



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Wirkprofil eines neu synthetisierten  
Tetrazol-Derivats (MGte1) auf isolierte Organe von  
Meerschweinchen“

verfasst von

Larissa Trimmel

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik



# DANKSAGUNG

---

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für seine liebevolle Betreuung, das gemütliche Arbeitsklima im Labor und die Hilfe bei der Realisierung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie bedanken.

Weiters möchte ich dem Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien für die Bereitstellung der neu synthetisierten Testsubstanz MGte1 meinen Dank aussprechen.

Ich möchte auch meinen engsten Freundinnen danken, die zu jeder Zeit für mich da waren und mir viel Kraft gegeben haben. Mit ihnen durfte ich während dieses langjährigen Lebensabschnittes viele wertvolle Erinnerungen teilen.

Ein großes Dankeschön gilt vor allem meinem Freund Norbert, der mich auf dieser Reise begleitet hat. Er hat mich immer seelisch unterstützt.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Schwiegereltern bedanken, die immer an mich geglaubt haben und mir Mut gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir ermöglicht haben, diesen Weg im Leben gehen zu dürfen. Nur durch ihre Liebe, Motivation und Hilfsbereitschaft, ihr Verständnis und ihre Fürsorge ist es mir gelungen das Pharmaziestudium zu absolvieren. Mama und Papa, niemand auf dieser Welt kann euch ersetzen!

Mein tiefster Dank gilt dir, lieber Papa. Ohne dich hätte ich das alles nie geschafft. Niemand konnte mich in meinen härtesten Lernphasen so gut beruhigen und mir die Angst nehmen wie du. Du hattest sogar um Mitternacht immer eine passende Antwort auf jede meiner fachlichen Fragen. Danke für alles, Papa.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Spasmolytika</b>	<b>2</b>
2.1.1	Neurotrope Spasmolytika	2
2.1.1.1	Atropin	2
2.1.1.2	Scopolamin	3
2.1.2	Muskulotrope Spasmolytika	4
2.1.2.1	Papaverin	4
2.1.2.2	Tiropamid	5
2.1.3	Neurotrop-muskulotrope Spasmolytika	5
2.1.3.1	Denaverin	5
2.1.3.2	Oxybutynin	5
<b>2.2</b>	<b>Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)</b>	<b>6</b>
2.2.1	Physiologische Bedeutung	6
<b>2.3</b>	<b>Stickstoffmonoxid (NO)</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Testsubstanz</b>	<b>7</b>
3.1.1	MGte1	7
3.1.2	Lösungsmittel	8
<b>3.2</b>	<b>Stammlösungen</b>	<b>10</b>
3.2.1	Tyrodellösung	10
3.2.2	Kaliumchloridlösung	11
<b>3.3</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>Isolierung und Präparation der Organe</b>	<b>13</b>
3.4.1	Rechter Vorhof (Atrium cordis dextrum)	14
3.4.2	Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	14
3.4.3	Papillarmuskel (Musculus papillaris)	15
3.4.4	Aorta (Aorta descendens)	15
3.4.5	Dünndarm (Ileum terminale)	16



<b>3.5</b>	<b>Apparaturen für die Versuche.....</b>	<b>17</b>
3.5.1	Apparatur A .....	17
3.5.2	Apparatur B .....	19
3.5.3	Kraftwandler .....	21
3.5.4	Verstärker und Schreiber .....	21
3.5.5	Versorgung mit Oxymix.....	21
<b>3.6</b>	<b>Durchführung der Versuche .....</b>	<b>22</b>
3.6.1	Versuchsablauf am rechten Vorhof.....	22
3.6.2	Versuchsablauf an der Lungenarterie.....	23
3.6.3	Versuchsablauf am Papillarmuskel.....	24
3.6.4	Versuchsablauf an der Aorta.....	25
3.6.5	Versuchsablauf am Dünndarm .....	25
<b>3.7</b>	<b>Durchführung des Wirkmechanismus.....</b>	<b>26</b>
3.7.1	Glibenclamid.....	26
3.7.2	Versuchsablauf am Dünndarm in Gegenwart von Glibenclamid.....	27
<b>3.8</b>	<b>Datenauswertung und Statistik.....</b>	<b>27</b>
3.8.1	Rechter Vorhof.....	28
3.8.2	Papillarmuskel .....	28
3.8.3	Lungenarterie, Aorta, Dünndarm .....	29
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Rechter Vorhof .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Lungenarterie .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Papillarmuskel.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Aorta .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Dünndarm .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Analyse des Wirkmechanismus.....</b>	<b>45</b>
4.6.1	Ergebnisse der Versuche mit 30µmol/l Glibenclamid .....	45
4.6.2	Ergebnisse der Versuche mit 100µmol/l Glibenclamid .....	48
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Versuchsreihen an der quergestreiften Herzmuskulatur.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Versuchsreihen an glattmuskulären Organen .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3</b>	<b>Versuchsreihen mit MGte1 in Kombination mit Glibenclamid.....</b>	<b>54</b>
5.3.1	Versuche mit MGte1 in Kombination mit 30µmol/l Glibenclamid.....	55
5.3.2	Versuche mit MGte1 in Kombination mit 100µmol/l Glibenclamid.....	55
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>58</b>



# 1 ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien neu synthetisierte Substanz MGte1 einer pharmakologischen Testung an isolierten Organen von Meerschweinchen unterzogen.

An den Herzmuskelpräparaten, welche quergestreifte Muskulatur aufweisen, wurden einerseits die Chronotropie am rechten Vorhof und andererseits die Inotropie am Papillarmuskel geprüft.

Weitere Versuche wurden an den glattmuskulären Organpräparaten durchgeführt. Man prüfte die vasodilatierende Wirkung an der Lungenarterie und Aorta, ebenfalls untersuchte man den Dünndarm auf eine eventuelle spasmolytische Wirkung.

Die Ergebnisse dieser Tests wurden protokolliert und ausgewertet.

Ziel dieser Arbeit war es den pharmakologischen Charakter der Testsubstanz MGte1 genauer zu erforschen.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Spasmolytika**

Spasmolytika sind Arzneistoffe, die krampflösend wirken, indem sie den Tonus der glatten Muskulatur (Gastrointestinaltrakt, Gefäße, Bronchien) durch Rezeptorblockade, Rezeptoraktivierung oder durch andere Mechanismen herabsetzen (Gruyter 2014).

Es handelt sich bei dem Begriff Spasmolytika um keine einheitliche Substanzklasse. Spasmolytisch wirkende Arzneistoffe werden unterteilt in neurotrope, muskulotrope und neurotrop-muskulotrope Spasmolytika (Ammon 2004).

#### **2.1.1 Neurotrope Spasmolytika**

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

Schließlich kommt es durch die Rezeptor-Blockade zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur (Mutschler 2008).

Verabreicht werden diese Arzneistoffe bei Spasmen der glatten Muskulatur im Bereich des Magen-Darm-Traktes, der ableitenden Gallen- und Harnwege und der weiblichen Genitalien (Ammon 2004).

##### **2.1.1.1 Atropin**

Atropin, das in die Gruppe der Parasympatholytika gehört, ist ein vor allem in *Atropa belladonna* (Tollkirsche) vorkommendes Alkaloid, chemisch gesehen handelt es sich um ein tertiäres Amin (Ammon 2004).

Es besteht aus farblosen Kristallen, welche sehr schwer löslich sind in Wasser, jedoch sehr gut löslich in Ethanol, Ether, fetten Ölen und Chloroform (Ammon 2004).

Atropin weist sowohl eine pupillenerweiternde als auch eine spasmolytische Wirkung im Bereich des Magen-Darm-Traktes auf. Am Herzen bewirkt es eine Zunahme der Schlagfrequenz und eine Verkürzung der atrioventrikulären Überleitung und kann entweder intravenös oder oral verabreicht werden (Mutschler 2008).

Es ist indiziert bei bradykarden Rhythmusstörungen, AV-Block und Asystolie.

Ebenfalls eingesetzt wird es als Prämedikation in der Anästhesie und als Mydriatikum (Dellas 2011).

Atropin wird gut resorbiert.

In therapeutischer Dosierung ist es nicht ZNS-gängig, da es im Blut zu 99% protoniert vorliegt. Bei Überdosierung kann es jedoch die Blut-Hirn-Schranke passieren und wirkt zentral erregend (Dellas 2011).

Eine Atropinvergiftung kann durch den Verzehr von Tollkirschen, Stechapfelsamen, Bilsenkraut oder auch durch eine medikamentöse Überdosierung entstehen. Bei einer Vergiftung treten anticholinerge Symptome wie Mundtrockenheit, trockene und juckende Haut, Hyperämie, Mydriasis, Photophobie, Akkommodationslähmung, Tachykardie, Arrhythmien, Angina-pectoris-Anfälle aufgrund des erhöhten Sauerstoffverbrauchs, Harnverhalten, Obstipation, Halluzinationen, Erregungszustände und Krämpfe auf bis hin zum Tod.

Als Antidot wird Physostigmin eingesetzt (Dellas 2011).

### **2.1.1.2 Scopolamin**

Scopolamin, welches ebenfalls zu den Parasympatholytika zählt, besitzt eine zentral-dämpfende Wirkung, die hauptsächlich als transdermales therapeutisches System bei Reisekrankheit Einsatz findet. Durch die zentralnervöse antimuscarinische Wirkung entsteht ein antiemetischer Effekt (Ammon 2004).

Scopolamin wird in Form von Butylscopolaminiumbromid bei Koliken im Magen-Darm-Trakt verabreicht (Ammon 2004).

Es ist besser ZNS-gängig als Atropin, da es im Blut nur zu ca. 50% protoniert vorliegt (Dellas 2011).

## **2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika**

Muskulotrope Spasmolytika bewirken ohne Beteiligung der Nerven direkt an den Muskelfasern der glatten Muskulatur eine Erschlaffung (Mutschler 2008).

### **2.1.2.1 Papaverin**

Papaverin, ein Isochinolinalkaloid, das in *Papaver somniferum* (Schlafmohn) vorkommt, gilt als Prototyp der Gruppe der Spasmolytika (Hiller 2005).

Deshalb werden diese Pharmaka auch als papaverinartige Spasmolytika bezeichnet (Oberdisse 2002).

Die muskelrelaxierende Wirkung ist durch eine Inhibition der Phosphodiesterasen bedingt. Infolge dessen steigen die intrazellulären cAMP- und cGMP-Konzentrationen an. Die Besonderheit ist, dass in diesem Fall nicht nur die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, sondern auch Gefäße und Bronchien entspannt werden (Ammon 2004).

Da schwerwiegende Nebenwirkungen wie starker Blutdruckabfall und Arrhythmien auftreten können, ist die Gabe von Papaverin heute obsolet (Oberdisse 2002).

### **2.1.2.2 Tiropramid**

Tiropramid ist ein neuwertigeres muskulotropes Spasmolytikum, das ebenfalls die intrazelluläre Phosphodiesterase-Aktivität hemmt und folglich zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt (Ammon 2004).

Es können als unerwünschte pharmakologische Nebenwirkungen Mundtrockenheit, Erbrechen, Obstipation und Schwindel auftreten (Ammon 2004).

### **2.1.3 Neurotrop-muskulotrope Spasmolytika**

Diese Arzneistoffgruppe besitzt sowohl eine neurotrope (parasympatholytische) als auch muskulotrope (papaverinartige) Wirkung (Ammon 2004).

#### **2.1.3.1 Denaverin**

Denaverin wird als Spasmoanalgetikum bei Nephrolithiasis mit Nieren- und Ureterkoliken, Gallenkoliken, postoperativen Schmerzen, Geburtserleichterung und bei Migräne eingesetzt (Mutschler 2008).

#### **2.1.3.2 Oxybutynin**

Oxybutynin wird zur Behandlung einer Überfunktion des Harnblasenmuskels verwendet (Ammon 2004).

## **2.2 Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)**

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase ist ein Protein, das zur Enzymfamilie der NO-Synthasen gehört. Es katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin (Mutschler 2008).

Je nach Lokalisation der Synthase unterscheidet man drei verschiedene Isoformen, erstens die eNOS (endotheliale NO-Synthase), welche in Endothelzellen lokalisiert ist, zweitens die nNOS (neuronale NO-Synthase), welche sich in Neuronen befindet und drittens die iNOS (induzierbare NO-Synthase), welche in Entzündungszellen vorkommt (Lüllmann 2010).

### **2.2.1 Physiologische Bedeutung**

Die eNOS, welche sich an der Innenseite von Blutgefäßen befindet, kann unter anderem über Muskarinrezeptoren aktiviert werden. Acetylcholin dockt am Muskarinrezeptor an und aktiviert ihn. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Relaxation der glatten Muskulatur kommt, da NO freigesetzt wird. NO wird auch als EDRF (Endothelium-derived relaxing factor) bezeichnet und ist ein relaxierender Faktor.

NO gelangt schließlich in die glatte Muskulatur. Weiters wird die Guanylatzyklase stimuliert. Danach wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration aufgrund verstärkter Bildung von cGMP vermindert, es folgt eine Gefäßerweiterung und der Blutdruck sinkt (Dellas 2011).

## **2.3 Stickstoffmonoxid (NO)**

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses Gas, das an der Luft sofort unter Bildung braunroter Dämpfe in Stickstoffdioxid übergeht (Ammon 2004).

Es spielt als Botensubstanz eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Weite von Blutgefäßen (Ammon 2004).

NO bewirkt eine Hemmung der Darmmotilität (Christian F. Mang, 2002 S.1) und eine Relaxation der glatten Muskulatur (Schwegler 2006).

### 3 MATERIAL UND METHODIK

In diesem Kapitel wird die Durchführung der praktischen Arbeit, die im Rahmen der Diplomarbeit erfolgte, dokumentiert.

#### 3.1 Testsubstanz

Die neu synthetisierte Substanz MGte1 wurde vom Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien von Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe für diese wissenschaftliche Arbeit bereitgestellt.

##### 3.1.1 MGte1

Der Name der Testsubstanz ist MGte1.

Die Nomenklatur von MGte1 lautet 2-Phenyl-5-(3-thienyl)tetrazol.

Das Molekulargewicht beträgt 228,28 g/mol.

Die Substanz ist in Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig löslich.

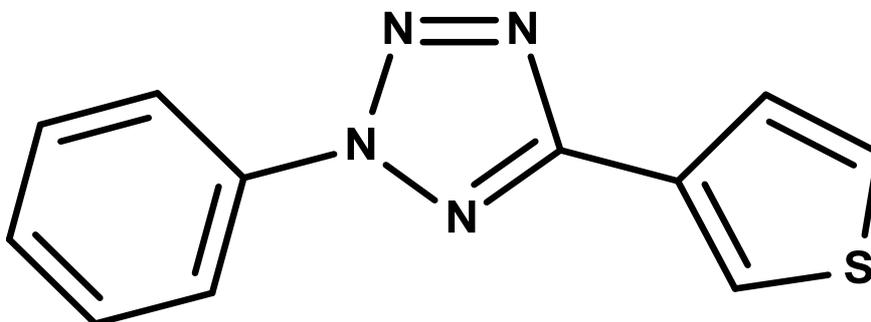


Abbildung 1: Struktur von MGte1

### 3.1.2 Lösungsmittel

Die Testsubstanz ist vollständig in DMSO löslich, deshalb diente DMSO als Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösungen.

Mithilfe des Molekulargewichtes konnte man die passende Konzentration an Testsubstanz für 100µl Stammlösung berechnen.

Es gab zwei unterschiedliche Größen von Organbädern. Das kleine Organbad hatte ein Fassungsvermögen von 8ml, das große Organbad umfasste 25ml. Je nach Fassungsvermögen des Organbades musste die entsprechende Menge an Testsubstanz eingewogen und in DMSO gelöst werden.

Substanz	Molare Masse	Organbad (ml)	Einwaage (mg/100 µl)
MGte1	228,28	8	0,18
MGte1	228,28	25	0,57

**Tabelle 1: Stammlösungen der Testsubstanz**

Die in DMSO gelöste Testsubstanz wurde langsam in das Organbad pipettiert. Der Reihe nach wurden aus der 100µl Stammlösung 3µl, 7µl, 20µl und 70µl genommen und mit einem Abstand von je 45 Minuten in das Organbad pipettiert. Nach 45 Minuten sollte die Steady-state-Konzentration erreicht sein und sich somit das Gleichgewicht eingestellt haben.

Die Endkonzentration der Testsubstanz im Organbad sollte deshalb 3µmol/l, 10µmol/l, 30µmol/l und am Ende jedes Versuchs 100µmol/l betragen.

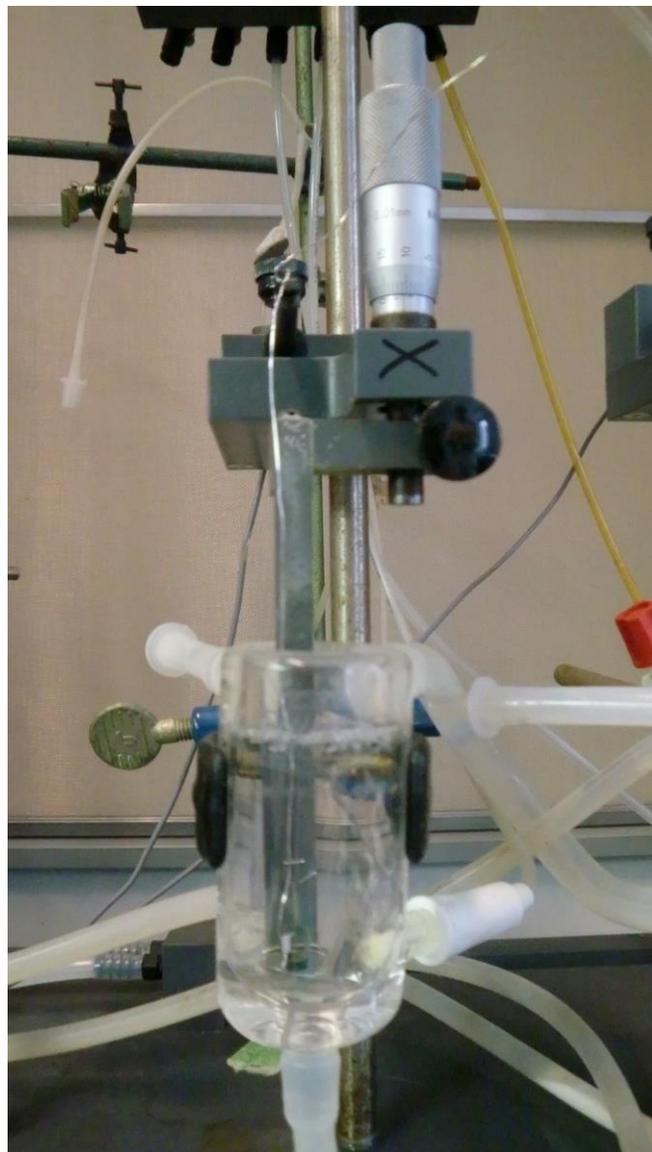
Man verwendete zum Pipettieren eine 100µl-Kolbenhubpipette.

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

**Tabelle 2: Pipettierschema**



**Abbildung 2: Pipetten**



**Abbildung 3: Organbad**

## 3.2 Stammlösungen

Um die Substanztestungen an isolierten und präparierten, jedoch noch lebenden Meerschweinchenorganen durchführen zu können, mussten für die Organe geeignete Bedingungen geschaffen werden, um sie nach der Entnahme am Leben zu erhalten. Dies gelang, indem die Organe sofort nach der Organentnahme in eine physiologische Elektrolytlösung eingelegt wurden, die mit Oxymix, einem Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, begast wurde.

### 3.2.1 Tyrodelösung

Die Nährlösung wurde täglich frisch zubereitet, was notwendig war, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Das exakte Mischverhältnis war entscheidend, um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Von großer Bedeutung war auch, dass die Nährlösung einen physiologischen Blut-pH-Wert von 7,2 – 7,4 und eine Temperatur von 35 – 37°C hatte, um die physiologischen Bedingungen so gut wie möglich nachzuahmen.

Diese Nährlösung ist auch als Tyrode Lösung bekannt, benannt nach Maurice Vejux Tyrode, einem Pharmakologen aus Cambridge. Sie ist eine blutisotonische Lösung, die als Blutersatz, zur Gewebezüchtung und Konservierung verwendet wird (Ammon 2004).

Substanz	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g/5l	33,6	115,01
KCl	50,33 g/5l	35,0	4,73
NaHCO <sub>3</sub>	125,0 g/5l	83,7	24,91
MgSO <sub>4</sub>	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62,0 g/250ml	1,18	2,15
CaCl <sub>2</sub>	34,0 g/250ml	3,2	3,92
Glucose	Reinsubstanz	1,98	-

**Tabelle 3: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung**

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

**Tabelle 4: Zusammensetzung für 2 Liter**

### 3.2.2 Kaliumchloridlösung

Zusätzlich zur Nährlösung mussten täglich zwei unterschiedliche Konzentrationen an Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion der glattmuskulären Organe frisch zubereitet werden. Diese Vorkontraktion der Gefäße war notwendig, um eine eventuelle dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz zu prüfen.

Die Lungenarterie und Aorta wurden mit einer 90mmol Kaliumchloridlösung versetzt, dafür wurden 0,67g KCl in 100ml Tyrode gegeben. Um ein homogenes Gemisch zu erzielen, war ein kräftiges Durchschütteln notwendig. Das KCl musste sich gut in der Tyrode auflösen.

Der Darm wurde mit einer 60mmol Kaliumchloridlösung versetzt, hierfür wurden 0,45g KCl in 100ml Tyrode gelöst.

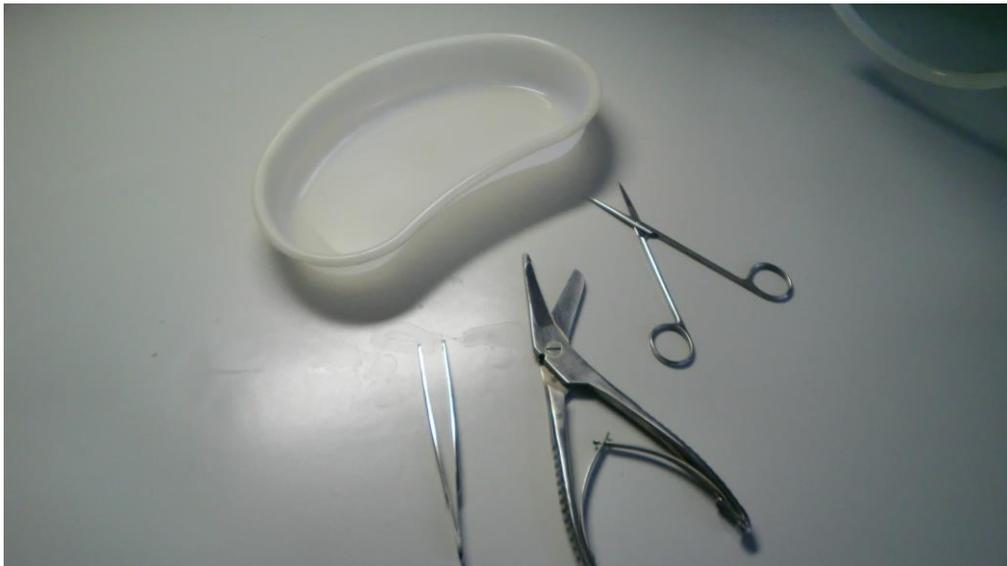
### 3.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Meerschweinchen vom TRIK Stamm verwendet. Die Tiere waren 8 – 12 Wochen alt und 300 – 600g schwer.

Die Meerschweinchen eignen sich gut als Versuchstiere, da die Beschaffenheit der Organe und vor allem die Ionenverhältnisse am Herzen denen des Menschen sehr ähnlich sind.



**Abbildung 4: Versuchstier**



**Abbildung 5: Präparierbesteck zur Isolierung der Organe**

Um die Testung der Testsubstanz an isolierten Meerschweinchenorganen durchführen zu können, musste pro Arbeitstag ein Meerschweinchen mittels Genickschlag getötet werden. Bei dieser Methode tritt der Tod sofort ein, sodass das Tier nicht unnötig leiden muss.

Unmittelbar nach der Tötung wurden Thorax und Abdomen des Versuchstieres geöffnet, die für die Testungen benötigten Organe (Herz, Lunge, Aorta und Dünndarm) vorsichtig entnommen und in die physiologische Nährlösung übergeführt. Danach erfolgte die Präparation der Organe.

### 3.4 Isolierung und Präparation der Organe

Die entnommenen Organe wurden unter einem Auflichtmikroskop präpariert. Dies erfolgte in Glaspetrischalen, die mit einer Korkplatte ausgelegt wurden, welche mit einem Gummischlauch am Rand fixiert wurde. Die Petrischalen wurden mit begaster Nährlösung gefüllt, um für optimale Bedingungen zu sorgen. Die Organe wurden mithilfe von Nadeln, Pinzetten, kleinen Scheren, Häkchen und Zwirn präpariert. Überschüssiges Fett- und Muskelgewebe musste immer gründlich entfernt werden.

Grundsätzlich ist es notwendig während des gesamten Präpariervorganges mit großer Sorgfalt zu arbeiten, da ein Überdehnen bzw. Verletzen der Organe zu dessen Absterben führt, sodass weiterführende Versuche nicht möglich sind.



**Abbildung 6: Mikroskop, Petrischale mit Kork und Präparierbesteck**

### **3.4.1 Rechter Vorhof (Atrium cordis dextrum)**

Der rechte Vorhof nimmt das Blut aus den großen Hohlvenen auf und leitet es an die rechte Kammer weiter (Mutschler 2008).

Das Herz und die Lunge wurden aus dem Thorax des getöteten Versuchstieres entnommen. Das Herz wurde vorsichtig herausgeschnitten, Lungenfragmente und anhaftendes Fettgewebe wurden entfernt. Nun wurden die Kammern von den Vorhöfen abgetrennt und der rechte Vorhof herausgeschnitten.

Zur Präparation wurde der Vorhof am oberen und unteren Ende mit kleinen Nadeln am Korkboden der Petrischale fixiert, die mit Nährlösung befüllt war. Der Vorhof durfte nicht gedehnt werden, damit der Sinusknoten nicht beschädigt wurde, da dieser die autonome Schlagkraft des Herzens sichert. Mit einem kurzen Stück Zwirn wurden an beiden Enden Silberhaken angebracht, danach musste der Vorhof so schnell wie möglich in die vorgesehene Versuchsanordnung eingespannt werden.

### **3.4.2 Lungenarterie (Arteria pulmonalis)**

Das Blut wird von der rechten Herzkammer über die Lungenarterie in die Lunge transportiert (Mutschler 2008).

Im Anschluss an den rechten Vorhof wurde die Lungenarterie vom Herzen abgetrennt. Es wurde der Lungenstamm verwendet. Dieser entspringt aus der rechten Herzkammer und ist ca. 1 cm lang.

Das umgebende Muskel- und Fettgewebe musste entfernt werden. Danach wurde die Lungenarterie in mehrere ca. 3 mm breite, ringförmige Stücke geschnitten, welche dann in ein mit Tyrode befülltes und begastetes Becherglas gelegt wurden. Damit war die Lungenarterie versuchsbereit und konnte direkt in die Apparatur gegeben werden.

### **3.4.3 Papillarmuskel (Musculus papillaris)**

Die Papillarmuskeln sind kegelförmige Muskelvorsprünge des Herzmuskels. Sie liegen an den Innenwänden der Herzkammern (Mutschler 2008).

Abschließend wurden dem Herzen die Papillarmuskeln entnommen. Dazu wurden die Herzkammern entlang des Septum bis zur Spitze aufgeschnitten, nachdem der rechte Vorhof abgetrennt war. Nach dem Aufklappen der Kammern und der Befestigung mit Präpariernadeln waren die Papillarmuskeln sichtbar. Die Purkinje-Fasern mussten jetzt abgetrennt werden, da sie einen Teil des Erregungsleitungssystems am Herzen darstellen und somit störend wirken, was zu einem verfälschten Versuchsergebnis führen könnte. Die weitere Präparation erfolgte wieder in einer mit Tyrode befüllten Petrischale, jedoch musste die Tyrode öfters gewechselt werden, da es während der Präparation oft zu Blutungen kam. Der Papillarmuskel wurde an einem Ende mit einem Häkchen versehen, weil es für diesen Versuch eine eigene Apparatur gab. Pro Versuchstier erhielt man 3 – 4 Papillarmuskeln, die nach der Präparation wieder schnell in begaste Nährlösung gelegt werden mussten.

### **3.4.4 Aorta (Aorta descendens)**

Die Aorta ist die Hauptschlagader. Sie nimmt das sauerstoffreiche Blut auf, welches vom linken Ventrikel ausgeworfen wird und leitet es danach in die Äste des Körperkreislaufes weiter (Mutschler 2008).

Das ca. 3cm lange Aortenstück, das dem Meerschweinchen entlang des Rückgrates entnommen wurde, wurde ebenfalls in einer Petrischale, die mit Tyrode befüllt war, präpariert. Wieder musste überschüssiges Fettgewebe entfernt werden. Mit einer Federschere wurde die gereinigte Aorta in ca. 2 - 3mm breite Ringe geschnitten, die in ein Becherglas mit begaster Tyrode gelegt wurden, bis sie für die Versuche in die Apparatur eingespannt wurden.



**Abbildung 7: Präparierte Aorta**

### **3.4.5 Dünndarm (Ileum terminale)**

Der Dünndarm wird in drei Abschnitte unterteilt: Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum) (Mutschler 2008).

Der Dünndarm wurde nahe dem Blinddarm durchtrennt und der jejunale Bereich mit einem Faden kenntlich gemacht. Ein ungefähr 25cm langes Darmstück wurde abgetrennt und in die Nährlösung gelegt. Im weiteren Verlauf wurde vom Darmstück ein ca. 1cm großes Stück abgeschnitten und in einer Petrischale präpariert. Hierfür wurde das kurze Darmstückchen durch Nadeln am Korkboden fixiert. Mit einer kleinen Pipette wurde das Darmstückchen mit Nährlösung durchgespült, um etwaigen Darminhalt zu entfernen. Im Anschluss wurden die beiden Enden des Darmstückchens schräg abgeschnitten und auf jeder Seite, in derselben Verfahrensweise wie auch beim Vorhof, wurde ein Häkchen mit Zwirn angebracht. Die schrägen Enden waren deshalb wichtig, weil das Darmlumen nach Befestigung der Häkchen geöffnet bleiben musste, damit der Wirkstoff, die Testsubstanz, eindringen konnte. Auch musste man mit dem Darm behutsam umgehen, um das Gewebe nicht zu verletzen. Das fertige Präparat wurde in die begaste Tyrode gegeben und war für den Versuch bereit.

## 3.5 Apparaturen für die Versuche

Es standen zwei unterschiedliche Apparaturen zur Untersuchung der Testsubstanz MGte1 an isolierten Meerschweinchenorganen zur Verfügung.

Apparatur A wurde ausschließlich für den Papillarmuskel verwendet.

Die Versuche am rechten Vorhof, an der Lungenarterie, Aorta und am Dünndarm wurden mit der Apparatur B durchgeführt.

Das Funktionsprinzip der beiden Apparaturen war gleich, sie unterschieden sich nur in Aufbau- und Befestigungsmechanismus.

Beide Apparaturen verfügten über ein Wasserbad, ein Organbad, einen Kraftwandler, der Veränderungen am Organ in elektrische Impulse umwandelte und einen Verstärker, der diese Signale verstärkte und mittels Schreiber auf ein Millimeterpapier aufzeichnete. Durch diese Aufzeichnungen war eine genaue Auswertung der Versuchsergebnisse möglich.

### 3.5.1 Apparatur A

Die Apparatur A wurde lediglich für die Untersuchungen am Papillarmuskel verwendet.

Die Apparatur A war aus einem Wasserbad aufgebaut, welches dazu diente, die Versuche bei stets gleichbleibender Temperatur durchzuführen. Mithilfe einer Heizspirale wurde das Wasserbad erwärmt und mittels Thermostat kontrolliert, um die Temperatur möglichst konstant bei 35°C zu halten.

Das Fassungsvermögen des Organbades betrug 28ml. Das Organbad wurde mit Tyrode befüllt. Falls zu viel Tyrode eingefüllt wurde, musste der Überlauf mit einer Plastikspritze entfernt werden.

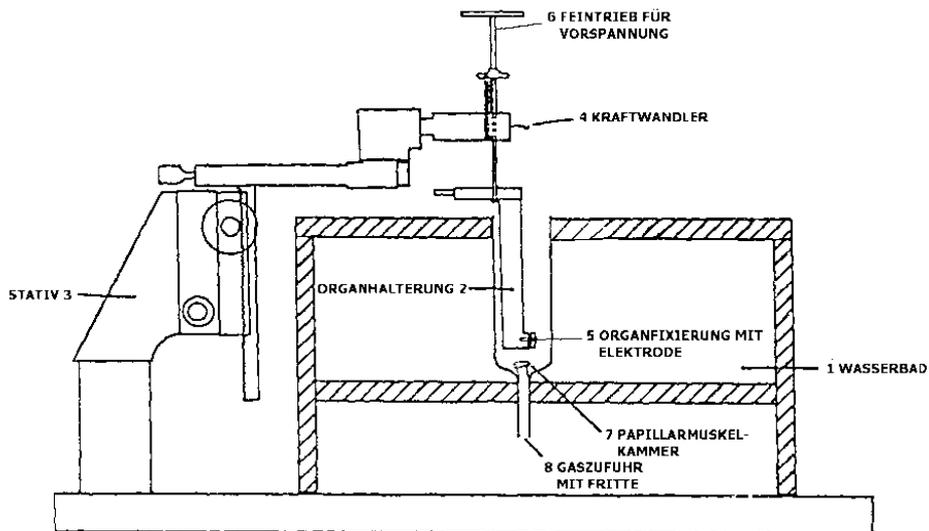
Oberhalb des Organbades war ein Stativ mit einer Halterung für die Organe, daran waren ein Kraftregler und ein Feintrieb für die Vorspannung der Organe angebracht. Die Organhalterung konnte man in das Organbad absenken.

Der isolierte und präparierte Papillarmuskel wurde mit einem Häkchen an einem Silberdraht, welcher mit dem Kraftwandler verbunden war, befestigt und in die Organhal-

terung eingespannt. Die untere Spitze des Muskels wurde zwischen einer Plexiglas-  
scheibe und einer Platinelektrode eingeklemmt. Nun konnte man das Organ in das  
Organbad absenken, das mit Oxymix begast werden musste.

Der Papillarmuskel wurde mit einem Accupulser Stimulator elektrisch gereizt, wodurch  
er kontrahiert wurde, da der Papillarmuskel nicht spontan aktiv ist.

Das mechanische Signal, welches durch die Kontraktion ausgelöst wurde, wurde mit-  
hilfe des Kraftwandlers in ein elektrisches Signal umgewandelt, an den Verstärker wei-  
tergeleitet und am Schluss durch einen Schreiber aufgezeichnet.



**Abbildung 8: Skizze der Apparatur A**

### 3.5.2 Apparatur B

Die Apparatur B wurde für den Vorhof, die Lungenarterie, Aorta und den Darm verwendet.

Das Organbad bestand aus einem doppelwandigen Glasgefäß. Zwischen den beiden Glaswänden zirkulierte temperiertes Wasser, das über Kunststoffschläuche zu- und abfloss.

Der Boden des Organbades war mit einem Abflussschlauch versehen, der durch eine Quetschklemme verschlossen war. Durch Öffnen dieser Quetschklemme war es möglich, die Tyrode zu wechseln bzw. das Organbad zu reinigen oder durchzuspülen.

Vor jedem Versuch wurde das Organbad mit Tyrode befüllt.

Da die Organhalterung, an dem das Organ mit kleinen Häkchen befestigt war, beweglich war, konnte man das Organ in das Organbad absenken. Über der Organhalterung befanden sich ein Feintrieb für die Vorspannung der Organe und ein Kraftwandler, der mit dem Silberdraht verbunden war.

Der präparierte Vorhof und der Darm wurden mit Häkchen an der Anhängervorrichtung fixiert, welche mit dem Silberdraht in Kontakt stand.

Lungenarterie und Aorta, die als Ringe vorlagen, spannte man direkt zwischen den zwei Silberdrähten ein.

Das Organbad wurde mit Nährlösung befüllt, mit Oxymix begast, danach wurden die Organe in das Organbad abgesenkt.

Durch die Veränderung der Schlagfrequenz des Vorhofes bzw. durch die spasmolytische Aktivität des Darmes oder durch die Veränderung des Gefäßtonus von Lungenarterie und Aorta wurde ein mechanisches Signal ausgelöst, das, wie auch bei der Apparatur A, von einem Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt und über einen Verstärker an den Schreiber weitergeleitet wurde, der die Veränderungen aufzeichnete.

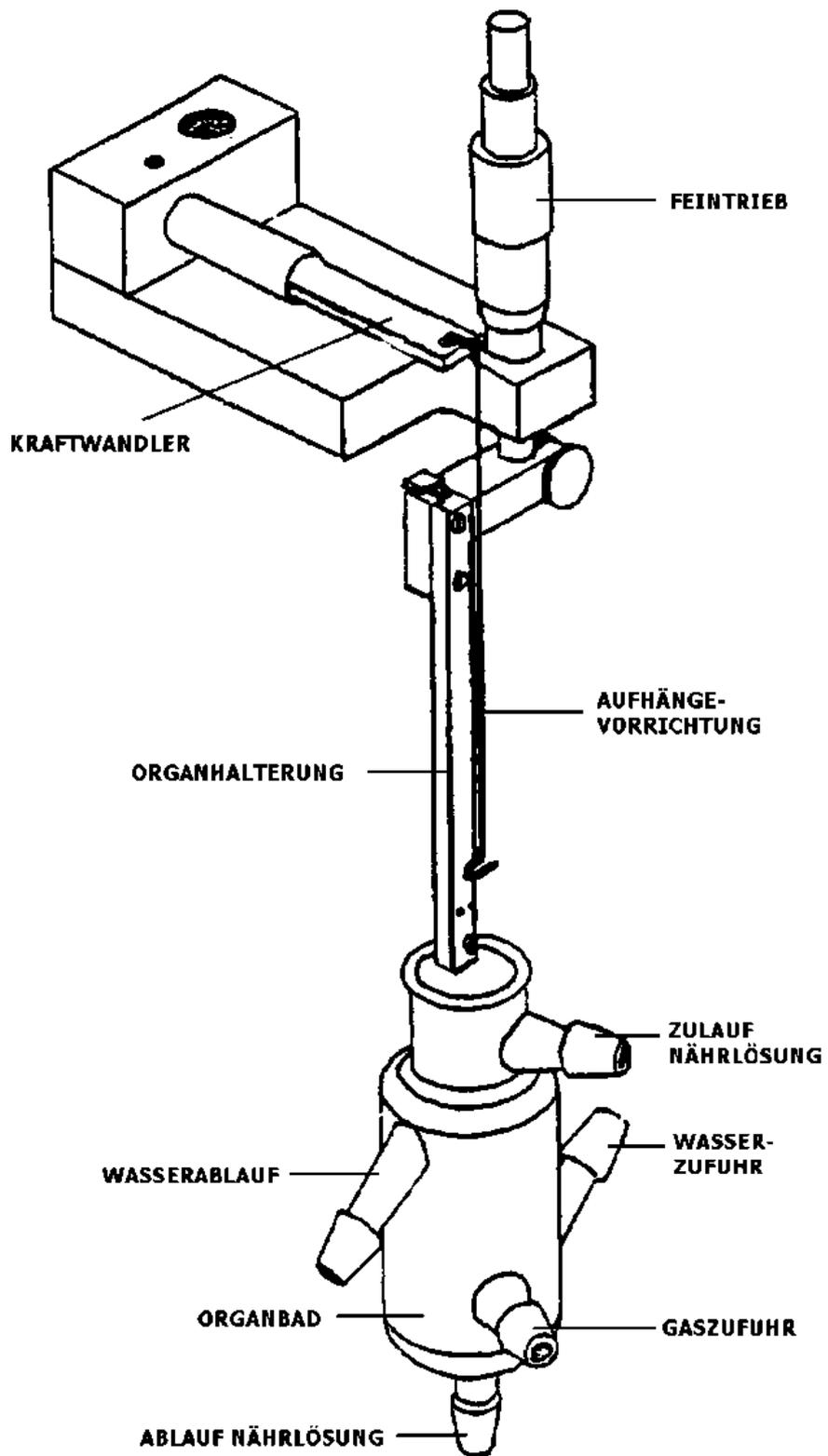


Abbildung 9: Skizze der Apparatur B

### 3.5.3 Kraftwandler

Der Kraftwandler spielte bei den Versuchen eine entscheidende Rolle, da er ein mechanisches Signal in eine elektrische, messbare Größe überführte. Die Messung erfolgte mittels eines Dehnungsmessstreifens, der die Veränderung der Kontraktion des Organs wahrnahm und es dadurch zu einer Änderung des Stromflusses kam.

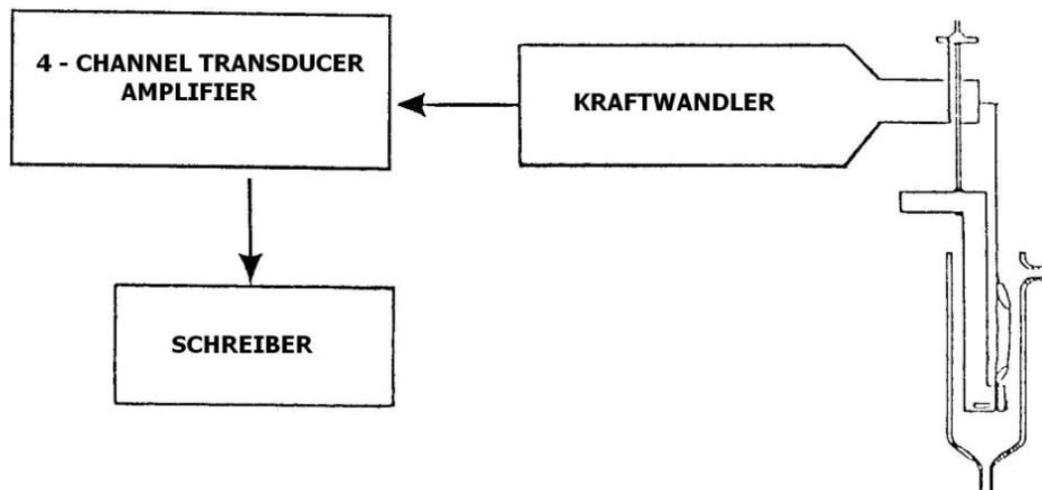


Abbildung 10: Skizze des Kraftwandlers

### 3.5.4 Verstärker und Schreiber

Das Signal des Kraftwandlers wurde letztendlich an den Verstärker weitergeschickt und in seiner Intensität verstärkt.

Der Flachbetschreiber zeichnete die Signale auf einem Millimeterpapier auf.

### 3.5.5 Versorgung mit Oxymix

Das Gasgemisch war für die optimale Versorgung der Organe essentiell. Wie bereits erwähnt, wurden die isolierten und danach präparierten Organe des Versuchstieres in die Tyrode Lösung gelegt und mit Oxymix begast. Diese Gas Mischung bestand aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Das Gasgemisch wurde während der Versuche über Schläuche

in das Organbad geleitet. Damit die Tyrode nicht zu stark begast wurde, leitete man das Gas durch Glasfritten ein. Das Gas konnte somit über Klemmen am Schlauch reguliert werden.

## **3.6 Durchführung der Versuche**

Zu Beginn jedes Arbeitstages musste sichergestellt werden, dass alle verwendeten Apparaturen gereinigt waren. Dafür wurden die Organbäder mehrmals mit Aqua destillata und einer Bürste gründlich geputzt und anschließend mit der Nährlösung durchgespült. Danach wurden die Wasserbäder eingeschaltet, damit sie die benötigte Temperatur erreichten. Dann wurden die Organbäder mit Tyrode befüllt und mit Oxymix begast.

Nun konnten die Testungen beginnen.

### **3.6.1 Versuchsablauf am rechten Vorhof**

Der isolierte und präparierte Vorhof wurde mit kleinen Häkchen an der Organhalterung der Apparatur B eingehängt. Wichtig war es darauf zu achten, dass der Vorhof nicht überdehnt wurde, da er eine Spontanaktivität aufweist. Im Gegensatz zum Papillarmuskel musste der Vorhof nicht mechanisch gereizt werden. Der Vorhof sollte locker in der Apparatur hängen. Danach wurde der Vorhof in das mit Tyrode befüllte und begaste Organbad abgesenkt. Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet, der Schreiber wurde auf den Nullpunkt gesetzt.

Es wurde eine Spannung von 5mV angelegt. Der Vorhof wurde auf 10,4mN vorgespannt. Wieder musste der Schreiber zum Nullpunkt zurückgesetzt werden.

Es war eine Anpassungsphase von 30 – 45 Minuten notwendig, da sich das Organ erholen musste.

Nach der Eingewöhnungsphase konnte mit der Kontrollmessung begonnen werden. Bevor man die Testsubstanz zutropfte, wurden 6 – 7 Kontrollwerte gemacht. Dafür wurde der Schreiber am Millimeterpapier aufgesetzt, und es wurde 12 Sekunden lang die Chronotropie gemessen und schließlich aufgezeichnet. Die Schreibgeschwindig-

keit des Schreibers war auf 5mV und Speed 5mm/sec eingestellt. Die Kontrollmessung sollte sich auf dem Millimeterpapier über 6 Kästchen erstrecken, wobei ein Kästchen 1cm entsprach. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis die Schläge konstant waren.

Um die Schlagfrequenz pro Minute zu berechnen, wurden die aufgezeichneten Schläge pro Messeinheit gezählt und mit 5 multipliziert.

Jetzt konnte man 3 $\mu$ l der Testsubstanz vorsichtig ins Organbad hineintropfen und in Abständen von 5 Minuten die Messungen durchführen. Insgesamt 9 Mal wurde dieser Vorgang wiederholt. Nach diesen 45 Minuten konnte man die nächste Konzentration laut Pipettierschema (siehe Kapitel 3.1.2) zugeben. Dies wurde so lange wiederholt bis man im Organbad eine Maximalkonzentration von 100 $\mu$ mol/l an Testsubstanz erreichte.

### **3.6.2 Versuchsablauf an der Lungenarterie**

Es wurde ein ringförmiges Stück der Lungenarterie aus der Nährlösung genommen und in die Apparatur B zwischen zwei L-förmigen Silberdrähten eingespannt, wobei das Organ nicht überdehnt werden durfte. Als nächstes wurde das fixierte Organ in das temperierte Organbad abgesenkt, das mit Tyrode befüllt war und begast wurde.

Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet. Die Vorspannung wurde bei 5mV vorgenommen und war mit 9,81mN gleichzusetzen. Der Schreiber musste in die Nullposition gebracht werden. Danach benötigte das Organ ca. 20 Minuten um sich zu akklimatisieren.

Nach diesen 20 Minuten wurde die Nährlösung vom Organbad abgelassen und stattdessen die 90mmol Kaliumchloridlösung eingefüllt zur Vorkontraktion der Lungenarterie. Der Schreiber musste wieder zum Nullpunkt zurückgedreht, auf das Millimeterpapier aufgesetzt und auf Speed 1mm/min eingestellt werden. Nun startete man mit den Aufzeichnungen.

Sofort kam es zu einer starken Kontraktion der Lungenarterie, was durch einen sehr hohen Ausschlag des Schreibers zu erkennen war. Das Organ konnte nur dann für die Versuche verwendet werden, wenn der Ausschlag über 5cm lag.

Nach ungefähr einer dreiviertel Stunde sollte die Kurve ein Plateau erreicht haben. Wenn dies nicht der Fall war, musste man abwarten bis die Plateauphase konstant war.

Danach wurde, wie schon beim Vorhof beschrieben, die in DMSO gelöste Prüfsubstanz MGte1 nach dem Pipettierschema in das Organbad getropft.

Wenn die Plateauphase erreicht war, wurden 3 $\mu$ l der Stammlösung in das Organbad pipettiert.

Nach 45 Minuten wurden 7 $\mu$ l zugegeben, nach weiteren 45 Minuten 20 $\mu$ l und wieder nach 45 Minuten 70 $\mu$ l, bis eine Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu$ mol/l erreicht wurde.

### **3.6.3 Versuchsablauf am Papillarmuskel**

Die Untersuchungen am Papillarmuskel wurden mit der Apparatur A vorgenommen. Der Papillarmuskel wurde über den befestigten Silberdrahthaken an der Halterung eingehängt, danach zwischen der Plexiglasscheibe und der Platinelektrode fixiert und nun in das temperierte, mit 25ml Tyrode befüllte, begaste Organbad abgesenkt. Es erfolgte eine Eingewöhnungsphase.

Weiters wurde eine Vorspannung von 3,92mN angelegt, das etwa 4cm entsprach. Um die Spannung konstant zu halten, musste der Feintrieb während der Versuche oft nachjustiert werden.

Beim Papillarmuskel war eine elektrische Reizung notwendig, da er nicht spontan aktiv ist. Man verwendete dafür das Reizgerät A310 Accupulser von der Firma WPI.

Der Papillarmuskel wurde mit Rechteckimpulsen mit einer Länge von 10ms<sup>-1</sup> und einer Frequenz von 1Hz stimuliert. Die Stromstärke sollte ca. 10% über der minimalen Reizschwelle liegen, um eine kontinuierliche Schlagfrequenz des Muskels zu erreichen.

Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet, die Einstellungen glichen denen beim Vorhof, wobei diesmal die Aufzeichnungen nicht über 6cm durchgeführt wurden, sie hingen nur von der Anzahl der Amplituden ab.

Die Aufzeichnung erfolgte bei Speed 5mm/sec. Alle 5 Minuten wurden 6 Amplituden aufgezeichnet.

Die Zugabe des Wirkstoffes erfolgte wieder alle 45 Minuten. Um ein genaueres Messen zu ermöglichen, wurde die jeweils letzte Messung einer Konzentration bei 20mm/sec durchgeführt.

### 3.6.4 Versuchsablauf an der Aorta

Der Ablauf der Versuche an der Aorta war dem an der Lungenarterie sehr ähnlich.

Die breiten, ringförmigen Stücke der Aorta wurden ebenfalls in die Apparatur B eingespannt und in das mit begaster Tyrode befüllte Organbad herabgelassen.

Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet, der Schreiber in Nullposition gebracht. Die Aorta wurde auf 10mN vorgespannt bei einer Spannung von 10mV.

Nun musste sich das Organ 20 Minuten im Organbad akklimatisieren.

Kurz bevor mit den Messungen begonnen wurde, wurde die Spannung auf 5mV reduziert.

Die Nährlösung wurde durch eine 90mmol Kaliumchloridlösung ausgetauscht. Nun starteten die Messungen.

Die Aufzeichnung erfolgte bei Speed 1mm/min. Die Kurve musste mindestens bis zur 5cm Marke reichen. Wieder war es notwendig 45 Minuten zu warten, bis die Kontraktion konstant war. Danach konnte man wieder nach dem bereits beschriebenen Pipettierschema die Testsubstanz in das Organbad zugeben.

### 3.6.5 Versuchsablauf am Dünndarm

Das präparierte Darmstückchen wurde mit Silberdrahthäkchen in die Organhalterung eingehängt und danach in das temperierte Organbad gesenkt, die Geräte wurden in Betrieb genommen. Es lief ähnlich ab wie beim Vorhof, jedoch betrug die Vorspannung 5cm, das 4,92mN entsprach.

Jetzt musste sich das Organ erholen.

Manchmal kam es durch die Peristaltik des Darmes zu einer Verschiebung des Nullpunktes, der dann mithilfe des Feintriebes nachjustiert werden musste.

Die Tyrode Lösung wurde aus dem Organbad entfernt und durch eine 60mmol Kaliumchloridlösung ersetzt.

Es war sofort eine Kontraktion des Organes erkennbar, diese fiel aber rasch wieder ab, und zwar bis zur Hälfte der maximalen Konzentration, sie pendelte sich langsam wieder ein. Sobald die Kurve nach mindestens 45 Minuten Wartezeit konstant war, konnte man 3 $\mu$ l der Testsubstanz in das Organbad spritzen, nach weiteren 45min 7 $\mu$ l,

wieder nach 45 Minuten 20µl und nach weiteren 45 Minuten 70µl, so wie im Pipettierschema beschrieben.

## 3.7 Durchführung des Wirkmechanismus

### 3.7.1 Glibenclamid

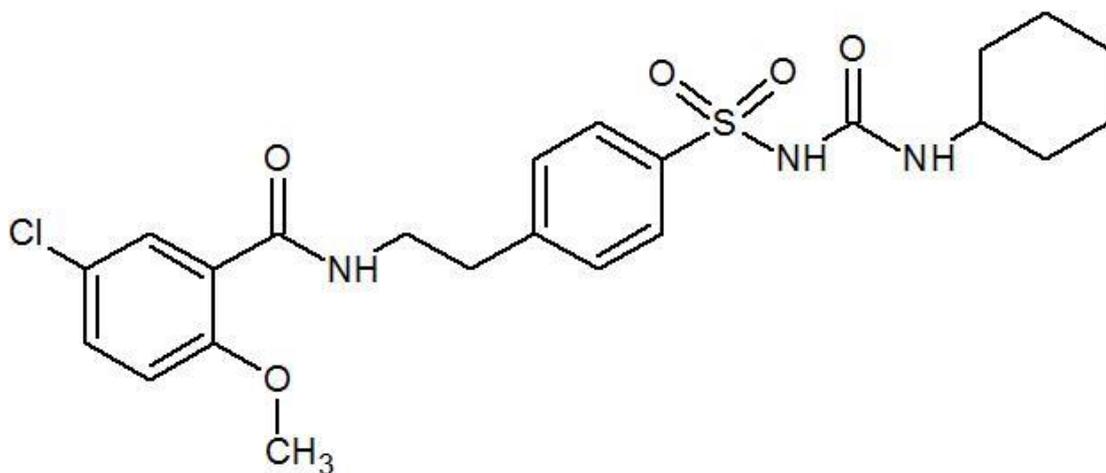


Abbildung 11: Struktur von Glibenclamid

Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoff, wird als orales Antidiabetikum bei Diabetes Typ II angewendet um den Blutzuckerspiegel zu senken (Ammon 2004).

Glibenclamid ist ein Antagonist am ATP-abhängigen Kaliumkanal und blockiert die ATP-abhängigen Kaliumkanäle in den B-Zellen der Bauchspeicheldrüse. Als Folge kommt es zu einer Depolarisation der Membran und spannungsabhängige Calciumkanäle werden schließlich geöffnet. Calcium kann in die Zelle einströmen. Es kommt zu einer Förderung der Insulinsekretion in den Extrazellularraum (Aktories 2009).

### **3.7.2 Versuchsablauf am Dünndarm in Gegenwart von Glibenclamid**

Die Untersuchung des Wirkmechanismus wurde am Dünndarm durchgeführt, da die Testsubstanz MGte1 am Darm die stärkste Wirkung zeigte.

Bei diesen Versuchen wurde zusätzlich zur Prüfsubstanz Glibenclamid als Antagonist in das Organbad gegeben. Eine Versuchsreihe wurde mit 30 $\mu$ mol/l Glibenclamid durchgeführt, eine weitere mit 100 $\mu$ mol/l.

Es wurde eine Stammlösung hergestellt, hierfür wurde Glibenclamid in DMSO gelöst. Der präparierte Darm wurde in die Apparatur B eingespannt und danach in das mit Tyrode befüllte, begaste Organbad gesenkt. Verstärker und Schreiber wurden eingeschaltet.

Nachdem sich das Organ akklimatisiert hatte, konnten die Messungen beginnen. Die Nährlösung wurde durch eine 60mmol Kaliumchloridlösung ersetzt.

Nun musste man warten, bis die Kurve am Millimeterpapier konstant war. Danach tropfte man zu Testbeginn 30 $\mu$ mol/l der Stammlösung von Glibenclamid in der ersten bzw. 100 $\mu$ mol/l in der zweiten Versuchsreihe in das Organbad.

Nach einer dreiviertel Stunde wurden schließlich 30 $\mu$ mol/l der Prüfsubstanz ins Organbad dazugegeben, diese Menge sollte der Konzentration des EC<sub>50</sub>-Wertes entsprechen.

Nach weiteren 45 Minuten war diese Testung beendet.

Bei der Auswertung musste die Eigenwirkung von DMSO als Lösungsmittel berücksichtigt werden.

## **3.8 Datenauswertung und Statistik**

Man berechnete die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) für die graphische und statistische Auswertung. Danach konnte man die Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellen. Bei diesen Kurven war auf der x-Achse die Konzentration der Prüfsubstanz in  $\mu$ mol/l logarithmisch dargestellt, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz in %.

Mittels der Grafiken und der Kurven erhielt man schließlich die  $EC_{50}$ -Werte, man verwendete dafür das Programm „Sigma Plot 9.0“. Der  $EC_{50}$ -Wert ist die mittlere effektive Konzentration (in diesem Fall der Testsubstanz) in mmol/l, bei der es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz des Organs auf 50% des Kontrollwerts kommt.

Weiters wurde der gepaarte Student-t-Test angewendet, um die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums der Versuchsreihen miteinzubeziehen. Werte  $< 5\%$  ( $P < 0,05$ ) bzw.  $< 1\%$  ( $P < 0,01$ ) waren signifikant, Werte  $< 0,1\%$  ( $P < 0,001$ ) waren hochsignifikant.

Da das Lösungsmittel DMSO, in dem die Testsubstanz gelöst wurde, selbst einen Effekt auf die Meerschweinchenorgane aufwies, war es notwendig, diese Wirkung von den gemessenen Werten abzuziehen.

### **3.8.1 Rechter Vorhof**

Die Versuche am Vorhof wurden vorgenommen, um den Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie zu prüfen. Die Schlagfrequenz wurde in Schlägen pro Minute gemessen.

Wie bereits beschrieben, musste die Messung am Vorhof alle 5 Minuten über eine Länge von 6cm durchgeführt werden. Es wurden die Ausschläge des Schreibers abgezählt und danach mit 5 multipliziert, um die Zahl der Schläge pro Minute zu erhalten.

### **3.8.2 Papillarmuskel**

Die Testungen am Papillarmuskel wurden durchgeführt, um die Inotropie zu prüfen, hierfür wurden die Aufzeichnungen der Amplituden herangezogen. Es wurden die letzten 7 Amplituden mit einem Lineal vermessen, anschließend wurde der Mittelwert der Amplitudenlängen berechnet.

Um die eigentliche Größe der Kontraktion zu erhalten, musste man die entsprechende Länge in cm mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multiplizieren.

### 3.8.3 Lungenarterie, Aorta, Dünndarm

An Lungenarterie und Aorta wurde eine vasodilatierende Wirkung geprüft, am Dünndarm wurde eine spasmolytische Wirkung untersucht.

Um eine maximale Kontraktion zu erreichen und somit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die glattmuskulären Organe mit einer KCl-Lösung versetzt.

Bei jeder Substanzzugabe wurden der exakte Zeitpunkt und die jeweilige Konzentration am Millimeterpapier vermerkt, um Veränderungen ermitteln zu können. Nach der Plateauphase und nach jeder weiteren Substanzzugabe wurde der Abstand bis zur Nulllinie vermessen und mit einem Referenzwert verglichen. Der Eichfaktor musste berücksichtigt werden.

Wenn es zu einer Relaxation kam bzw. wenn die Kontraktion nachließ, war dies durch eine Kurve ersichtlich, die in Richtung Nullwert verlief.

## 4 ERGEBNISSE

Mithilfe von Tabellen, Diagrammen, Grafiken und Originalaufzeichnungen des Schreibers werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Wirkung der Prüfsubstanz MGte1 auf die 5 verschiedenen Meerschweinchenorgane dargestellt.

### 4.1 Rechter Vorhof

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Wirkung der Testsubstanz MGte1 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes zu ermitteln, wurden 4 Versuche durchgeführt. Die Versuchsabläufe am Vorhof wurden in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

Der Mittelwert der Kontrolle betrug  $188,75 \pm 4,27$  Schläge/min, dies entsprach 0% Abnahme der Chronotropie.

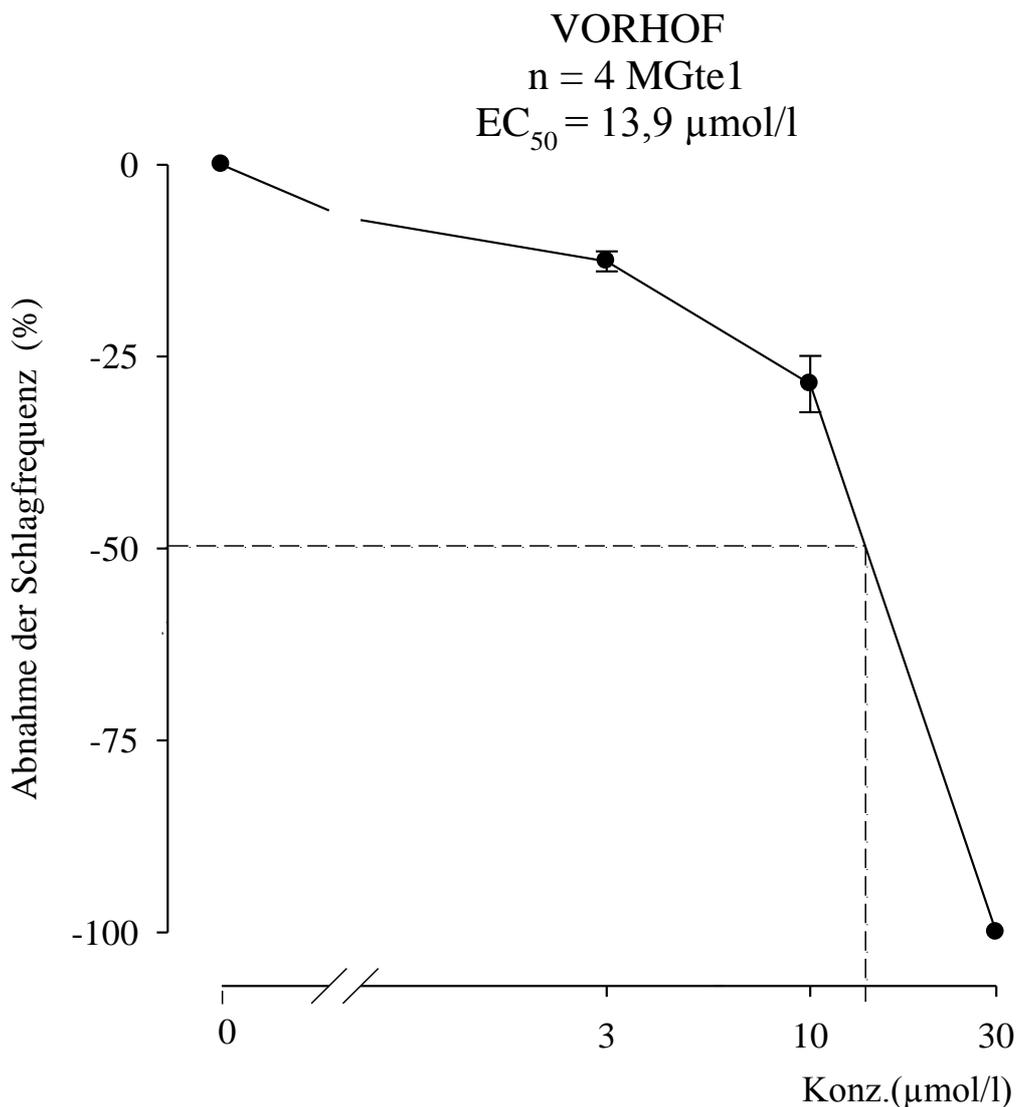
Die Tabelle 5 zeigt die Substanzmengen in  $\mu\text{mol/l}$ , die in das Organbad pipettiert wurden, die errechneten arithmetischen Mittelwerte ( $f$ ) des Sinusknotens sowohl in Anzahl der Schläge pro Minute ( $x/\text{min}$ ) als auch in Prozent (%) inklusive der Standardfehler (SEM), die Anzahl der Versuche ( $n$ ) und die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $P$ ).

<b>MGte1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f \pm \text{SEM}</math> (x/min)</b>	<b><math>f \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</b>
Kontrolle	$188,75 \pm 4,27$	$100 \pm 0$	4	-
3	$165 \pm 5,00$	$87,40 \pm 1,29$	4	0,05
10	$135 \pm 8,42$	$71,42 \pm 3,66$	4	0,05
30	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	4	0,01
100	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	4	0,01

**Tabelle 5: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MGte1 am Vorhof**

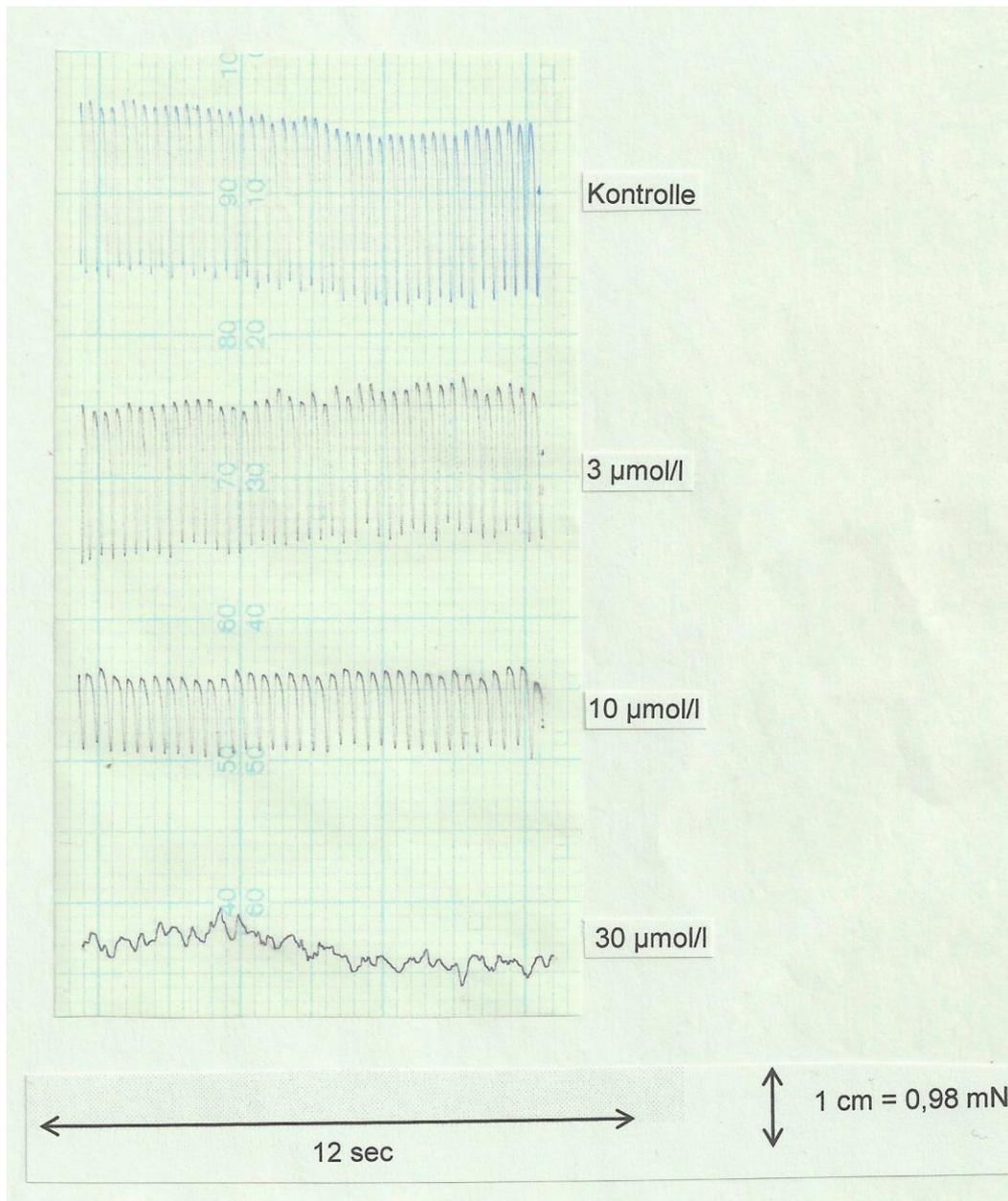
Die folgende Grafik beschreibt die Wirkung der Testsubstanz auf den Vorhof und veranschaulicht die Abnahme der Schlagfrequenz.

Auf der x-Achse wird logarithmisch die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in %. Die schwarzen Punkte zeigen die jeweils berechneten arithmetischen Mittelwerte und die Balken die Standardfehler. Den  $\text{EC}_{50}$ -Wert, welcher  $13,9\mu\text{mol/l}$  beträgt, kann man durch die gestrichelten Linien ebenfalls aus dem Diagramm ablesen.



**Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MGte1 am Vorhof**

Diese angeführten Originalaufzeichnungen zeigen die Schlagfrequenz des Vorhofes in Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz MGte1. Man erkennt deutlich die Abnahme der Chronotropie mit steigender Substanzgabe. Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  kam es bei diesem Versuch zum Erlöschen der Frequenz.



**Abbildung 12: Originalaufzeichnungen der Wirkung von MGte1 auf den Vorhof**

## 4.2 Lungenarterie

Es wurden insgesamt 4 Versuche durchgeführt, um eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz MGte1 auf die Lungenarterie zu untersuchen.

Der Mittelwert der Kontrolle betrug  $8,76 \pm 0,98\text{mN}$ , dies entsprach 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Tabelle 6 zeigt, wie auch schon beim Vorhof, die Substanzmengen in  $\mu\text{mol/l}$ , die in das Organbad getropft wurden, die Mittelwerte samt Standardfehler, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

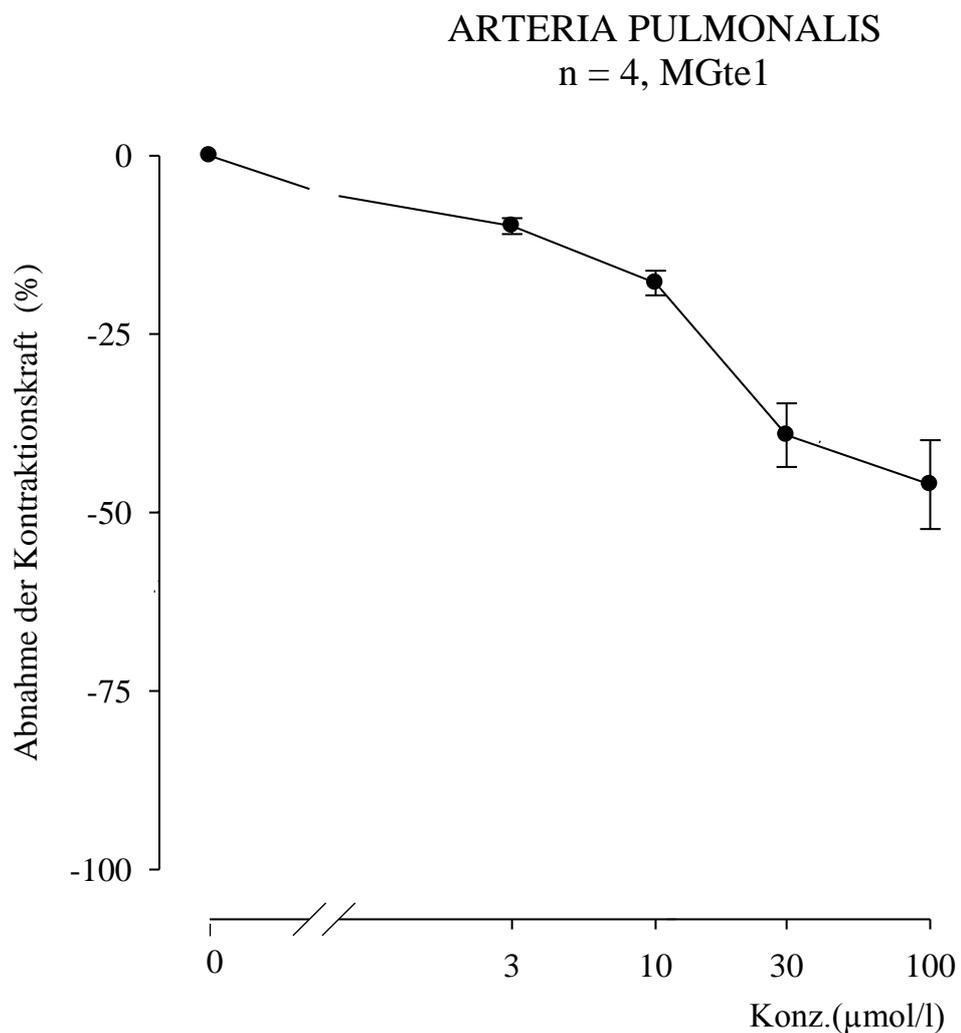
<b>MGte1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</b>
Kontrolle	$8,76 \pm 0,98$	$100 \pm 0$	4	-
3	$7,77 \pm 1,05$	$90,13 \pm 1,12$	4	0,05
10	$7,06 \pm 0,92$	$82,15 \pm 1,71$	4	0,05
30	$5,32 \pm 0,89$	$60,84 \pm 4,46$	4	0,01
100	$4,62 \pm 0,77$	$53,91 \pm 6,23$	4	0,01

**Tabelle 6: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MGte1 an der Lungenarterie**

Dieses Diagramm zeigt den Effekt von MGte1 auf die Lungenarterie.

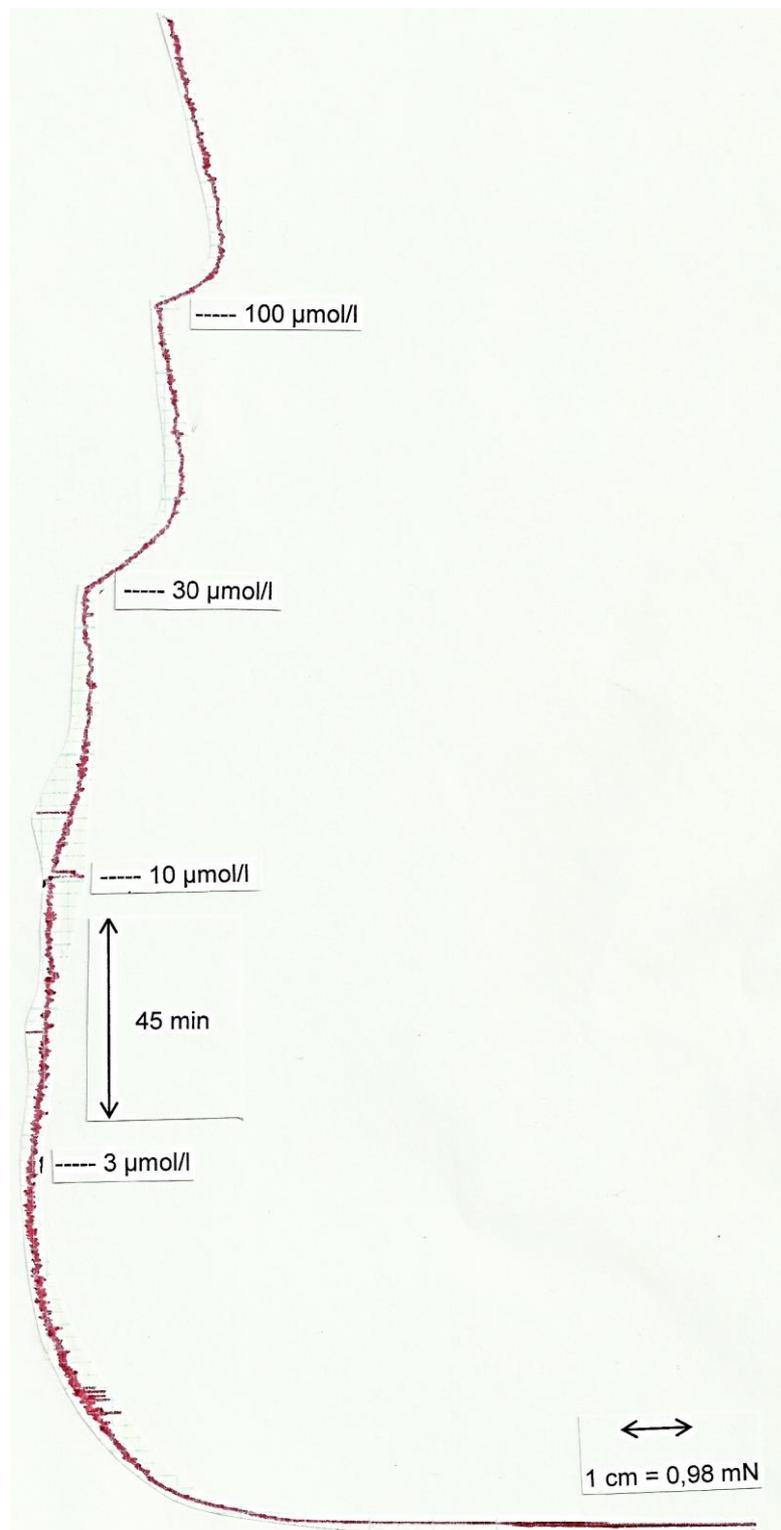
Auf der x-Achse wird logarithmisch die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die schwarzen Punkte markieren, ebenfalls wie beim Vorhof, die jeweils berechneten arithmetischen Mittelwerte und die Balken stellen die Standardfehler dar.

Mit zunehmender Konzentration der Prüfsubstanz ist eine minimale Dilatation feststellbar, jedoch ist diese zu gering um die  $\text{EC}_{50}$  zu ermitteln.



**Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MGte1 an der Lungenarterie**

Diese Originalaufnahmen des Schreibers auf dem Millimeterpapier zeigen eine geringe Dilatation durch die Zugabe der Testsubstanz MGte1.



**Abbildung 13: Originalaufzeichnungen der Wirkung von MGte1 an der Lungenarterie**

### 4.3 Papillarmuskel

Am Papillarmuskel wurden für die Untersuchung der inotropen Wirkung von MGte1 6 Versuche vorgenommen.

Der Kontrollwert betrug  $1,12 \pm 0,13\text{mN}$ , dies entsprach 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Tabelle 7 zeigt die Substanzkonzentrationen, die Mittelwerte, Standardfehler, Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

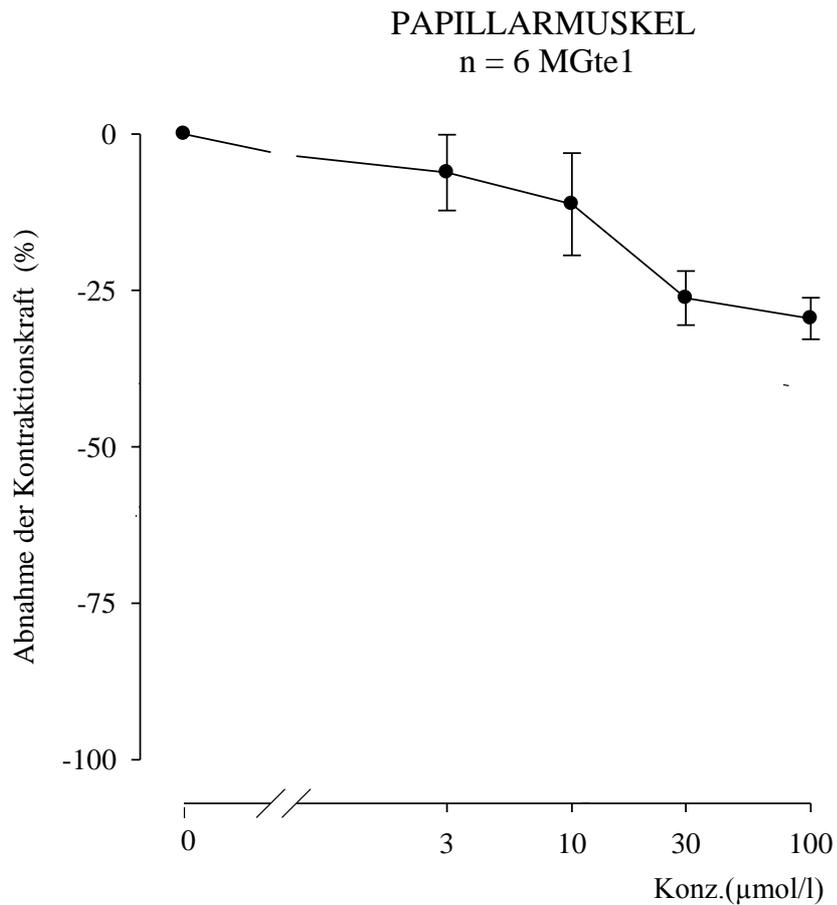
<b>MGte1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</b>
Kontrolle	$1,12 \pm 0,13$	$100 \pm 0$	6	-
3	$1,02 \pm 0,11$	$93,82 \pm 6,06$	6	n.s.
10	$0,97 \pm 0,14$	$88,77 \pm 8,18$	6	0,05
30	$0,82 \pm 0,10$	$73,76 \pm 4,32$	6	0,05
100	$0,77 \pm 0,09$	$70,50 \pm 3,31$	6	0,05

**Tabelle 7: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MGte1 am Papillarmuskel**

Diese Grafik zeigt den Einfluss von MGte1 am Papillarmuskel.

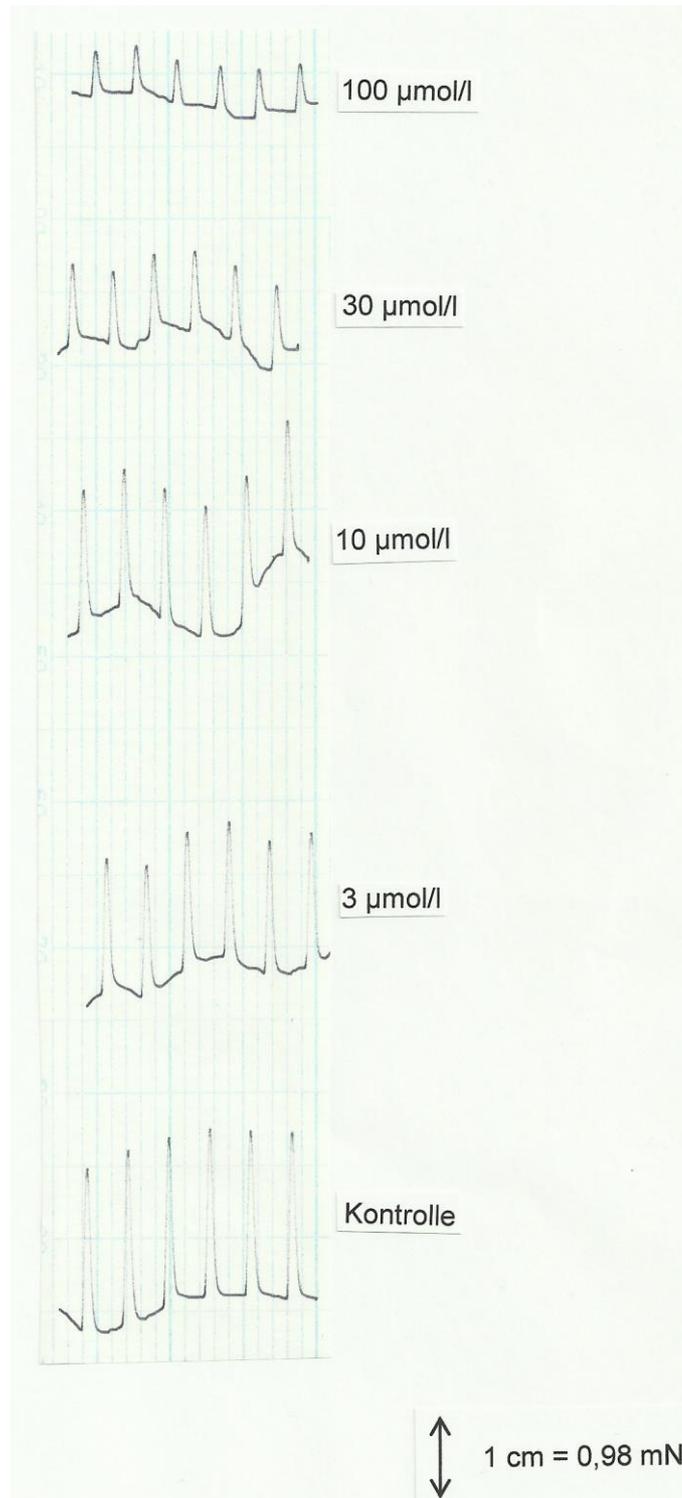
Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration in  $\mu\text{mol/l}$  dargestellt und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte zeigen wieder die Mittelwerte der Ergebnisse und die Balken die Standardfehler.

Nach Zugabe der Prüfsubstanz kam es bei diesem Versuch zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft.



**Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MGte1 am Papillarmuskel**

Diese Kurven zeigen die Abnahme der Amplituden bei der Zugabe der Prüfsubstanz, da diese eine negativ inotrope Wirkung aufweist.



**Abbildung 14: Originalaufzeichnungen der Wirkung von MGTe1 am Papillarmuskel**

## 4.4 Aorta

An der Aorta wurden 4 Untersuchungen durchgeführt, um eine dilatierende Wirkung von MGte1 zu untersuchen.

Der Kontrollwert lag bei  $9,38 \pm 2,45$  mN, dies entsprach 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Tabelle 8 fasst die Substanzkonzentrationen, die errechneten arithmetischen Mittelwerte, Standardfehler, Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit zusammen.

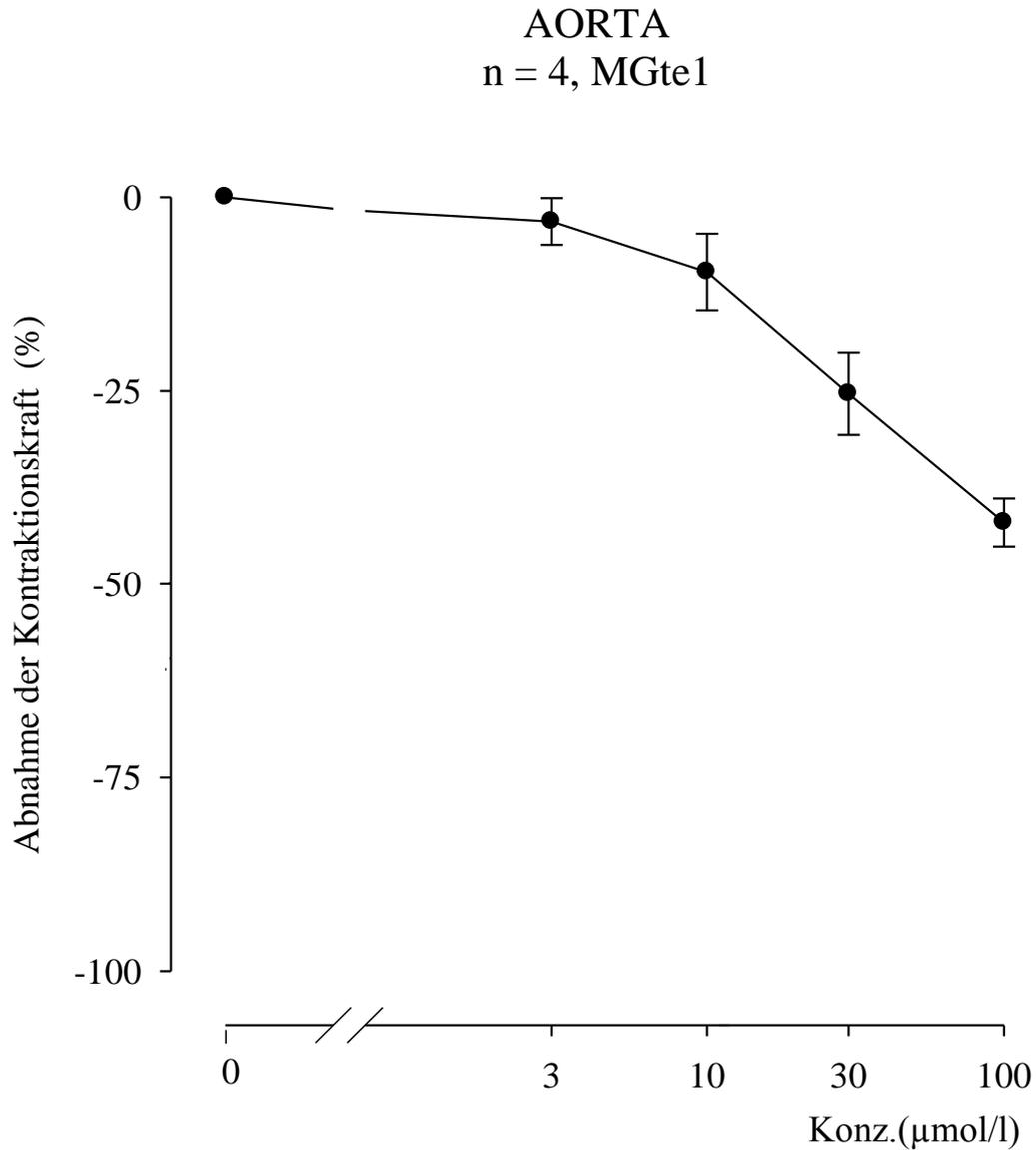
<b>MGte1 (<math>\mu</math>mol/l)</b>	<b><math>f_c \pm</math> SEM (mN)</b>	<b><math>f_c \pm</math> SEM (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</b>
Kontrolle	$9,38 \pm 2,45$	$100 \pm 0$	4	-
3	$8,88 \pm 2,04$	$96,85 \pm 3,02$	4	n.s.
10	$8,15 \pm 1,68$	$90,33 \pm 4,95$	4	n.s.
30	$6,06 \pm 1,20$	$74,64 \pm 5,30$	4	0,05
100	$5,43 \pm 1,34$	$58,01 \pm 3,11$	4	0,01

**Tabelle 8: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MGte1 an der Aorta**

Die folgende Kurve zeigt die Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta.

Auf der Abszisse ist die Substanzkonzentration in  $\mu\text{mol/l}$  dargestellt und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Mittelwerte der Ergebnisse mit den Standardfehlern werden als schwarze Punkte mit vertikalen Balken dargestellt.

Man erkennt eine minimal dilatierende Wirkung der Testsubstanz auf das Organ. Die Dilatation ist aber so gering, sodass keine  $\text{EC}_{50}$  ermittelt werden konnte.



**Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MGte1 an der Aorta**

Diese Abbildung zeigt die gering dilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta.

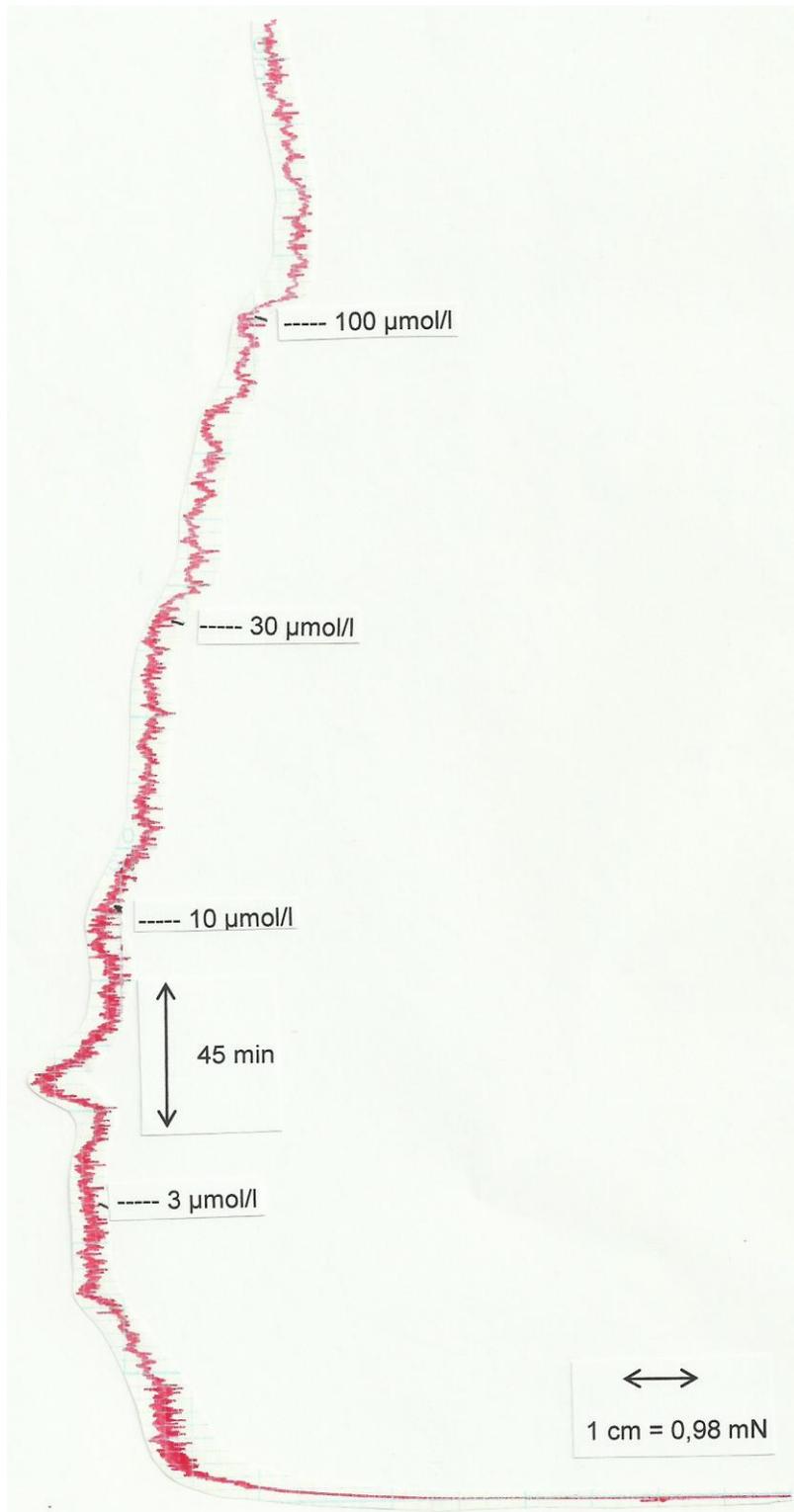


Abbildung 15: Originalaufzeichnungen der Wirkung von MGte1 an der Aorta

## 4.5 Dünndarm

Die Wirkung auf den Dünndarm wurde in einer Versuchsreihe von 5 Versuchen durchgeführt.

Der Mittelwert der Kontrolle war  $8,56 \pm 1,68$  mN, dies entsprach 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

In der Tabelle 9 werden die Ergebnisse dargestellt.

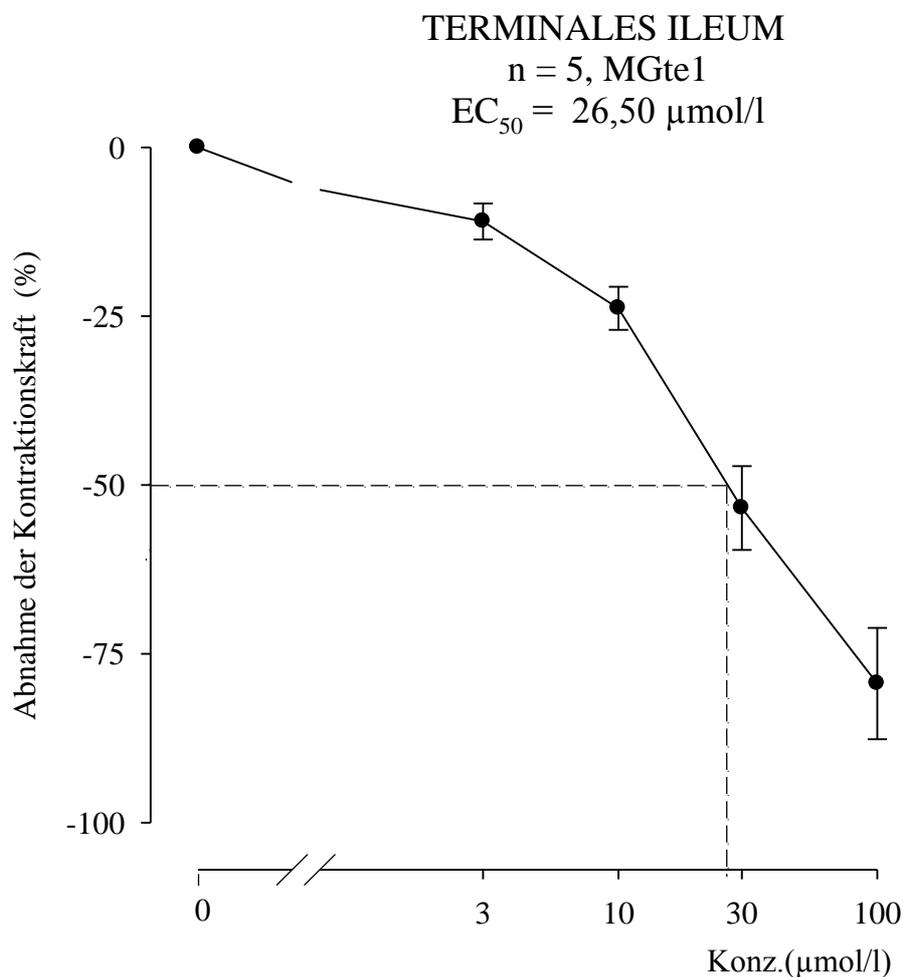
<b>MGte1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</b>
Kontrolle	$8,56 \pm 1,68$	$100 \pm 0$	5	-
3	$8,23 \pm 1,72$	$95,58 \pm 2,67$	5	n.s.
10	$7,40 \pm 1,56$	$85,94 \pm 3,19$	5	0,05
30	$5,17 \pm 1,12$	$60,78 \pm 6,22$	5	0,01
100	$3,34 \pm 1,06$	$37,97 \pm 8,24$	5	0,01

**Tabelle 9: Versuchsergebnisse der Testsubstanz MGte1 am Dünndarm**

In der folgenden Grafik ist deutlich zu erkennen, dass die Kontraktionskraft des Dünndarmes in Gegenwart der Prüfsubstanz MGte1 abnimmt. Das bedeutet, dass durch zunehmende Substanzgabe die spasmolytische Wirkung verstärkt wird.

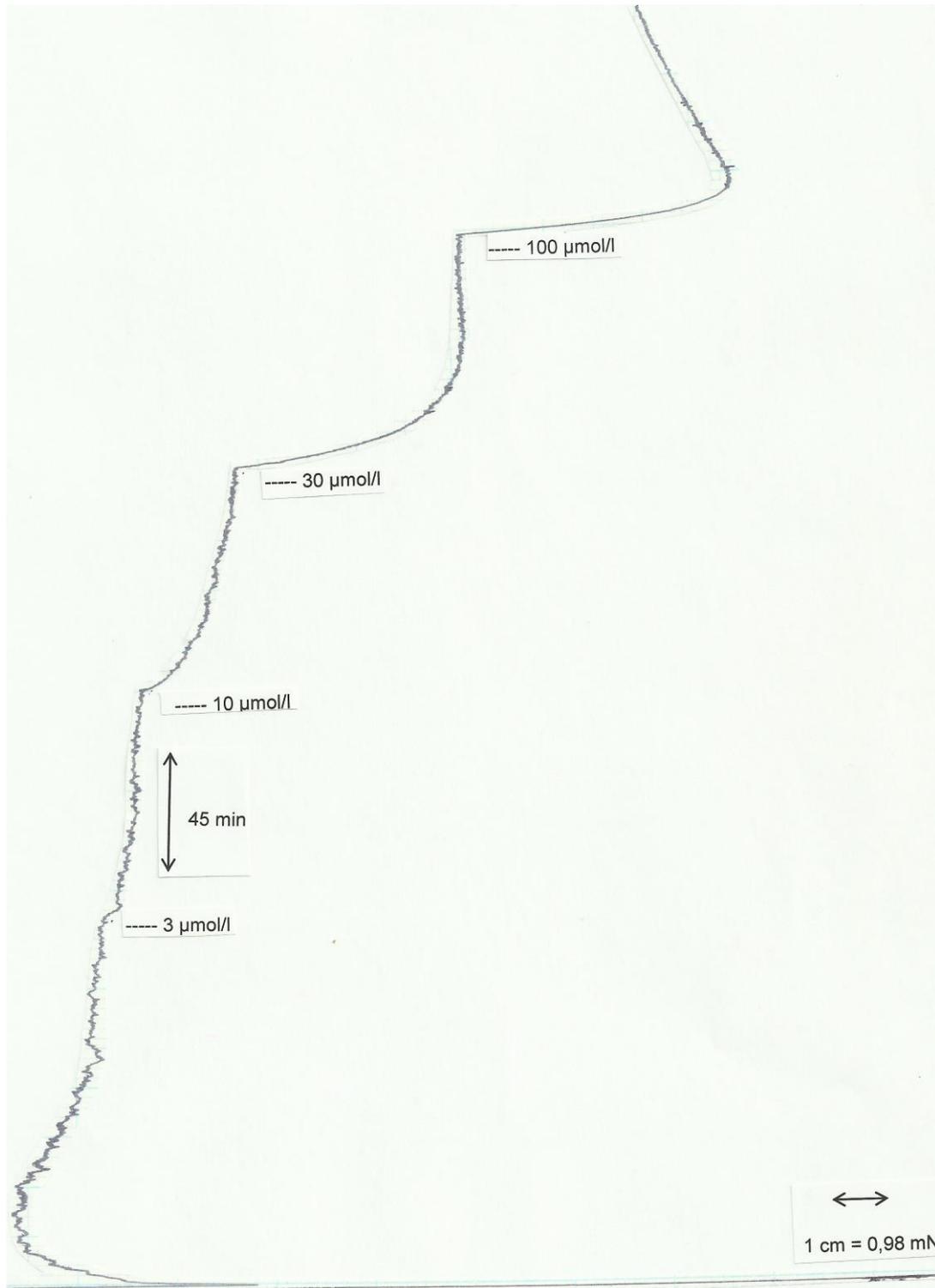
Auf der Abszisse ist die Substanzkonzentration in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Mittelwerte der Ergebnisse mit den Standardfehlern werden wieder als schwarze Punkte mit vertikalen Balken dargestellt.

Aufgrund der starken Wirkung von MGte1 konnte die  $EC_{50}$ , die  $26,50\mu\text{mol/l}$  beträgt, berechnet werden, welche in der Grafik ersichtlich ist.



**Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MGte1 am Dünndarm**

Die in den Originalaufnahmen sich stark nach rechts neigende Kurve bestätigt das Ergebnis, dass es bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz zu einer spasmodischen Wirkung am Dünndarm kommt.



**Abbildung 16: Originalaufzeichnungen der Wirkung von MGte1 am Dünndarm**

## 4.6 Analyse des Wirkmechanismus

Da die Testsubstanz MGte1 am Dünndarm die effektivste Wirkung zeigte, wurden an diesem weitere Untersuchungen durchgeführt.

Ziel war es, den vermuteten Wirkmechanismus der Prüfsubstanz aufzuklären. Dafür wurde der  $K_{ATP}$ -Kanalblocker Glibenclamid eingesetzt, der bereits erläutert wurde. Es sollte herausgefunden werden, ob die Wirkung von MGte1 durch eine Öffnung der Kaliumkanäle bedingt war.

Es wurden je drei Versuchsreihen mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Glibenclamid durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe arbeitete man mit  $30\mu\text{mol/l}$ , in der zweiten mit  $100\mu\text{mol/l}$ .

Bei diesen Versuchsreihen wurde zuerst der  $K_{ATP}$ -Kanalblocker in das Organbad pipettiert und 45 Minuten später die Prüfsubstanz.

### 4.6.1 Ergebnisse der Versuche mit $30\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Die Tabelle 10 zeigt die Substanzmenge von Glibenclamid und die der Testsubstanz MGte1 in  $\mu\text{mol/l}$ , die in das Organbad pipettiert wurden, die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardfehler, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

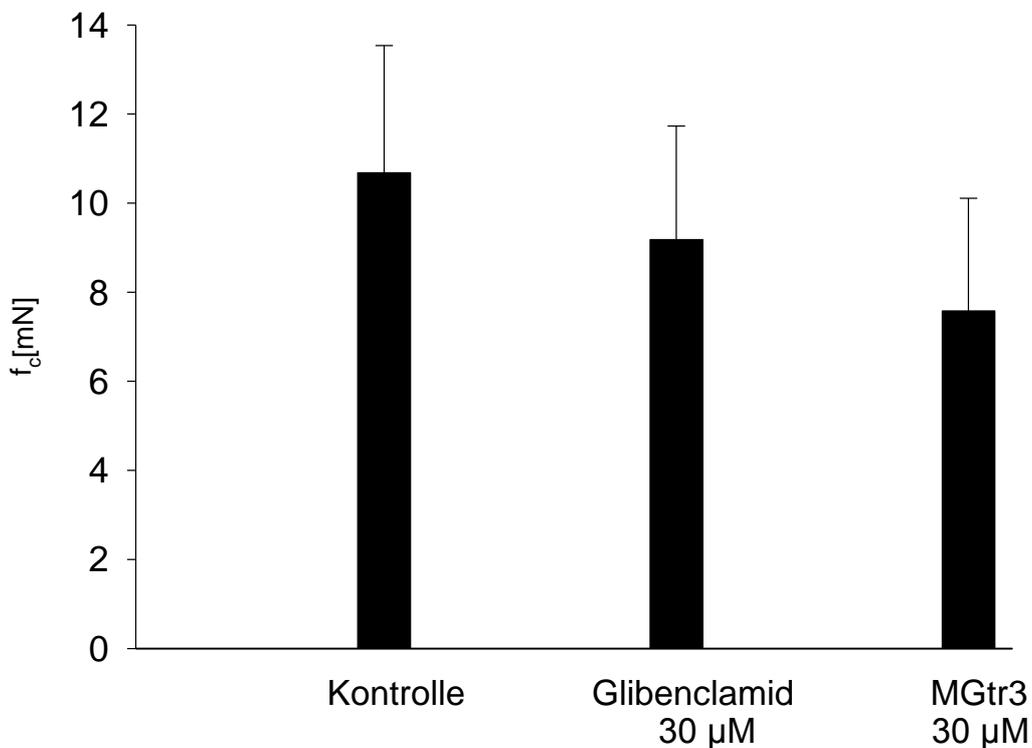
Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,68 \pm 2,86$	3	-
Glibenclamid 30	$9,18 \pm 2,55$	3	-
+ MGte1 30	$7,58 \pm 2,53$	3	n.s.

**Tabelle 10: Wirkung von  $30\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid auf das terminale Ileum**

Dieses Balkendiagramm beschreibt die Auswirkung auf die Kontraktionskraft des Darmes nach Zugabe von 30µmol/l Glibenclamid und anschließender Gabe von 30µmol/l der Testsubstanz MGte1.

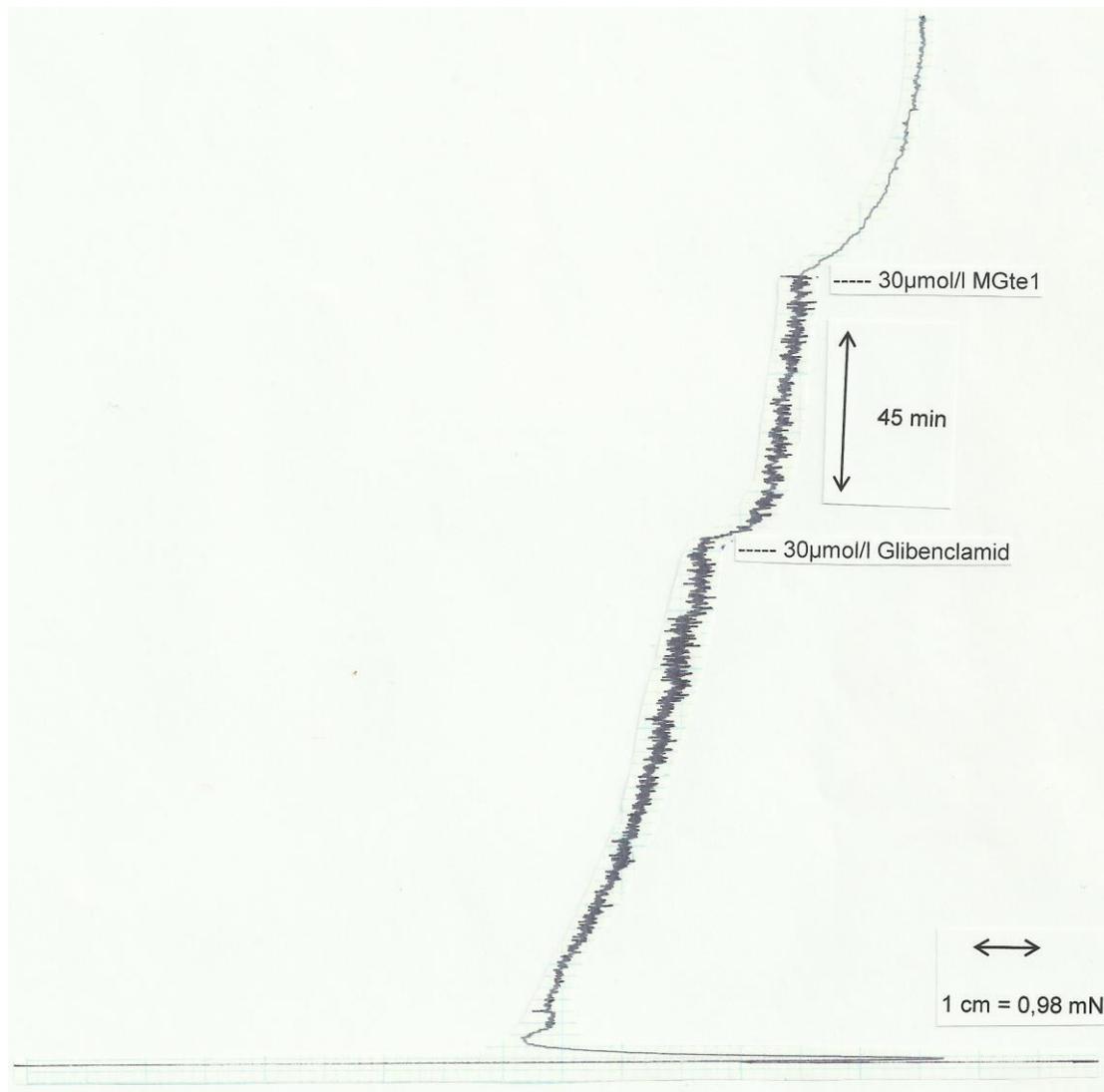
Auf der x-Achse sind der Kontrollwert und die zugefügten Mengen an Glibenclamid und Testsubstanz aufgetragen, während auf der y-Achse die Kontraktionskraft dargestellt ist, welche dem Kontrollwert von 100% entspricht.

### Terminales Ileum, Glibenclamid MGte1, 30 µmol/l n=3



**Diagramm 6: Graphische Darstellung der Wirkung von 30µmol/l Glibenclamid unter Zugabe von 30µmol/l MGte1 in einem Balkendiagramm**

Diese angeführten Originalaufzeichnungen zeigen die Abnahme der Kontraktionskraft während der Glibenclamid-Phase, welche nach der Zugabe von MGte1 leicht verstärkt wurde.



**Abbildung 17: Originalaufzeichnungen der Wirkung von 30 µmol/l Glibenclamid unter Zugabe von 30 µmol/l MGte1**

## 4.6.2 Ergebnisse der Versuche mit 100µmol/l Glibenclamid

Die Tabelle 11 beschreibt die Ergebnisse der Testsubstanz am Dünndarm in Gegenwart von 100µmol/l Glibenclamid.

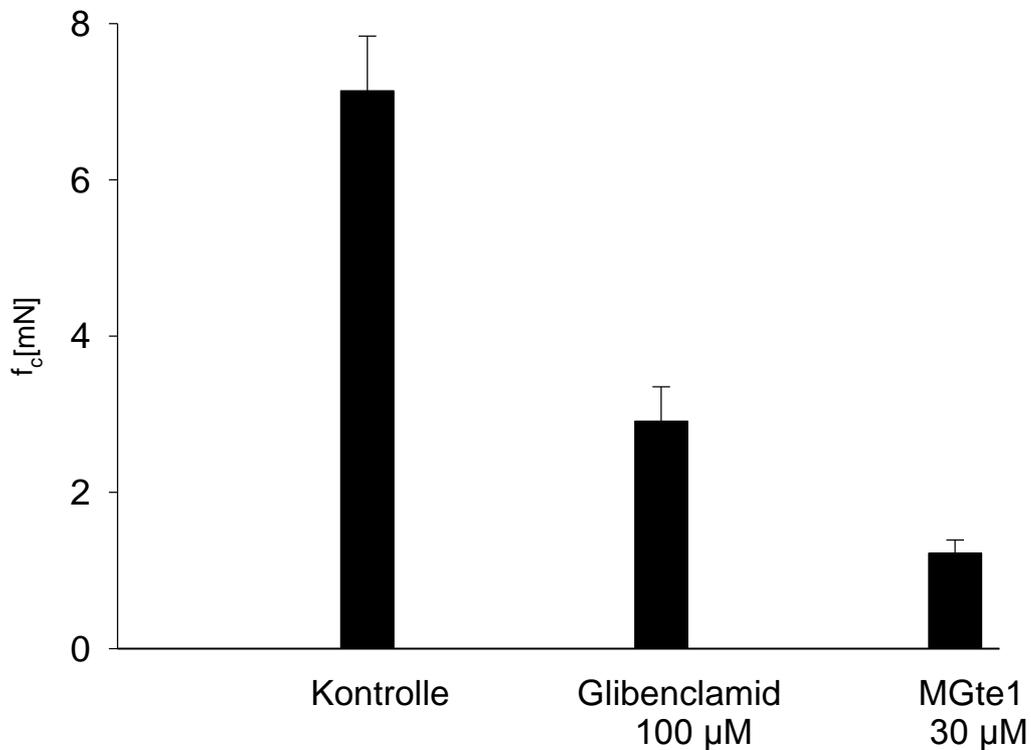
Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	7,14 ± 0,7	3	-
Glibenclamid 100	2,91 ± 0,44	3	-
+ MGte1 30	1,22 ± 0,17	3	0,05

**Tabelle 11: Wirkung von 100µmol/l Glibenclamid auf das terminale Ileum**

Diese Grafik stellt die Auswirkung auf die Kontraktionskraft des Darmes nach Zugabe von 100µmol/l Glibenclamid und anschließender Gabe von 30µmol/l von MGte1 dar.

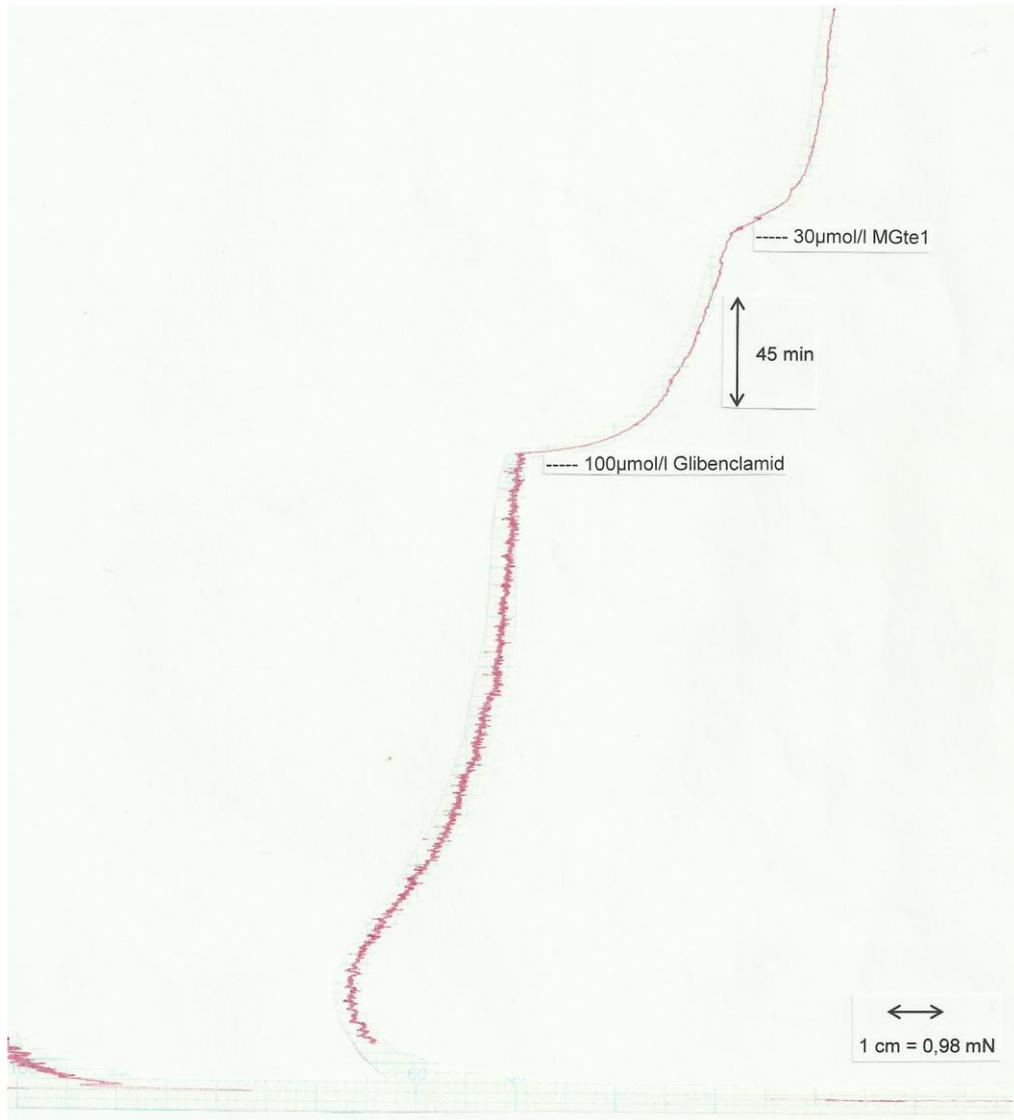
Auf der x-Achse sind wieder der Kontrollwert und die zugeführten Mengen an Glibenclamid und Testsubstanz aufgetragen, während auf der y-Achse die Kontraktionskraft dargestellt ist, welche dem Kontrollwert von 100% entspricht.

**Terminales Ileum, Glibenclamid  
MGte1, 30 µmol/l  
n=3**



**Diagramm 7: Graphische Darstellung der Wirkung von 100µmol/l Glibenclamid unter Zugabe von 30µmol/l MGte1 in einem Balkendiagramm**

Diese Kurve zeigt, dass es nach Zugabe von Glibenclamid zu einer Abnahme der Kontraktion des Ileum kommt. Durch die Zugabe der Testsubstanz wird die Spasmodolyse verstärkt.



**Abbildung 18: Originalaufzeichnungen der Wirkung von 100µmol/l Glibenclamid unter Zugabe von 30µmol/l MGte1**

Aus diesen Testungen zum Wirkmechanismus kann geschlossen werden, dass die spasmodolytische Wirkung von MGte1 zumindest teilweise durch die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zustande kommen könnte, was vor allem deutlich bei der ersten Versuchsreihe, bei der 30µmol/l Glibenclamid in das Organbad pipettiert wurde, erkennbar ist.

## 5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde durch Untersuchungen an fünf verschiedenen Organen von Meerschweinchen mögliche Wirkungen der neu synthetisierten Substanz MGte1 geprüft. Weiters wurde der Wirkmechanismus der Testsubstanz genauer untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es ein pharmakologisches Wirkprofil der Prüfsubstanz MGte1 zu erstellen.

Mithilfe von Präparaten des rechten Vorhofes und des Papillarmuskels wurden die Wirkungen auf die quergestreifte Herzmuskulatur erforscht. Die Versuchsdurchführung am rechten Vorhof diente dabei der Ermittlung einer chronotropen Wirkung, während am Papillarmuskel eine eventuell vorhandene inotrope Wirkung untersucht wurde.

Die Lungenarterie, Aorta und der Darm wurden verwendet, um Wirkungen von MGte1 auf die glatte Muskulatur herauszufinden. Lungenarterie und Aorta wurden auf eine eventuell auftretende vasodilatierende Wirkung analysiert, die Versuche am Darm dienen dem Eruiere einer spasmolytischen Wirkung.

In diesem Kapitel werden die Effekte von MGte1 auf glattmuskuläre Organe und auf Herzmuskelpräparate analysiert.

### 5.1 Versuchsreihen an der quergestreiften Herzmuskulatur

Der rechte Vorhof, welcher auf positive bzw. negative Chronotropie geprüft wurde, verfügt über ein spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten.

Der Papillarmuskel, welcher auf positive bzw. negative Inotropie getestet wurde, musste elektrisch gereizt werden.

Organpräparat	MGte1 $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC <sub>50</sub>
Vorhof	0,00 $\pm$ 0,00	13,90 $\mu\text{mol/l}$
Papillarmuskel	70,50 $\pm$ 3,31	> 100 $\mu\text{mol/l}$

**Tabelle 12: Wirkung von MGte1 auf die quergestreifte Herzmuskulatur**

Anhand der in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass die Testsubstanz MGte1 eine starke Wirkung auf den Vorhof hat.

Die Versuche zeigten, dass die Schlagfrequenz bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz um 29% abnahm. Bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$  kam es in allen 4 Versuchen sogar zum Absterben des Organs. Dies bedeutet, dass die Prüfsubstanz einen starken Effekt auf den Vorhof ausübt.

Der EC<sub>50</sub>-Wert der Prüfsubstanz beträgt am rechten Vorhof 13,90 $\mu\text{mol/l}$ , was auf eine stark negativ chronotrope Wirkung zurückzuführen ist.

Klinisch relevante Arzneistoffe sollten prinzipiell eine EC<sub>50</sub> von weniger als 30 $\mu\text{mol/l}$  aufweisen.

Es ist festzuhalten, dass eine EC<sub>50</sub> von 13,90 $\mu\text{mol/l}$  somit für einen therapeutischen Einsatz geeignet wäre. Eine perorale Gabe wäre in diesem Fall möglich. Generell ist ein Wirkstoff umso besser anwendbar, je niedriger die effektive Konzentration ist.

Am Papillarmuskel konnte nur eine minimal negativ inotrope Wirkung erkannt werden.

Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$  Prüfsubstanz betrug die Abnahme der Kontraktionskraft nur etwa 30%.

Die Ausprägung der Wirkung war zu gering, um in weiterer Folge eine EC<sub>50</sub> berechnen zu können.

## 5.2 Versuchsreihen an glattmuskulären Organen

Zu den glattmuskulären Organen der verwendeten Präparaten zählten die Lungenarterie, die Aorta und der Dünndarm.

Organpräparat	MGte1 $f_c \pm SEM$ (%) bei 100 $\mu$ mol/l	EC <sub>50</sub>
Lungenarterie	53,91 $\pm$ 6,23	> 100 $\mu$ mol/l
Aorta	58,01 $\pm$ 3,11	> 100 $\mu$ mol/l
Dünndarm	37,97 $\pm$ 8,24	26,50 $\mu$ mol/l

**Tabelle 13: Wirkung von MGte1 auf die glatte Muskulatur**

Mithilfe der Ergebnisse in der Tabelle 13 wird ersichtlich, dass die Testsubstanz an der Lungenarterie nur zu einer gering dilatierenden Wirkung führt.

Bei einer Konzentration von 100 $\mu$ mol/l Testsubstanz lag die Kontraktionskraft des Organs noch immer bei 54%.

Die Wirkung war zu gering, um die EC<sub>50</sub> zu berechnen.

Die Ergebnisse an der Aorta lieferten ebenfalls nur eine minimal dilatierende Wirkung.

Bei einer Konzentration von 100 $\mu$ mol/l Prüfsubstanz betrug die Abnahme der Kontraktionskraft 42%.

Auch hier konnte keine EC<sub>50</sub> berechnet werden, da die Wirkung zu gering war.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Prüfsubstanz am Darm eine signifikante Wirkung hervorruft.

Bei einer Konzentration von 30 $\mu$ mol/l Testsubstanz betrug die Abnahme der Kontraktionskraft fast 40%, bei der Endkonzentration von 100 $\mu$ mol/l bereits 62%. Dies bedeutet, dass es bei der Endkonzentration zu einem stark spasmolytischen Effekt kam. Der Dünndarm wurde somit durch die Prüfsubstanz MGte1 relaxiert.

Der EC<sub>50</sub>-Wert konnte aus der deutlichen Wirksamkeit ermittelt werden. Die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt, beträgt 26,50 $\mu$ mol/l.

Da der  $EC_{50}$ -Wert weniger als  $30\mu\text{mol/l}$  beträgt, wäre diese Testsubstanz klinisch relevant, eine orale Gabe wäre möglich.

Der spasmolytische Effekt von MGte1 auf den Darm stellte in weiterer Folge die Grundlage für die Testungen des Wirkmechanismus dar.

Wenn man nun alle Versuchsreihen mit den verschiedenen Organen in Augenschein nimmt, ist zu erkennen, dass die Testsubstanz MGte1 nicht organspezifisch wirkt, da es am Vorhof und auch am Darm zu einer signifikanten Wirkung kommt. Die Wirkung auf den Papillarmuskel ist minimal, und auf die Lungenarterie und Aorta schwach.

Für einen Arzneistoff wäre eine organspezifische Wirkung wünschenswert, somit ist es fragwürdig, ob ein therapeutischer Einsatz sinnvoll wäre.

Das Nebenwirkungsprofil an der Herzmuskulatur könnte zu schwerwiegenden Komplikationen führen, wenn die stark spasmolytische Wirkung am Darm genutzt würde.

Ob man als Einsatzgebiet Herz oder Darm wählt, mit gravierenden Nebenwirkungen müsste gerechnet werden.

### **5.3 Versuchsreihen mit MGte1 in Kombination mit Glibenclamid**

Die Wirkung von MGte1 wurde wie bereits erwähnt in Kombination mit dem  $K_{ATP}$ -Kanalblocker Glibenclamid am Dünndarm analysiert.

Es wurde geprüft, ob die gefäßerweiternde Wirkung auf Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen beruht. Man wollte herausfinden, ob die Prüfsubstanz MGte1 in der Lage ist, blockierte Kaliumkanäle zu öffnen.

In der ersten Versuchsreihe wurde mit  $30\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid gearbeitet, in der zweiten mit  $100\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid.

### **5.3.1 Versuche mit MGte1 in Kombination mit 30µmol/l Glibenclamid**

Zu Beginn des Versuchs wurde mithilfe einer Kaliumchloridlösung eine Vorkontraktion des Dünndarms erreicht. Danach wurden 30µmol/l Glibenclamid in das Organbad pipettiert, wodurch es zu einer leichten Abnahme der Kontraktion kam. Nach 45 Minuten wurden schließlich 30µmol/l der Testsubstanz zugetropft. Nun kam es zu einer verstärkten Abnahme der Kontraktionskraft.

### **5.3.2 Versuche mit MGte1 in Kombination mit 100µmol/l Glibenclamid**

In dieser Versuchsreihe wurden anstatt 30µmol/l Glibenclamid nun 100µmol/l Glibenclamid zugefügt, wodurch es wieder zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft kam, welche nach Zugabe der 30µmol/l Testsubstanz noch verstärkt wurde.

Anhand der Ergebnisse zum Wirkmechanismus kommt man zum Schluss, dass die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz MGte1 zumindest teilweise durch Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen zustande kommen könnte.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die in vitro Untersuchung von einer am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisierten Testsubstanz.

Es wurde ein pharmakologisches Wirkprofil der neu entwickelten Substanz MGte1 erstellt.

Für die Untersuchungen wurden vom Meerschweinchen der rechte Vorhof und der Papillarmuskel getestet, welche zur quergestreiften Herzmuskulatur gehören, und die Lungenarterie, Aorta und der Dünndarm, welche zur glatten Muskulatur zählen.

Die chronotropen, inotropen, gefäßerweiternden und krampflösenden Effekte konnten durch isometrische Kontraktionsmessung bestimmt werden.

Die Meerschweinchenorgane mussten täglich frisch entnommen und danach präpariert werden, um in die Versuchsaapparaturen eingespannt zu werden. Die Organbäder wurden mit einer begasten Nährlösung befüllt, um einen Versuchsablauf bei physiologischen Bedingungen zu gewährleisten.

Die Prüfsubstanz MGte1, welche in Dimethylsulfoxid gelöst wurde, wurde in Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 $\mu$ mol/l getestet. Danach wurden die Auswirkungen über einen Kraftwandler und Verstärker auf einen Schreiber weitergeleitet, auf Millimeterpapier aufgezeichnet, vermessen und am Ende jeder Versuchsreihe ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass es am Vorhof zu einer stark negativ chronotropen Wirkung kommt.

Am Papillarmuskel ist nur eine minimal negativ inotrope Wirkung nachweisbar.

An der Lungenarterie und an der Aorta ist eine gering dilatierende Wirkung vorhanden.

Der Darm reagiert mit einer stark spasmolytischen Wirkung.

Die Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Wirkmechanismus, welche am Dünndarm durchgeführt wurden, bestätigen, dass die spasmolytische Wirkung zumindest teilweise durch Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle bedingt sein könnte.

Da die Wirkung nicht selektiv auf einem Organ beruht, ist der therapeutische Einsatz nicht sinnvoll, da das Nebenwirkungsprofil der Prüfsubstanz MGte1 für die Anwendung als Arzneimittel nicht vertretbar wäre.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Aktories, Förstermann, Hofman, Starke (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevir GmbH, München, 10.Auflage

Ammon HPT (2004) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. de Gruyter Verlag, Berlin, 9.Auflage

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

Gruyter W (2014) Pschremberl Klinisches Wörterbuch. de Gruyter Verlag, 266.Auflage

Hiller K, Melzig MF (2005) Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen. area verlag gmbh, Erfstadt

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2010) Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 17.Auflage

Mang C, Truempler S, Erbeling D, Kilbinger H (2002) Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice, Mainz, AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283 : G1132-G1138

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

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

Schwegler J (2006) Der Mensch Anatomie und Physiologie Schritt für Schritt Zusammenhänge verstehen. Georg Thieme Verlag, Ettlingen, 4.Auflage

## 8 CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten

Vor-und Zuname : Larissa Trimmel  
Adresse : Salesianergasse 3/3/16, 1030 Wien  
Telefon : 0676/5617212  
E-Mail : larissi@gmx.at  
Geburtsdatum : 7.12.1985  
Staatsangehörigkeit : Österreich  
Familienstand : ledig  
Eltern : Mag. Karla Trimmel, AHS-Lehrerin  
Dr. Robert Trimmel, Gynäkologe  
Geschwister : DI Raffael Trimmel, Informatiker

### Ausbildung

1992 bis 1996 Volksschule Wolfgarten Eisenstadt  
1996 bis 2001 Gymnasium Mattersburg  
2001 bis 2004 Gymnasium Theresianum Eisenstadt  
(Schwerpunkt Musik und Kunst)  
seit Okt. 2004 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

### Vorangegangene Tätigkeiten

seit 1.Okt. 2004 geringfügig beschäftigt in der Ordination  
Dr. Robert Trimmel (FA für Gynäkologie und Geburtshilfe in 7132 Frauenkirchen)