



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Bioaktivität eines neu synthetisierten Pyrazol-Derivats  
(BW 16) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von / submitted by

Kerstin Brunner

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

Wien, 2018/ Vienna, 2018

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. Mag. Dr. Christian Studenik

## *Danksagung*

*Recht herzlich möchte ich mich bei den Personen bedanken, die bei der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt und mich unterstützt haben.*

*In erster Linie möchte ich meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Realisierung meiner Arbeit danken. Er ermöglichte es mir, diese Arbeit im Rahmen meines Studiengangs zu schreiben und unterstützte mich stets mit seiner freundlichen Art und seinem kompetenten Fachwissen. Somit konnte ich den praktischen Teil meiner Arbeit in einer angenehmen Atmosphäre absolvieren. Vielen herzlichen Dank!*

*Ein weiteres Dankeschön gilt den Menschen, die im Laufe der Studienjahre zu guten Freunden wurden. Durch sie bestand der Unialltag auch aus vielen fröhlichen Stunden und wurde durch lustige Momente bereichert.*

*Der größte Dank gebührt meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht und mich all die Jahre immerzu unterstützt haben. Nur durch ihre Liebe, Zuversicht und Hilfsbereitschaft ist es mir gelungen diesen Weg zu gehen. Ich schätze mich unheimlich glücklich, solch eine wundervolle Familie zu haben.*

*Meinem lieben Freund Maximilian möchte ich für seine unermessliche Liebe, Fürsorge und sein Verständnis danken. Mit seinen Aufmunterungen gab er mir Kraft in den intensiven Lernphasen.*

*Abschließend danke ich der Arbeitsgruppe des Departments für Pharmazeutische Chemie rund um Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Wolfgang Holzer für die Bereitstellung der Testsubstanz.*

*Vielen Dank!*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Material und Methodik.....</b>	<b>9</b>
3.1. Testsubstanz .....	9
3.2. Lösungsmittel und Herstellung der Untersuchungslösung.....	10
3.3. Meerschweinchen als Versuchstiere .....	12
3.4. Versuchslösungen.....	13
3.4.1. Tyrode ( <i>Physiologische Elektrolytlösung</i> ).....	13
3.4.2. Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion an glatter Muskulatur.....	15
3.5. Organpräparate .....	16
3.5.1. Isolierung und Präparation der Organe.....	17
3.5.2. Atrium cordis dextrum .....	18
3.5.3 Musculus papillaris .....	19
3.5.4. Arteria pulmonalis.....	20
3.5.5. Terminales Ileum .....	21
3.5.6. Aorta descendens.....	22
3.6. Apparaturen zur Durchführung der Versuche .....	23
3.6.1. Prinzip des Messvorgangs.....	23
3.6.2. Apparatur I.....	24
3.6.3. Apparatur II.....	26
3.6.4. Apparatur III.....	28
3.6.5. Gaszufuhr & Wasserbad.....	29
3.7. Versuchsabläufe .....	29
3.7.1. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum .....	30
3.7.2. Versuchsablauf am Musculus papillaris.....	31
3.7.3. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis und an der Aorta descendens .....	32
3.7.4. Versuchsablauf am terminalen Ileum .....	33
3.7.5. Versuchsablauf am terminalen Ileum zur Analysierung des Wirkmechanismus von BW 16.....	34
3.8. Datenauswertung.....	35

3.8.1. Datenauswertung des Atrium cordis dextrum .....	36
3.8.2. Datenauswertung des Musculus papillaris.....	36
3.8.3. Datenauswertung von Arteria pulmonalis, Ileum terminale und Aorta descendens .	37
3.8.4. Datenauswertung an der Apparatur III.....	37
3.9. Statistik.....	38
<b>4. Resultate .....</b>	<b>39</b>
4.1. Wirkung von BW 16 auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum .....	39
4.2. Wirkung von BW 16 auf die Schlagkraft des Musculus papillaris .....	42
4.3. Wirkung von BW 16 auf die Arteria pulmonalis .....	45
4.4. Wirkung von BW 16 auf das Ileum terminale .....	48
4.5. Wirkung von BW 16 auf die Aorta descendens.....	51
4.6. Untersuchung des Wirkmechanismus von BW 16 auf das Ileum terminale.....	54
4.6.1. Wirkung von BW 16 in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf das terminale Ileum .	54
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>58</b>
5.1. Wirkung der Testsubstanz auf Organe der glatten Muskulatur.....	58
5.1.2. Wirkung der Testsubstanz auf die Arteria pulmonalis .....	59
5.1.3. Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta descendens .....	59
5.1.4. Wirkung der Testsubstanz auf das terminale Ileum.....	60
5.2. Wirkung der Testsubstanz auf Organe der quergestreiften Muskulatur.....	60
5.2.1. Wirkung der Testsubstanz auf das Atrium cordis dextrum.....	61
5.2.2. Wirkung der Testsubstanz auf den Musculus papillaris .....	61
5.2.3. Analyse des Wirkmechanismus am terminalen Ileum.....	62
<b>6. Conclusio .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>

## 1. Zielsetzung

Diese Diplomarbeit befasste sich mit einem neu synthetisierten Wirkstoff, (BW 16) um die potentielle Wirkung zu erforschen, beziehungsweise unerwünschte Nebenwirkungen an isolierten Präparaten von Meerschweinchen nachzuweisen.

Die verwendete Substanz BW 16 wurde vom Departement für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien neu synthetisiert und zur Testung auf ihre biologische Aktivität zur Verfügung gestellt.

Zur Durchführung dieser Versuche wurden sowohl Organe der glatten, als auch der quergestreiften Muskulatur verwendet.

Als Vertreter der glatten Muskulatur eigneten sich die Aorta descendens, die Aorta pulmonalis sowie das terminale Ileum. Im Gegenzug wurden als Vertreter der quergestreiften Muskulatur das Atrium cordis dextrum und der Musculus papillaris verwendet.

Der Einfluss von BW 16 auf die Aorta descendens sowie auf die Arteria pulmonalis diente dafür, um einen potentiellen vasodilatierenden Effekt nachzuweisen, beziehungsweise als unerwünschte Nebenwirkung auszuschließen. Ebenso wurde das terminale Ileum auf eine spasmolytische Veränderung getestet.

Um die Variabilität der chronotropen (der Schlagfrequenz) als auch der inotropen (der Schlagkraft) Wirksamkeit sichtbar zu machen, wurden für diese Untersuchungen das Atrium cordis dextrum sowie der Musculus papillaris herangezogen.

Für die jeweiligen Organe wurden nach Beendigung der Versuche eine Konzentrationswirkungskurve graphisch dargestellt und die dazugehörige mittlere effektive Wirkkonzentration berechnet.

Um letztendlich den genauen Wirkungsmechanismus zu erforschen, wurde jenes Organ mit der größten Veränderung nach Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz verwendet. Die größte Wirksamkeit wurde bei BW 16 am terminalen Ileum nachgewiesen.

Da jede zusätzliche Wirkung an anderen Organen automatisch unerwünschte Wirkungen hervorrufen kann, ist es von Vorteil, wenn nur eine signifikante Wirkung auf eines der angeführten Organe zu beobachten ist.

## 2. Einleitung

### *Anatomie des Herzens und Hypertonie*

Das Herz ist ein kräftiger Muskel und wird im Inneren in 4 Kammern aufgeteilt: die beiden oberen heißen Herzvorhöfe, während man die beiden unteren Kammern als Herzkammer oder Ventrikel bezeichnet. Eine starke Muskelwand, das Septum, teilt die linke und die rechte Herzhälfte voneinander, während 4 Klappen den Blutfluss kontrollieren.

In jeden Vorhof münden zwei bis vier große Gefäße (Venen); unterdessen führt aus jeder Kammer ein großes Gefäß (Arterie) in den Lungen-, beziehungsweise Körperkreislauf.

Sauerstoffarmes Blut aus dem Körper gelangt über die untere und obere Hohlvene in den rechten Vorhof und anschließend in die rechte Herzkammer. Von dort wird es über die Pulmonalklappe in die Lungenarterie und weiter zur Lunge gepumpt und mit Sauerstoff angereichert (Lungenkreislauf). Danach strömt das sauerstoffreiche Blut über die Lungenvenen in den linken Vorhof zurück, gesammelt und über die Mitralklappe in die linke Herzkammer geleitet. Über austretende Gefäße (Arterien und Arteriolen) wird nun das Blut über die Aortenklappe in die Hauptschlagader (Aorta) gepumpt (Faller et al. 2012).

Die aus der linken Kammer entspringende Aorta zieht nach rechts oben und verläuft über dem aus der rechten Kammer kommenden Truncus pulmonalis in einem Bogen, um dann hinter dem Herzen weiter abwärts zu ziehen. Truncus pulmonalis ist der kurze, gemeinsame Stamm der linken und rechten Aorta pulmonalis (Paulsen et al. 2010).

Nach Abgabe des Sauerstoffs und Nährstoffe an die Organe, wird nun das sauerstoffarme Blut über eintretende Gefäße (Venen) in den rechten Vorhof des Herzens zurückgeleitet.

Man unterscheidet zwei Arten von Herzmuskelfasern, die wesentliche Funktionselemente des Herzens darstellen: Fasern des Erregungsbildungssystems sowie Fasern des Arbeitsmyokards.

Das primäre Erregungsbildungszentrum des Herzens geht vom Sinusknoten aus. Dieser befindet sich in der rechten Wand des Vorhofs und übernimmt die Funktion des primären Schrittmachers. Die von ihm ausgehenden elektrischen Impulse verteilen sich über Vorhöfe und regen Zellen zur Kontraktion an. Die Erregung breitet sich über das Arbeitsmyokard beider Atrien aus.

Dabei kommt es zu einer temporären Verzögerung der Erregungsausbreitung und wird anschließend über das His-Purkinje-System in die Kammermuskulatur fortgeleitet (Lüllmann et al. 2008). Der Atrioventrikularknoten, kurz AV-Knoten, ist im Bereich des rechten Atrium, in der Nähe des Vorhofseptums lokalisiert und ist das sekundäre Erregungsbildungszentrum des Herzens. Er ist für die Weiterleitung des Signals in die Hauptkammer verantwortlich, weshalb eine Kontraktion des Herzmuskels hervorgerufen wird (Jecklin, 2016). Somit dient der rechte Vorhof, beziehungsweise der dort befindliche Sinusknoten zur Erforschung der Chronotropie (Schlagfrequenz).

Als Blutdruck wird jener Druck bezeichnet, mit dem das Herz Blut durch das Gefäßsystem pumpt. Dieser Wert wird sowohl durch die Herzleistung als auch durch die Weite der Blutgefäße beeinflusst. Die Herzleistung ist als diejenige Blutmenge messbar, die vom Herzen pro Minute bewegt wird. Während die Gefäßweite den Widerstand bestimmt, den der Herzmuskel überwinden muss. Die Regulation erfolgt durch ein komplexes Zusammenwirken beider Parameter, in großem Maße über das vegetative Nervensystem sowie hormonell.

In der Allgemeinbevölkerung beträgt die Prävalenz der Hypertonie 23–25 %. Sie ist für Frauen etwas niedriger als für Männer.

Zur Diagnostik und Behandlung der arteriellen Hypertonie hat die Deutsche Hochdruckliga Definition und Klassifikation der Blutdruckstufen vorgeschlagen. Es basiert auf der epidemiologischen Erkenntnis, dass Sterberate und Mortalität an koronarer Herzkrankheit vom niedrigsten noch physiologischen Blutdruck aus kontinuierlich zunehmen.

Mit transportablen Blutdruckautomaten gelingt eine objektive Erfassung des Blutdrucktagesprofils, das zur Beurteilung des Schweregrades der Hypertonie und des Therapieeffektes von großem Nutzen ist. Es schützt auch davor, einen erregungsbedingten Bluthochdruck „white coat hypertension“ zu missdeuten und falsch zu behandeln. Beim ambulanten Blutdruckmonitoring (ABDM) wird der Blutdruck in halb- bis einstündigen Intervallen über 24 h gemessen. In der Nacht sinkt der Blutdruck normalerweise deutlich ab (Piper, 2012).

Die nachstehende Tabelle beschreibt die Definition und Klassifikation der Blutdruckstufen:

<i>Kategorie</i>	<i>Systolischer Druck (mmHg)</i>	<i>Diastolischer Druck (mmHg)</i>
Optimal	< 120	< 80
Normal	120–129	80–84
Noch normal	130–139	85–89
Stufe-1-Hypertonie (mild)	140–159	90–99
Stufe-2-Hypertonie (mittel)	160–179	100–109
Stufe-3-Hypertonie (stark)	$\geq 180$	$\geq 110$
Isolierte systolische Hypertonie	$\geq 140$	<90

(Quelle: Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga)

Durch Druckbelastung schädigt erhöhter Blutdruck die Arterien und das Herz. Hypertoniker haben deshalb ein zur Blutdruckhöhe proportionales Risiko an Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Schlaganfall und terminaler Niereninsuffizienz zu erkranken und zu sterben. Die Risiken steigen, wenn die Hypertonie mit weiteren Risikofaktoren der Arteriosklerose zusammentrifft: Rauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie (Piper, 2012).

Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Hypertonie:

Primäre oder essenzielle Hypertonie: Hochdruck ungeklärter pathophysiologischer Ursache mit einem Häufigkeitsanteil von 90 %. Gehäuftes familiäres Vorkommen ohne definierten Erbgang. Manifestation zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr.

Sekundäre Hypertonie: Bluthochdruck ist die Folge anderer Grunderkrankungen mit bekannter Ursache.

Nicht medikamentöse Maßnahmen wären:

- Gewichtsreduktion
- Ernährungsumstellung
- Kochsalzrestriktion
- Einschränkung des Alkoholkonsums
- Körperliche Betätigung
- Nikotinverzicht

Die 5 Wirkstoffklassen zur pharmakologischen Behandlung von arterieller Hypertonie:

- ACE-Hemmer
- AT1-Rezeptorblocker („Sartane“)
- Calciumantagonisten
- Diuretika
- Beta-Blocker

ACE-Hemmer greifen in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und senken den Blutdruck, indem sie das Angiotensin Converting Enzym und somit die Bildung des vasokonstriktorisches Angiotensin II und den Abbau des vasodilatierenden Bradykinin hemmen. Zusätzlich unterdrücken sie die Aldosteronfreisetzung und wirken damit einer Wasserretention und Natriumretention entgegen. Hinzu kommen wichtige protektive kardiovaskuläre Wirkungen durch Blockade der Bildung von Angiotensin II.

AT1-Rezeptorblocker greifen ebenfalls in das RAAS ein, das den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt und somit den Blutdruck reguliert. Durch Angiotensin 1-Rezeptorblockade hemmen sie die Angiotensin II Wirkungen und Aldosteronsekretion und dadurch sinkt die Natrium und Wasserretention und Kaliumausscheidung.

Die blutdrucksenkende Wirkung der Calciumantagonisten beruht auf der Blockade der spannungsabhängigen L-Typ Calcium Kanäle und lösen eine Dilatation der Gefäßmuskulatur aus.

Diuretika sind Substanzen, die die Harnausscheidung fördern. Durch Steigerung der Natriuresis senken sie extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen und Herzminutenvolumen. Somit werden periphere Vasokonstriktion und Blutdruck gesenkt. Ein direkter antihypertensiver Effekt ist nicht gesichert. Da die Diuretika die Wirkung fast aller Antihypertensiva verstärken, sollten sie in jeder Kombination aufgenommen werden.

Beta Blocker senken den Blutdruck, weil die Förderleistung des Herzens durch Herabsetzung der myokardialen Kontraktilität und der Herzfrequenz nachlässt. Dazu trägt bei, dass Beta Blocker die renale Reninsekretion und damit die Bildung des vasokonstriktorisches wirkenden Angiotensin II hemmen. Sie zählen nicht mehr zu den Mitteln der ersten Wahl bei Bluthochdruck (Piper 2012).

Auf Basis der aktuellen Studienlage ist der Beginn der Hypertoniebehandlung mit einer niedrig dosierten Kombinationstherapie aus Diuretikum und  $\beta$ - Adrenozeptor- Antagonisten oder Diuretikum und ACE-Hemmer hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungen als gleichwertig mit einer initialen Monotherapie anzusehen. Die ALLHAT-Studie legt nahe, bei der Kombination von zwei und mehr Antihypertensiva immer ein Diuretikum als einen Kombinationspartner zu verwenden. Wobei sich aus der Gruppe der Diuretika primär die Thiazide aufgrund ihrer längeren Wirkdauer als Antihypertensiva eignen.

Wenn das Therapieziel mit der normalen therapeutischen Dosierung einer Monosubstanz nicht erreicht wird, sollte man sich frühzeitig zur Gabe von Zweier- oder auch Dreierkombinationen entschließen, da so die Erfolgsrate erhöht wird und die Dosen (und damit der unerwünschten Wirkungen) der individuellen Kombinationspartner klein gehalten werden können (Forth et al.2017).

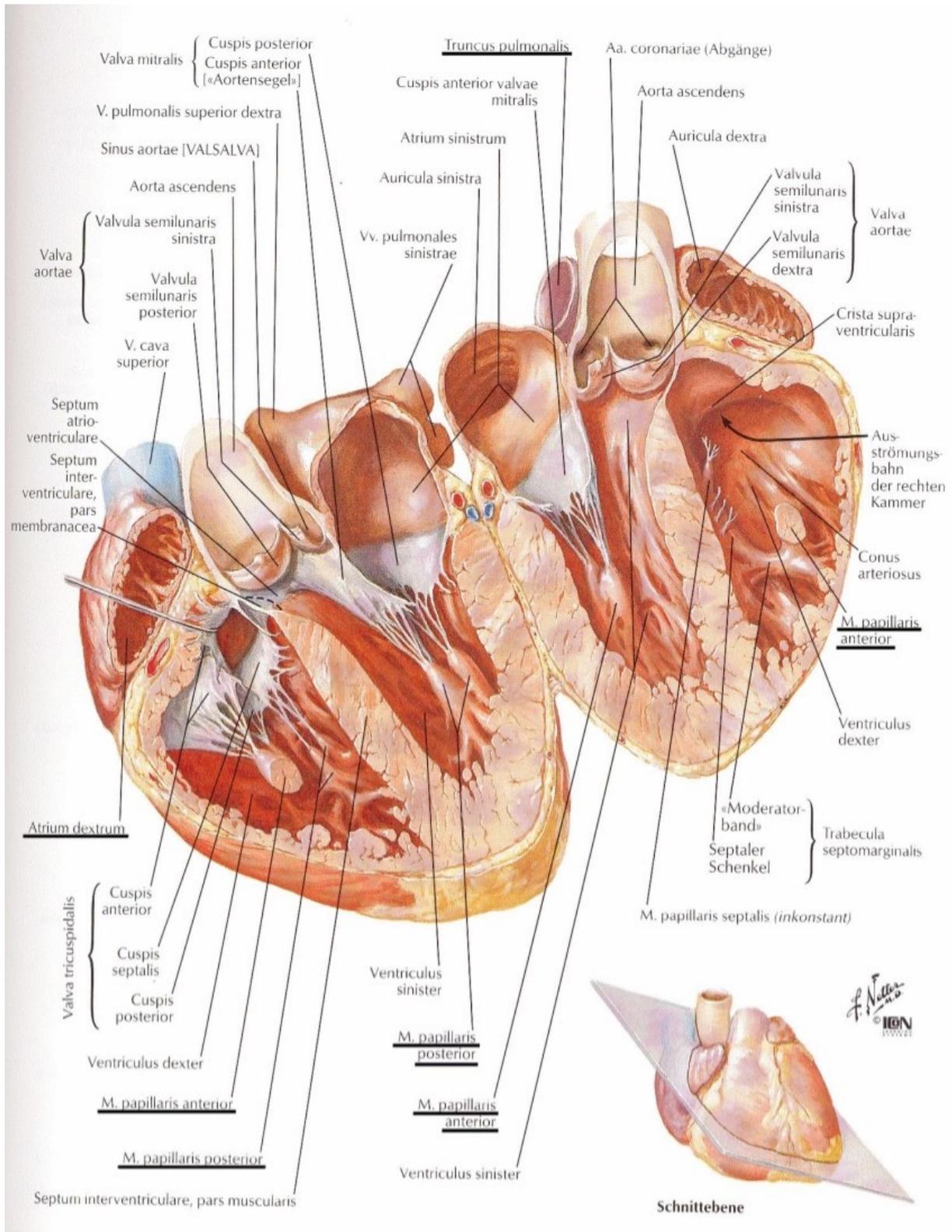


Abbildung 1: anatomische Darstellung des Herzens (Netter 2003)

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Testsubstanz

Bei der Testsubstanz BW 16, die im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht wurde, handelt es sich um folgende chemische Verbindung:

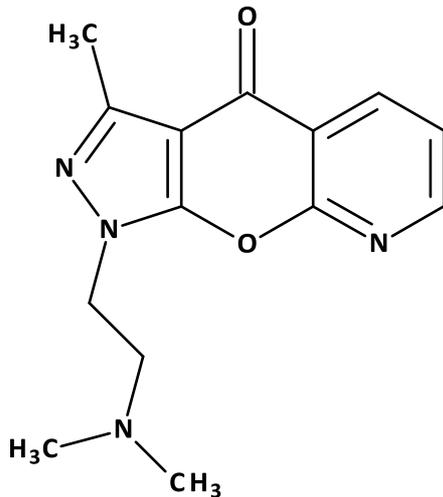


Abbildung 2: Strukturformel der Testsubstanz BW 16

Summenformel:  $C_{14}H_{16}N_4O_2$

Molekulargewicht: 272,30 g/mol

Nomenklatur: 1-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-methylpyrazolo[4',3':5,6]pyrano[2,3-*b*]pyridin-4(1*H*)-on

Die zu untersuchende Substanz wurde am Departement für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien von der Arbeitsgruppe von Hr. Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Wolfgang Holzer synthetisiert und für pharmakologische Untersuchungen dem Departement für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien zur Verfügung gestellt.

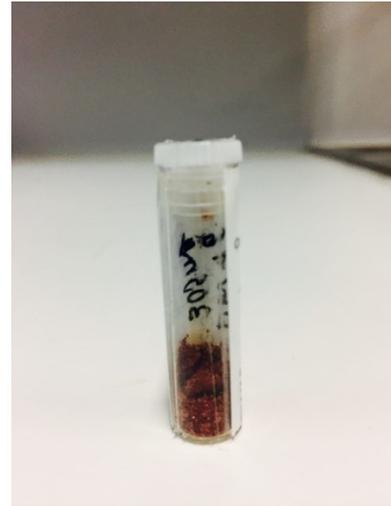


Abbildung 3: BW 16 in Violengefäß im Labor

### 3.2. Lösungsmittel und Herstellung der Untersuchungslösung

Zur Durchführung der Versuche musste zunächst die kristalline Verbindung in Lösung gebracht werden. Hierfür eignete sich Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist sowohl mit Wasser, Alkoholen, Chloroform, Aceton sowie Benzol mischbar, nicht jedoch mit Alkanen. Da DMSO selbst auch einen vasodilatierenden Effekt hervorrufen kann, musste dieser Umstand in die Ergebnisse miteinkalkuliert werden. (Beyer, et al., 1998)

Die gewünschte Endkonzentration betrug 100  $\mu\text{mol/l}$ . Da die unterschiedlichen Organbäder im Fassungsvermögen variierten, wurde die Substanzmenge stets so berechnet, dass nach kumulativer Zugabe die gewünschte Konzentration

(100  $\mu\text{mol/l}$ ) erreicht wurde. (siehe Tabelle 1) Die zu untersuchende Testsubstanz wurde bei jedem Versuch neuerlich in der entsprechenden Menge DMSO gelöst.

<i>Substanz</i>	<i>Molare Masse (g/mol)</i>	<i>Volumen Organbad (ml)</i>	<i>Einwaage Testsubstanz (100 <math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>
BW 16	272,30	5 ml	0,136 mg
BW 16	272,30	25 ml	0,680 mg

Tabelle 1: Einwaage der Testsubstanz- Stammlösungen

Zunächst wurde dem Organbad 3 µl der Stammlösung hinzu pipettiert. Nach jeweils 45-minütiger Wartezeit wurden 7 µl, dann 20 µl und nach weiterer Wartezeit 70 µl der gelösten Testsubstanz mit einer Kolbenhubpipette zugefügt, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Der Zeitabstand zwischen dem Einspritzen der Konzentrationen war essentiell zur Einstellung eines Fließgleichgewichtes und Erreichen eines „steady state“. Von einem Schreiber, wurde immer jener Effekt nach eingespritzter Konzentration aufgezeichnet, den die Stammlösung auf das eingespannte Organ im Bad auslöste. Eine Kontrollphase diente dazu, damit sich das eingespannte Organ an die neue Umgebung gewöhnt. Dabei war es von großer Bedeutung, dass die Aorta descendens, Arteria pulmonalis sowie das terminale Ileum maximal kontrahiert waren, bevor die gelöste Testsubstanz hinzu pipettiert wurde. Der Musculus papillaris musste konstant sein und die Herzfrequenz des Vorhofes musste regelmäßig sein. Kleinste Störungen, wie beispielsweise das Berühren der Silberdrähte, könnte eine Verfälschung der Aufzeichnungen als Folge haben sowie keine reproduzierbaren Messwerte.

<i>Hinzugefügtes Volumen</i>	<i>Erreichte Konzentration im Organbad; Endkonzentration: 100 µmol/l</i>
3 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

*Tabelle 2: Pipettierschema zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration von 100 µmol/l*

### 3.3. Meerschweinchen als Versuchstiere

Bei allen durchgeführten Versuchen, wurden sowohl männliche als auch weibliche Meerschweinchen herangezogen. Nicht nur die Tatsache, dass das Verhältnis von Proportionen der Organe zur Körpergröße des Meerschweinchens mit denen des Menschen sehr ähnlich ist, sondern sie sich auch hinsichtlich ihrer Ionenkanäle gleichen, sind Gründe für den Einsatz als Versuchstiere.

Nachdem die Nährlösung (siehe Kapitel 3.4.1) täglich frisch zubereitet worden ist, wurde eines der Versuchstiere durch einen exakten Genickschlag getötet. Auf diese Weise tritt der Exitus innerhalb weniger Sekunden ein, der Thorax wurde mit einer Schere geöffnet, die zu untersuchenden Organe augenblicklich entnommen und in die physiologische Elektrolytlösung eingebracht. Somit konnte die Haltbarkeit der Organe für mehrere Stunden sichergestellt werden.

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

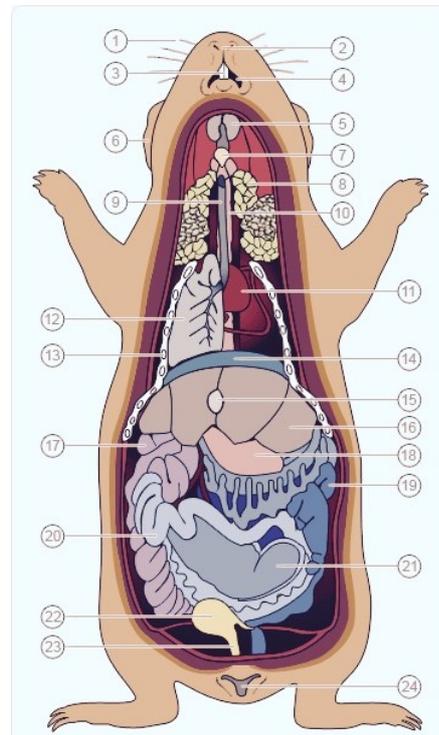


Abbildung 4: Organischer Aufbau des Meerschweinchens (just-Schweinchen)

### 3.4. Versuchslösungen

#### 3.4.1. Tyrode (Physiologische Elektrolytlösung)

Die verwendete Nährlösung wurde zur Aufbewahrung der Organe verwendet und ermöglicht eine zeitweilige Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen.

Bei dieser Elektrolytlösung für Säugerzellen handelt es sich um eine abgewandelte Version der Krebs-Henseleit-Lösung, welche nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux als Tyrode benannt wurde. Die einzelnen Komponenten dieser Nährlösung sind in den beiden nachfolgenden Tabellen ersichtlich. Die dominierenden Kationen bzw. Anionen sind  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , daneben noch  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Natrium und Chlorid sind für den osmotischen Druck des Nährmediums verantwortlich. Natrium und Kalium für die Aufrechterhaltung des Zellmembranpotentials, die Phosphationen und Hydrogencarbonat für die Isohydrie. (Zell-und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen 2013)

<i>Substanz</i>	<i>Molare Masse (g/mol)</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>Menge für 1 Liter Tyrode</i>	<i>Konzentration (mmol/l)</i>
<i>NaCl</i>	58,44	1000,25g/5l	33,60	115,01
<i>KCl</i>	74,55	50,33g/5l	35,00	4,73
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	84,01	125,00g/5l	83,70	24,91
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	120,37	147,02g/5l	1,18	0,29
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	136,09	62,00g/250ml	1,18	2,15
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	110,98	34,00g/250ml	3,20	3,92
<i>Glucose</i>	180,16	Reinsubstanz	1,98	-

Tabelle 3: Zusammensetzung und Bestandteile der Tyrode

Für einen Ansatz von 2000 ml bedeutet dies folgende Mengenangaben:

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

*Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode für 2000 ml (benötigte Menge/Tag)*

Um eine reibungslose und reproduzierbare Versuchsreihe zu gewährleisten, wurde die physiologische Elektrolytlösung täglich frisch zubereitet. Zunächst wurden nacheinander in einen Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 2 Liter die Lösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumhydrogencarbonat und Kaliumhydrogenphosphat zugegeben. Danach wurde die benötigte Menge Glucose in einem Wägeschiffchen eingewogen, dem Gemisch beigefügt und mit Aqua destillata auf ca. drei Viertel des Volumens aufgefüllt. Durch anschließendes schütteln wurden die Bestandteile vermischt und Oxymix beziehungsweise Carbogen, ein Gemisch bestehend aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid für 10 Minuten eingeleitet und begast. Zuletzt wurde tropfenweise mit einer Pasteurpipette Calciumchlorid beigemischt und für weitere 10 Minuten begast, ehe mit Aqua destillata bis zum Meniskus auf 2000 ml aufgefüllt wurde. Die Begasung diente dafür, um die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen und der Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes.

### 3.4.2. Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion an glatter Muskulatur

Durch Einfüllen einer Kaliumchloridlösung in das Organbad, wurden die glattmuskulären Organe (Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminale Ileum) chemisch gereizt, wobei es zu einer Kontraktion der Organe kam.

Diese Kontraktion war von großer Bedeutung, um auf eine eventuell durch die Substanz herbeigeführte Vasodilatation aufmerksam zu werden. Hierfür wurde täglich eine 60 mmolare Lösung für das terminale Ileum frisch zubereitet, während für die Aorta descendens und die Arteria pulmonalis eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung notwendig war, um eine maximale und stabile Kontraktion herbeizuführen. Erst nachdem ein konstanter Wert erreicht wurde, konnte mit dem Einspritzen der Testsubstanz begonnen werden.

Als Einwaage an KCl für die Kontraktion am terminalen Ileum galt 0,45 g, während für die beiden anderen Organe die Einwaage 0,67 g KCl betrug. (siehe Tabelle 5)

Die Festsubstanz wurde mit einem Wägeschiffchen eingewogen und danach in einem 100 ml Messkolben mit Tyrode bis zur Markierung aufgefüllt.

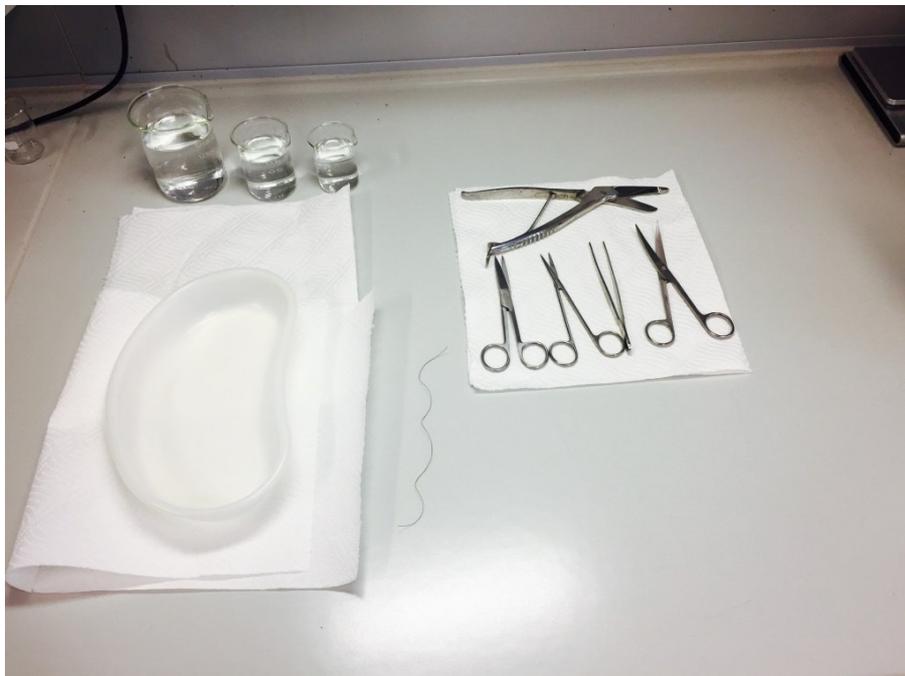
<b><i>Organ</i></b>	<b><i>Einwaage KCl (g)</i></b>	<b><i>Konzentration (mmol)</i></b>	<b><i>Endvolumen (in Tyrode gelöst)</i></b>
Ileum terminale	0,45 g	60 mmol	100 ml Messkolben
Aorta descendens bzw. Arteria pulmonalis	0,67 g	90 mmol	100 ml Messkolben

*Tabelle 5: Herstellung der Kaliumchloridlösung*

Der Vorhof erfährt diese Reizung durch den Sinusknoten, weshalb auf eine chemische Kontraktion durch Zugabe einer Kaliumchloridlösung verzichtet werden konnte. Ebenso bei Musculus papillaris, da dieser während des Versuches in ein Gerät eingespannt und somit elektrisch kontrahiert wurde.

### 3.5. Organpräparate

Nach dem raschen und schmerzfreien Tod des Meerschweinchens,- herbeigeführt durch einen Genickschlag, wurde mittels Schere der Thorax geöffnet, unverzüglich das noch schlagende Herz entnommen und in ein mit Tyrode gefülltes Becherglas eingebracht. Danach wurde mit einem Faden ein Abschnitt des terminalen Ileums abgebunden und ebenfalls in ein separates Becherglas eingebracht. Abschließend, wurde der thorakale Abschnitt der Aorta descendens herausgeschnitten. Um optimale Verwendung der Versuchspräpate zu gewährleisten, ist eine unmittelbare Begasung der entnommenen Organe von großer Bedeutung.

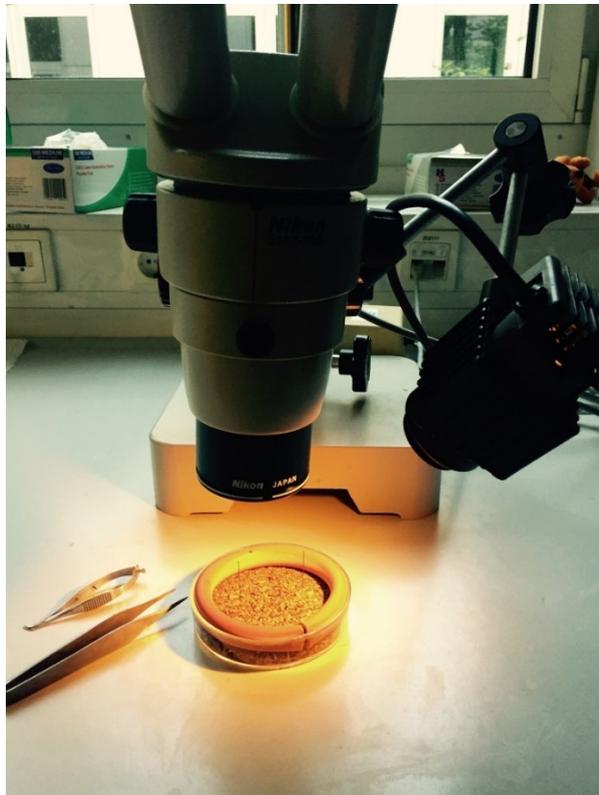


*Abbildung 5: Operationsutensilien*

### 3.5.1. Isolierung und Präparation der Organe

Zur Präparation, wurden die Organe in eine mit Tyrode befüllte Petrischale, bestehend aus einer Korkplatte als Untergrund sowie einem Gummiring, welcher einen Auftrieb des Korks verhindert, übergeführt. Auch Pinzetten, Spitzscheren, Federgriffscheren sowie Pasteurpipetten zählten zu den häufig verwendeten Präparierutensilien.

Die eigentliche Präparation erfolgte unter dem Lichtmikroskop aufgrund der geringen Größe der Organe. Nach der Reinigung der Präparate von Fettgewebe bzw. Blutkapillaren, wurden die Organe in begaster physiologischer Nährlösung aufbewahrt.



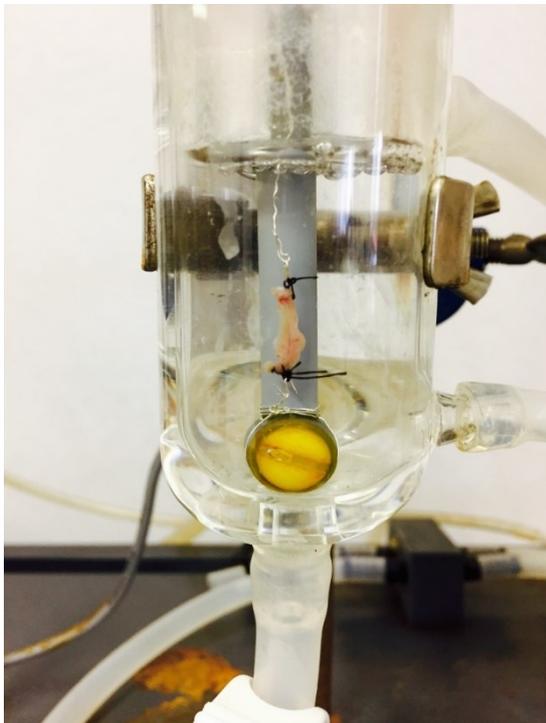
*Abbildung 6: Lichtmikroskop und verwendete Präparierutensilien*

### 3.5.2. Atrium cordis dextrum

Um eine mögliche Koagulation des Blutes zu vermeiden, musste sofort mit der Präparation des Herzens begonnen werden. In einer mit Tyrode befüllten Petrischale wurde nun das Herz mit 2 Präpariernadeln an der Basis sowie an der Spitze fixiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde anschließend das Perikard sowie überschüssiges Fett und anhaftendes Lungengewebe entfernt. Um Vorhof und Kammer zu trennen, wurde entlang des Sulcus coronarius geschnitten. Dabei war es essentiell, den am rechten Vorhof befindlichen Sinusknoten nicht zu verletzen, da dieser für die Chronotropie und damit für die weitere Versuchsdurchführung notwendig war. Dieser sogenannte „Schrittmacher“, erzeugt einen elektrischen Impuls, mit dem das Herz Blut in die Gefäße pumpen kann und somit Zellen zur Kontraktion bringt. (Campbell 2003)

Anschließend wurde der Vorhof am oberen Ende sowie am Herzohr mit 2 Häkchen aus Silberdraht und Bindfaden versehen. Diese Häkchen waren nötig, um den Vorhof in die Versuchsapparatur einzuhängen.

Der fertig präparierte Vorhof wurde bis zum Beginn des Versuches in begaster physiologischer Nährlösung aufbewahrt, wobei besonders bei diesem isolierten Organ ein rascher Ablauf und schneller Beginn wichtig war.



*Abbildung 7: präparierter und eingespannter Vorhof im Organbad*

### 3.5.3 Musculus papillaris

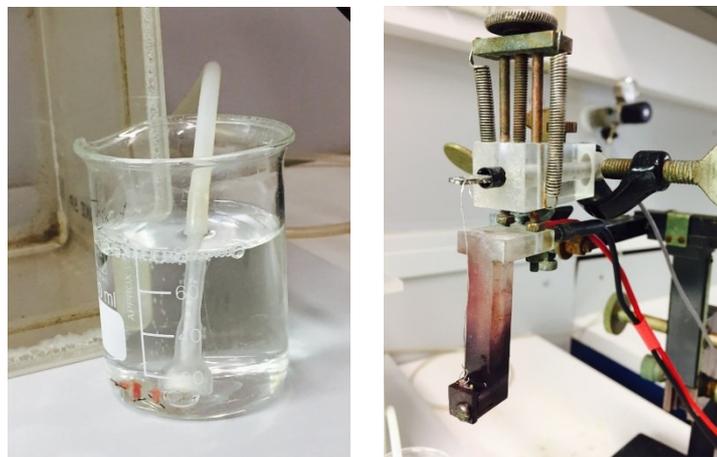
Ein weiterer Bestandteil des Herzens ist der Papillarmuskel. Zur Isolierung wurde durch das Septum des Herzens geschnitten, der Herzmuskel aufgeklappt, um somit zu den beiden Herzkammern zu gelangen.

Die physiologische Nährlösung wurde aufgrund starker Blutungen während der Präparation wiederholt gewechselt, wodurch eine Trübung bzw. Rotfärbung durch das Blut verhindert werden konnte, um vollständige Sicht zu gewährleisten.

Neben der Beseitigung des Papillarmuskels von umliegenden Gewebe, war es essentiell vor allem die Purkinje-Fasern vollständig zu entfernen. Aufgrund ihrer Spontanaktivität könnte es zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Zuletzt wurde der Musculus papillaris mit Silberhaken versehen, um ihn anschließend in die Apparatur 2 (siehe Kapitel 3.6. Apparaturen zur Durchführung der Versuche) einzuspannen.

Bis zur Verwendung wurden die 3-4 Papillarmuskel-Präparate, die täglich von einem Versuchstier entnommen werden konnten, in begaster Nährlösung aufbewahrt.



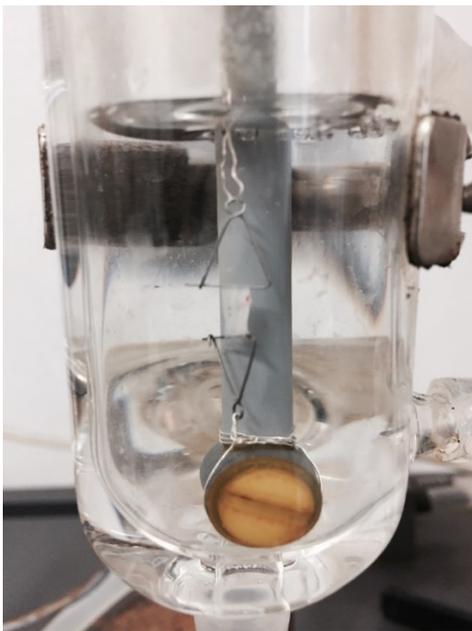
*Abbildung 8: Musculus papillaris mit Silberhaken und eingespannter Papillarmuskel zwischen Metallplättchen*

#### 3.5.4. Arteria pulmonalis

Das letzte verwendete Präparat, das dem Herz entstammt ist die Pulmonalarterie.

Für diese Versuchsreihe wurde lediglich der Truncus pulmonalis, der kurze, gemeinsame Stamm der linken und rechten Aorta pulmonalis verwendet. Nach der Entfernung des Herzbeutels und weitere Teile der Lunge wurde der Lungenstamm, der direkt der rechten Herzkammer entspringt, ersichtlich. Nachdem auch die Lungenarterie von anhaftendem Fremdgewebe sowie Blutgerinnseln gereinigt wurde, konnte der etwa 1 cm breite Pulmonalisring in ungefähr 3 mm lange, ringförmige Stücke geschnitten werden.

Zur Aufbewahrung und Erhaltung ihrer physiologischen Bedingungen wurden sie vorübergehend in begaster Tyrode aufbewahrt, ehe diese mit 2 Silberdrahtdreiecke versehen wurden. Die beiden Silberdrahtdreiecke, die für das Einspannen in die Apparatur notwendig waren, wurden durch das Lumen der ringförmigen Stücke eingefädelt.



*Abbildung 9: Arteria pulmonalis zwischen Silberdrahtdreiecke im Organbad eingespannt*

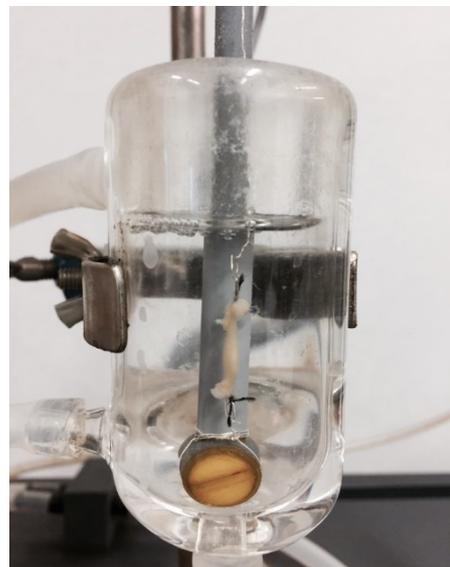
### 3.5.5. Terminales Ileum

Nach der Entfernung des Herzens wurde die Bauchdecke gewissenhaft weiter geöffnet, um den benötigten Abschnitt des Darms zu isolieren.

Das terminale Ileum ist der Abschnitt nach dem Jejunum (Leerdarm) und vor dem Intestinum crassum (Dickdarm). Der untere Abschnitt des Dünndarms, sogenannte Krummdarm, wurde mit einer Schere schräg abgeschnitten und in ein Becherglas mit Nährlösung vorübergehend eingebracht. Von dem etwa 25-35cm langen, isolierten Abschnitt des Dünndarms, wurden für jede einzelne Versuchsreihe etwa 5 mm lange Stücke spitz zugeschnitten.

Anschließend wurde das verwendete Teilstück in eine Petrischale mit Nährlösung übergeführt und mit 2 Präpariernadeln an den zugespitzten Enden am Korkboden fixiert. Durch spitzes Zuschneiden der Enden, konnte man vermeiden, dass die Öffnung mit einem Faden zugebunden wird, um einen ununterbrochenen Kreislauf der Prüfsubstanz sicherzustellen. An diesem Bindfaden wurden die beiden Silberhaken zum Einspannen in die Apparatur befestigt.

Das Darmpräparat wurde mit einer Pasteurpipette gereinigt, um eine vollständige Zirkulation der Testsubstanz im Darmlumen zu gewährleisten.



*Abbildung 10: terminales Ileum während der Präparation und eingespannter Ileum im Organbad*

### 3.5.6. Aorta descendens

Um an die Aorta descendens zu gelangen, musste zunächst Herz und Darm entfernt werden. Anschließend wurde der komplette Brustkorb des Meerschweinchens geöffnet und gedehnt. Durch Überstrecken des Rückgrats konnte nun mit einer Pinzette in der einen Hand, die thorakale Aorta leicht ziehend gespannt werden, während man mit der Schere in der anderen Hand durch kleine Schnitte die Aorta entlang des Rückgrats entfernt. Somit konnte der absteigende Teil der Hauptschlagader (Aorta) gewonnen werden.

Die isolierte Aorta wurde in einer mit Nährlösung befüllten Petrischale mit 2 Nadeln fixiert. Unter der Stereolupe wurde vorsichtig umgebendes Fett und Bindegewebe sowie koaguliertes Blut mit einer Federschere entfernt, anschließend analog zur Arteria pulmonalis in ca. 3 mm kleine Stücke geschnitten und diese bis zur Durchführung des Versuches in begaster Nährlösung aufbewahrt. Zum Befestigen an der Apparatur wurden wieder zwei dreieckige Silberhaken durch das Lumen durchgefädelt.

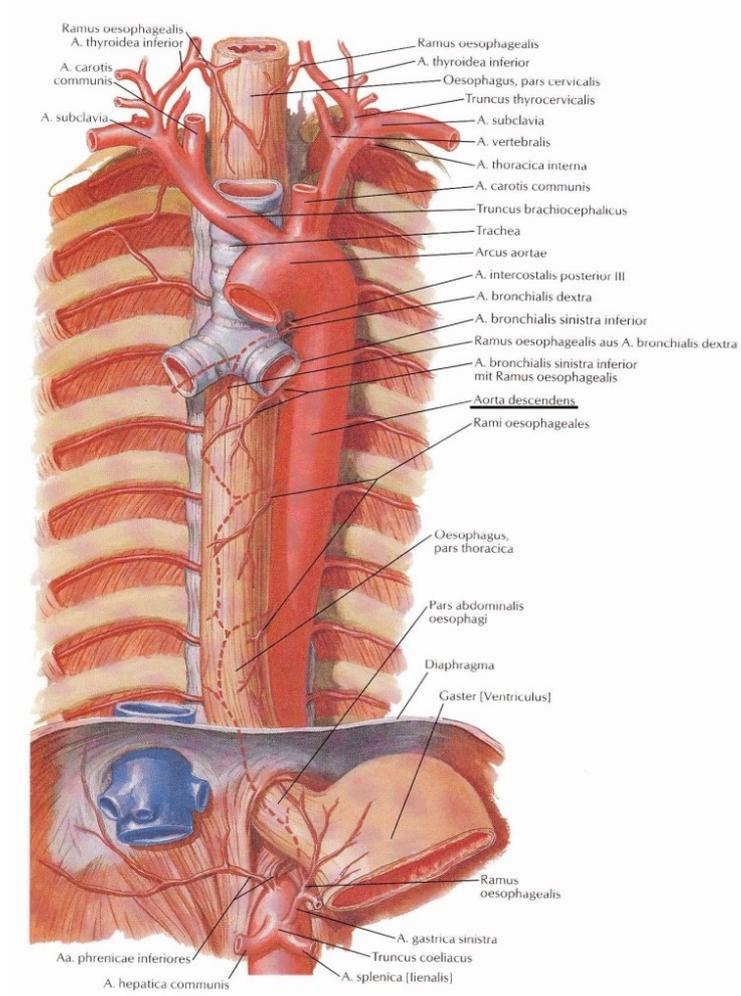


Abbildung 11: schematische Darstellung der Aorta descendens (Netter 2003)

### 3.6. Apparaturen zur Durchführung der Versuche

Für die Untersuchung der Testsubstanz wurden drei verschiedene Apparaturen verwendet, die in den darauffolgenden Unterpunkten näher beschrieben werden.

Zur Durchführung der Versuche am Atrium cordis dextrum, Ileum terminale sowie Teilmessungen an der Aorta descendens und an der Arteria pulmonalis wurde die *Apparatur I* verwendet. Die restlichen Messungen an der Aorta und Pulmonalarterie wurden mithilfe der *Apparatur III* durchgeführt. Während alle Versuche am Musculus papillaris an der *Apparatur II* vorgenommen wurden.

#### 3.6.1. Prinzip des Messvorgangs

Die zuvor an den Präparaten angebrachten Silberhaken dienten nun dazu, um die Organe, die für die Apparatur I und II bestimmt waren, mit einem Kraftwandler zu verbinden. Die Auswertung der Messungen erfolgte durch die Umwandlung des Kraftwandlers von einem mechanischen in ein elektrisches Signal. Durch anschließende Weiterleitung an einen Amplifier (4-Channel Transducer Amplifier der Firma WPI) wurde das Signal verstärkt und somit konnten die empfangenen Signale über einen Flachbettschreiber (Firma Kipp & Zonen) auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet und ausgewertet werden.

Der Kraftwandler bzw. Widerstandswandler bewirkte, dass mechanische Signale in eine messbare Größe umgewandelt wurden. Die Theorie beruht auf der Änderung des Dehnungsmessstreifens, weshalb eine Änderung des messbaren Stromflusses resultiert. (siehe Abbildung: Funktionsprinzip des Kraftwandlers)

Der einzige wesentliche Unterschied zwischen der Apparatur II und Apparatur III bestand nur darin, dass bei der Apparatur III der Amplifier nicht mit einem Schreiber verbunden war, sondern mit einem PC und dem dazugehörigen Programm Labscribe 2.

Für die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse war es von großer Bedeutung, dass sowohl pH-Wert, Temperatur und eine konstante Sauerstoffversorgung sichergestellt waren.

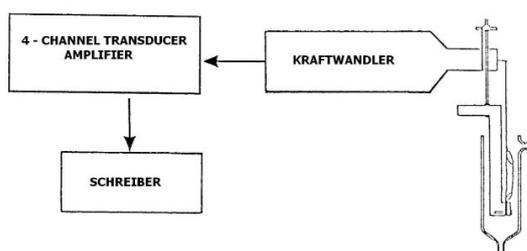
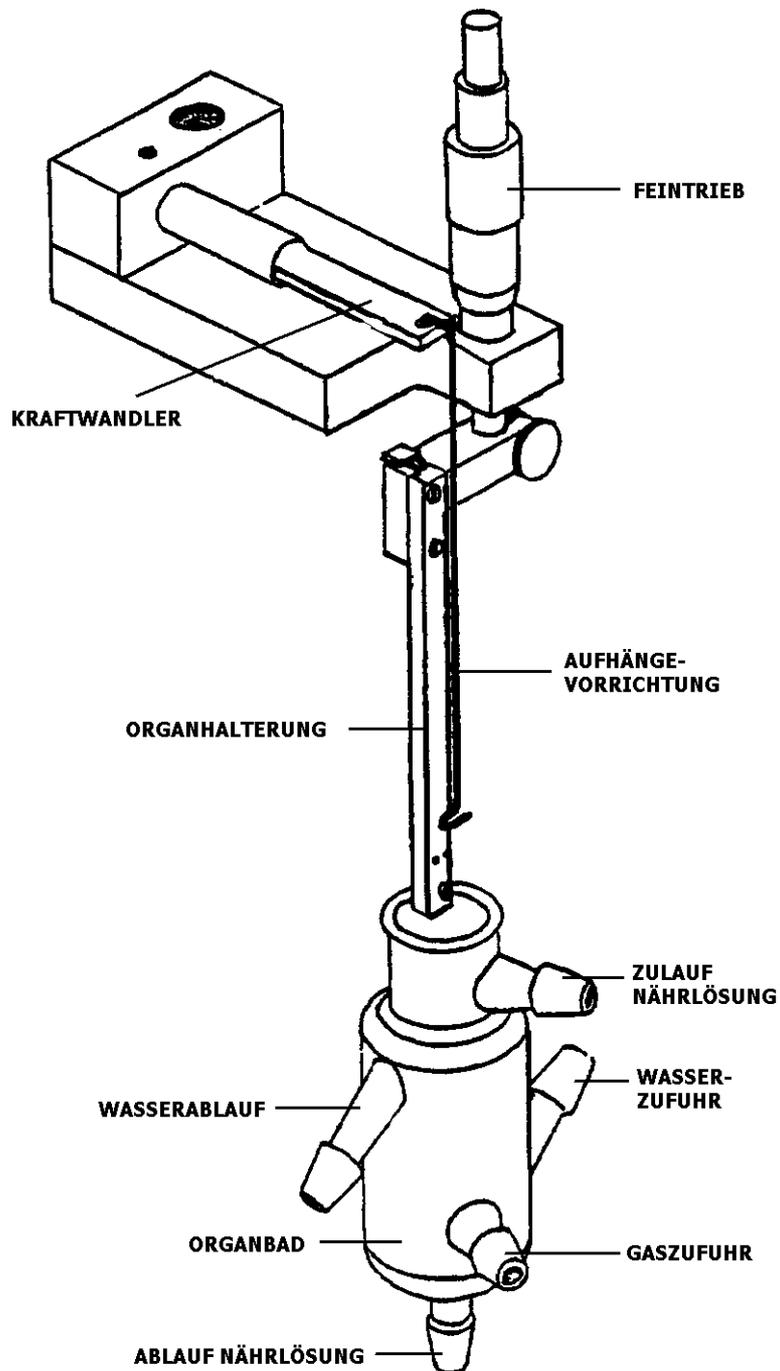


Abbildung 12: Funktionsprinzip des Kraftwandlers

### 3.6.2. Apparatur I

Diese Apparatur wurde für die Versuche am Vorhof, am terminalen Ileum, und zur Durchführung einer Teilmessung an der Aorta und der Pulmonalarterie verwendet.



*Abbildung 13: schematischer Aufbau der Apparatur I*

Eine Apparatur dieses Typus besteht aus einem gläsernen Doppelkammersystem, welches mit Hilfe von Polyethylenschläuchen an die Wasserzufuhr gekoppelt ist. Somit taucht hier die Organkammer nicht in ein thermostatisiertes Wasserbad ein, sondern wird über das Schlauchsystem mit konstant temperierten Wasser von 37 °C versorgt. Ein weiterer Bestandteil ist das Stativ, an dem Feintrieb, Kraftwandler sowie die Organhalterung angebracht ist.

Mit Hilfe des Feintriebs, konnte die benötigte Vorspannung, die von Organ zu Organ unterschiedlich war, erreicht werden.

Da die auf dieser Apparatur verwendeten Organpräparate auf keine elektrischen Impulse angewiesen waren, bestand keine Verbindung mit einem Accupulser.

Der bereits präparierte Darm und Vorhof konnte nun über die S-förmig gestalteten Silberdrahthäkchen an der Aufhängevorrichtung angebracht und in die Apparatur eingespannt werden.

Um die Aorta beziehungsweise Pulmonalarterie ordnungsgemäß in der Apparatur zu befestigen, wurden diese Gefäße mit Silberdreiecke versehen. (siehe Kapitel 3.5.1. Isolierung und Präparation der Organe)

Auch hier erfüllten die Silberdrahthaken beziehungsweise Silberdreiecke den Zweck, um eine Verbindung zwischen Organ und Kraftwandler herbeizuführen. Somit konnte bei Aorta, Pulmonalarterie und terminalen Ileum eine Abweichung des Gefäßtonus sichtbar gemacht werden, während beim Vorhof eine Veränderung der Chronotropie festgestellt werden konnte.

Nach der Befestigung der Präparate an der Apparatur, war ein rasches Einbringen in die Organkammer essentiell. Um optimale, physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde das Organbad bereits ca. 10 Minuten vor Versuchsbeginn mit Nährlösung befüllt, bei gleichzeitiger Begasung mit Oxymix.

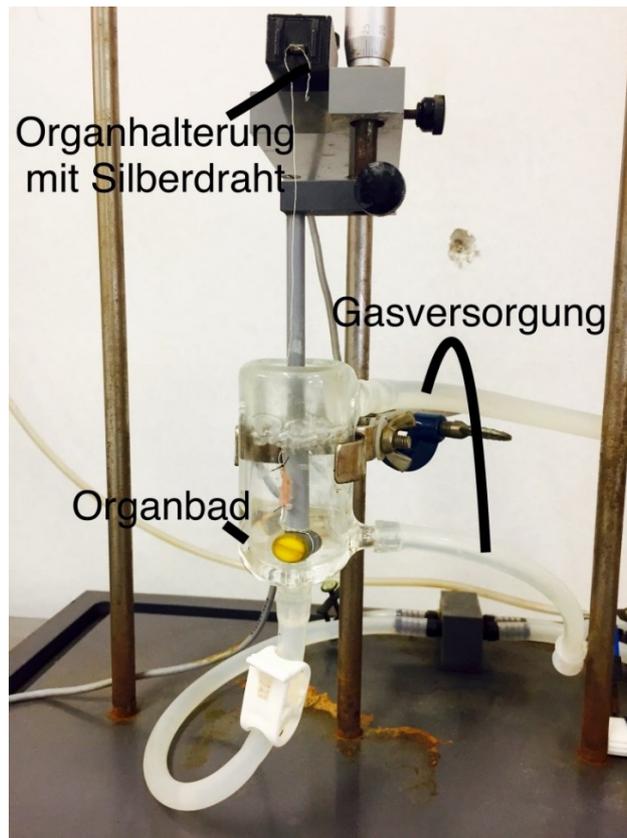


Abbildung 14: Originalaufnahme der Apparatur I

### 3.6.3. Apparatur II

An dieser Apparatur wurden lediglich Versuche am Papillarmuskel vorgenommen, um die potentielle Veränderung der Inotropie zu messen.

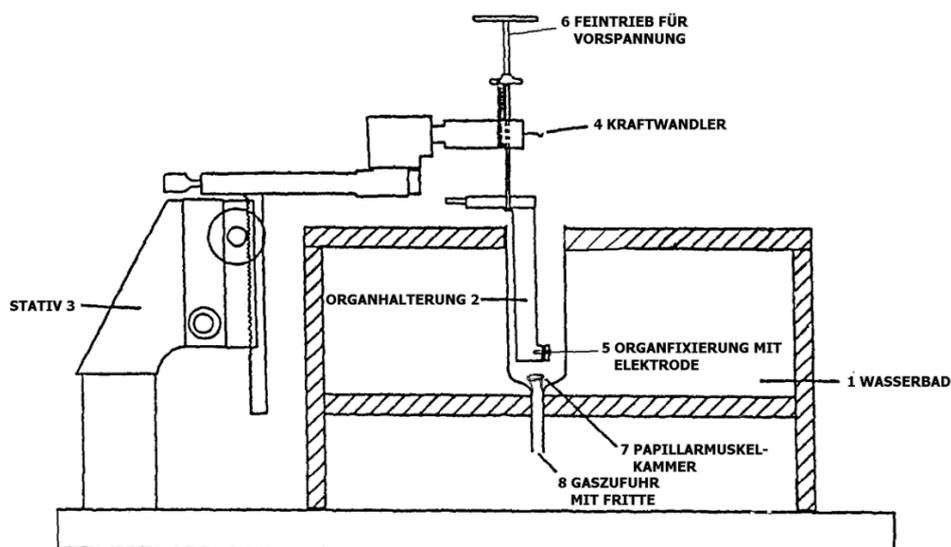


Abbildung 15: schematischer Aufbau der Apparatur II

Die Bestandteile des Gerätes sind eine Wasserbadwanne aus Acrylglas, in der sich knapp unter dem Wasserspiegel eine Muskelkammer befindet. Das Wasserbad beinhaltet Aqua bidestillata, welches konstant über eine Heizspirale auf 35°C temperiert ist.

Zusätzlich verfügt auch diese Apparatur über ein Stativ, an dem Feintrieb, Kraftwandler sowie die Organhalterung festgemacht sind.

Durch einen Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) konnte der Papillarmuskel elektrisch gereizt werden, da von ihm keine spontanen Erregungen ausgehen.

Diese Signale wurden von einem Amplifier 100-fach verstärkt und mittels eines Flachbetschreibers auf ein Millimeterpapier übertragen.

Nachdem die Nährlösung in die Muskelkammer eingebracht und von außen über das Wasserbad auf die gewünschte Temperatur geheizt wurde, konnte der Papillarmuskel mittels Silberhaken an der Organhalterung befestigt werden. Dieser wurde achtsam zwischen einer Plexiglasscheibe und einer Platinelektrode mittels Feststellschraube eingespannt und anschließend in das Organbad eingetaucht. Hierbei war ein flaches Anliegen des Papillarmuskel an der Elektrode wesentlich.

Um eine reproduzierbare Versuchsreihe zu gewährleisten, wurde die Vorspannung mittels Feintrieb eingestellt.

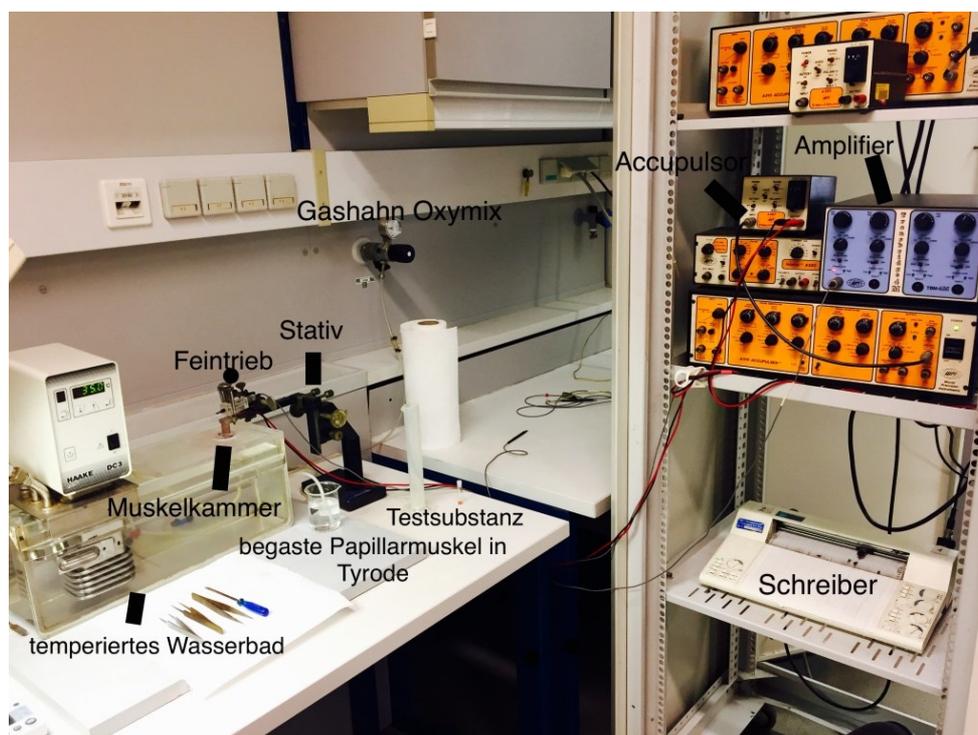


Abbildung 16: Originalaufnahme der Apparatur II

### 3.6.4. Apparatur III

An dieser Apparatur wurden Teilversuche an Aorta und Pulmonalarterie durchgeführt, wobei ein wesentlicher Vorteil darin bestand, dass bei diesem Gerät vier Parallelversuche vorgenommen werden konnten.

Im Gegensatz zu Apparatur I, war hier der Amplifier nicht an einen Schreiber gekoppelt, sondern die Signale wurden per Computer mit einem speziellen Programm (Labscribe 2) aufgezeichnet und anschließend analysiert.

Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu den anderen Apparaturen bestand darin, dass das Fassungsvermögen der Organbäder, nicht wie sonst üblich 25 ml fasste, sondern nur 5 ml, weshalb eine 5-fache Verdünnung der herkömmlichen Einwaage der Untersuchungssubstanz notwendig war.



*Abbildung 17: Originalaufnahme der Apparatur III*

### 3.6.5. Gaszufuhr & Wasserbad

Wie bereits angeführt, wurde für die optimale Stabilisierung der Präparate ein Gasgemisch, bestehend aus 95% Sauerstoff und 5% CO<sub>2</sub> eingeleitet. Das sogenannte Carbogen beziehungsweise Oxymix war notwendig, für die Versorgung und Aufrechterhaltung der Organe mit lebensnotwendigen Sauerstoff, um den physiologischen pH-Wert (7,2-7,4) aufrecht zu erhalten und gleichzeitig eine Hypoxie beziehungsweise ein Absterben der Organe zu vermeiden.

Ebenfalls von großer Wichtigkeit, um ideale Versuchsbedingungen zu schaffen, war ein temperiertes Wasserbad. Die mit Aqua bidestillata gefüllte Wanne, war mit einem Thermostat inklusive Heizspirale ausgestattet, um die gewünschte Temperatur konstant zu halten. Die Temperatur der physiologischen Nährlösung in der Organkammer bei Versuchen am Papillarmuskel sollte auf 35° C ± 1° C erwärmt werden, während für alle anderen Präparate 37° C ± 1° C erforderlich waren.

### **3.7. Versuchsabläufe**

Im folgenden Kapitel möchte ich eine detaillierte Schilderung der Versuchsabfolge an den unterschiedlichen Präparaten aufzeigen.

Bevor mit der Durchführung des Nachweises begonnen werden konnte, wurden die Organbäder zweifach mit Wasser und Nährlösung gespült um diverse Substanzreste zu entfernen und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Ebenso mussten die Geräte nach Beendigung des Versuches gründlich mit Aqua bidestillata, verdünntem Ethanol und abschließend mit verdünnter Salzsäure gereinigt werden, um etwaige Rückstände zu beseitigen.

Nach dem Reinigungsvorgang konnte die Organkammer mit Nährlösung befüllt werden. Die gewünschte Temperatur der Nährlösung wurde nach etwa 10-minütiger Wartezeit erreicht. Anschließend konnte mit dem Einspannen der bereits präparierten Organe begonnen werden. Dieser Schritt sollte möglichst rasch erfolgen, um dem Organ fortwährend physiologische Bedingungen zu gewährleisten.

Beim Einbringen des Organs in die Aufhängevorrichtung war stets darauf zu achten, dass das Präparat nicht überdehnt wurde. Durch anschließendes Justieren mit Grob-/ Feintrieb konnte

die gewünschte Vorspannung für das jeweilige Organ erreicht werden, um eine maximale Kontraktion zu erzielen.

Besondere Aufmerksamkeit musste daraufgelegt werden, dass bei Zugabe der zu untersuchenden Substanz, weder das eingespannte Organ, noch der Silberdraht oder Kraftwandler mit der Finnmikropipette in Berührung kamen.

### 3.7.1. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum

Nach der Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs, (siehe Kapitel 3.5.2. a)) konnte dieser mithilfe der beiden angebrachten Silberhaken in die oben beschriebene Apparatur I eingespannt werden. Die Organkammer wurde bereits ca. 10 Minuten vor Beginn des Versuchs mit 25 ml physiologischer Nährlösung befüllt, unter fortwährender Begasung mit Oxymix.

Die Temperatur wurde während jeder Versuchsreihe konstant auf  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  gehalten.

Nachdem der rechte Vorhof zügig in der dafür vorgesehenen Halterung befestigt war, konnte das Organ in die bereits konstant temperierte Nährlösung vollständig eingetaucht werden. Dabei war darauf zu achten, dass der isolierte rechte Vorhof nicht zu stark gedehnt wird, so wodurch eine Organschädigung auftreten könnte und die Spontanaktivität, bedingt durch die Sinuszellen verloren gegangen wäre.

Bevor mit der Aufzeichnung begonnen werden konnte, mussten die jeweiligen Geräte individuell eingestellt werden. Beim Atrium cordis dextrum wurde die Geschwindigkeit des Flachbetschreibers auf 5 mm/sec. reguliert, während die Amplitudenhöhe 5mV betrug.

Um eine reproduzierbare Versuchsreihe sicherzustellen, wurde der Schreiber zum Nullpunkt geführt und anschließend mithilfe des Feintriebs eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt.

Die Herzschläge konnte man von Beginn weg am Schreiber beobachten. Somit musste aufgrund der spontanen Kontraktilität kein zusätzliches Reizgerät zwischengeschaltet werden.

Bei fehlender Amplitudenhöhe bestand die Option, die Millivolt auf 2 beziehungsweise 1 zu dezimieren. Nachdem eine Wartezeit von etwa 25 Minuten eingehalten wurde, um das Organ an die vorherrschenden Bedingungen zu gewöhnen, konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden. Die Messung und gleichzeitige Aufzeichnung der Schlagfrequenz auf ein Millimeterpapier erfolgte alle 5 Minuten und erstreckte sich über 12 Sekunden. Dies entspricht einer Schreib-Strecke von 6 cm. Nach dem Erreichen des „steady-state“, also wenn zwei Aufzeichnungen nacheinander sich nur durch maximal einen Schlag unterscheiden, konnte die gemessene Chronotropie als konstant angenommen werden.

Der ermittelte Wert diente bei der Auswertung als Kontroll- und Bezugswert. Anschließend konnte die Testsubstanz in niedrigster Konzentration (3 $\mu$ l) dem Organbad hinzupipettiert werden, worauf alle 5 Minuten eine Schreib-Strecke von 6 cm aufgezeichnet wurde. Um die angestrebten Konzentrationen zu erreichen, wurden im Abstand von 45 Minuten 7  $\mu$ l, 20  $\mu$ l und zuletzt 70  $\mu$ l der zu untersuchenden Substanz hinzugefügt und wie beschrieben vorgegangen.

### 3.7.2. Versuchsablauf am Musculus papillaris

Nach erfolgter Isolierung und Präparation des Papillarmuskels (siehe Kapitel 3.5.2. b)), konnte dieser anhand der befestigten Silberhaken in die Apparatur II (siehe Kapitel 3.6.3.) aufgehängt werden. Am oberen Ende wurde der präparierte Muskel über den Silberhaken fixiert, während das untere Ende zwischen Plexiglasscheibe und Platinelektrode eingeklemmt wurde.

Nach raschem und korrektem Einbringen in die Apparatur, wurde das präparierte Organ in die bereits auf 35°C $\pm$  1°C temperierte Nährlösung abgesenkt.

Als vorgeschriebene Versuchsbedingungen, musste hier der Schreiber auf 5mV Amplitudenhöhe (bei Bedarf 2 mV oder 1mV) und 5 mm/sec. Aufzeichnungsgeschwindigkeit eingestellt werden. Mithilfe des Feintriebs konnte eine Vorspannung von 3,9 mN erzielt werden.

Im Vergleich zum Vorhof, von dem selbst elektrische Impulse hervorgerufen werden, benötigte der Papillarmuskel aufgrund fehlender Spontanaktivität einen Accupulser (A310, WPI), um ihn zur Kontraktion anzuregen.

Die Reizung, die dem Muskel einen Stromimpuls pro Sekunde verschaffte, resultierte in Form von Rechteckimpulsen von 3 ms<sup>-1</sup> Dauer bei einer Frequenz von 1 Hertz. Die Reizstärke konnte bis zur Erreichung der Schwellenstromstärke erhöht werden (ca. 10% über der minimalen), wobei eine zu hoch ausgewählte Stromstärke, eine unkontrollierte Entleerung der Catecholaminspeicher und vorzeitiges Erschlaffen des Muskels als Folge gehabt hätte.

Unerwünschte, spontan auftretende Aktivität, deutete darauf hin, dass die Purkinje-Fasern während der Präparation nicht vollständig entfernt wurden.

Nachdem sich der Muskel an die vorherrschenden Bedingungen gewöhnt hatte, konnte mit der Kontrollmessung begonnen werden. Die Kontrolle wurde so lange durchgeführt, bis die Amplitudenlänge einen konstanten Wert angenommen hatte, wobei die Werte von zwei nacheinander folgenden Messungen nicht mehr als einen Millimeter Unterschied aufweisen durften.

Weiters mussten die Ausschläge genügend groß sein, um mit der Versuchsreihe beginnen zu können. Falls eine Amplitude von 2 cm nicht erreicht wurde, musste das Organ verworfen werden.

Nachdem die Kontrollmessung als konstant angenommen werden konnte und die Amplitudenlänge 2 cm erreichte, konnte mit der Substanzzugabe nach dem gleichen Pipettierschema (siehe Tabelle 2) in Abständen von 45 Minuten begonnen werden. Die Inotropie wurde in Form von 6 aufeinanderfolgenden Amplituden auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet. Diese Aufzeichnung erfolgte alle 5 Minuten, wobei nach 9 Messungen die nächsthöhere Konzentration hinzupipettiert wurde.

Um eine Auswertung der Inotropie zu ermöglichen, wurde die Amplitude jeder 9. Aufzeichnung abgemessen und notiert.

### 3.7.3. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis und an der Aorta descendens

Zur Durchführung des Versuchs wurden die ringförmig präparierten Gefäße der Arteria pulmonalis und Aorta descendens über 2 dreieckige Silberhaken in die jeweilige Apparatur (siehe Kapitel: Apparatur I und III) eingespannt. Auch hier wurde das Organbad mit physiologischer Nährlösung befüllt, konstant temperiert ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) und mit Oxymix begast. Nach Absenken der präparierten Stücke in die Nährlösung, musste erneut auf ein zu starkes dehnen der Gefäße geachtet werden. Die Vorspannung von 19,6 mN wurde durch nachjustieren mittels Feintrieb reguliert und der Schreiber mit einer Spannung von 10 mV sowie einer Geschwindigkeit von 1mm/sec. eingestellt. Unter diesen Bedingungen wurden die beiden Gefäße 20 Minuten begast, um eine Gewöhnung an die vorliegenden Bedingungen zu schaffen. Bei der Versuchsdurchführung der Aorta musste hier ein zusätzlicher Schritt erfolgen. Hierfür wurde nach der Eingewöhnungsphase die Spannung auf dem Schreiber auf 5 mV runtergesetzt, was eine Kraft von 9,81 mN entsprach. Nachdem der Schreibkopf zum Nullpunkt zurückgedreht wurde, konnte mit der Aufzeichnung begonnen werden.

Die Nährlösung wurde abgelassen und die Organkammer mit 25 ml 90 mmolare Kaliumchloridlösung (siehe Kapitel 3.4.2.; Herstellung: Tabelle 5) gefüllt, um eine maximale Kontraktion der glatten Muskulatur auszulösen.

Nachdem eine stabile Plateauphase erreicht wurde, hierfür war zunächst ein Ausschlag von mindestens 10 cm notwendig, konnte mit dem üblichen Pipettierschema begonnen werden.

Bei beiden Organpräparaten konnte die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur untersucht werden.

#### 3.7.4. Versuchsablauf am terminalen Ileum

Zur Versuchsdurchführung wurde das isolierte und präparierte Darmstück (siehe Kapitel 3.5.3) in die dafür vorgesehene Apparatur I (siehe Kapitel 3.6.2) eingebracht. Anhand der zuvor befestigten Silberhaken, konnte der Darm an der Organhalterung befestigt werden, ehe dieser in die konstant temperierte und begaste Nährlösung ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) abgesenkt wurde. Auch hier musste wieder auf ein zu starkes Überdehnen des Darms Rücksicht genommen werden. Danach wurden sowohl Schreiber als auch Amplifier eingeschaltet und die dafür vorgesehene Spannung von 5 mV und Geschwindigkeit von 1 mm/min. eingestellt. Der Schreiber wurde mithilfe der Stellschraube am Amplifier erneut zum Nullpunkt geführt. Anschließend konnte die notwendige Vorspannung zur Erreichung der maximalen Darmkontraktion von 4,92 mN angelegt werden, gefolgt von einer 20-minütigen Akklimatisierungsphase.

Bevor mit dem Ablassen der Tyrode begonnen wurde, musste der Schreibkopf erneut zum Nullpunkt justiert werden. Die Verschiebung des Schreibkopfes ist auf eine Veränderung der Darmperistaltik zurückzuführen.

Die Nährlösung wurde abgelassen und die Organkammer erneut mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung gefüllt, um ebenfalls eine maximale Kontraktion des Organs hervorzurufen. Im Vergleich zu den Präparaten der Aorta und der Pulmonalarterie, erfolgte hier die Kontraktion sehr rasch, dann nahm sie kurzzeitig ab, ehe sie sich wieder auf einem höheren Niveau stabilisierte. Um den Versuch starten zu können, musste auch am terminalen Ileum zumindest ein Ausschlag von 5 cm sowie eine stabile Plateauphase erreicht werden.

Sobald diese Voraussetzungen geschaffen wurden, konnte mit der kumulativen Zugabe der gelösten Testsubstanz nach dem gewöhnlichen Pipettierschema  $3\mu\text{mol}$ ,  $7\mu\text{mol}$ ,  $20\mu\text{mol}$ ,  $70\mu\text{mol}$  in je 45-minütigen Zeitabständen begonnen werden, um wieder die angestrebten Konzentrationen zu erreichen.

### 3.7.5. Versuchsablauf am terminalen Ileum zur Analysierung des Wirkmechanismus von BW 16

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus wurde jenes Organ herangezogen, bei dem anhand der zuvor ermittelten  $EC_{50}$ -Werte, eine 50%ige Wirkung der untersuchenden Substanz festgestellt werden konnte.

Der stärkste Effekt von BW 16 wurde am terminalen Ileum beobachtet, weshalb dieses Organ zur genaueren Erforschung des Wirkmechanismus herangezogen wurde.

Die Isolierung, Präparation sowie das Einspannen des terminalen Ileums in die Apparatur I wurde wie gewohnt und bereits ausführlich in Kapitel 3.5.3 beziehungsweise Kapitel 3.7.4 beschrieben, durchgeführt. Nach Befestigen des terminalen Ileums an der Organhalterung über die angebrachten Silberhaken und Eintauchen in die konstant, temperierte ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) und begaste Tyrode, wurde auch hier der Schreiber auf eine Geschwindigkeit von 1 mm/min. und 5 mV eingestellt, bei einer Vorspannung von 4,92 mN. Nach Abwarten der Gewöhnungsphase (20 min.), wurde die Nährlösung abgelassen und die Organkammer erneut mit 25 ml 60 mmolare Kaliumchloridlösung gefüllt.

Ein wesentlicher Unterschied bei der Untersuchung des Wirkmechanismus war, dass nach Erreichen der Plateauphase, nicht wie sonst üblich die gelöste Analysesubstanz hinzupipettiert wurde, sondern Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100 mol/l eingespritzt wurde. Da Nitro-L-Arginin in KCl nur schwer löslich ist, wurde die Viole mit dem darin befindlichen Antagonisten für 45 Minuten in ein Ultraschallbad eingebracht und somit die Löslichkeit verbessert. Die erforderliche Mindesteinwaage betrug bei einem Molekulargewicht von 219,20 g/mol für ein 25 ml fassendes Organbad 0,548 mg.

Nach hinzupipettieren von 100  $\mu\text{l}$  Nitro-L-Arginin in die mit KCl enthaltene Organkammer, wurde 45 Minuten abgewartet und anschließend 100  $\mu\text{l}$  der in DMSO gelösten Testsubstanz zugegeben. Nach weiteren 45 Minuten, war die Untersuchung des Wirkmechanismus erfolgreich beendet.

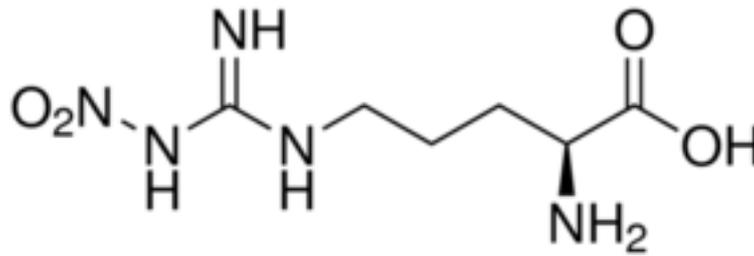


Abbildung 18: Strukturformel von Nitro-L-Arginin (Sigma-Aldrich)

Stickstoffoxid (NO) ist das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül und wird aus der Aminosäure L-Arginin durch drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase synthetisiert: die neuronale, induzierbare und endotheliale NO-Synthase. Die NO-Synthase katalysiert in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin, wobei NO freigesetzt wird. Stickstoffoxid bewirkt durch Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (GC-S) die Bildung von cyclischem GMP aus GTP. Dies führt zu einer Kontraktionshemmung der glatten Muskulatur und somit zu einem Überwiegen der Vasodilatation. NO wird somit als protektives Molekül im Gefäßsystem angesehen. Demzufolge begünstigt ein Mangel an NO daher die Entstehung von Arteriosklerose und Hypertonie (Mutschler et al. 2001).

Die NO-Synthase kann von einigen Substanzen inhibiert werden. Als kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthase zählt unter anderem auch Nitro-L-Arginin (Forth et al. 2017).

Nach hinzupipettieren von L-Nitro-Arginin ist somit durch Blockade der endothelialen NO-Synthase die Freisetzung von Stickstoffoxid inhibiert. Falls es bei der untersuchten Substanz gemeinsam mit NO zu einer Vasodilatation kommen würde, müsste somit nach Zugabe von Nitro-L-Arginin eine gefäßerweiternde Wirkung der Testsubstanz fernbleiben.

### 3.8. Datenauswertung

Zur Auswertung der durchgeführten Messungen wurden die Aufzeichnungen vom Schreiber sowie vom Computer herangezogen. Die erhobenen Daten der Kontrollphase dienten als Referenzwert (100%), um eine Beziehung zu den ermittelten Werten nach Substanzzugabe herzustellen.

### 3.8.1. Datenauswertung des Atrium cordis dextrum

Die vom Sinusknoten ausgehende Spontanaktivität kann durch Einwirkung der zu untersuchenden Substanz beeinflusst werden. Die mögliche Auswirkung der Testsubstanz auf die Chronotropie des Herzens wurde somit erforscht, wobei eine positive (Zunahme der Herzschläge), negative (Abnahme an Schlägen) oder aber auch eine neutrale, beziehungsweise unveränderte Chronotropie festgestellt werden konnte.

Chronotropie gibt die Anzahl der Schläge pro Minute an und wird durch die Frequenz der Impulse des Sinusknoten festgelegt.

Zur Auswertung wurde die Schlagfrequenz über 12 Sekunden aufgezeichnet, dies entsprach 6 cm am Millimeterpapier. Die abgezählten Herzschläge wurden mit dem Faktor 5 multipliziert, um die Anzahl der Schläge pro Minute (Sinusfrequenz) zu erhalten.

Der Kontrollwert (100 %) wurde nur mit den letzten Messungen jeder Konzentration in Relation gesetzt, da hier ein Erreichen des steady states angenommen werden konnte.

### 3.8.2. Datenauswertung des Musculus papillaris

Bei den Versuchen am Papillarmuskel, wurde die Veränderung der Kontraktionskraft (Inotropie) des Herzens untersucht, um somit einen positiven oder negativen inotropen Effekt der Substanz sichtbar zu machen.

Auch hier wurden die Messungen alle 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 5mm/sec. durchgeführt. Zur Datenauswertung wurden nicht, wie beim rechten Vorhof die Schläge gezählt, sondern jeweils die letzte Amplitude vor Zugabe der nächsthöheren Konzentration mit einem Lineal vermessen. Der erhobene Wert der Kontrollmessung, der bereits „steady state“ Bedingungen aufwies, wurde wieder als Bezugspunkt herangezogen und gleich 100 % gesetzt, um dadurch die nach Substanzzugabe ermittelten Werte vergleichbar zu machen. Somit konnte eine Zunahme oder Abnahme der Kontraktionskraft sichtbar gemacht werden.

Da bei Versuchen am Papillarmuskel bei zu geringer Aktivität, die Spannung von 5 mV auf 2 mV beziehungsweise auf 1 mV herabgesetzt werden konnte, musste anschließend mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden, um vergleichbare Werte von mN zu erhalten.

Bei Durchführung der Versuchsreihe mit einer Spannung von 5 mV, wurde anschließend mit 0,98 multipliziert, während der Multiplikationsfaktor bei 2 mV oder 1 mV 0,39 betrug.

### 3.8.3. Datenauswertung von Arteria pulmonalis, Ileum terminale und Aorta descendens

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte bei glattmuskulären Organen auf dieselbe Weise. Als Nullpunkt wurde jener Punkt vor Zugabe der Kaliumchloridlösung angenommen. Durch Ersetzen der Nährlösung mit KCl wurden die Organe maximal vorkontrahiert, um eine Relaxation der Gefäße sichtbar zu machen.

Der Kontrollwert war die Differenz der Plateauphase zum zuvor markierten Nullpunkt. Die Höhe wurde an der Verlaufskurve jeweils nach Zugabe der Testsubstanz markiert, ehe nach einer Wartezeit von 45 Minuten und Hinzufügen der darauffolgenden Konzentration, der nächste Wert ermittelt werden konnte. Nach diesem Prinzip wurde bei den weiteren Konzentrationen vorgegangen.

Die Daten erhielt man durch Abmessen der Differenz zwischen Nullpunkt und den fünf, während der Versuchsdurchführung markierten Werten. Der erste markierte Wert wurde wieder als Referenz herangezogen und gleich 100% gesetzt.

Auch hier mussten die erhobenen Messwerte bei einer angelegten Spannung von 5 mV mit dem Faktor 0,98 multipliziert werden, um die Kontraktionskraft in man zu erhalten.

### 3.8.4. Datenauswertung an der Apparatur III

Die eigentliche Auswertung der Daten erfolgte bei der Durchführung der Versuche an der Apparatur III nicht anhand eines Millimeterpapiers, sondern mithilfe eines speziellen Tools im Programm Labscribe 2. Über die Funktion „Datenauswertung“ konnte die jeweilige Zeit, in der die Testsubstanz in den unterschiedlichen Konzentrationen hinzupipettiert wurde, eingegeben und anschließend die dazugehörigen Werte abgelesen werden.

Auch hier wurde mit einem Multiplikationsfaktor von 0,98 gerechnet, um vergleichbare Werte zu erhalten.

### 3.9. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten der jeweiligen Versuche, wurde der arithmetische Mittelwert sowie Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet.

Für die graphische Auswertung wurde das Computerprogramm „Sigma Plot 9.0“ angewendet und Konzentration-Wirkungskurven erstellt, wobei auf der Ordinate die Änderung der Kontraktion und auf der Abszisse die Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen wurde.

Aus den Diagrammen konnte die  $EC_{50}$ , jene Dosis bei der ein halbmaximaler Effekt hervorgerufen wird, ermittelt werden. Es handelt sich hierbei um ein Maß für die dosisbezogene Wirkstärke eines Arzneimittels (Fischer et al. 2013).

Die  $EC_{50}$  entspricht bei den durchgeführten Versuchen nun jener Konzentration, bei der sich je nach Organ die Inotropie, Chronotropie oder Kontraktionskraft um 50% verändert hat.

Um die Signifikanz der Messdaten zu beurteilen und die Irrtumswahrscheinlichkeit zu eruieren, wurde ein „student-t-test“ durchgeführt. Als signifikant galten Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ( $P < 0,05$ ) sowie 1 % ( $P < 0,01$ ). Als hochsignifikant wurden Werte unter 0,1% ( $P < 0,001$ ) angesehen.

## 4. Resultate

Im folgenden Kapitel werden die Resultate der diversen Versuche sowohl in tabellarischer als auch in graphischer Darstellung wiedergegeben und erläutert. Die Originalaufzeichnungen eines Organs, sollen jeweils stellvertretend für die insgesamt 4 beziehungsweise 5 durchgeführten Versuchsreihen stehen.

### 4.1. Wirkung von BW 16 auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum

Für die Untersuchung der Testsubstanz auf eine veränderte chronotrope Wirkung, wurden insgesamt 4 Versuche am rechten Vorhof durchgeführt.

Zur Bedeutung der in Tabelle 6 angegebenen Abkürzungen bezeichnet SEM den Standardfehler,  $f_c$  ist durch die Anzahl der Schläge pro Minute definiert, während n für die Anzahl der Versuche und P die Irrtumswahrscheinlichkeit wiedergibt.

Nach der Gewöhnungsphase an die vorherrschenden Bedingungen betrug die Schlagfrequenz  $218,75 \pm 7,47$  Schläge pro Minute. Dieser Wert wurde als Kontrollwert angenommen, um die nach Substanzzugabe ermittelten Werte vergleichbar zu machen.

Anhand den 4 durchgeführten Versuchen und den anschließend ermittelten Werten, konnte eine Aussage über eine Veränderung der Chronotropie bedingt durch die Testsubstanz getroffen werden.

Die nachfolgende Tabelle 6 verdeutlicht, dass BW 16 nur eine *schwach positive chronotrope* Wirkung am rechten Vorhof herbeiführte.

Die mittlere effektive Konzentration, also jene Dosis bei der ein halbmaximaler Effekt hervorgerufen wird (EC50), konnte nicht erreicht werden.

<b>BW 16 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (x/min)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</b>
<b>Kontrolle</b>	$218,75 \pm 7,47$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
<b>3</b>	$221,25 \pm 6,88$	$1,18 \pm 0,68$	4	n.s
<b>10</b>	$228,75 \pm 7,47$	$4,59 \pm 0,16$	4	n.s
<b>30</b>	$233,75 \pm 7,47$	$6,88 \pm 0,24$	4	n.s
<b>100</b>	$230,00 \pm 7,91$	$5,14 \pm 0,53$	4	n.s

Tabelle 6: Wirkung von BW 16 auf den rechten Vorhof

Rechter Vorhof  
n = 4, BW 16

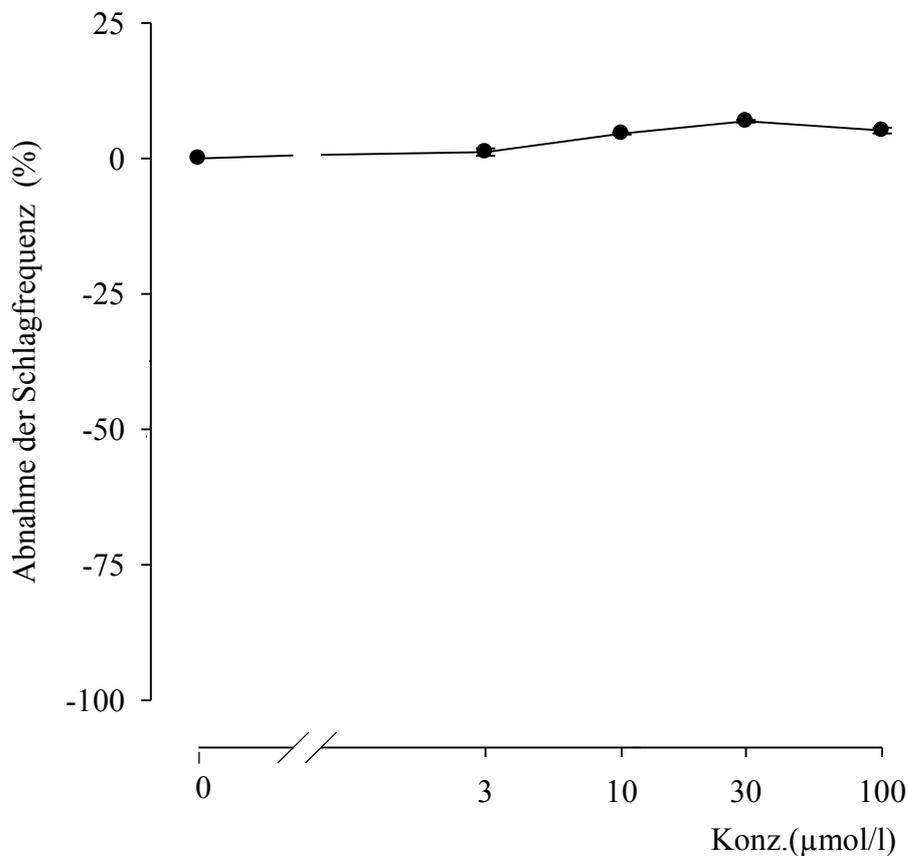


Abbildung 19: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf den rechten Vorhof

Die Abbildung 18 ermöglicht eine Veranschaulichung der Konzentration-Wirkungskurve und beschreibt die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz in µmol/l. Die entlang der Konzentration-Wirkungskurve befindlichen Punkte, zeigen die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz bei der jeweiligen Konzentration (3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l) an, während die horizontalen Balken oberhalb und unterhalb der Punkte, die dazugehörige Standardabweichung versinnbildlichen.

Aus dieser Originalaufzeichnung ist ebenfalls eine *schwach positive chronotrope* Wirkung ersichtlich, da auch nach Erhöhung der Konzentration die Schlagkraft nur minimal variierte.

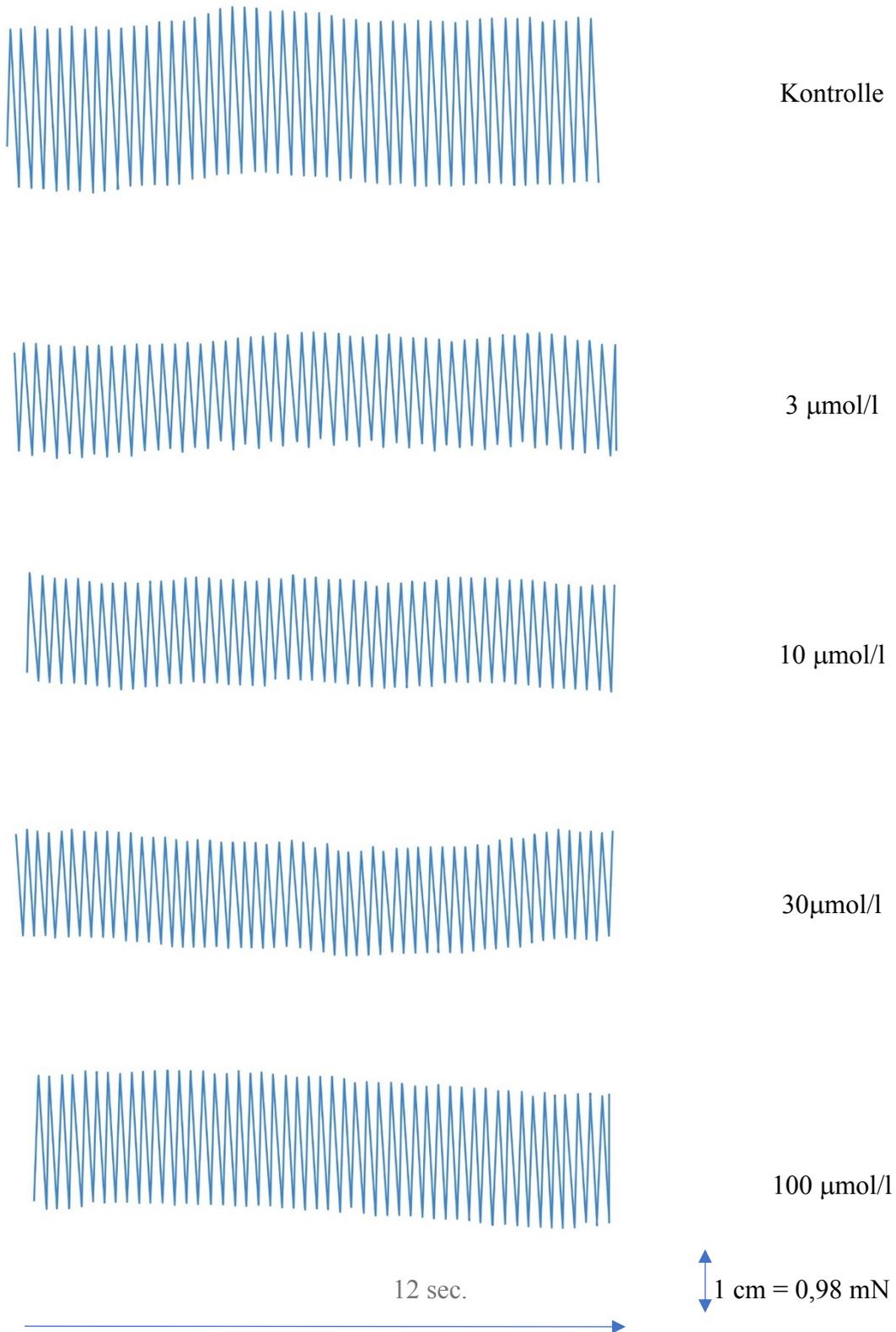


Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf den rechten Vorhof

## 4.2. Wirkung von BW 16 auf die Kontraktionskraft des Musculus papillaris

Um die inotrope Wirkung, also die Kontraktionskraft des Herzens zu untersuchen, wurden 4 Versuche an Papillarmuskelpräparaten durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle werden nun erneut die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung bei der jeweiligen Konzentration prozentuell sowie in mN dargestellt, wobei hier nicht die Schlagzahl pro Minute, sondern die Kontraktionskraft in mN von Bedeutung war.

Nach Beenden der Gewöhnungsphase und vor Zugabe der Testsubstanz betrug die Kontraktionskraft  $1,08 \pm 0,09$  mN. Dieser Wert wurde somit erneut als Kontrollwert angenommen.

Im Laufe des Versuches kam es zunächst zu einer Abnahme der Kontraktionskraft bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  ( $-8,02 \pm 5,55\%$ ) sowie bei 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $-1,02 \pm 4,70\%$ ), ehe bei Erreichen der Endkonzentration ein *schwach positiv inotroper Effekt* verzeichnet werden konnte.

<b>BW 16 (<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>
<b>Kontrolle</b>	$1,08 \pm 0,09$	$0 \pm 0$	4	-
<b>3</b>	$0,99 \pm 0,11$	$-8,02 \pm 5,55$	4	n.s
<b>10</b>	$1,07 \pm 0,11$	$-1,02 \pm 4,70$	4	n.s
<b>30</b>	$1,13 \pm 0,10$	$4,63 \pm 2,87$	4	n.s
<b>100</b>	$1,08 \pm 0,09$	$0,66 \pm 3,00$	4	n.s

Tabelle 7: Wirkung von BW 16 auf den Papillarmuskel

Papillarmuskel  
n = 4, BW 16

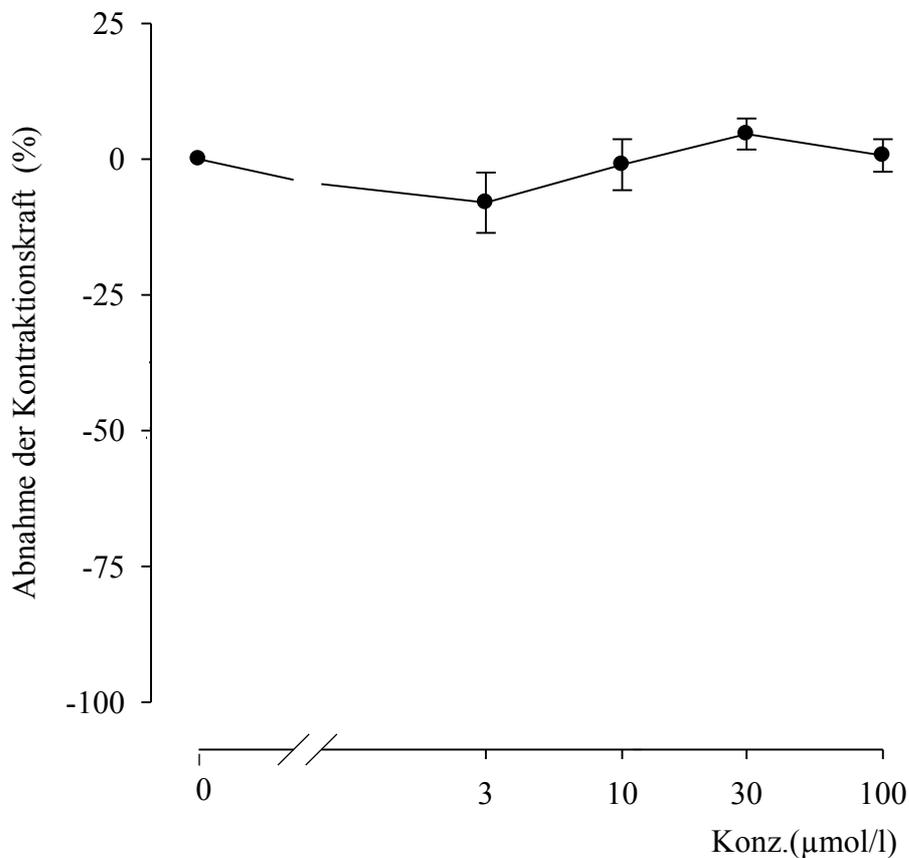
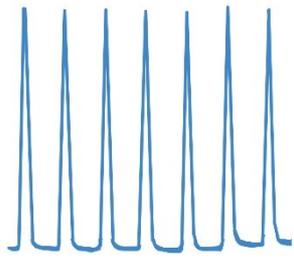


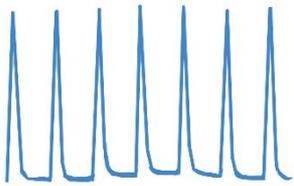
Abbildung 21: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf den Papillarmuskel

Anhand der Abbildung 21 wird ebenfalls die Konzentrations-Wirkungskurve und der resultierende Effekt von BW 16 auf den Papillarmuskel verdeutlicht. Bei einer Konzentration von 3 µmol/l konnte zunächst eine schwach negativ inotrope Wirkung verzeichnet werden, ehe bei einer Endkonzentration von 100 µmol/l ein schwach positiv inotroper Effekt ersichtlich wurde.

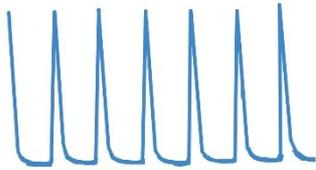
Erneut widerspiegelt die Abszisse die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l und die Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Eine EC<sub>50</sub> konnte nicht erreicht werden.



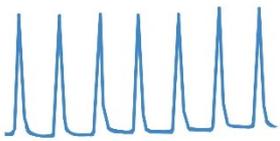
Kontrolle



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 Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel

### 4.3. Wirkung von BW 16 auf die Arteria pulmonalis

Für die Untersuchung einer potentiellen Veränderung auf die Relaxation der Lungenarterie, wurden 5 Versuche durchgeführt.

In Tabelle 8 können die erhobenen Daten als arithmetische Mittelwerte in mN sowie die prozentuelle Veränderung für die jeweilige Konzentration neben deren Standardfehler (SEM) abgelesen werden.

Nach Beenden der Gewöhnungsphase konnte als Referenz eine maximale Kontraktion durch chemische Reizung mit einer 90 mmolaren Kaliumchloridlösung von  $16,03 \pm 3,28$  mN erreicht werden. Dieser Wert wurde erneut als Kontrollwert angenommen. Die einzelnen Messwerte der jeweiligen Konzentration konnten nun somit, mit jenem Wert, der in der Plateauphase erreicht wurde (=Kontrollwert) verglichen werden, um den auftretenden Effekt in Relation zu setzen. Am Ende der kumulativen Substanzzugabe konnte eine *geringe Dilatation* beobachtet werden, ebenso wurde eine  $EC_{50}$  nicht erreicht.

<b>BW 16 (<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>
<b>Kontrolle</b>	16,03 $\pm$ 3,28	0,00 $\pm$ 0,00	5	-
<b>3</b>	15,51 $\pm$ 3,10	-2,92 $\pm$ 1,26	5	n.s
<b>10</b>	15,33 $\pm$ 3,18	-4,75 $\pm$ 0,59	5	0,05
<b>30</b>	15,13 $\pm$ 3,19	-6,52 $\pm$ 1,36	5	0,05
<b>100</b>	14,35 $\pm$ 2,98	-10,91 $\pm$ 1,55	5	0,05

Tabelle 8: Wirkung von BW 16 auf die Lungenarterie

Arteria pulmonalis  
n = 5, BW 16

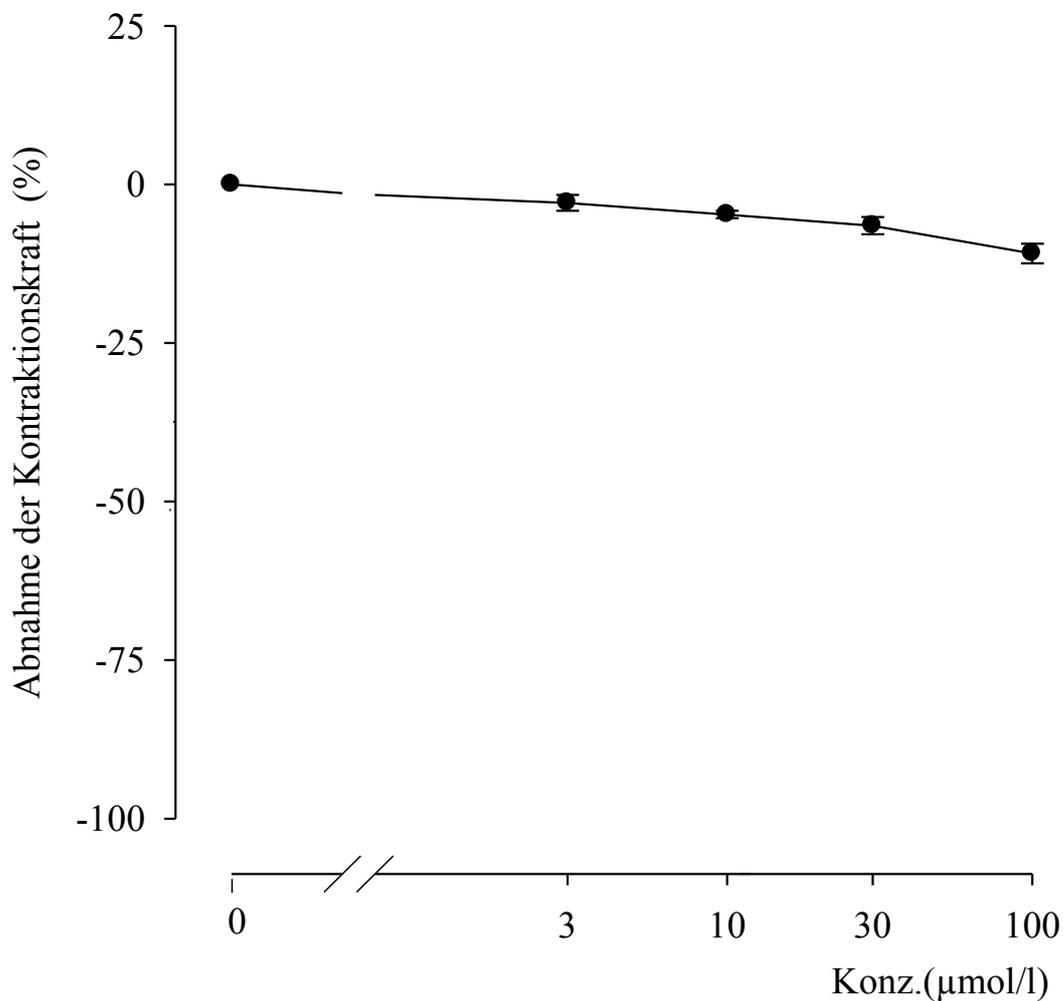


Abbildung 23: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf die Pulmonalarterie

Anhand der abgebildeten Konzentration-Wirkungskurve, wird noch einmal die geringe vasodilatative Wirkung von BW 16 auf die Lungenarterie ersichtlich. Auf der Abszisse ist erneut die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l aufgetragen und auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Abermals konnte eine  $EC_{50}$  nicht erreicht werden.

Die Originalaufnahme widerspiegelt die geringe vasodilatierende Wirkung von BW 16 auf die Lungenarterie. Auch während der kumulativen Substanzzugabe ist keine signifikante Abnahme der Kontraktion ersichtlich.

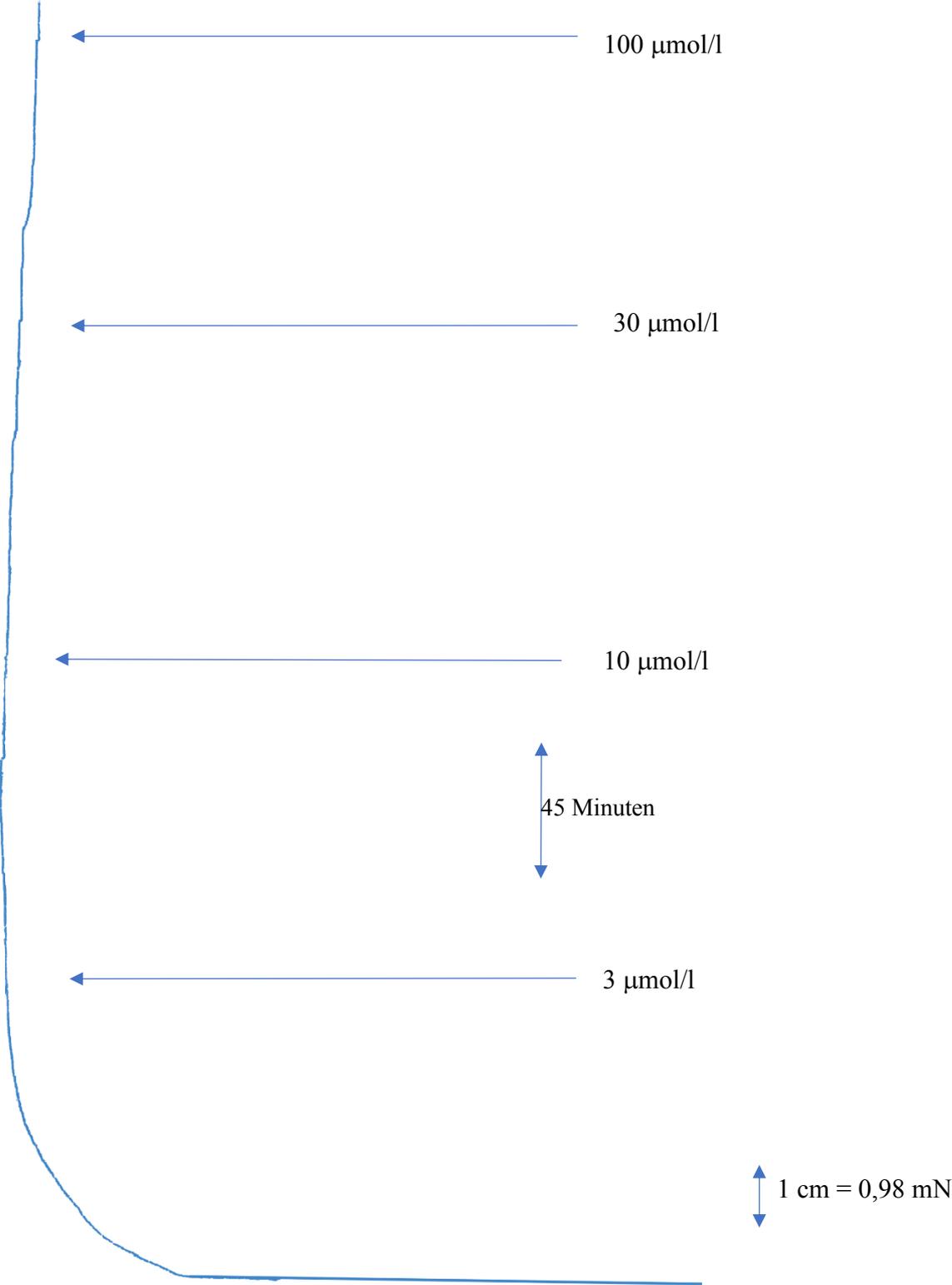


Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf die Pulmonalarterie

#### 4.4. Wirkung von BW 16 auf das Ileum terminale

Zur Testung der spasmolytischen bzw. dilatierenden Aktivität der Testsubstanz auf das terminale Ileum, wurden 5 Versuche durchgeführt. Durch chemische Reizung mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung, konnte eine maximale Darmkontraktion von  $10,98 \pm 1,22$  mN erreicht werden. Dieser Wert wurde erneut als Kontrollwert definiert, um den nach kumulativer Substanzzugabe auftretenden Effekt wieder in Relation zum Kontrollwert setzen zu können. Bei diesen Versuchen konnte eine leichte Veränderung der Kontraktionskraft abgeleitet werden, jedoch ebenfalls eine zu *geringe spasmolytische Wirkung*, um eine  $EC_{50}$  zu ermitteln. Nach kumulativer Substanzzugabe von BW 16 und Erreichen der gewünschten Endkonzentration kam es zu einer 18,93%-igen Reduktion der Kontraktionskraft des terminalen Ileums.

In Tabelle 9 werden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung (SEM) in nM sowie die prozentuelle Veränderung bei der jeweiligen Konzentration erläutert.

<b>BW 16 (<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>
<b>Kontrolle</b>	10,98 $\pm$ 1,22	0,00 $\pm$ 0,00	5	-
<b>3</b>	10,88 $\pm$ 1,26	-1,21 $\pm$ 2,07	5	n.s
<b>10</b>	10,44 $\pm$ 1,23	-5,26 $\pm$ 2,20	5	0,05
<b>30</b>	9,64 $\pm$ 1,12	-12,37 $\pm$ 3,18	5	0,05
<b>100</b>	8,87 $\pm$ 1,04	-18,93 $\pm$ 5,54	5	0,05

*Tabelle 9: Wirkung von BW 16 auf das terminale Ileum*

Terminales Ileum  
n = 5, BW 16

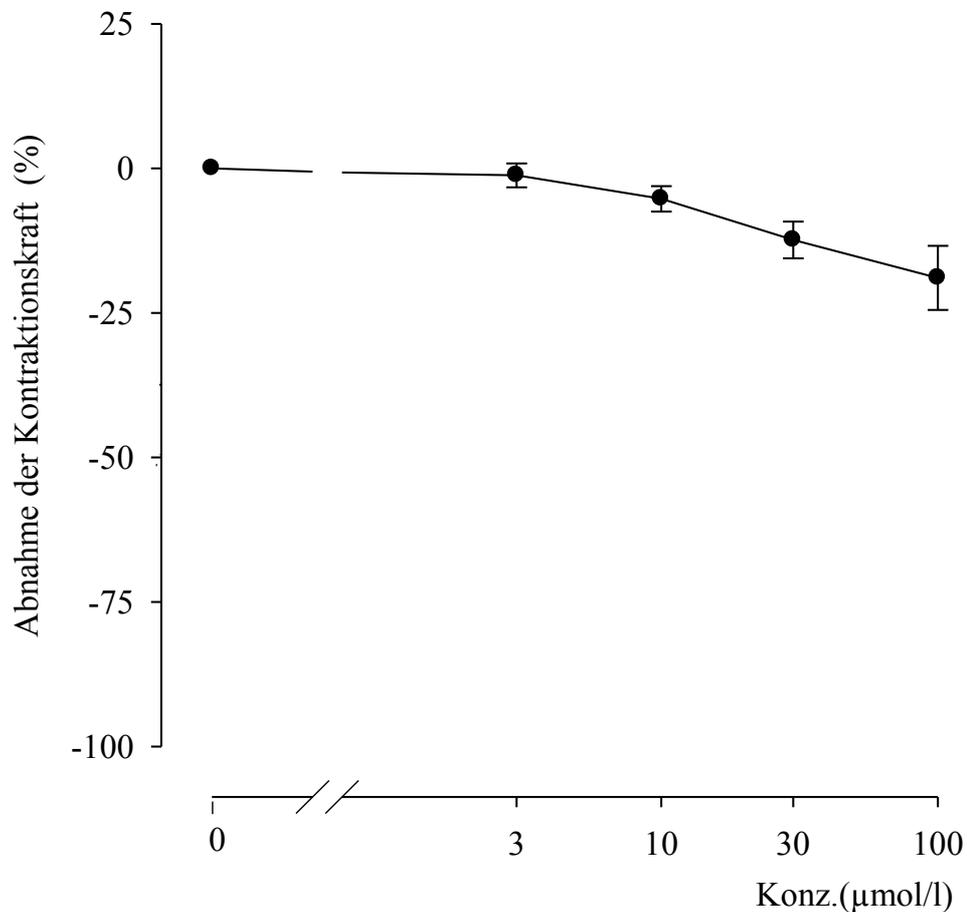
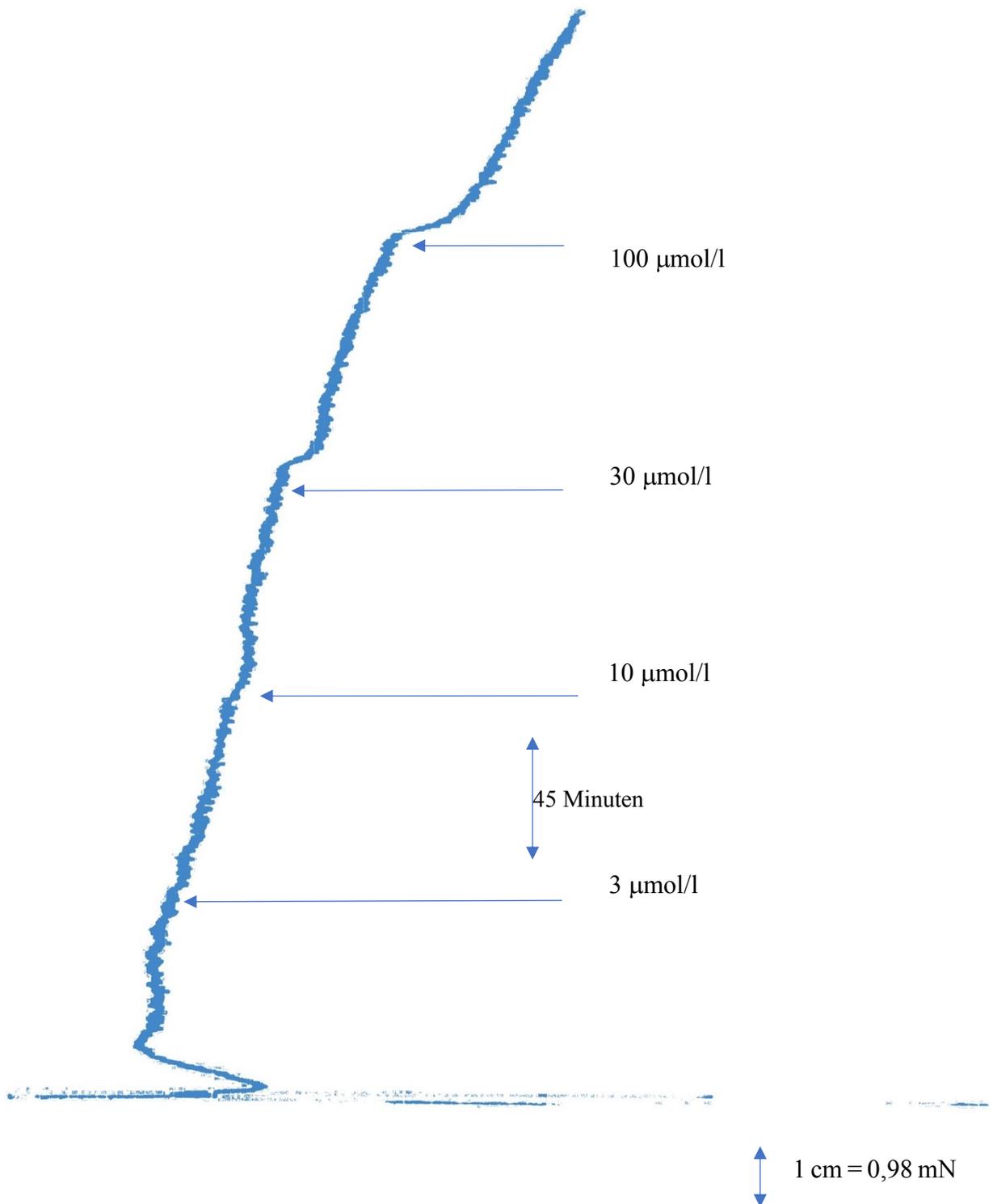


Abbildung 25: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf das terminale Ileum

Die Konzentration-Wirkungskurve veranschaulicht die prozentuelle Veränderung der Kontraktionskraft in Relation auf die Substanzkonzentration in µmol/l im Organbad. Die Punkte kennzeichnen die jeweiligen Mittelwerte der Kontraktionskraft, hingegen die horizontalen Balken, die Standardabweichung.

Der Graph verdeutlicht, dass die spasmolytische Aktivität von BW 16 ab einer Konzentration von 10 µmol/l deutlich profilierter ist.



Der Kurvenverlauf zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft nach Erreichen der Plateauphase.

*Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf das terminale Ileum*

#### 4.5. Wirkung von BW 16 auf die Aorta descendens

An diesem Organ wurden 5 weitere Versuche durchgeführt, um eine potentielle vasodilatative Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur der Aorta zu untersuchen.

Nach maximaler Kontraktion durch 90 mmolare Kaliumchloridlösung und anschließender kumulativen Zugabe der Substanz, konnte die daraus resultierende Änderung der Kontraktionskraft durch Vermessen des Abstands zur Nulllinie ermittelt werden. Die so vermessenen Werte wurden erneut in Relation zum Kontrollwert gesetzt, um sie so vergleichbar zu machen.

Bei der gewünschten Endkonzentration (100µmol/l) im Organbad wurde eine minimale Relaxation der Gefäßmuskulatur von  $-6,31 \pm 4,17$  hervorgerufen.

Die Abnahme der Kontraktionskraft ist *nicht signifikant*, weshalb auch eine mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) nicht berechnet werden konnte.

Durch die in Tabelle 10 angeführten arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung (SEM) in nM sowie die prozentuelle Veränderung bei der jeweiligen Konzentration wird die geringe vasodilatative Wirkung ersichtlich.

<b>BW 16 (µmol/l)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (mN)</b>	<b>f<sub>c</sub> ± SEM (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</b>
<b>Kontrolle</b>	10,68±3,50	0,00±0,00	5	-
<b>3</b>	10,39±3,44	-3,44±1,77	5	n.s
<b>10</b>	10,42±3,54	-4,03±2,81	5	n.s
<b>30</b>	10,35±3,58	-5,25±3,66	5	n.s
<b>100</b>	10,40±3,78	-6,31±4,17	5	n.s

*Tabelle 10: Wirkung von BW 16 auf die Aorta*

AORTA  
n = 5, BW 16

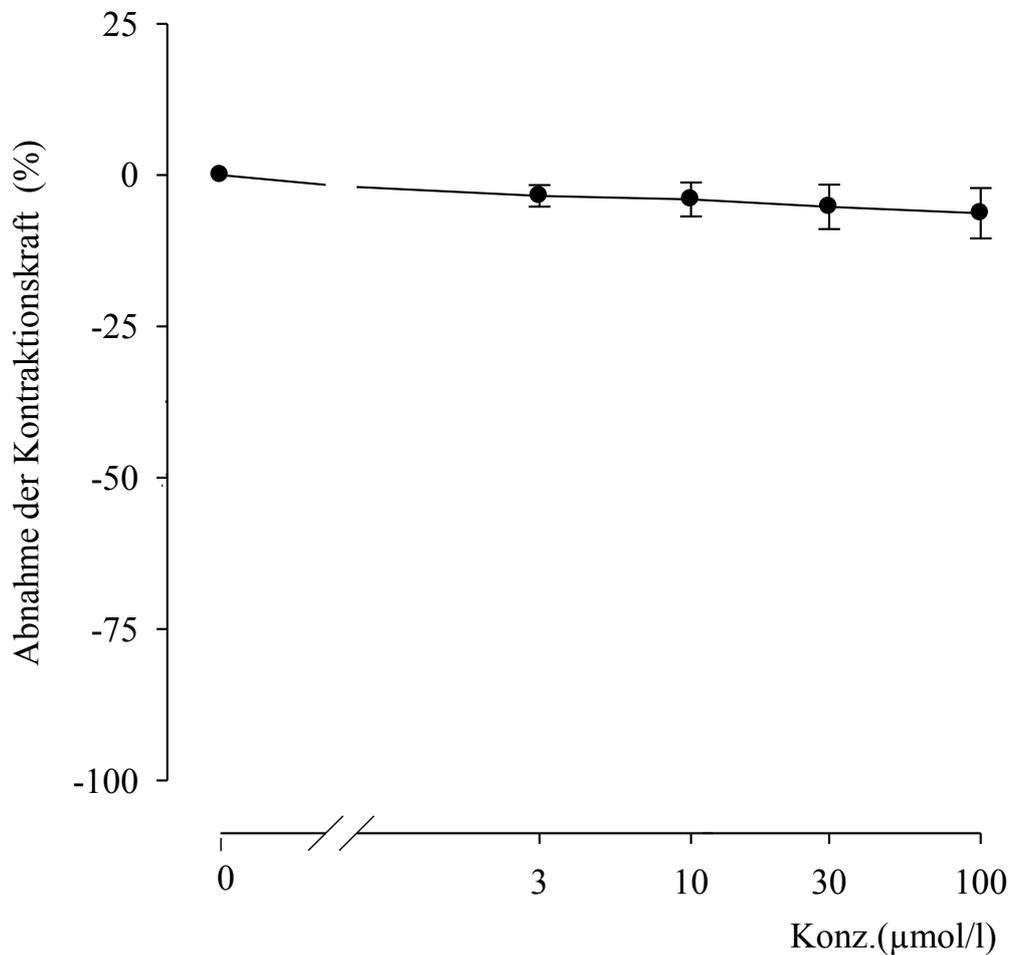
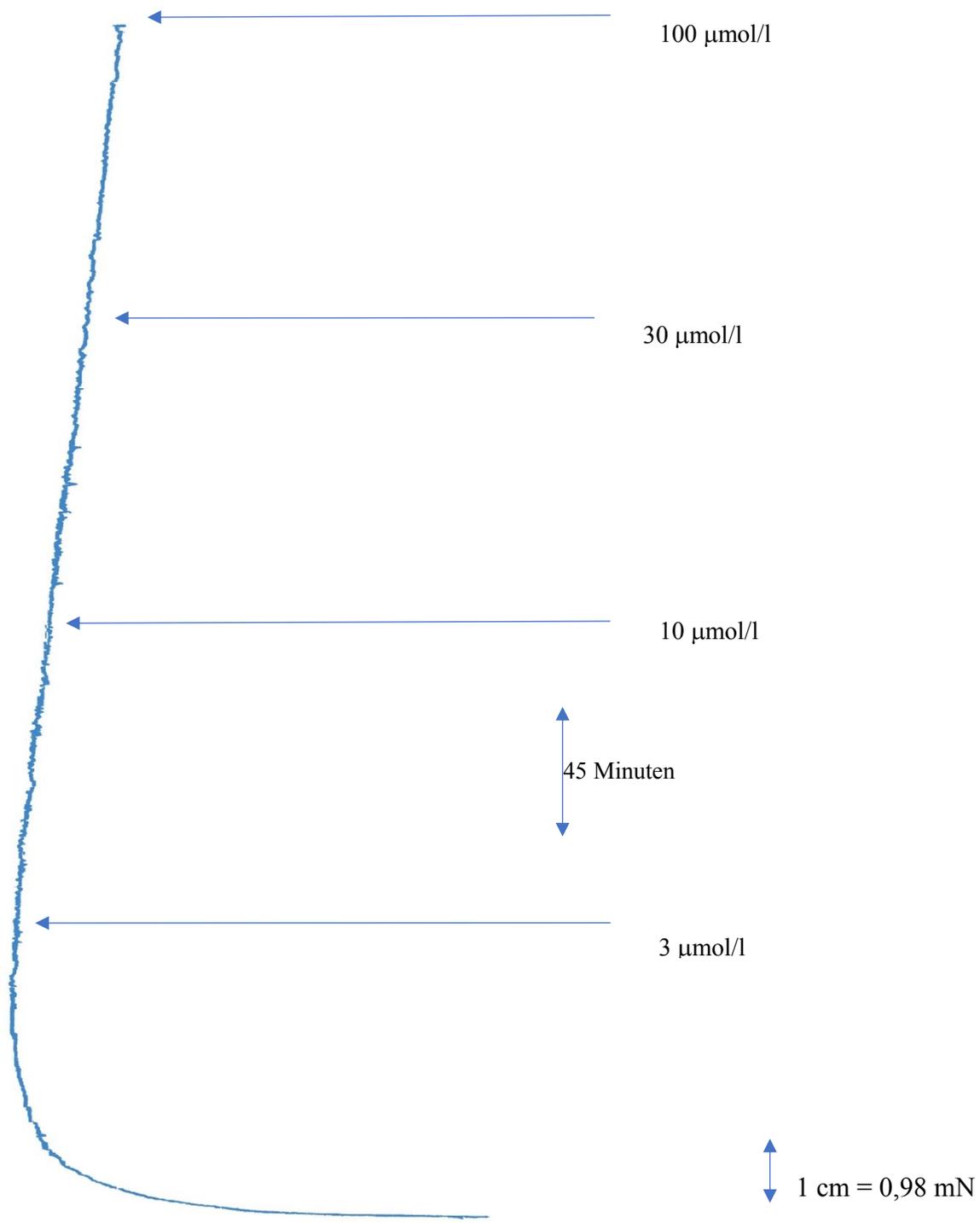


Abbildung 27: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf die Aorta

Die abnehmende Kontraktionskraft (in %) der Aorta ist im Zusammenhang mit der Substanzkonzentration in µmol/l graphisch dargestellt.

Die Punkte symbolisieren die Mittelwerte der Kontraktionskraft nach Einspritzen der entsprechenden Konzentration und die horizontalen Balken, deren Standardfehler.

An der Aorta zeigt die Testsubstanz den minimalsten Effekt auf, wobei eine geringe vasodilatative Wirkung zu beobachten ist.



Die Originalaufnahme zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration im Organbad.

Abbildung 28: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf die Aorta

## **4.6. Untersuchung des Wirkmechanismus von BW 16 auf das Ileum terminale**

Der Wirkmechanismus der zu untersuchenden Substanz wurde anhand der Darmmuskulatur aufgezeigt, da sich hier die stärkste spasmolytische Wirkung erwies. Diese Untersuchung wurde mithilfe des Antagonisten Nitro-L-Arginin erforscht, wobei 3 Versuche durchgeführt wurden.

### 4.6.1. Wirkung von BW 16 in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf das terminale Ileum

Zunächst wurde die glatte Muskulatur des terminalen Ileums durch Zugabe einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung maximal vorkontrahiert, ehe nachträglich 100 µl einer 100 µM Lösung von Nitro-L-Arginin dem Organbad zugefügt wurde. Nach maximaler Kontraktion konnte ein Kontrollwert von  $10,95 \pm 1,31$  erreicht werden. Eine schwache spasmolytische Wirkung, die nach Zugabe von Nitro-L-Arginin auftrat, veranlasste eine Abnahme der Kontraktionskraft auf  $10,61 \pm 1,15$ . Wie bereits in Kapitel 3.7.5 erläutert, beruht die Tonussenkung der glatten Gefäßmuskulatur auf einer Aktivierung der Guanylylcyclase mit Erhöhung des zellulären cGMP-Gehaltes und veranlasst durch Relaxation vaskulärer glatter Muskelzellen eine Vasodilatation.

NO kann physiologisch als Botenstoff von Endothelzellen an die umliegenden glatten Muskelzellen des terminalen Ileums abgegeben werden. Durch Beifügen von Nitro-L-Arginin ist eine Freisetzung von NO durch Blockade der eNOS nicht möglich, wodurch eine Relaxation der glatten Muskulatur ausbleibt.

Nach einer Wartezeit von 45 Minuten, wurde 100 µl einer 100 µM Lösung der Testsubstanz in die Organkammer zugegeben, welche eine weitere Abnahme der Kontraktionskraft von  $7,34 \pm 0,45$  herbeiführte.

Die spasmolytische Wirkung zeigte mehr Relevanz ohne Zugabe von Nitro-L-Arginin, jedoch kam es auch nach Zugabe des Antagonisten zu einem gefäßerweiternden Effekt.

Somit spielt die endotheliale NO-Synthase vermutlich keine Rolle an der aufgezeigten Wirkung der Testsubstanz, wenn auch nur von geringerer Bedeutsamkeit.

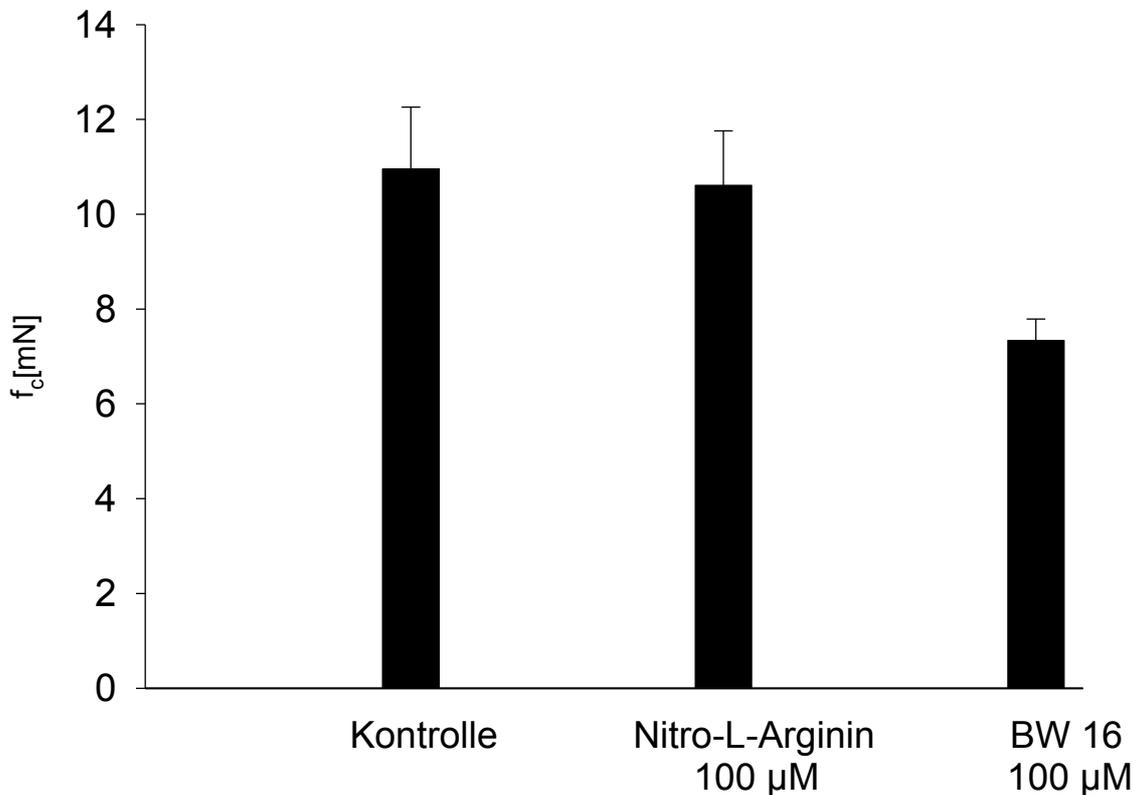
Wahrscheinlich sind andere Mechanismen und Vorgänge an der Wirkung beteiligt, wie beispielsweise eine sympathische Regulation der Gefäße. Um dies zu überprüfen, wären noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Mittelwerte der Kontraktionsänderung in mN und deren Standardfehler sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

<b>BW 16 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche (n)</b>	<b>Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)</b>
<b>Kontrolle</b>	10,95 $\pm$ 1,31	4	-
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> Nitro-L-Arginin</b>	10,61 $\pm$ 1,15	4	-
<b>+ 100 <math>\mu\text{M}</math> BW 16</b>	7,34 $\pm$ 0,45	4	0,05

*Tabelle 11: Wirkmechanismus von BW 16 in Kombination mit 100 $\mu\text{l}$  Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum*

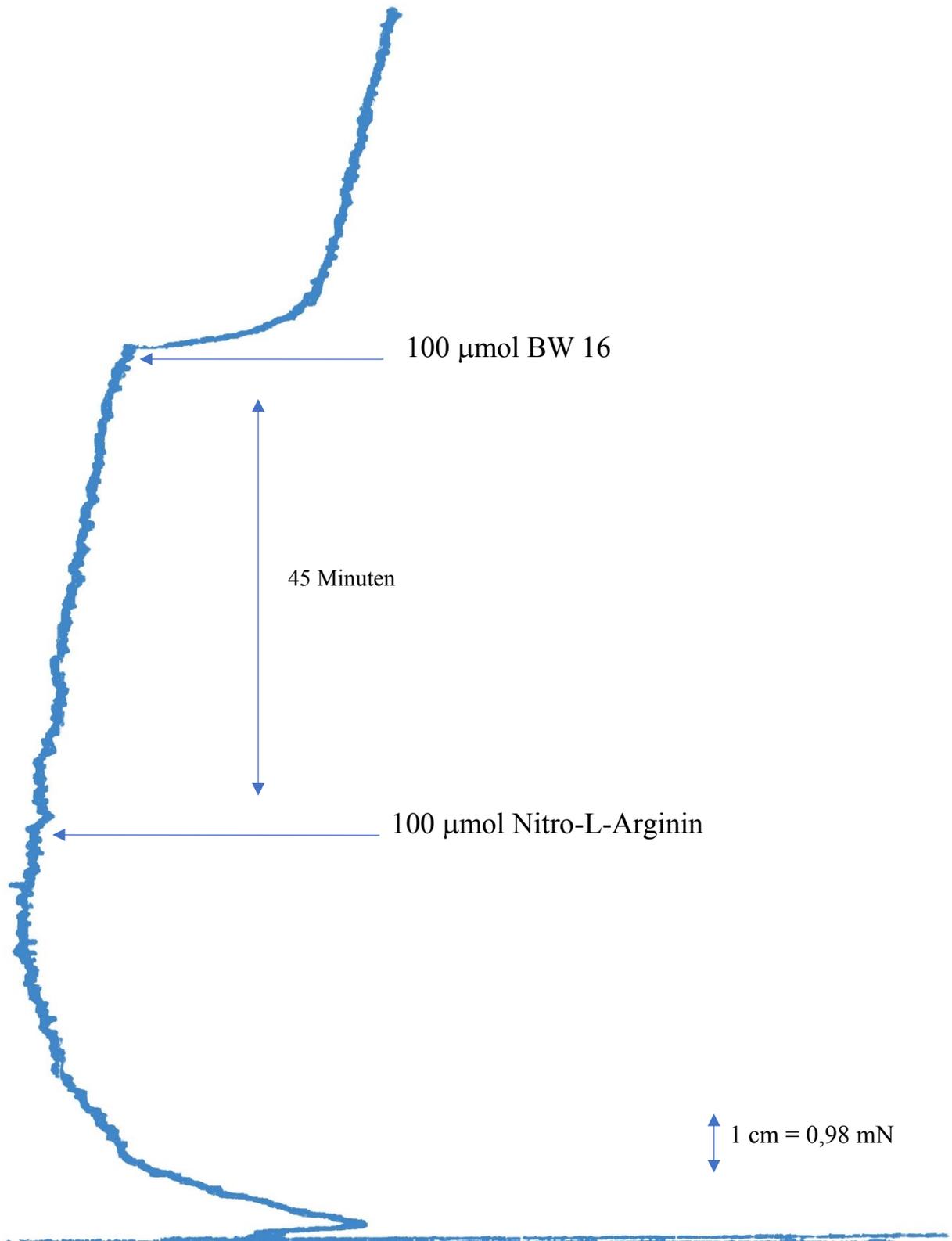
**Terminales Ileum, Nitro-L-Arginin (100 $\mu$ M)  
BW 16, 100  $\mu$ mol/l  
n=4**



*Abbildung 29: Graphische Darstellung der Wirkung von Nitro-L-Arginin und die Wirkung in Kombination mit BW 16*

Mithilfe des dazugehörigen Balkendiagramms können die erhobenen Messwerte graphisch abgebildet werden. Die Darstellung zeigt die Änderung der Kontraktilität in mN auf der Ordinate in Abhängigkeit der zugefügten Substanzen bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M sowie den Kontrollwert auf der Abszisse.

Anhand der Balken lassen sich die arithmetischen Mittelwerte der Kontrolle und die Kontraktionskraft nach Zugabe von 100  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Lösung von Nitro-L-Arginin sowie nach Zugabe von 100  $\mu$ l der gelösten Testsubstanz beobachten. Die Linien sollen deren Standardfehler symbolisieren.



Nach Erreichen der Plateauphase und Zugabe des Antagonisten wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft unter Einwirkung von Nitro-L-Arginin herbeigeführt, ehe nach 45-Minuten die Testsubstanz zugefügt wurde, wodurch eine bedeutendere Spasmolyse resultierte.

*Abbildung 30: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 in Kombination mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum*

## 5. Diskussion

Ziel dieser praktischen Arbeit war die Analyse einer neu synthetisierten Substanz bezüglich ihrer Wirkung auf die Organe des Meerschweinchens zu testen. Zur Erforschung der Vasodilatation wurden die glattmuskulären Organe der Aorta, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums herangezogen.

Präparate der quergestreiften Herzmuskulatur, wie das Atrium cordis dexter und der Musculus papillaris waren erforderlich, um Aussagen bezüglich Chronotropie beziehungsweise Inotropie zu treffen.

Die folgenden beiden Abschnitte dienen der Analyse und Gegenüberstellung der erhobenen Ergebnisse.

### 5.1. Wirkung der Testsubstanz auf Organe der glatten Muskulatur

Zur Untersuchung der Testsubstanz auf eine dilatierende Komponente, wurden die glattmuskulären Gefäße der Aorta descendens und Arteria pulmonalis verwendet, während zum Nachweis einer potentiellen spasmolytischen Wirkung das terminale Ileum eingesetzt wurde.

Am terminalen Ileum wurde der stärkste Effekt hervorgerufen, wobei auch hier eine mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) nicht ermittelt werden konnte.

An den beiden Gefäßen konnte eine schwach dilatierende Wirkung beobachtet werden, jedoch ebenfalls zu minimal um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen.

Anhand der Ergebnisse von Aorta descendens sowie Arteria pulmonalis wird bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  der ähnliche Aufbau der beiden Gefäße ersichtlich. Der Unterschied in der Änderung ihrer Kontraktionskraft nimmt erst bei einer höheren Konzentration zu.

Die entsprechenden Messwerte der jeweiligen Organpräparate bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  und der erreichten Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  können aus der nachstehenden Tabelle entnommen werden.

Organpräparat	Änderung der Kontraktionskraft in Prozent $\pm$ SEM bei 10 $\mu$ mol/l	Änderung der Kontraktionskraft in Prozent $\pm$ SEM bei 100 $\mu$ mol/l
Arteria pulmonalis	-4,75 $\pm$ 0,59	-10,91 $\pm$ 1,55
Aorta descendens	-4,03 $\pm$ 2,81	-6,31 $\pm$ 4,17
Ileum terminale	-5,26 $\pm$ 2,20	-18,93 $\pm$ 5,54

*Tabelle 12: Änderung der Kontraktionskraft an glattmuskulären Organen in Abhängigkeit der Substanzkonzentration*

### 5.1.2. Wirkung der Testsubstanz auf die Arteria pulmonalis

Die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die Pulmonalarterie war etwas ausgeprägter als der Effekt auf die Aorta. Zu Beginn konnte zwar eine ähnliche Änderung der Kontraktion der beiden Gefäße festgestellt werden, jedoch beträgt die Abnahme an der Arteria pulmonalis bei der gewünschten Endkonzentration von 100  $\mu$ mol/l -10,91 $\pm$ 1,55. Im Vergleich dazu ist die Wirkung der Testsubstanz an der Pulmonalarterie bei einer Konzentration von 3 $\mu$ mol/l mit einer Abnahme von -2,92 $\pm$ 1,26 noch nicht wirklich ersichtlich. Es konnte trotzdem keine EC<sub>50</sub> berechnet werden.

### 5.1.3. Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta descendens

Wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, konnte an den beiden Gefäßen ein ähnlicher Effekt beobachtet werden, der allerdings ab einer Konzentration von 100  $\mu$ mol/l an der Pulmonalarterie profilierter war.

Bei einer Konzentration von 3  $\mu$ mol/l war nur eine leichte Veränderung der Kontraktionskraft zu erkennen (-3,44 $\pm$ 1,77), während bei einer Konzentration von 100  $\mu$ mol/l der vasodilatierende Effekt beinahe auf das Doppelte anstieg (-6,31 $\pm$ 4,17).

Ein halbmaximaler Effekt konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

#### 5.1.4. Wirkung der Testsubstanz auf das terminale Ileum

Von den drei untersuchten glattmuskulären Organen, wurde an den Darmpräparaten die deutlichste Wirkung auf die Änderung der Kontraktionskraft ersichtlich.

Bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  ist der hervorgerufene spasmolytische Effekt noch vergleichsweise gering und mit einer Abnahme von  $-1,21 \pm 2,07$  noch kaum ersichtlich. Dieser Effekt nimmt jedoch mit steigender Konzentration zu und endet bei einer durchschnittlichen, prozentuellen Abnahme der Kontraktionskraft von  $-18,93 \pm 5,54$ . Auch hier kann eine  $EC_{50}$  nicht ermittelt werden.

### **5.2. Wirkung der Testsubstanz auf Organe der quergestreiften Muskulatur**

An der Herzmuskulatur wurden weitere Wirkungen der Testsubstanz erforscht.

Zur Feststellung der Chronotropie (Schlagfrequenz) wurden Versuchsreihen am rechten Vorhof durchgeführt, während der Papillarmuskel zur Ermittlung der inotropen Änderung (Änderung der Kontraktionskraft) herangezogen wurde.

Wie aus der nachfolgenden Tabelle 13 ersichtlich wird, weist die Testsubstanz zwar einen Effekt auf die Organe der quergestreiften Muskulatur auf, wenn auch nur in geringem Ausmaß.

Organpräparat	Änderung der Kontraktionskraft in Prozent $\pm$ SEM bei $10\mu\text{mol/l}$	Änderung der Kontraktionskraft in Prozent $\pm$ SEM bei $100\mu\text{mol/l}$
Atrium cordis dextrum	$4,59 \pm 0,16$	$5,14 \pm 0,53$
Musculus papillaris	$-1,02 \pm 4,70$	$0,66 \pm 3,00$

*Tabelle 13: Änderung der Kontraktionskraft auf die Herzmuskulatur*

### 5.2.1. Wirkung der Testsubstanz auf das Atrium cordis dextrum

Am rechten Vorhof wurden in 4 Versuchsreihen die Schläge des Herzmuskels pro Minute ermittelt, um eine Aussage über die Chronotropie zu treffen.

Das arithmetische Mittel des Kontrollwertes betrug  $218,75 \pm 7,47$  Schläge pro Minute.

Eine minimal positive chronotrope Wirkung zeichnete sich im Verlauf der Versuchsreihen ab. So betrug die prozentuelle Zunahme der Schlagfrequenz bei den ersten beiden Konzentrationsstufen ( $3 \mu\text{mol/l}$ ;  $10 \mu\text{mol/l}$ )  $1,18 \pm 0,68$  beziehungsweise  $4,59 \pm 0,16$ .

Mit Erreichen der gewünschten Endkonzentration konnte nun erneut eine schwach positive chronotrope Wirkung demonstriert werden, jedoch zu gering um eine  $EC_{50}$  festzustellen.

Das arithmetische Mittel betrug bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  230 Schläge pro Minute, bezogen auf den Referenzwert. Bei keinem der 4 durchgeführten Versuche konnte ein halbmaximaler Effekt erreicht werden.

### 5.2.2. Wirkung der Testsubstanz auf den Musculus papillaris

Zur Untersuchung der Testsubstanz auf einen inotropen Effekt, wurden vier Versuche am Papillarmuskel durchgeführt. Eine Abnahme der Kontraktionskraft lässt auf eine negative Inotropie schließen, während eine gesteigerte Kontraktionsfähigkeit des Papillarmuskels nach Substanzzugabe auf einen positiv inotropen Effekt hinweist.

Im Laufe der Versuchsreihe konnte zunächst eine Abnahme der Inotropie bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  ( $-8,02 \pm 5,55\%$ ) sowie bei  $10 \mu\text{mol/l}$  ( $-1,02 \pm 4,70\%$ ) verzeichnet werden. Bei Erreichen der Endkonzentration wurde eine vergleichsweise geringe prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft ( $0,66 \pm 3,00$ ) ersichtlich und somit ein schwach positiv inotroper Effekt.

### 5.2.3. Analyse des Wirkmechanismus am terminalen Ileum

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus wurde jenes Organ verwendet, an dem eine mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) bestimmt werden konnte, beziehungsweise jenes Organ an dem der hervorgerufene Effekt am stärksten war

Bei den Versuchen am terminalen Ileum zeigte BW 16 die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft, jedoch konnte auch hier eine  $EC_{50}$  nicht ermittelt werden.

Zur Analyse des Wirkmechanismus wurden 4 Versuche am terminalen Ileum durchgeführt, jeweils mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin.

Wie bereits in Kapitel 3.7.5. beschrieben, wird durch das antagonistisch wirkende Nitro-L-Arginin die NO-Synthase inhibiert und somit eine Freisetzung von Stickstoffoxid verhindert, wodurch eine Kontraktionshemmung der glatten Muskulatur und somit eine Vasodilatation ausbleibt.

Ob es trotz Zugabe des kompetitiven Hemmstoff Nitro-L-Arginin zu einer Relaxation kommt, musste überprüft werden.

Nach Erreichen der maximalen Kontraktion (Kontrollwert:  $10,95 \pm 1,31$ ), konnte nach Zugabe des Antagonisten zunächst eine schwache Abnahme der Kontraktionskraft ( $10,61 \pm 1,15$ ) verzeichnet werden, ehe nach Zugabe der Testsubstanz eine stärkere Vasodilatation resultierte ( $7,34 \pm 0,45$ ). Somit ist die endotheliale NO-Synthase an der aufgezeigten Wirkung nicht beteiligt. Vermutlich spielen andere Mechanismen am hervorgerufenen spasmolytischen Effekt eine Rolle.

## 6. Conclusio

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit sollte die Wirkung eines neu synthetisierten Arzneistoffs an isolierten Meerschweinchenorganen erforscht werden.

Folgende Präparate wurden für die jeweiligen Versuche herangezogen: das Atrium cordis dextrum und der Musculus papillaris kamen als Vertreter der quergestreiften Muskulatur in Verwendung, während die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum als glattmuskuläre Organe analysiert wurden.

Zur Untersuchung der Testsubstanz auf einen möglichen vasodilatierenden beziehungsweise spasmolytischen Effekt, waren die isolierten Präparate der glatten Gewebszellen Gegenstand der Analyse. Zur Erhebung weiterer Effekte wurden die Herzpräparate untersucht. Hierfür diente der Papillarmuskel zur Erforschung der inotropen Wirkung, während am rechten Vorhof negativ oder positiv chronotrope Mechanismen untersucht wurden.

Die verwendeten Organe wurden entsprechend präpariert und anschließend in begaste und mit Nährlösung befüllte Organkammern eingebracht, um möglichst physiologische Bedingungen sicherzustellen.

In Abständen von 45 Minuten, um „steady state“ Bedingungen zu schaffen, wurde die in DMSO gelöste Testsubstanz unter kumulativer Zugabe nach dem vorgegebenen Pipettierschema ( $3\mu\text{mol}$ ,  $7\mu\text{mol}$ ,  $20\mu\text{mol}$ ,  $70\mu\text{mol}$ ) dem Organbad zugefügt. Der hervorgerufene Effekt wurde mittels Amplifier verstärkt und der Verlauf der Untersuchung über einen Flachbettsschreiber dokumentiert und anschließend vermessen.

Um eine statistische Auswertung der erhobenen Daten vornehmen zu können, wurden stets mindestens 4 Versuche an den jeweiligen Organen durchgeführt. Die arithmetischen Mittelwerte sowie deren Standardfehler wurden berechnet. Als Kontrollwert diente jener Wert, vor Substanzzugabe und nach Einstellen eines Fließgleichgewichtes, um nachfolgend den hervorgerufenen Effekt in Relation setzen zu können.

An den Herzpräparaten konnten keine bedeutsamen Wirkungen hervorgerufen werden.

Der Effekt der Testsubstanz auf das Atrium cordis dextrum erwies sich als schwach positiv chronotrop. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  wurde die Schlagfrequenz um  $5,14 \pm 0,53$  % des Kontrollwertes erhöht.

Ebenfalls konnte auch am Papillarmuskel nur eine schwach positiv inotrope Wirkung mit einer Abnahme der Kontraktionskraft bei Erreichen der Endkonzentration um  $0,66 \pm 3,00$  % verzeichnet werden.

Der vasodilatierende Einfluss der Testsubstanz auf glattmuskuläre Organe war ebenfalls nicht von großer Bedeutung.

Lediglich am terminalen Ileum konnte ein relevanter spasmolytischer Effekt notiert werden, indem die Abnahme der Kontraktionskraft bei der gewünschten Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  um  $-18,93 \pm 5,54$  % des Kontrollwertes vermindert wurde.

Dieses Organ wurde auch zur Untersuchung des Wirkmechanismus herangezogen.

Als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase wurde Nitro-L-Arginin verwendet. Stickstoffoxid bewirkt durch Stimulierung der löslichen Guanylylcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur und einhergehendem Anstieg der Konzentration an cyclischem GMP eine verminderte cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Gefäßrelaxation.

Wie die Ergebnisse des Wirkmechanismus zeigten, kam es an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums, trotz hervorgerufene Blockade der endothelialen NO-Synthase zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft. Folglich wären noch weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Wirkmechanismus zu eruieren, da vermutlich noch andere Mechanismen für den relaxierenden Effekt verantwortlich sind.

Eine  $\text{EC}_{50}$  konnte bei keinem der untersuchten Organe ermittelt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (begründet von Forth, Henschler D, Rummel W) (2017) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer, 2017.

Beyer H, Walter W (1998) *Lehrbuch der organischen Chemie*. 23. Auflage. Stuttgart: S Hirzel Verlag, 1998.

Campbell N. A, Reece J. B, Markl J (2003) *Biologie*. 6. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.

Faller A, Schünke M, unter Mitarbeit von Schünke G (©1966, 2012) *Der Körper des Menschen*. 16. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG, 2012.

Fischer D, Breitenbach J (2013) *Die Pharmaindustrie- Einblick, Durchblick, Perspektiven*. 4. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 2013.

Fritsch H, Kühnel W (©1975, 2013) *Taschenatlas Anatomie, 2 Innere Organe*. 11. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG, 2013.

Gstraunthaler G, Lindl T (2013) *Zell-und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.

Jecklin E (2016) *Arbeitsbuch Anatomie und Physiologie*. 15. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2016.

Just-Schweinchen.de; <http://www.just-schweinchen.de/meerschweinchen-koerperbau.php>  
[Online]

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (©1990, 2008) *Taschenatlas Pharmakologie*. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer - Korting M (2001), *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft GmbH, 2001.

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

Paulsen F, Waschke (Hrsg.) J (2010) Sobotta, *Atlas der Anatomie des Menschen*. (der komplette Atlas in einem Band), 23. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2010.

Piper W (2012) *Innere Medizin*. 2., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007, 2013.

Sigma Aldrich; <http://www.sigmaaldrich.com/austria.html>. [Online]

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: anatomische Darstellung des Herzens (Netter 2003).....	8
Abbildung 2: Strukturformel der Testsubstanz BW 16.....	9
Abbildung 3: BW 16 in Violengefäß im Labor.....	10
Abbildung 4: Organischer Aufbau des Meerschweinchens (just-Schweinchen).....	12
Abbildung 5: Operationsutensilien.....	16
Abbildung 6: Lichtmikroskop und verwendete Präparierutensilien .....	17
Abbildung 7: präparierter und eingespannter Vorhof im Organbad .....	18
Abbildung 8: Musculus papillaris mit Silberhaken und eingespannter Papillarmuskel zwischen Metallplättchen .....	19
Abbildung 9: Arteria pulmonalis zwischen Silberdrahtdreiecke im Organbad eingespannt ...	20
Abbildung 10: terminales Ileum während der Präparation und eingespannter Ileum im Organbad.....	21
Abbildung 11: schematische Darstellung der Aorta descendens (Netter 2003).....	22
Abbildung 12: Funktionsprinzip des Kraftwandlers .....	23
Abbildung 13: schematischer Aufbau der Apparatur I .....	24
Abbildung 14: Originalaufnahme der Apparatur I.....	26
Abbildung 15: schematischer Aufbau der Apparatur II.....	26
Abbildung 16: Originalaufnahme der Apparatur II.....	27
Abbildung 17: Originalaufnahme der Apparatur III .....	28
Abbildung 18: Strukturformel von Nitro-L-Arginin (Sigma-Aldrich) .....	35
Abbildung 19: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf den rechten Vorhof.....	40
Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf den rechten Vorhof.....	41
Abbildung 21: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf den Papillarmuskel .....	43
Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel.....	44

Abbildung 23: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf die Pulmonalarterie.....	46
Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf die Pulmonalarterie.....	47
Abbildung 25: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf das terminale Ileum .....	49
Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf das terminale Ileum .....	50
Abbildung 27: Konzentration-Wirkungskurve von BW 16 auf die Aorta .....	52
Abbildung 28: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 auf die Aorta .....	53
Abbildung 29: Graphische Darstellung der Wirkung von Nitro-L-Arginin und die Wirkung in Kombination mit BW 16.....	56
Abbildung 30: Originalaufzeichnung der Wirkung von BW 16 in Kombination mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum.....	57

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einwaage der Testsubstanz- Stammlösungen .....	10
Tabelle 2: Pipettierschema zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration von 100 µmol/l .....	11
Tabelle 3: Zusammensetzung und Bestandteile der Tyrode .....	13
Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode für 2000 ml (benötigte Menge/Tag) .....	14
Tabelle 5: Herstellung der Kaliumchloridlösung .....	15
Tabelle 6: Wirkung von BW 16 auf den rechten Vorhof .....	39
Tabelle 7: Wirkung von BW 16 auf den Papillarmuskel .....	42
Tabelle 8: Wirkung von BW 16 auf die Lungenarterie .....	45
Tabelle 9: Wirkung von BW 16 auf das terminale Ileum .....	48
Tabelle 10: Wirkung von BW 16 auf die Aorta .....	51
Tabelle 11: Wirkmechanismus von BW 16 in Kombination mit 100µl Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum .....	55
Tabelle 12: Änderung der Kontraktionskraft an glattmuskulären Organen in Abhängigkeit der Substanzkonzentration .....	59
Tabelle 13: Änderung der Kontraktionskraft auf die Herzmuskulatur .....	60

## 10. Abkürzungsverzeichnis

CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
f <sub>c</sub>	Mittelwert
GC-s	lösliche Guanylylcyclase
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MG	Molekulargewicht
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
ms <sup>-1</sup>	Millisekunde
mV	Millivolt
mN	Millinewton
n	Anzahl
n.s	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
SEM	Standardfehler