsysteme durch die KCl-Lösung wurde mit dem Pipettierschema begonnen.

Die Entfernung des Nullpunktes zur Plateauphase, welche die konstante maximale Kontraktion darstellt, wurde als 100% angenommen. Dieser Wert wurde also als Referenzwert gesetzt.

Der Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanz wurde auf dem Millimeterpapier genau gekennzeichnet. Die erste Kennzeichnung stellte das Ende der Kontrollphase dar. Die zweite Markierung lieferte den Kontraktionswert bei einer Konzentration von $3\ \mu M$, die dritte bei einer Konzentration von $10\ \mu M$ und die vierte bei einer Konzentration von $100\ \mu M$. Folgte im Falle der Aorta und der Pulmonalarterie eine gewisse Gefäßrelaxation und im Falle des terminalen Ileums eine gewisse Spasmolyse, resultierte dies in einer Abnahme der Kontraktionskurve. Diese Abnahme der Kurve konnte mit einem Lineal vermessen werden und wurde folglich auf den Referenzwert bezogen.

Da 1 cm auf dem Millimeterpapier gleich 0,98 mN entsprach, mussten die erhaltenen Werte mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert werden.

3.12.1.2 Auswertung Atrium cordis dextrum

Am rechten Vorhof wurde, wie bereits erwähnt, der Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie untersucht. Unter positiv chronotrop versteht man daher die Zunahme, unter negativ chronotrop die Abnahme der Herzfrequenz. Nach konstanter Schlagfrequenz des Vorhofes wurde mit dem bekannten Pipettierschema begonnen. Nach jeder Steigerung der Wirkstoffkonzentration wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten alle 5 Minuten für je 12 Sekunden gemessen.

Daraufhin zählte man die Peaks die vom Schreiber innerhalb von 12 Sekunden aufgezeichnet wurden, wobei jeder Peak einen Herzschlag darstellte. Diese Anzahl wurde mit 5 multipliziert um die Anzahl der Herzschläge pro Minute zu bekommen.

In die statistische Auswertung flossen nur die letzten Messungen nach jeweils 45 Minuten ein. Der Wert am Ende der Kontrollphase stellte den Referenzwert mit 100% dar. Bei einem positiv chronotropen Effekt der Testsubstanz stieg der Prozentsatz auf über 100 %, bei einem negativ chronotropen Effekt lag der Wert unterhalb 100 %.

3.12.1.3 Auswertung *Musculus papillaris*

Wie im Kapitel „3.11.6 Versuchsaufbau *Musculus papillaris*“ beschrieben, wurde bei dieser Versuchsdurchführung die Auswirkung der Testsubstanz auf die Inotropie, also die Kontraktionskraft des Papillarmuskels bestimmt. Positiv inotrop bedeutet eine Steigerung der Kontraktionskraft, negativ inotrop bedeutet eine Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Kontraktionskraft wurde nicht durch die Anzahl, sondern durch die Höhe der Amplituden dargestellt. Diese Höhe der Amplituden wurden mit einem Lineal vermessen, man bekam dadurch einen Wert in Zentimeter. Die Amplitudenhöhe der letzten Aufzeichnung der Kontrollphase stellte wieder den Referenzwert dar.

Für die Statistik wurden die Werte der letzten Messungen bei den Testsubstanzkonzentrationen von 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM auf den Referenzwert bezogen.

Um die Messwerte in mN darzustellen musste die Amplitudenhöhe mit dem Faktor des Kraftwandlers multipliziert werden. Wie in der Tabelle „Multiplikationsfaktor für Papillarmuskel“ ersichtlich, konnte dieser Faktor je nach Spannung verschiedene Werte annehmen.

Spannung in mV	Multiplikationsfaktor
5	0,98
2	0,39
1	0,39

Tabelle 11: Multiplikationsfaktor für Papillarmuskel

3.12.1.4 Auswertung Wirkmechanismus

Ziel dieser Versuchsdurchführung war die Beteiligung der eNOS an der Wirkung der Testsubstanz zu ermitteln.

Das Ende der Kontrollphase stellte wieder den Referenzwert dar.

Der Zeitpunkt der Zugabe von 30 μM oder 100 μM Nitro-L-Arginin wurde genau markiert. Ebenso wurde bei der Zugabe von 20 μM Testsubstanz ein Marker gesetzt.

Die Werte wurden wieder mit einem Lineal vermessen und auf den Referenzwert bezogen. Resultierte daraus eine starke Abnahme der Kontraktionskraft, so konnte man daraus schließen, dass die eNOS kaum Einfluss auf den Wirkmechanismus der Testsubstanz hat. Wurde keine Abnahme der Kontraktionskraft gemessen, so hatte die eNOS großen Einfluss auf den Wirkmechanismus.

3.12.2 Statistische Auswertung am Computer

Die manuell ausgewerteten Daten wurden in eine Excel-Tabelle transferiert. Diese berechnete die Mittelwerte, Standardabweichung und die Standardfehler.

Diese Daten konnten mit dem Programm „Sigma Plot“ graphisch als Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt werden.

So wurde auf der x-Achse die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Aus diesen Kurven konnte für jedes Organ ein spezifischer EC_{50} Wert abgelesen werden.

Um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu bestimmen wurde ein sogenannter Student-t-Test durchgeführt. Durch diesen Test wurden Werte von $P < 0,05$ als signifikant, Werte von $P < 0,01$ als hoch signifikant und Werte von $P < 0,001$ als sehr hoch signifikant eingestuft.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden für jedes Organsystem in einer Tabelle aufgelistet. In dieser Tabelle wird die Anzahl der durchgeführten Versuche (n), sowie für jede Konzentration der arithmetische Mittelwert der Kontraktionskraft (f_c in mN), der relative mittlere Anteil der Kontraktionsänderung (f_c in %) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) aufgelistet.

Die Tabelle des rechten Vorhofes enthält den arithmetischen Mittelwert der Schlagfrequenz (f in Hz) und den relativen Anteil der Frequenzänderung (f in %).

In den folgenden Tabellen steht SEM für den Standardfehler. Ist die Irrtumswahrscheinlichkeit mit n.s. angegeben, so ist diese nicht signifikant.

Zusätzlich wird für jedes Organsystem eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve abgebildet. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in %.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Vorhofes enthält auf der y-Achse die Änderung der Schlagfrequenz.

Die EC_{50} Werte werden durch eine strichlierte Linie dargestellt.

Für jedes Organsystem wird eine Originalaufnahme einer Versuchsdurchführung abgebildet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse Aorta descendens

Die Testsubstanz STM2.HCl wurde in 8 Versuchen an der Aorta descendens getestet. Die Versuche wurden wie im Kapitel „3.11.2 Versuchsablauf Aorta descendens“ durchgeführt.

Der Kontrollwert wurde aus dem arithmetischen Mittelwert der Versuche berechnet und mit $9,68 \pm 1,65$ mN angegeben.

Nach der ersten Wirkstoffzugabe von $3 \mu\text{mol/l}$ zeigte sich eine schwache Wirkung der Testsubstanz auf das Aortenpräparat.

Wie in der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, konnte auch bei einer Steigerung der Konzentration eine geringe Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet werden.

Bei der Höchstkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ wurde eine durchschnittliche Abnahme der Kontraktionskraft von $28,44\% \pm 9,91\%$ festgestellt.

Der vasodilatierende Effekt an der Aorta war zu gering um einen EC_{50} Wert zu ermitteln.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$9,68 \pm 1,65$	$0 \div 0$	8	-
3	$9,40 \pm 1,79$	$-4,27 \pm 4,53$	8	n.s.
10	$9,08 \pm 1,78$	$-6,97 \pm 4,59$	8	n.s.
30	$7,87 \pm 1,85$	$-19,87 \pm 8,08$	8	0,05
100	$7,02 \pm 1,96$	$-28,44 \pm 9,91$	8	0,05

Tabelle 12: Versuchsergebnisse Aorta

Anhand dieser Graphik ist der Effekt der Substanz STM2.HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta ersichtlich. Aus dieser Dosis-Wirkungs-Kurve konnte kein EC_{50} Wert abgeleitet werden.

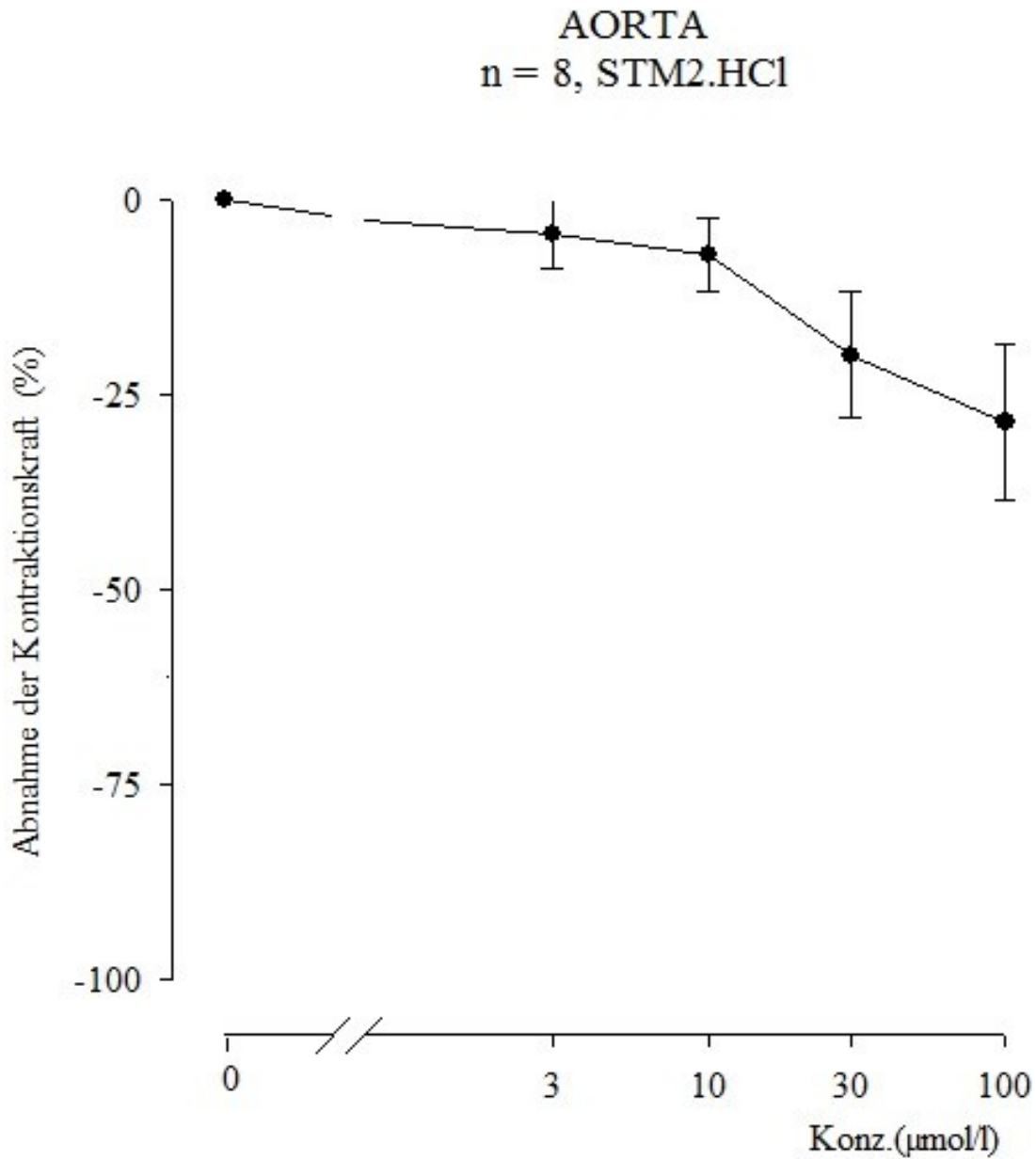


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve Aorta

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in % abzulesen.

Die arithmetischen Mittelwerte werden durch Punkte dargestellt.

Die von den Punkten ausgehenden vertikal verlaufenden Linien geben den Standardfehler wieder.

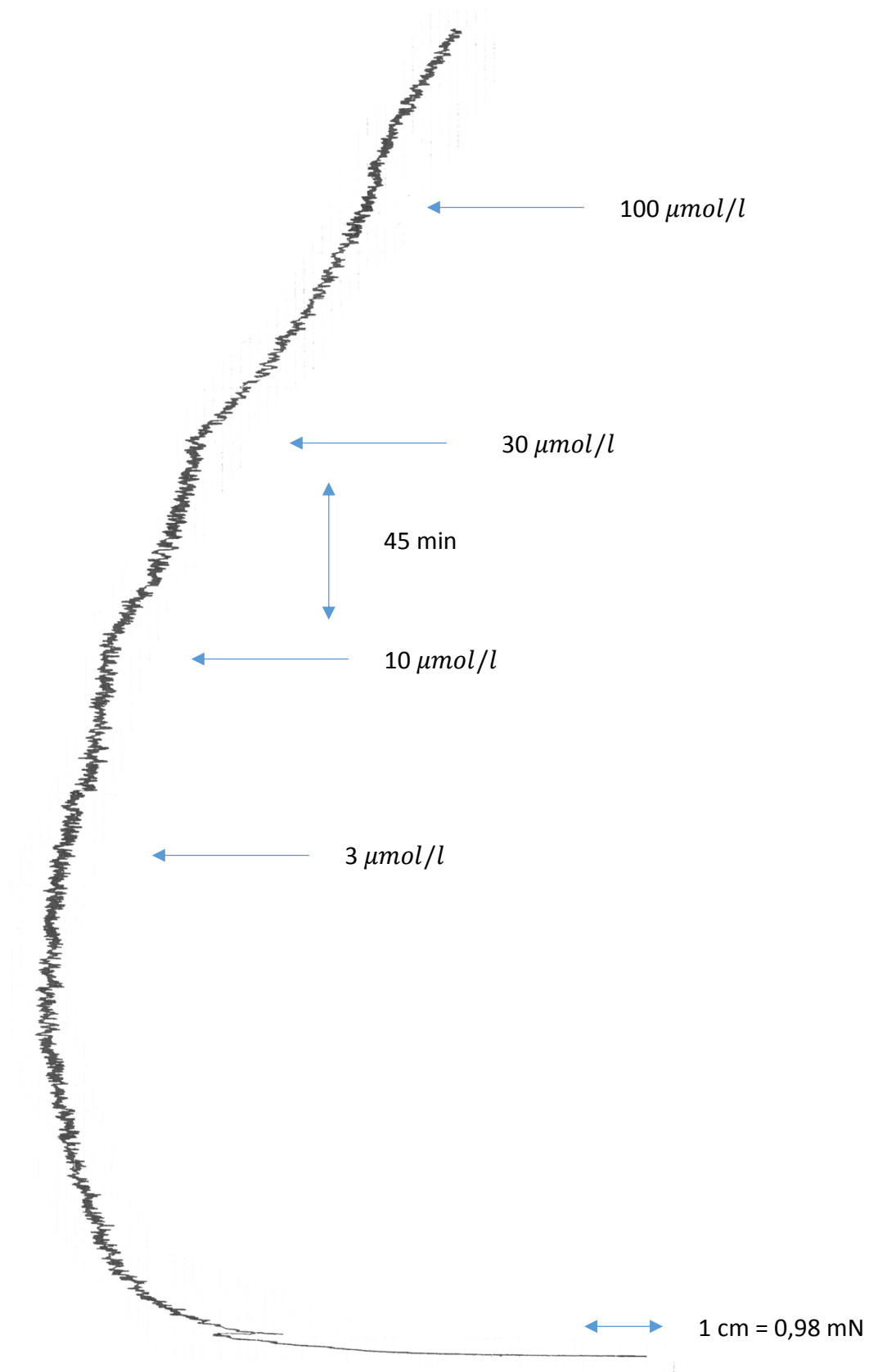


Abbildung 14: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Aorta

4.2 Ergebnisse Truncus pulmonalis

An der Pulmonalarterie wurden insgesamt 5 Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert wurde mit $19,38 \pm 2,89$ mN berechnet.

Die Testsubstanz STM2.HCl zeigt einen deutlichen vasodilatierenden Effekt auf dieses Organsystem.

Bei den Konzentrationen von $3 \mu\text{mol/l}$ und von $10 \mu\text{mol/l}$ wurde eine mäßige Abnahme der Kontraktionskraft gemessen. Die Steigerung der Wirkstoffkonzentration auf $30 \mu\text{mol/l}$ und schließlich auf $100 \mu\text{mol/l}$ resultierte in einem stärkeren Abfallen der Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Höchstkonzentration der Testsubstanz hatte eine Abnahme der Kontraktionskraft um $48,10 \% \pm 8,74 \%$ zur Folge.

Auch bei der Pulmonalarterie konnte kein EC_{50} Wert ermittelt werden.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$19,38 \pm 2,89$	0 ± 0	5	-
3	$19,34 \pm 3,35$	$-1,57 \pm 2,56$	5	n.s.
10	$18,67 \pm 3,46$	$-5,62 \pm 4,02$	5	n.s.
30	$15,70 \pm 2,67$	$-19,58 \pm 3,71$	5	0,05
100	$9,70 \pm 1,79$	$-48,10 \pm 8,74$	5	0,01

Tabelle 13: Versuchsergebnisse Truncus pulmonalis

In dieser Graphik ist der mäßige Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve bei den Konzentrationen von $3\ \mu\text{mol/l}$ und bei $10\ \mu\text{mol/l}$, sowie der steile Abfall der Kurve bei $30\ \mu\text{mol/l}$ und bei $100\ \mu\text{mol/l}$ deutlich ersichtlich. Ein EC_{50} Wert konnte aus dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurve nicht ermittelt werden.

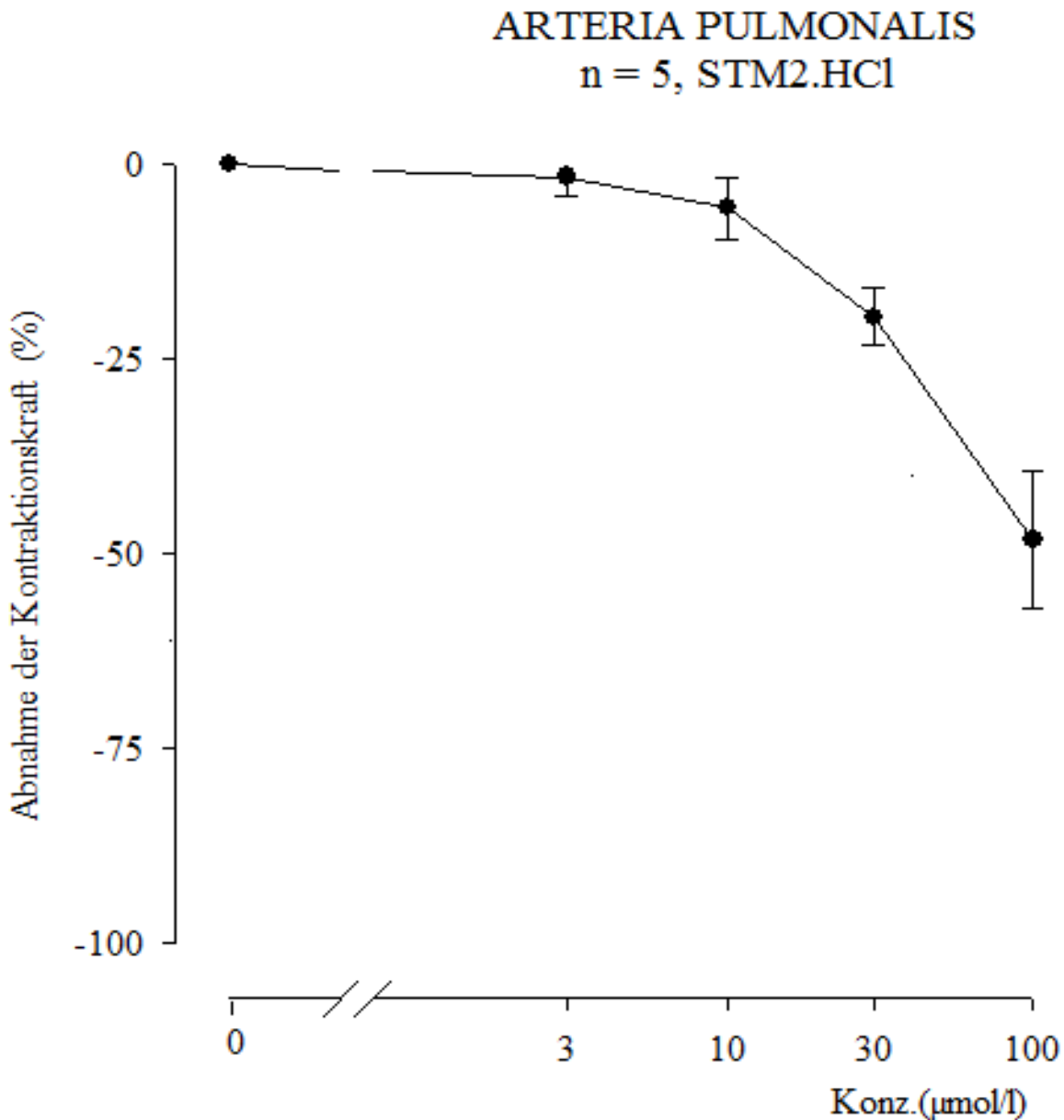


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve Arteria Pulmonalis

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in % abzulesen.

Die arithmetischen Mittelwerte werden durch Punkte dargestellt.

Die von den Punkten ausgehenden vertikal verlaufenden Linien geben den Standardfehler wieder.

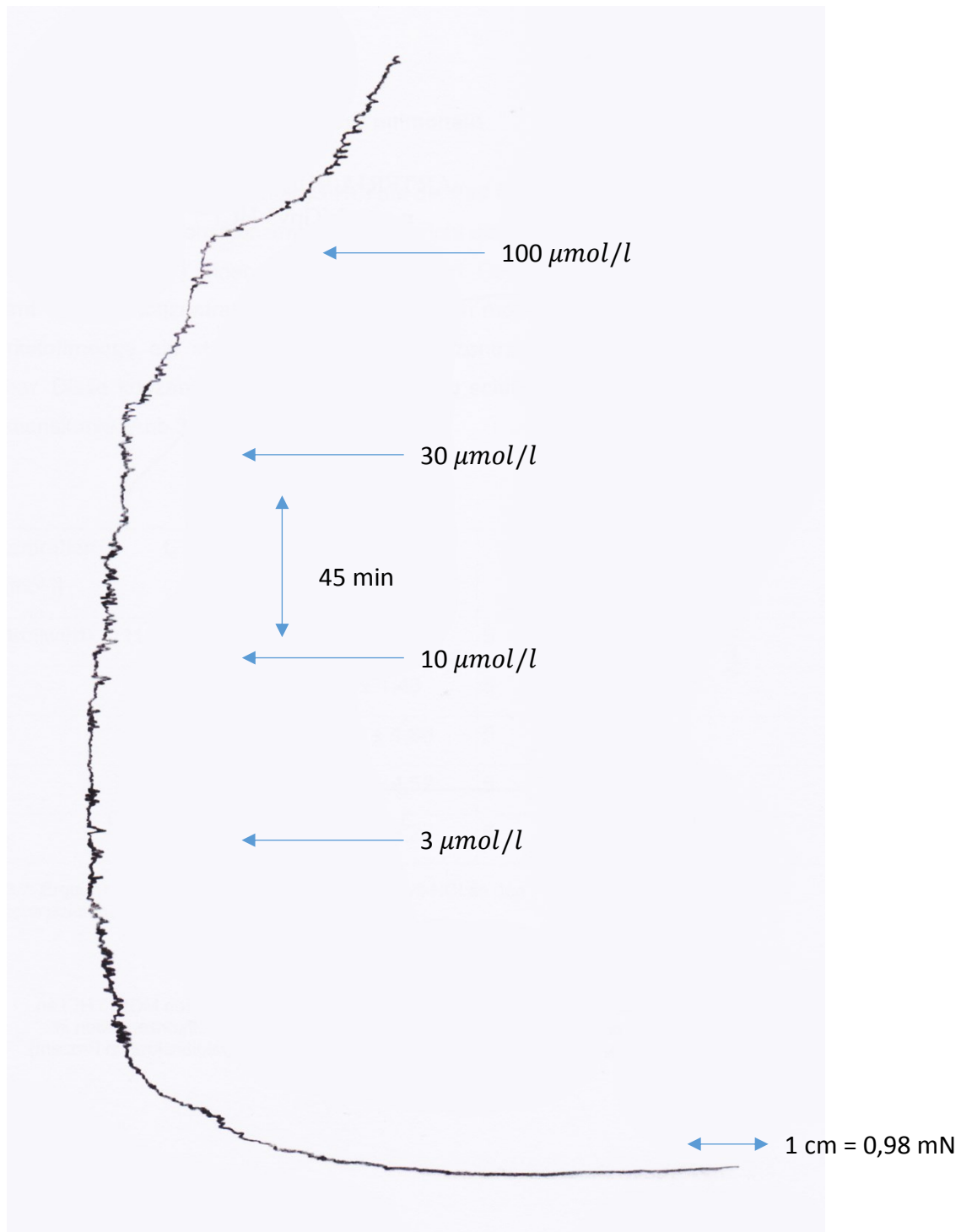


Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve der Arteria Pulmonalis

4.3 Ergebnisse terminales Ileum

Für die Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf das terminale Ileum wurden insgesamt 5 Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert wurde mit $6,88 \pm 0,50$ mN berechnet.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurde bereits bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ ein deutlicher Abfall der Kontraktion festgestellt.

Weitere Konzentrationssteigerungen resultierten in einer noch deutlicheren Abnahme der Kontraktionskraft. Bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ konnte das Organpräparat die Zeitdauer von 45 Minuten nicht mehr überstehen.

Die Testsubstanz STM2.HCl hat eine starke spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum. Aus diesem Grund wurde auch der Wirkmechanismus der Testsubstanz an diesem Organ getestet.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$6,88 \pm 0,50$	0 ± 0	5	-
3	$6,21 \pm 0,68$	$-10,64 \pm 3,78$	5	0,05
10	$4,68 \pm 0,81$	$-33,59 \pm 8,53$	5	0,05
30	$1,80 \pm 0,59$	$-74,79 \pm 8,14$	5	0,01
100	0 ± 0	-100 ± 0	5	0,01

Tabelle 14: Versuchsergebnisse terminales Ileum

Anhand dieser Abbildung ist die stark ausgeprägte Wirkung der Testsubstanz STM2.HCl auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums zu sehen. Je höher die Konzentration des Wirkstoffes, desto steiler fällt die Kontraktionskurve ab. Anhand dieses Graphen konnte man einen EC_{50} Wert von $15 \mu\text{mol/l}$ festlegen.

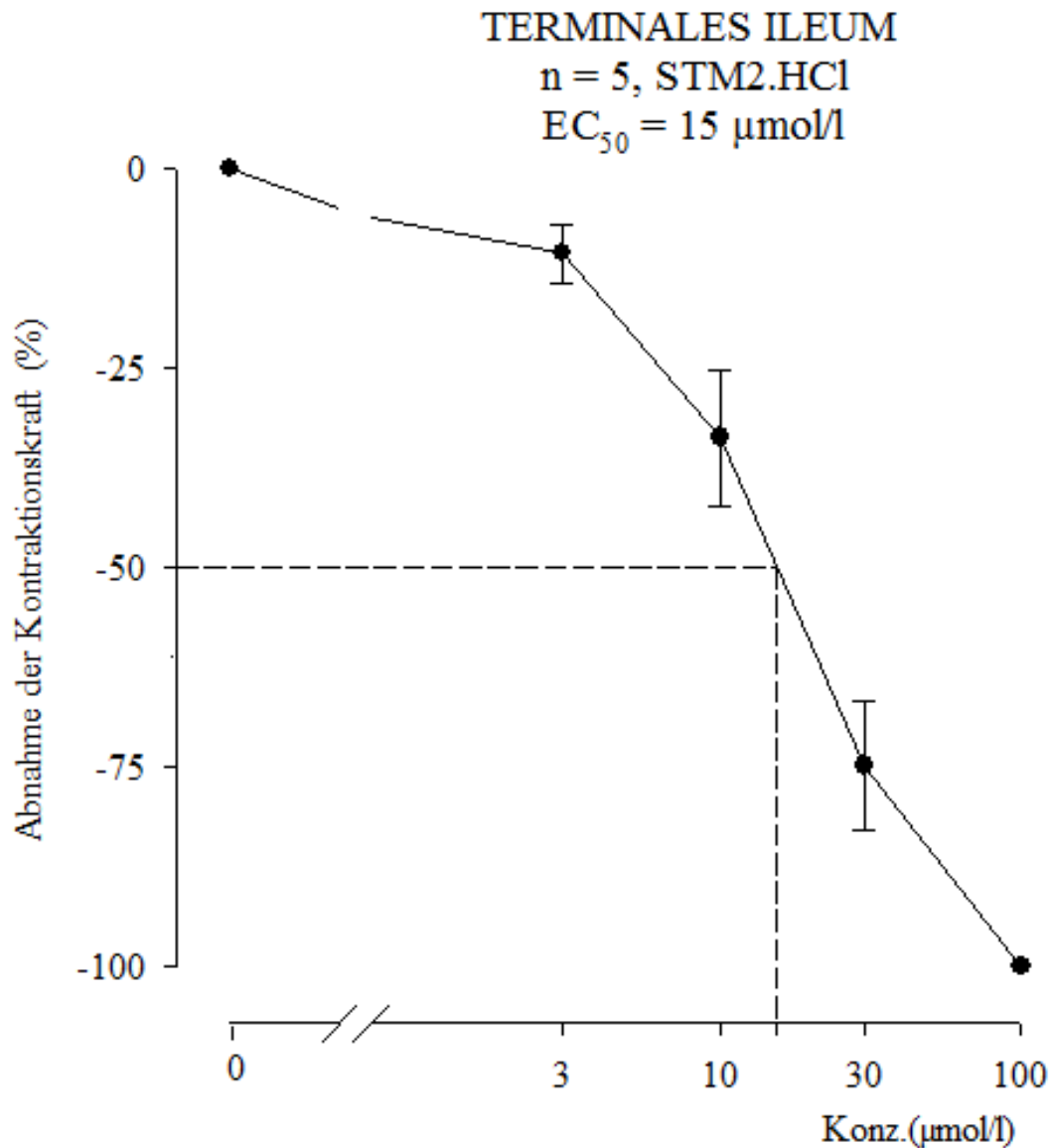


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve terminales Ileum

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in % abzulesen.

Die arithmetischen Mittelwerte werden durch Punkte dargestellt.

Die von den Punkten ausgehenden vertikal verlaufenden Linien geben den Standardfehler wieder.

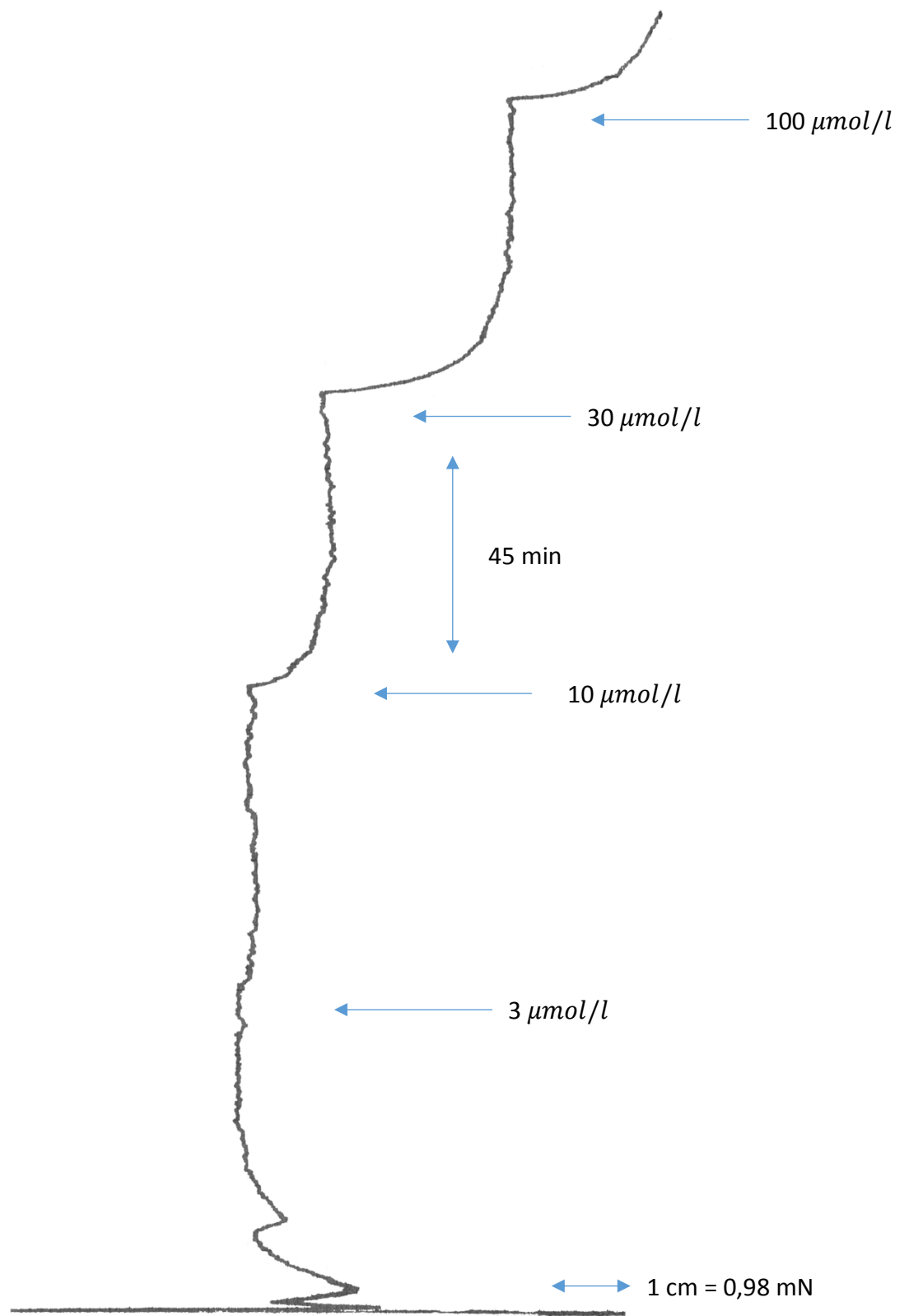


Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve des terminalen Ileums

4.4 Ergebnisse Atrium cordis dextrum

Die Testsubstanz STM2.HCl hat eine stark ausgeprägte negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof. Es wurden insgesamt 5 Versuche an Vorhof-Präparaten durchgeführt. Der Kontrollwert wurde mit einer durchschnittlichen Frequenz von $194,00 \pm 9,14$ Schlägen pro Minute angegeben. Bereits bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ war eine Abnahme der Herzfrequenz auf $177 \pm 5,29$ Schläge pro Minute zu beobachten. Dies entspricht einer relativen Abnahme von $8,03 \pm 4,84 \%$. Durch Steigerung der Konzentration auf $10 \mu\text{mol/l}$ wurde eine Chronotropie von $136,00 \pm 9,14$ Schlägen pro Minute gemessen.

Dies entspricht einer Abnahme der Herzfrequenz von $29,33 \pm 5,89 \%$.

Die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz war so stark ausgeprägt, dass ab einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ kein Vorhof-Präparat eine chronotrope Aktivität zeigte.

Der EC_{50} Wert liegt bei $13,8 \mu\text{mol/l}$.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$194,00 \pm 9,14$	0 ± 0	5	-
3	$177,00 \pm 5,39$	$-8,03 \pm 4,84$	5	0,05
10	$136,00 \pm 9,14$	$-29,33 \pm 5,89$	5	0,05
30	0 ± 0	0 ± 0	5	0,01

Tabelle 15: Versuchsergebnisse Atrium cordis dextrum

Diese Abbildung zeigt die ausgeprägte Wirkung der Testsubstanz STM2.HCl.

Bereits bei der ersten Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Abnahme der Schlagfrequenz um $8,03 \pm 4,84\%$ und somit zu einer Senkung der Wirkungs-Kurve. Eine Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ bewirkte eine Abnahme der Schlagfrequenz um $29,33 \pm 5,89\%$ und somit einen steileren Abfall der Kurve. Ab einer Konzentration von $30\mu\text{mol/l}$ fiel die Wirkungskurve sehr steil ab, was in einer Abnahme der Herzfrequenz um 100% resultierte.

Die gestrichelte Linie zeigt den EC_{50} Wert auf, welcher bei einer Konzentration von $13,8\mu\text{mol/l}$ liegt.

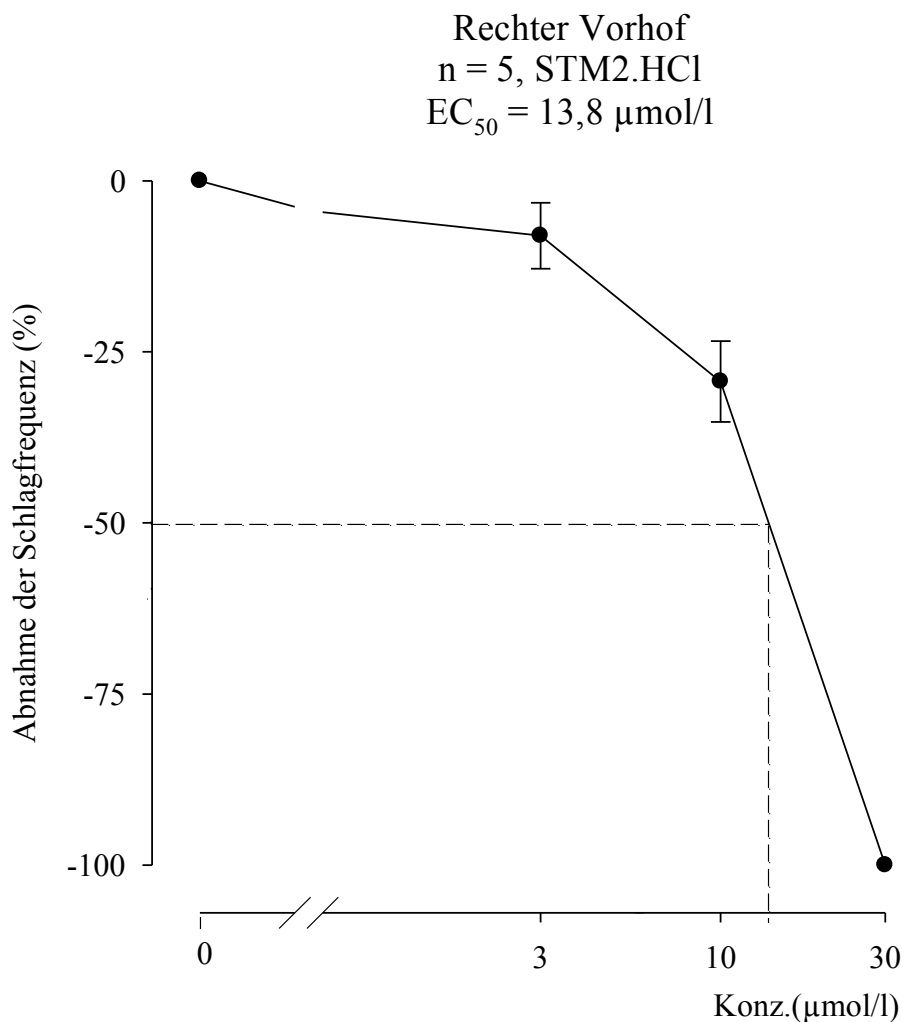


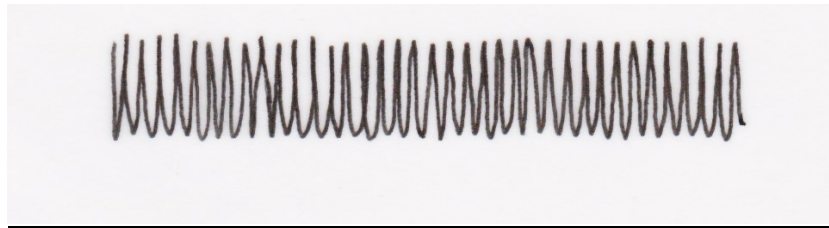
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve Atrium cordis dextrum

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in % abzulesen.

Die arithmetischen Mittelwerte werden durch Punkte dargestellt.

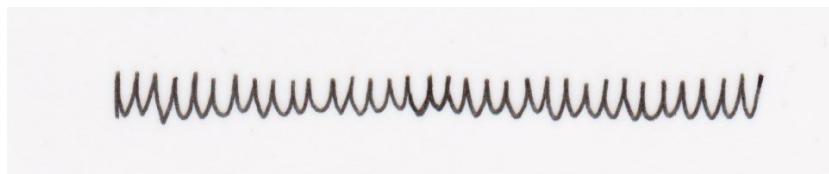
Die von den Punkten ausgehenden vertikal verlaufenden Linien geben den Standardfehler wieder.



← Kontrolle



← 3 $\mu\text{mol/l}$



← 10 $\mu\text{mol/l}$



← 30 $\mu\text{mol/l}$

← 12 sec →

↑ 1 cm = 0,98 mN ↓

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Frequenz des Vorhofes

4.5 Ergebnisse Musculus papillaris

Anhand der Präparate des Musculus papillaris wurde eine negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz gemessen.

Insgesamt sind 5 Versuche durchgeführt worden. Der Kontrollwert wurde mit $1,12 \pm 0,05$ mN berechnet.

Auffallend war, dass bereits eine Konzentration der Testsubstanz von $3 \mu\text{mol/l}$ eine sehr ausgeprägte negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel hatte. Bei dieser Konzentration nahm die Kontraktionskraft um $47,05 \pm 8,93$ % im Vergleich zum Kontrollwert ab.

Eine weitere Konzentrationssteigerung der Testsubstanz STM2.HCl auf $10 \mu\text{mol/l}$ resultierte in einer Abnahme der Inotropie um $72,72 \pm 5,62$ %. Ab einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft von $-88,47 \pm 4,58$ % gemessen. Bei der Konzentration der Testsubstanz von $100 \mu\text{mol/l}$ konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden.

Die hohe Empfindlichkeit des Papillarmuskels auf die Testsubstanz spiegelt der EC_{50} Wert von $3,45 \mu\text{mol/l}$ wieder.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$1,12 \pm 0,05$	0 ± 0	5	-
3	$0,60 \pm 0,12$	$-47,05 \pm 8,93$	5	0,01
10	$0,31 \pm 0,06$	$-72,72 \pm 5,62$	5	0,01
30	$0,13 \pm 0,06$	$-88,47 \pm 4,58$	5	0,01
100	0 ± 0	0 ± 0	5	0,01

Tabelle 16: Versuchsergebnisse Musculus papillaris

Diese Abbildung stellt die ausgeprägte Wirkung der Testsubstanz auf den Papillarmuskel graphisch dar. Der steile Abfall des Graphen bei der Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ entspricht einer relativen Abnahme von $-47,05 \pm 8,93 \%$ und spiegelt die ausgeprägte, negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz wieder. Das Ausmaß der Abnahme der Kontraktionskraft war bei weiteren Konzentrationssteigerungen etwas geringer und wird anhand dieses Graphen durch einen folglich etwas flacheren Kurven-Abfall beschrieben. Der EC_{50} Wert lag bereits bei einer Konzentration von $3,45 \mu\text{mol/l}$.

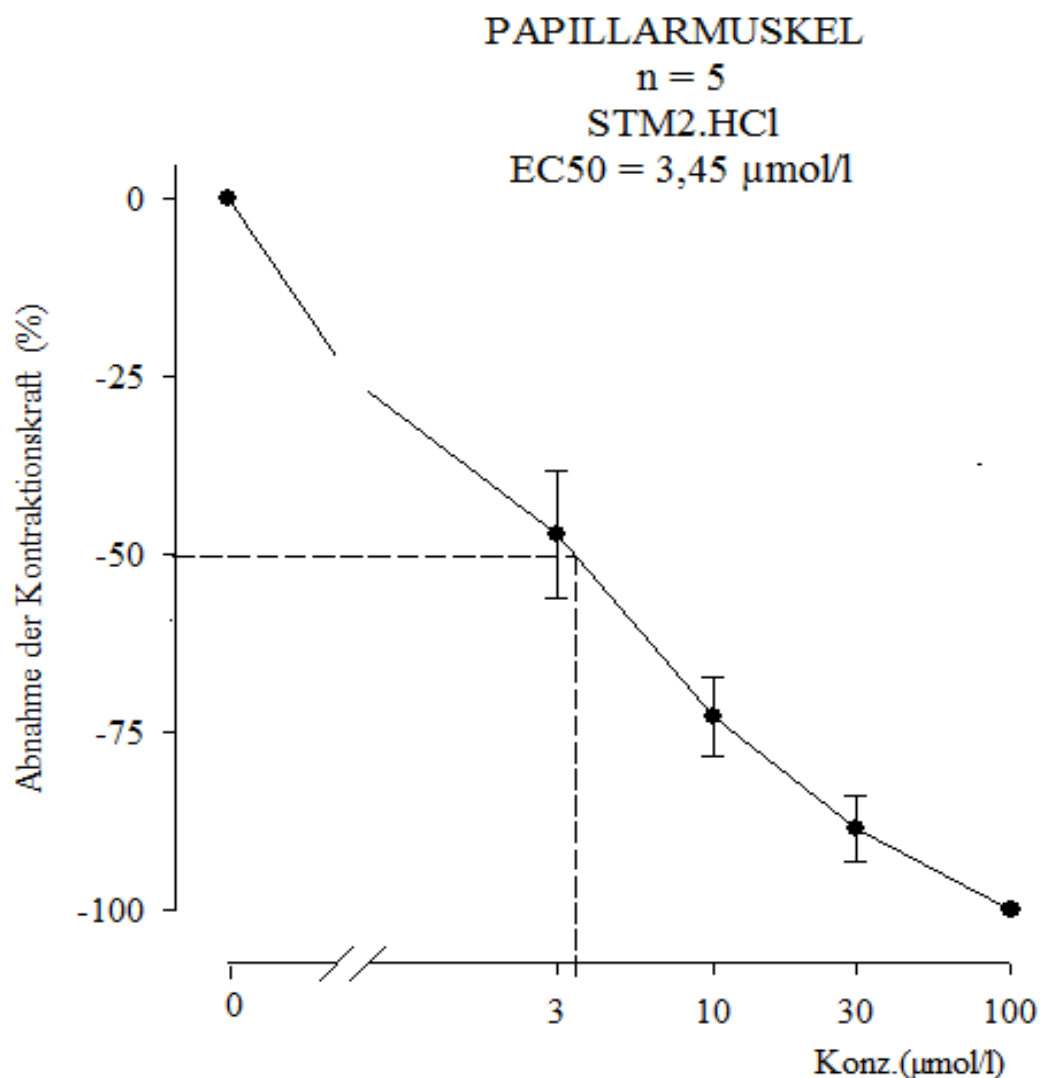


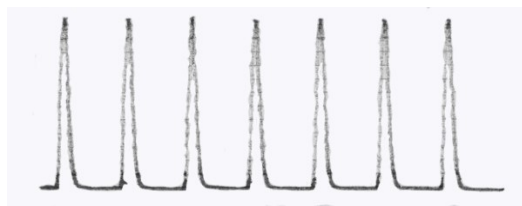
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve Papillarmuskel

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen.

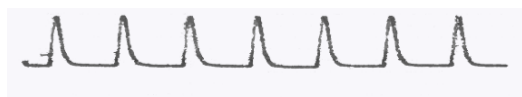
Auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft in % abzulesen.

Die arithmetischen Mittelwerte werden durch Punkte dargestellt.

Die von den Punkten ausgehenden vertikal verlaufenden Linien geben den Standardfehler wieder.



← Kontrolle



← $3 \mu\text{mol/l}$



← $10 \mu\text{mol/l}$



← $30 \mu\text{mol/l}$



← $100 \mu\text{mol/l}$

↑
1 cm = 0,98 mN
↓

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Amplituden des Papillarmuskels

4.6 Ergebnisse Wirkmechanismus

Wie bereits im Kapitel „4.3 Ergebnisse terminales Ileum“ erwähnt hatte die Testsubstanz eine ausgeprägte, spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum, wodurch es möglich wurde einen EC_{50} Wert aus den Ergebnissen abzuleiten. Dieser Wert beträgt $15 \mu\text{mol/l}$.

Die Wirkung von STM2.HCl am terminalen Ileum war prädestiniert für die genauere Untersuchung des Wirkmechanismus der Substanz.

Hierfür wurden nach dem Erreichen einer konstanten Kontraktion des terminalen Ileums Versuchsreihen mit entweder $30 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin oder mit $100 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin durchgeführt.

Nitro-L-Arginin hat einen antagonistischen Effekt auf die eNOS, wodurch die Freisetzung von NO gehemmt wird.

Durch die Blockade der eNOS konnte die Frage geklärt werden, ob die Wirkung der Testsubstanz über die eNOS vermittelt wurde.

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

Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, wurden für diese Versuchsreihe insgesamt 5 Versuche durchgeführt.

Sobald das terminale Ileum eine konstante Kontraktion aufwies, wurden $30 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin direkt in das Organbad zugegeben. Anschließend wurde für 45 Minuten gewartet, um dem Antagonisten ausreichend Wirkungszeit einzuräumen. Daraufhin wurde die Testsubstanz in einer Konzentration von $20 \mu\text{mol/l}$ in das Organbad eingebracht. Es war von Bedeutung, dass die zugegebene Substanzkonzentration etwas über dem EC_{50} Wert lag. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten wurde der Versuch beendet.

Nach Auswertung der Daten wurde ein Kontrollwert von $9,45 \pm 2,11 \text{ mN}$ berechnet.

Die Zugabe von $30 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin resultierte in einer Abnahme der Kontraktionskraft auf $9,11 \pm 2,00 \text{ mN}$. Dies entspricht einer relativen Abnahme von $2,92 \pm 1,81 \%$.

Nach der Zugabe von $20 \mu\text{mol/l}$ STM2.HCl wurde eine Kontraktionskraft von $4,23 \pm 1,23 \text{ mN}$ gemessen. Dieser Wert entspricht einer relativen Abnahme von $58,12 \pm 3,69 \%$.

Aufgrund dieser Daten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die eNOS nicht signifikant am Wirkmechanismus der Testsubstanz STM2.HCl beteiligt sind.

Substanz-Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Kontrolle	$9,45 \pm 2,11$	0 ± 0	5	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	$9,11 \pm 2,00$	$-2,92 \pm 1,81$	5	-
20 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	$4,23 \pm 1,23$	$-58,12 \pm 3,69$	5	0,01

Tabelle 17: Versuchsergebnisse Wirkmechanismus mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

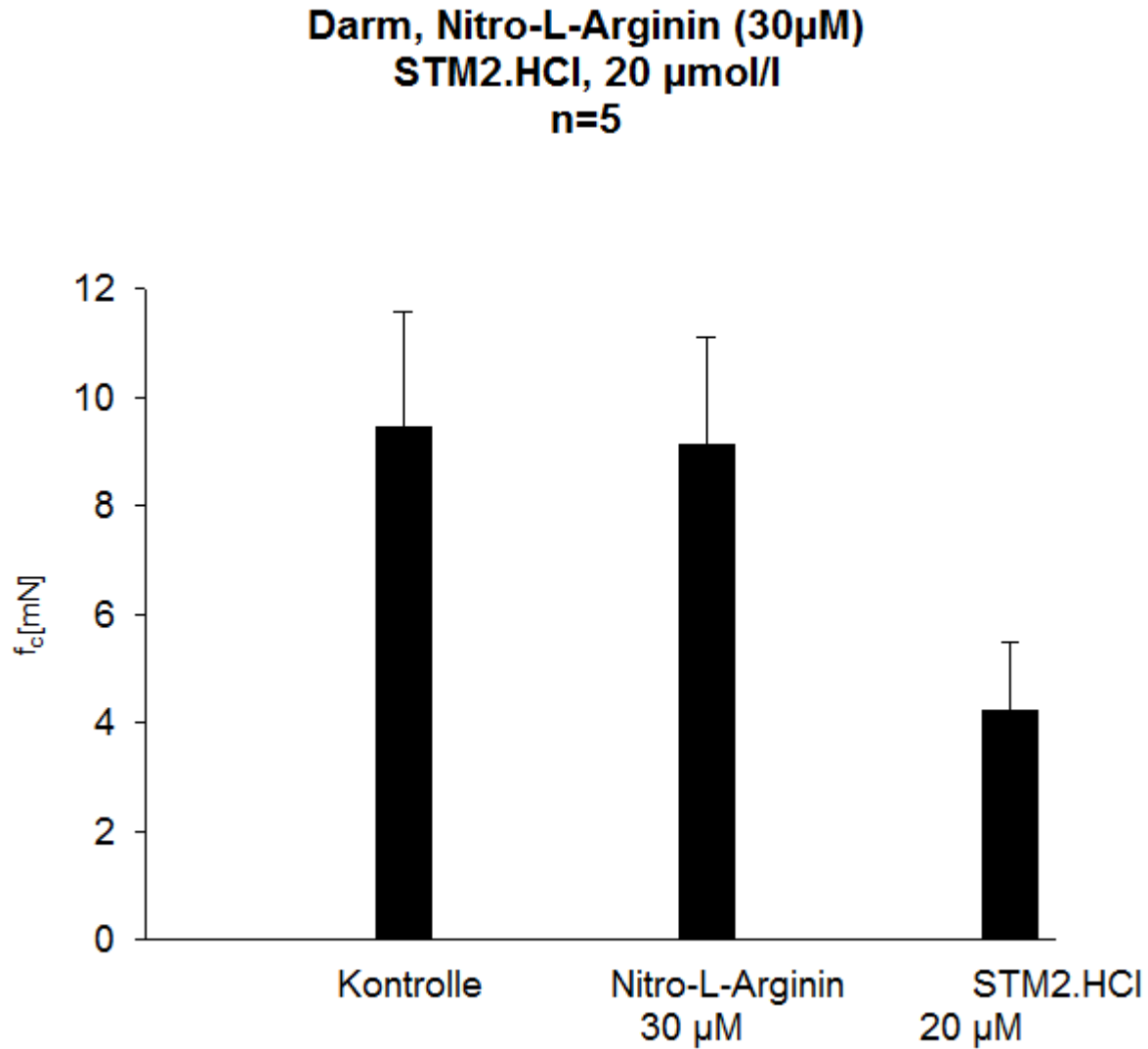


Abbildung 23: Balkendiagramm des Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit 30 µmol Nitro-L-Arginin

In diesem Balkendiagramm ist die Kontraktionskraft in mN auf der y-Achse aufgetragen. Die zugegebenen Substanzen in deren jeweiligen Konzentrationen sind auf der x-Achse aufgetragen. Die Balken geben die berechneten Mittelwerte der 5 Versuche wieder. Die Standardabweichungen sind in Form der Verlängerungen der Balken zu sehen.

Auffallend ist die geringe Abnahme der Kontraktionskraft nach Zugabe von 30 µmol/l Nitro-L-Arginin, sowie die ausgeprägte Abnahme der Kontraktionskraft nach Zugabe von 20 µmol/l STM2.HCl.

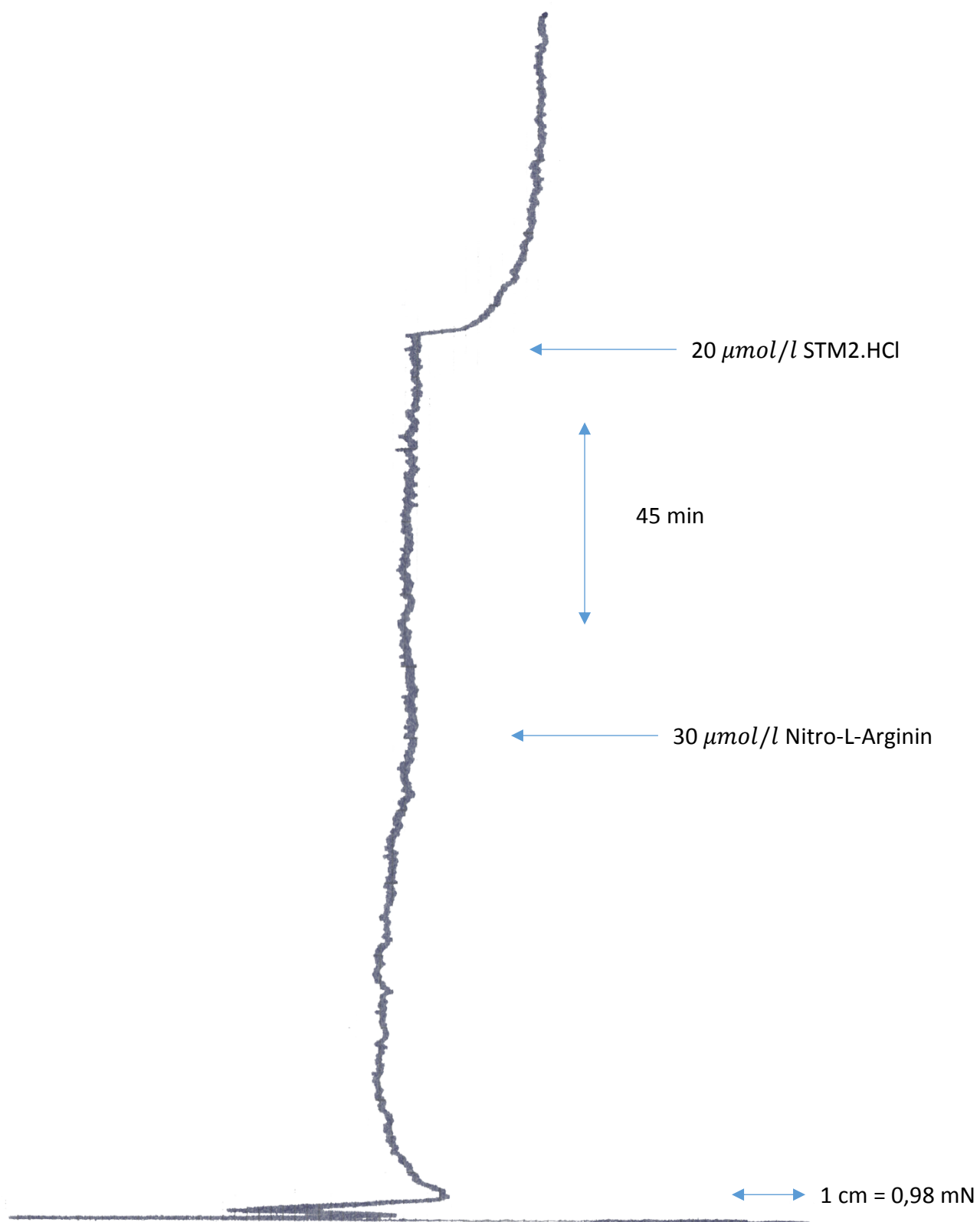


Abbildung 24: Originalaufzeichnung Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit $30\ \mu\text{mol/l Nitro-L-Arginin}$

4.6.2 Ergebnisse Wirkmechanismus 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

Diese Versuchsdurchführung war ident zu den oben genannten Versuchen, es wurde lediglich 100 $\mu\text{mol/l}$ anstatt 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin verwendet.

Aus den Messergebnissen wurde ein Kontrollwert von $7,88 \pm 1,69$ mN berechnet. Nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin wurde eine Zunahme der Kontraktionskraft auf $8,37 \pm 1,82$ mN gemessen. Dieser Wert entspricht einer Zunahme um $5,84 \pm 5,74$ %. Die Zugabe von 20 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl resultierte wiederum in einer Abnahme der Kontraktionskraft um $53,15 \pm 7,45$ % auf einen Wert von $3,80 \pm 1,80$ mN.

Diese Werte entsprechen den Werten der Versuchsreihe mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin und bestätigen, dass die eNOS nicht signifikant am Wirkmechanismus der Testsubstanz beteiligt sind.

Substanz-Konzentration	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Kontrolle	$7,88 \pm 1,69$	0 ± 0	5	-
100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	$8,37 \pm 1,82$	$+5,84 \pm 5,74$	5	-
20 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	$3,80 \pm 1,80$	$-53,15 \pm 7,45$	5	0,01

Tabelle 18: Versuchsergebnisse Wirkmechanismus mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

**Darm, Nitro-L-Arginin (100 μ M)
STM2.HCl, 20 μ mol/l
n=5**

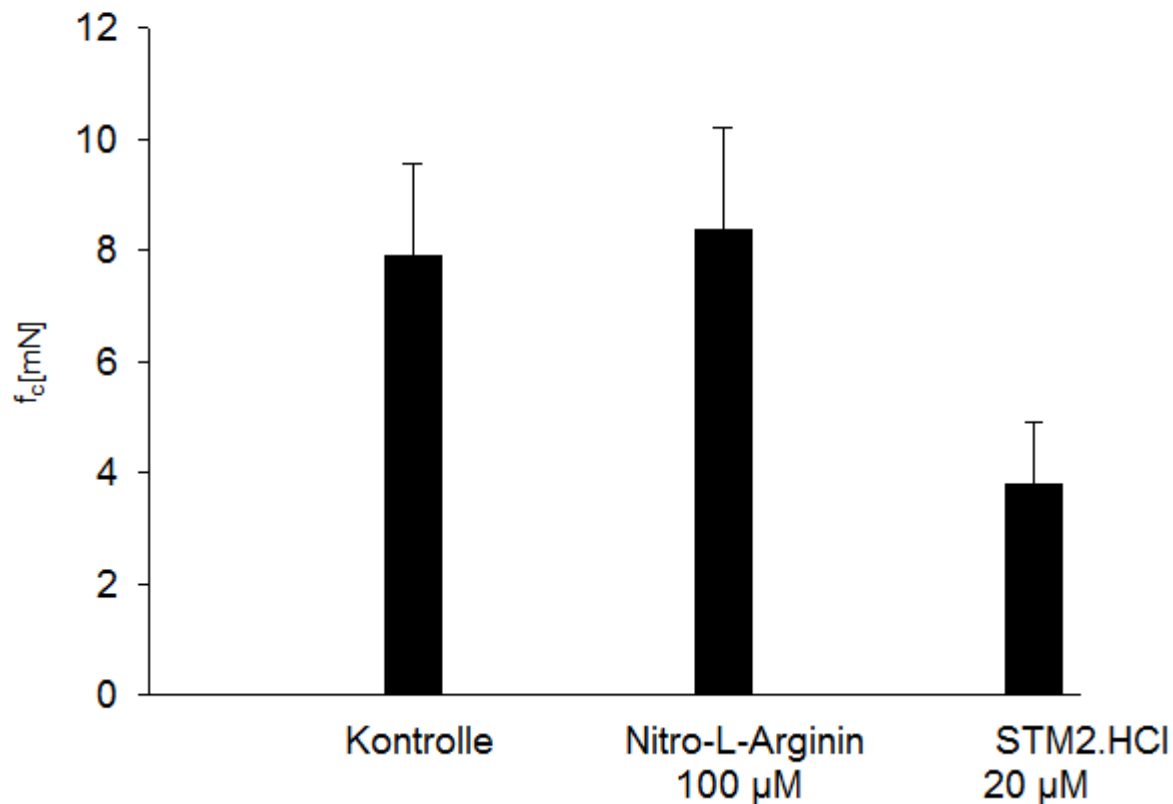


Abbildung 25: Balkendiagramm des Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit 100 μ mol Nitro-L-Arginin

Auch in diesem Balkendiagramm ist die Kontraktionskraft in mN auf der y-Achse aufgetragen. Die zugegebenen Substanzen in deren jeweiligen Konzentrationen sind auf der x-Achse aufgetragen. Die Balken geben die berechneten Mittelwerte der 5 Versuche wieder. Die Standardabweichungen sind in Form der Verlängerungen der Balken zu sehen.

Aus diesem Balkendiagramm ist die geringe Zunahme der Kontraktionskraft nach Zugabe von 100 μ mol/l Nitro-L-Arginin ersichtlich. Ausserdem ist die signifikante Abnahme der Kontraktionskraft nach Zugabe von 20 μ mol/l STM2.HCl graphisch dargestellt.

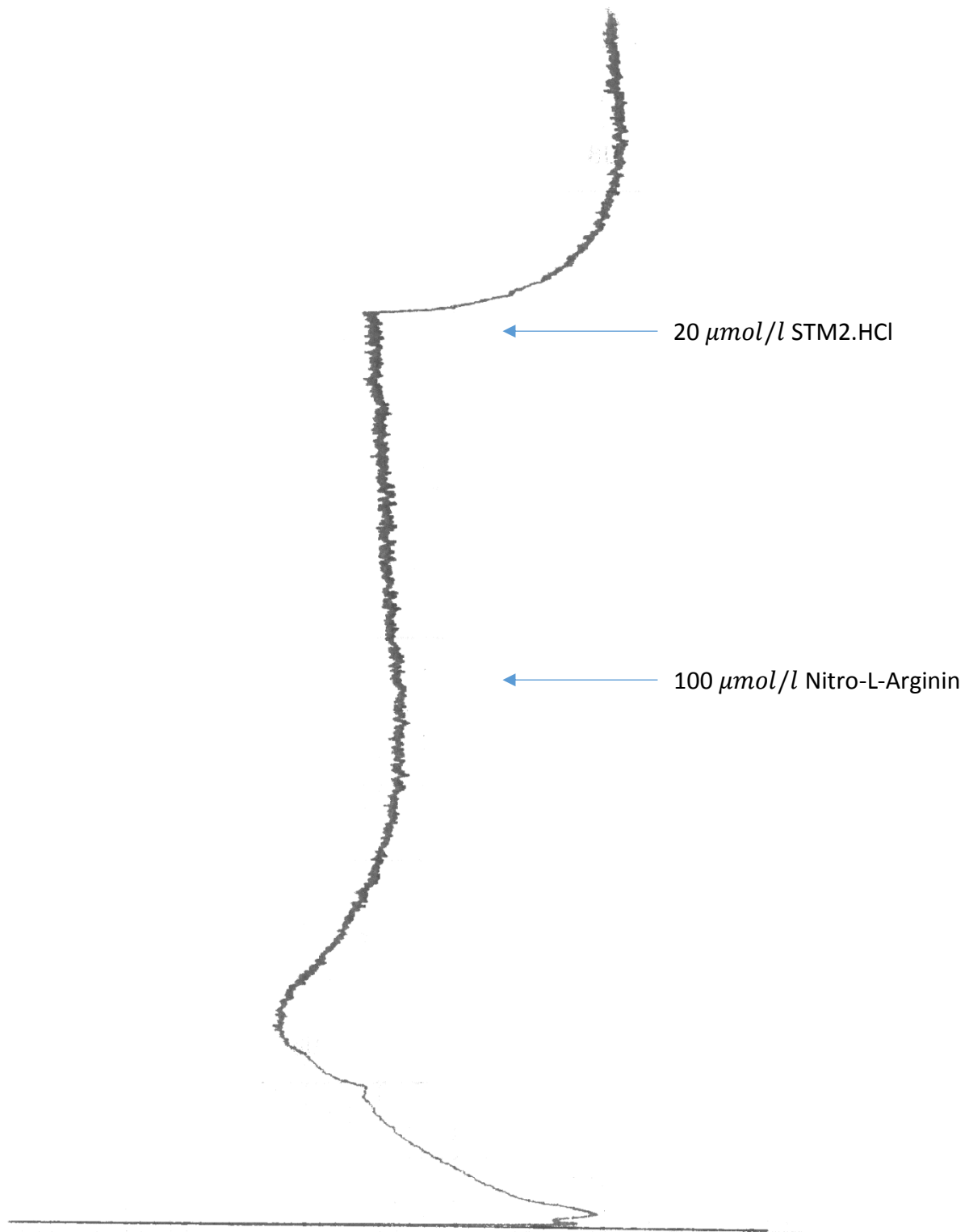


Abbildung 26: Originalaufzeichnung Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

5 Diskussion

Nach der Durchführung der Versuchsreihen und der statistischen Auswertung der Messdaten konnte das vasodilatorische Potential der Testsubstanz an der Aorta descendens und der Arteria pulmonalis, sowie das spasmolytische Potential am terminalen Ileum genauer definiert werden. Zusätzlich konnte die Wirkung der Substanz STM2.HCl auf die Herzmuskulatur durch die Versuchsreihen am Atrium cordis dextrum, sowie am Musculus papillaris näher beschrieben werden.

5.1 Wirkung von STM2.HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	Kontraktionsänderung in % bei 3 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	Kontraktionsänderung in % bei 100 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	EC ₅₀ in $\mu\text{mol/l}$
Aorta descendens	-4,27 $\pm$ 4,53	-28,44 $\pm$ 9,91	> 100
Arteria pulmonalis	-1,57 $\pm$ 2,56	-48,10 $\pm$ 8,74	> 100
Terminales Ileum	-10,64 $\pm$ 3,78	-100 $\pm$ 0	15

Tabelle 19: Wirkung auf die glatte Muskulatur

Wie den oben angeführten Daten zu entnehmen ist hatte die Testsubstanz in niedriger Konzentration nur einen geringen Effekt auf die Aorta descendens und auf die Arteria pulmonalis. Durch Steigerung auf die maximale Konzentration der Testsubstanz auf 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine signifikante, moderate Abnahme der Kontraktionskraft beider Organe gemessen. Jedoch war das vasodilatorische Potential an der Arteria pulmonalis um 19,66 % stärker ausgeprägt im Vergleich zur Aorta descendens.

Aufgrund der zu geringen Abnahme der Kontraktionskraft konnte allerdings an beiden Präparaten kein EC₅₀ Wert ermittelt werden.

Bezieht man sich auf die Konzentrations-Wirkungskurven der Aorta descendens sowie der Arteria pulmonalis, so ist eindeutig festzustellen, dass jede Konzentrationssteigerung in einem Abfall der Kurve resultiert. Diese Tatsache gibt Aufschluss über eine tatsächliche Wirkung der Substanz STM2.HCl an der Aorta descendens sowie der Arteria pulmonalis.

Der Effekt der Testsubstanz auf Präparate des terminalen Ileums war wesentlich stärker ausgeprägt als bei anderen Organen glatter Muskulatur. Bereits die niedrigste Substanzkonzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ resultierte in einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve fiel bei jeder Konzentrationssteigerung steiler ab. Der Effekt der Substanz bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ war so ausgeprägt, dass dieser vom terminalen Ileum nicht mehr überstanden wurde.

Eine spasmolytische Wirkung der Testsubstanz an diesem Organ der glatten Muskulatur war hoch signifikant. Daraus konnte ein EC_{50} Wert von 15 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden, welcher für die Durchführung der Versuche zur Aufklärung des Wirkmechanismus herangezogen wurde.

5.2 Wirkung von STM2.HCL auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	Kontraktionsänderung in % bei 3 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	Kontraktionsänderung in % bei 100 $\mu\text{mol/l}$ STM2.HCl	EC_{50} in $\mu\text{mol/l}$
Atrium cordis dextrum	-8,03 $\pm$ 4,84	0 $\pm$ 0	13,8
Musculus papillaris	-47,05 $\pm$ 8,93	0 $\pm$ 0	3,45

Tabelle 20: Wirkung auf die Herzmuskulatur

Zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz an der quergestreiften Muskulatur wurden Versuche am Atrium cordis dextrum sowie am Musculus papillaris durchgeführt.

Wie bereits erwähnt wurde anhand der Untersuchung am Vorhof ein potentieller Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie und somit auf die Herzfrequenz untersucht.

An den Präparaten des Papillarmuskels wurde ein möglicher Effekt auf die Inotropie, also auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels untersucht.

In Bezug auf den rechten Vorhof wurde bereits bei einer Konzentration der Testsubstanz von $3 \mu\text{mol/l}$ eine Abnahme der Chronotropie um $8,03 \pm 4,84 \%$ festgestellt. Mit jeder Konzentrationssteigerung konnte eine stärkere Abnahme der Herzfrequenz gemessen werden.

Ab einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ konnte keine Aktivität des rechten Vorhofes festgestellt werden.

Betrachtet man die Dosis-Wirkungs-Kurve des Atrium cordis dextrum, so kann man bei jeder Konzentrationssteigerung der Testsubstanz einen steileren Abfall der Kurve feststellen.

Aufgrund der ausgeprägten Wirkung wurde der EC_{50} Wert bereits bei $13,8 \mu\text{mol/l}$ eruiert. Die Tatsache, dass jede Konzentrationssteigerung in einem noch steileren Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve resultiert, lässt darauf schließen, dass die Substanz STM2.HCl eine signifikante, stark ausgeprägte, negativ chronotrope Wirkung auf das Atrium cordis dextrum hat.

Im Vergleich dazu war der Effekt der Testsubstanz bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ auf den Musculus papillaris, mit einer Abnahme der Inotropie um $47,05 \pm 8,93 \%$, noch stärker ausgeprägt. Von allen untersuchten Organsystemen wurde am Papillarmuskel der größte Effekt der Testsubstanz bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ festgestellt.

Der EC_{50} Wert von $3,45 \mu\text{mol/l}$ lag dabei nur oberhalb dieser ersten Konzentrationsstufe. Die Konzentrationen von $10 \mu\text{mol/l}$ und von $30 \mu\text{mol/l}$ haben eine Abnahme der Kontraktionskraft um $72,72 \pm 5,62 \%$ und um $88,47 \pm 4,58 \%$ zur Folge. Ab einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden.

Aufgrund dieser Daten kann man darauf schließen, dass die Testsubstanz STM2.HCl eine signifikante, stark ausgeprägte, negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel hat.

Beide Organsysteme quergestreifter Muskulatur weisen hohe Empfindlichkeit für die Testsubstanz auf.

5.3 Wirkmechanismus von STM2.HCl

Aufgrund der im Kapitel „4.6 Ergebnisse Wirkmechanismus“ angeführten Daten, lässt sich eindeutig feststellen, dass die spasmolytische Wirkung der Substanz STM2.HCl nicht durch die Beteiligung der eNOS resultiert. Für die festgestellte Wirkung kommen daher andere Wirkmechanismen in Frage, deren Aufklärung jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

6 Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit wurde am Department für Pharmakologie und Toxikologie mit dem Ziel durchgeführt eine potentielle Wirkung der neu synthetisierten Substanz STM2.HCl, sowie deren Wirkmechanismus an isolierten Organen von Meerschweinchen zu untersuchen.

STM2.HCl wurde sowohl an Organen glatter Muskulatur, wie an der Aorta descendens, dem Truncus pulmonalis und dem terminalen Ileum getestet, als auch an Organe der Herzmuskulatur, wie dem Atrium cordis dextrum und dem Musculus papillaris.

So wurde an der Aorta descendens und dem Truncus pulmonalis eine potentielle vasodilatative Wirkung untersucht.

Eine mögliche spasmolytische Wirkung konnte durch Versuche am terminalen Ileum getestet werden.

Durch Versuche am Atrium cordis dextrum konnte der Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie untersucht werden. Der Effekt der Testsubstanz auf die Inotropie wurde durch Versuche am Musculus papillaris näher beschrieben.

Die betreffenden Organe wurden täglich von einem Meerschweinchen isoliert und auf eine bestimmte Art präpariert, wodurch diese in verschiedene Versuchs-Apparaturen eingebracht werden konnten. Um das Überleben der Organe zu sichern befanden sich diese während den Versuchen in einem Organbad, welches mit Nährlösung gefüllt und mit Oxygum begast wurde.

Die Zugabe der wasserlöslichen Substanz STM2.HCl erfolgte kumulativ. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$. Diese Konzentration wurde anschließend auf 10 $\mu\text{mol/l}$, dann auf 30 $\mu\text{mol/l}$ und schließlich auf 100 $\mu\text{mol/l}$ gesteigert. Zwischen den Konzentrationssteigerungen wurde jeweils eine Wartezeit von 45 Minuten eingehalten.

In Abhängigkeit der Konzentration wurden isometrische Kontraktionsänderungen gemessen, welche durch einen Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet wurden. Die daraus resultierenden Kontraktionskurven wurden manuell vermessen und statistisch ausgewertet.

Durch die graphische Darstellung der ausgewerteten Daten als Konzentrations-Wirkungs-Kurve konnte zusätzlich ein EC_{50} Wert ermittelt werden.

Die Testsubstanz zeigt eine moderate Vasodilatation auf die Präparate der Aorta pulmonalis, sowie der Arteria pulmonalis. Die Wirkung auf diese Organe war jedoch zu gering um einen EC_{50} Wert zu ermitteln.

Der spasmolytische Effekt der Testsubstanz auf die Präparate des terminalen Ileums war hingegen wesentlich stärker ausgeprägt. An diesem Organsystem konnte ein EC_{50} Wert von $15 \mu\text{mol/l}$ eruiert werden. Aus diesem Grund wurde auch die Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum durchgeführt.

STM2.HCl zeigte eine signifikant ausgeprägte Wirkung auf Präparate des Atrium cordis dextrum. Hier wurde eine starke Abnahme der Chronotropie gemessen und ein EC_{50} Wert von $13,8 \mu\text{mol/l}$ ermittelt.

Durch Versuche am Musculus papillaris konnte eine stark ausgeprägte, negativ inotrope Wirkung festgestellt werden. Dieser Effekt wird durch einen EC_{50} Wert von $3,45 \mu\text{mol/l}$ dargestellt.

Zur Durchführung der Versuche für die Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum wurde zuerst die eNOS mittels Nitro-L-Arginin antagonisiert. Hierbei wurden zwei Versuchsreihen mit $30 \mu\text{mol/l}$ und mit $100 \mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz auf das terminale Ileum nicht über die eNOS vermittelt wird. Die Aufklärung des Wirkmechanismus bedarf daher noch weiteren Untersuchungen.

8. Literaturverzeichnis

Wolfgang Kruis, Martin Rebstock (2001) Kurzleitfaden Reizdarmsyndrom, Thieme Verlag, Stuttgart/New York

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? Part1. Definition of IBS and colonic motility. Dig dis Sci 38: 1761-1762

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

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 56:1770-1789

Björn Lemmer, Kay Brune (2004) Pharmakotherapie Klinische Pharmakologie, 12. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York. ISBN: 3-540-20414-8

Hänsel R, Sticher O (2010) Pharmakognosie – Phytopharmazie. 9. Auflage. Springer Verlag, Berlin

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

Wichtl M, Barthlen U, Hanke G, Tegtmeier M (2008) Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 440-443

Psychrembel W (2013) Psychrembel klinisches Wörterbuch. 265. Aktualisierte Auflage, De Gruyter Verlag, Berlin, 1991

Ammon HPT, Hunnius C (2010) Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch. 10. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, New York, 310, 1131, 1567-1577

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

Estler C, Schmidt H (2007) Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis. 6. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart

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