



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bioaktivität eines neu synthetisierten Pyrazol-Derivates
(MGpy4.HCl) auf isolierte Meerschweinchenpräparate“

verfasst von

Michaela Hebein

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao.Univ.- Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für die Freundlichkeit und das gute Arbeitsklima im Rahmen der Diplomarbeit bedanken. Er stand mir jederzeit für jegliche Fragen zur Verfügung. Ich bedanke mich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung und Organisation rund um die Diplomarbeit.

Weiters bedanke ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit. Seine Arbeitsgruppe war für die Testsubstanz verantwortlich und hat mir diese zur Verfügung gestellt.

Ich möchte mich auch herzlich bei meinen Eltern, Freunden und Menschen die mir ans Herz gewachsen sind bedanken, dass sie mich durch die Höhen und Tiefen des Studiums begleitet haben und in jeder Situation für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis

1	ZIELSETZUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	SPASMOLYTIKA.....	2
2.1.1	<i>Neurotrope Spasmolytika.....</i>	2
2.1.1.1	Atropin.....	2
2.1.1.2	Scopolamin.....	3
2.1.2	<i>Muskulotrope Spasmolytika.....</i>	3
2.1.2.1	Papaverin.....	3
2.1.2.2	Tiropamid.....	4
2.1.3	<i>Neurotrop- muskulotrope Spasmolytika.....</i>	4
2.1.3.1	Denaverin.....	4
2.1.3.2	Oxybutynin.....	4
2.2	ENDOTHELIALE STICKSTOFFMONOXID SYNTHASE (ENOS).....	4
2.2.1	<i>Physiologische Bedeutung.....</i>	5
2.3	STICKSTOFFMONOXID (NO).....	5
3	MATERIALIEN UND METHODIK.....	6
3.1	TESTSUBSTANZ - MGpy4.HCL.....	6
3.1.1	<i>Nomenklierung und Strukturformel.....</i>	6
3.1.2	<i>Einwaage der Testsubstanz MGpy4.HCl.....</i>	6
3.1.3	<i>Pipettierschema der Testsubstanz MGpy4.HCl.....</i>	7
3.2	NITRO- L- ARGININ.....	8
3.2.1	<i>Einwaage von Nitro- L- Arginin.....</i>	8
3.2.2	<i>Pipettierschema von Nitro- L- Arginin.....</i>	9
3.3	STAMMLÖSUNGEN.....	10
3.3.1	<i>Tyrodelösung.....</i>	11
3.3.2	<i>Kaliumchlorid- Lösung.....</i>	12
3.4	VERSUCHSTIERE.....	12
3.4.1	<i>Organentnahme und Präparation.....</i>	13
3.4.1.1	Isolierung des rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter).....	14
3.4.1.2	Isolierung der Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis).....	15
3.4.1.3	Isolierung des Papillarmuskels (Musculus papillaris).....	15
3.4.1.4	Isolierung der Aorta (Aorta descendens).....	16
3.4.1.5	Isolierung des Dünndarms (terminales Ileum).....	19
3.5	VERSUCHSANORDNUNG UND APPARATUREN.....	21
3.5.1	<i>Apparatur A.....</i>	22

3.5.2	<i>Apparatur B</i>	24
3.5.3	<i>Kraftwandler</i>	26
3.5.4	<i>Gasversorgung</i>	26
3.6	DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE	27
3.6.1	<i>Versuchsablauf am rechten Vorhof (Atrium cordis dextrum)</i>	28
3.6.2	<i>Versuchsablauf an der Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis)</i>	28
3.6.3	<i>Versuchsablauf am Papillarmuskel (Musculus papillaris)</i>	29
3.6.4	<i>Versuchsablauf an der Aorta (Aorta descendens)</i>	30
3.6.5	<i>Versuchsablauf am Dünndarm (terminales Ileum)</i>	31
3.7	VERSUCHSABLAUF ZUR TESTUNG DES WIRKMECHANISMUS	32
3.7.1	<i>Versuchsablauf mit Nitro- L- Arginin</i>	32
3.8	DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK	32
3.8.1	<i>Datenauswertung am rechten Vorhof</i>	32
3.8.2	<i>Datenauswertung am Papillarmuskel</i>	33
3.8.3	<i>Datenauswertung an der Aorta, Pulmonalarterie und am terminalen Ileum</i>	34
3.8.4	<i>Statistik</i>	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	TESTERGEBNIS VON MGPY4.HCL AM RECHTEN VORHOF (ATRIUM CORDIS DEXTER).....	36
4.2	TESTERGEBNIS VON MGPY4.HCL AN DER PULMONALARTERIE (ARTERIA PULMONALIS)	38
4.3	TESTERGEBNIS VON MGPY4.HCL AM PAPILLARMUSKEL (MUSCULUS PAPILLARIS)	41
4.4	TESTERGEBNIS VON MGPY4.HCL AN DER AORTA (AORTA DESCENDENS)	44
4.5	TESTERGEBNIS VON MGPY4.HCL AM DÜNNDARM (TERMINALES ILEUM).....	47
4.6	TESTERGEBNISSE ZUR BESTIMMUNG DES WIRKMECHANISMUS AM DÜNNDARM (TERMINALES ILEUM)	50
5	DISKUSSION	56
5.1	VERGLEICH DER ERGEBNISSE AN DER QUERGESTREIFTEN HERZMUSKULATUR	56
5.2	VERGLEICH DER ERGEBNISSE AN DER GLATTEN MUSKULATUR	57
5.3	ERGEBNISSE DER VERSUCHE VON MGPY4.HCL IN KOMBINATION MIT 30µM NITRO- L- ARGININ	59
5.4	ERGEBNISSE DER VERSUCHE VON MGPY4.HCL IN KOMBINATION MIT 100µM NITRO- L- ARGININ	59
6	RESÜMEE	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	CURRICULUM VITAE	63

1 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird die neu synthetisierte Substanz MGpy4.HCl einer pharmakologischen Testung an isolierten Organen von Meerschweinchen unterzogen.

Die Testsubstanz MGpy4.HCl ist am Department für medizinische und pharmazeutische Chemie der Universität Wien in Zusammenarbeit mit Ao.Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe synthetisiert worden.

Die Prüfung hinsichtlich pharmakologischer Wirkungen wird am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien unter der Leitung von Ao.Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik durchgeführt.

Um die Wirkung der neu entwickelten Substanz näher zu definieren, wird diese an fünf verschiedenen Organen getestet.

Der rechte Vorhof wird dabei einer Prüfung auf Chronotropie unterzogen.

Der Papillarmuskel wird hinsichtlich einer inotropen Wirkung untersucht.

An der Aorta und der Lungenarterie wird eine vasodilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur untersucht.

An Präparaten des Darms kommt es zur einer pharmakologischen Untersuchung hinsichtlich einer spasmolytischen Wirkung.

Eine ideale Substanz sollte dabei möglichst gewebsspezifisch sein bzw. ausschließlich an einem Organ, wie beispielsweise am Herzen, eine Wirkung zeigen, um in der Arzneimitteltherapie einsatzfähig zu sein. Weist die Substanz an mehreren Organen unterschiedliche Wirkungen auf, handelt es sich dabei automatisch um Nebenwirkungen.

In dieser Diplomarbeit kommt es am terminalen Ileum zu einer spasmolytischen Wirkung. Folglich werden weitere Versuche durchgeführt, um einen möglichen Wirkmechanismus herauszufinden. Die Untersuchungen für die Erforschung des Wirkmechanismus werden mit Hilfe von Nitro- L- Arginin, ein Arzneistoff welcher die Freisetzung von eNOS inhibiert, durchgeführt.

2 Einleitung

2.1 Spasmolytika

Spasmolytika sind "Pharmaka, die den Tonus der glatten Muskulatur (Gastrointestinaltrakt, Gefäße, Bronchien u.a.) durch Rezeptor- Blockade (z.B. Parasympatholytika) oder Rezeptor- Aktivierung (z.B. Betasympathomimetika) bzw. über andere Mechanismen (myotrope Spasmolytika, z.B. Papaverin, Nitroglycerol) herabsetzen." (Gruyter 2014)

Spasmolytisch wirkende Arzneimittel werden eingeteilt in neurotrope, muskulotrope und neurotrop- muskulotrope Spasmolytika. (Ammon 2004)

2.1.1 Neurotrope Spasmolytika

Die Wirkung von neurotrophen Spasmolytika kommt durch eine kompetitive Blockade von muskarinen Acetylcholin- Rezeptoren zu Stande. Dabei wird die Bindungsmöglichkeit für den Neurotransmitter Acetylcholin am Rezeptor kompetitiv antagonisiert. (Mutschler 2008)

Acetylcholin ist ein Transmitter des parasympathischen Nervensystems. (Mutschler 2008)

Durch diese Rezeptor- Blockade kommt es folglich zur Erschlaffung der glatten Muskulatur. (Mutschler 2008)

Indiziert sind diese Pharmaka beispielsweise bei Spasmen der glatten Muskulatur im Bereich des Magen- Darm- Traktes, der ableitenden Gallen- und Harnwege sowie der weiblichen Genitalien. (Mutschler 2008)

2.1.1.1 Atropin

Atropin ist ein Inhaltsstoff der Tollkirsche (*Atropa belladonna*) und ist vor allem als Mydriatikum bekannt. (Hiller 2005)

Chemisch gesehen handelt sich dabei um ein tertiäres Amin. (Mutschler 2008)

Neben der Pupillen- erweiternden Wirkung, weist Atropin eine spasmolytische Wirkung im Bereich des Magen- Darm- Traktes auf. Es kann sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden. (Mutschler 2008)

2.1.1.2 Scopolamin

Scopolamin ist eine weitere parasympholytisch wirkende Substanz. (Oberdisse 2002) Scopolamin besitzt eine zentraldämpfende Wirkung und wird hauptsächlich als transdermales therapeutisches System bei Reisekrankheit eingesetzt. Der antiemetische Effekt kommt dabei durch die zentralnervöse antimuscarinische Wirkung zustande. (Mutschler 2008)

In Form von Butylscopolaminiumbromid (Handelsname: Buscopan®) wird es als Spasmolytikum bei Koliken betreffend den Magen- Darm- Trakt eingesetzt. (Mutschler 2008)

2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika

Bei muskulotropen Spasmolytika kommt es zur Erschlaffung der glatten Muskulatur durch direkte Einwirkung der Substanzen auf glatte Muskelzellen. Das vegetative Nervensystem spielt in diesem Fall keine Rolle. (Mutschler 2008)

2.1.2.1 Papaverin

Papaverin ist ein Inhaltsstoff des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) und gilt als Prototyp dieser Gruppe der Spasmolytika. (Hiller 2005) Folglich werden diese Arzneistoffe auch als papaverinartige Spasmolytika bezeichnet. (Oberdisse 2002)

Papaverin ist ein Isochinolinalkaloid. Die muskelrelaxierende Wirkung ist durch eine Hemmung der Phosphodiesterasen bedingt. Infolge dessen kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP- und cGMP- Konzentration. Es ist festzuhalten, dass nicht ausschließlich die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts, sondern auch Gefäße und Bronchien relaxiert werden.

Aufgrund schwerer Nebenwirkungen wie enormer Blutdruckabfall und Herzrhythmusstörungen nach intravenöser Verabreichung ist die Gabe von Papaverin heute obsolet. (Oberdisse 2002)

2.1.2.2 Tiropramid

Bei Tiropramid handelt es sich um ein neuwertigeres muskulotropes Spasmolytikum, welches ebenfalls zur Inhibition von Phosphodiesterasen führt und dadurch zur Muskelrelaxation der glatten Muskulatur. (Oberdisse 2002)

Die unerwünschten pharmakologischen Wirkungen beschränken sich grundsätzlich auf das zentrale Nervensystem. Schläfrigkeit, Benommenheit und Schwindel können dabei als Nebenwirkungen auftreten. (Oberdisse 2002)

2.1.3 Neurotrop- muskulotrope Spasmolytika

Diese Gruppe der Spasmolytika nimmt eine Zwischenstellung ein. Hierbei kommt es sowohl zu einer neurotrophen (parasympatholytischen) als auch muskulotropen (papaverinartigen) Wirkung. (Oberdisse 2002)

2.1.3.1 Denaverin

Denaverin wird zur Behandlung von Spasmen im Urogenital- und Gastrointestinaltrakt eingesetzt. (Mutschler 2008)

2.1.3.2 Oxybutynin

Oxybutynin ist indiziert bei Krämpfen im Bereich des Magen- Darm- Traktes und der ableitenden Harn- und Gallenwege. (Oberdisse 2002)

2.2 Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)

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

Je nach Lokalisation der Synthase wird zwischen drei unterschiedlichen Formen unterschieden. Erstens die endotheliale NO- Synthase (eNOS), welche sich im Endothel befindet, zweitens die neuronale NO- Synthase (nNOS), welche in Nervenzellen lokalisiert ist, und

drittens die induzierbare NO- Synthase (iNOS), welche in Entzündungszellen vor kommt. (Lüllmann 2010)

2.2.1 Physiologische Bedeutung

Die eNOS ist im Gefäßendothel lokalisiert und kann unter anderem über Muskarinrezeptoren aktiviert werden. Der Neurotransmitter Acetylcholin dockt hierbei an den Muskarinrezeptor an und aktiviert diesen. Es kommt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur, bedingt durch die Ausschüttung von NO. Bei NO handelt es sich um einen relaxierenden Faktor, der auch als EDRF (Endothelium- derived relaxing factor) bezeichnet wird.

NO diffundiert nun in die glatte Muskelzelle und es kommt zur Stimulation der Guanylatzyklase. Folglich sinkt die intrazelluläre Calcium- Konzentration aufgrund vermehrter Bildung von cGMP, wodurch es zu einer Vasodilatation kommt. Dadurch ist der Gefäßtonus herabgesetzt und der Blutdruck sinkt ebenfalls. (Dellas 2011)

2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Bei NO handelt es sich um einen Botenstoff, der mit Hilfe einer NO- Synthase aus der Aminosäure L- Arginin abgespalten wird. (Lüllmann 2010)

NO bewirkt eine Inhibition der Darmmotilität (Christian F.Mang, 2002 S. 1) und eine Relaxation der glatten Muskulatur. Die Wand des Gastrointestinal- Traktes ist von glatter Muskulatur ausgekleidet. (Schwegler 2006)

3 Materialien und Methodik

3.1 Testsubstanz - MGpy4.HCl

Die zu testende Substanz MGpy4.HCl ist am Department für medizinische und pharmazeutische Chemie der Universität Wien entwickelt worden.

MGpy4.HCl wird im Rahmen meiner Diplomarbeit einer ersten Testung hinsichtlich der pharmakologischen Wirkung unterzogen.

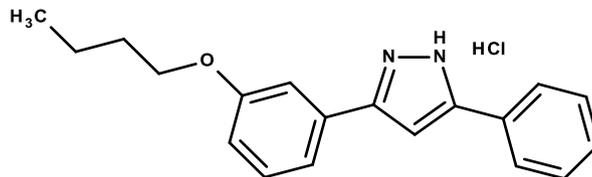
3.1.1 Nomenklierung und Strukturformel

Die Nomenklatur der Substanz MGpy4.HCl lautet 3-(3-Butoxyphenyl)-5-phenyl-1H-pyrazol Hydrochlorid.

Das Molekulargewicht beträgt 328,84 g/mol.

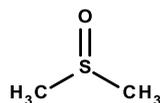
Die Testsubstanz ist in Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig löslich.

Abbildung 1: Strukturformel MGpy4.HCl



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Abbildung 2: Strukturformel DMSO



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.1.2 Einwaage der Testsubstanz MGpy4.HCl

Die Einwaage ist entsprechend der Größe des Organbads folgendermaßen zu wählen:

Tabelle 1: Einwaage von MGpy4.HCl

Einwaage großes Organbad (25 ml)	Einwaage kleines Organbad (8 ml)
$(\text{MG}/100) / 4$	$(\text{MG}/100) / 12,5$
$(328,84 \text{ g/mol}/100) / 4 = 0,00082\text{g} = 0,82\text{mg}$	$(328,84 \text{ g/mol}/100) / 12,5 = 0,00026\text{g} = 0,26\text{mg}$

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Die entsprechende Einwaage der Testsubstanz wird anschließend wie folgt in DMSO gelöst.

0,82 mg MGpy4.HCl 100 µl DMSO

bzw.

0,26 mg MGpy4.HCl 100 µl DMSO

3.1.3 Pipettierschema der Testsubstanz MGpy4.HCl

Die Stammlösung der Testsubstanz muss während des Versuchs in genau definierter Menge und zu exakt definierten Zeitpunkten in das mit Tyrodelösung bzw. KCl- Lösung befüllte Organbad pipettiert werden.

Tabelle 2: Pipettierschema von MGpy4.HCl

Zeitpunkt	Volumen	Konzentration im Organbad
0 min	3 µl	3 µM
45 min	7 µl	10 µM
1:30 h	20 µl	30 µM
2:15 h	70 µl	100 µM
3:00 h	Versuchsende	Versuchsende

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.2 Nitro- L- Arginin

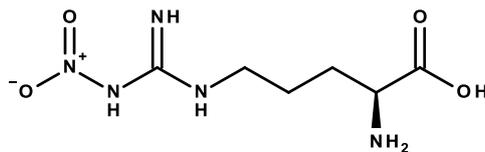
Nitro- L- Arginin ist ein Derivat der Aminosäure L- Arginin. Im Laufe der Versuchsreihe wird diese Substanz verwendet um einen möglichen Wirkmechanismus von MGpy4.HCl herauszufinden.

Nitro- L- Arginin blockiert die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) und ermöglicht so eine Aussage über die eventuelle Wirkungsbeitragung der eNOS am pharmakologischen Wirkprofil der Testsubstanz.

Die Inhibition der eNOS unterdrückt die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Organismus, wodurch eine Dilatation der Gefäße auf diesem Weg nicht mehr gewährleistet ist.

Das Molekulargewicht beträgt 210,66 g/mol.

Abbildung 3: Strukturformel Nitro- L- Arginin



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.2.1 Einwaage von Nitro- L- Arginin

Die Einwaage der Substanz Nitro- L- Arginin ist entsprechend der Größe des Organbads zu wählen. Allerdings ist hier nur das große Organbad zu berücksichtigen, da der Wirkmechanismus ausschließlich am Dünndarm getestet wird.

Tabelle 3: Einwaage von Nitro- L- Arginin

Einwaage großes Organbad (25 ml)
$(MG/100) / 4$
$(210,66 \text{ g/mol}/100) / 4 = 0,00053\text{g} = 0,53\text{mg}$

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Die entsprechende Einwaage der Substanz wird anschließend wie folgt in 60 mmolarer KCl- Lösung gelöst.

0,53 mg Nitro- L- Arginin 100 µl KCl- Lösung (60mmol)

3.2.2 Pipettierschema von Nitro- L- Arginin

Die Stammlösung der Substanz wird im Laufe des Versuchs in genau definierter Menge und zu exakt definierten Zeitpunkten in das Organbad mittels einer Eppendorf Pipette pipettiert. In diesem Fall ist das Organbad mit 60 mmolarer KCl- Lösung befüllt, da der Wirkmechanismus am Dünndarm analysiert wird.

Nitro- L- Arginin wird in separaten Versuchen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt.

Abbildung 4: Eppendorf Pipetten



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Tabelle 4: Pipettierschema Nitro- L- Arginin mit einer Konzentration von 30 μM

	Zeitpunkt	Volumen	Konzentration im Organbad
Nitro- L- Arginin Stammlösung	0 min	30 μl	30 μM
MGpy4.HCl Stammlösung	45 min	100 μl	100 μM
	1:30 min	Versuchsende	Versuchsende

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Tabelle 5: Pipettierschema Nitro- L- Arginin mit einer Konzentration von 100 μM

	Zeitpunkt	Volumen	Konzentration im Organbad
Nitro- L- Arginin Stammlösung	0 min	100 μl	100 μM
MGpy4.HCl Stammlösung	45 min	100 μl	100 μM
	1:30 min	Versuchsende	Versuchsende

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.3 Stammlösungen

Für die Durchführung der Versuche werden zwei Stammlösungen benötigt, die täglich am Beginn des Arbeitstages frisch herzustellen sind.

3.3.1 Tyrodelösung

Die Tyrodelösung ist eine modifizierte Krebs- Henseleit Lösung. Dabei handelt es sich um eine Pufferlösung, welche eine unterschiedliche Zusammensetzung von Ionen aufweist. Diese physiologische Elektrolytlösung wird als Nährlösung für die entnommenen Organe verwendet.

Die Tyrodelösung ist wie bereits erwähnt täglich frisch in einem zwei Liter Messkolben zuzubereiten.

Bereitung der Tyrodelösung

Tabelle 6: Zusammensetzung der Tyrodelösung

Substanz	Stammlösung	Stammlösung/l Tyrodelösung
NaCl	1000,25g/5l	33,60ml
KCl	50,33g/5l	35,00ml
NaHCO ₃	125,00g/5l	83,70ml
MgSO ₄	147,02g/5l	1,18ml
KH ₂ PO ₄	62,00g/250ml	1,18ml
CaCl ₂	34,00g/250ml	3,20ml
Glucose	Reinsubstanz	1,98g

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Zur Bereitung der Tyrodelösung werden die Stammlösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat der Reihe nach in einen zwei Liter Messkolben eingefüllt. Anschließend wird die Glucose eingewogen und hinzugefügt. Der Messkolben wird mit destilliertem Wasser bis auf circa 75% des Gesamtvolumens aufgefüllt und sorgfältig durchgeschüttelt. Die Calciumchlorid- Stammlösung wird zunächst in ein kleines Becherglas pipettiert. Die Lösung wird für etwa zwanzig Minuten mit Oxymix begast, um eine vollständige Sauerstoff- und Kohlendioxidsättigung zu erreichen. Nachfolgend wird Calciumchlorid unter Begasung, mit Hilfe einer Pipette, tropfenweise zugegeben. Es ist darauf zu achten, dass die Calciumchlorid- Stammlösung langsam zugetropft wird, da es ansonsten zum Ausfallen von schwerlöslichen Calciumsalzen kommt. Folglich entsteht eine Trübung der Tyrodelösung, welche nicht mehr zur Versuchsdurchführung verwendet werden kann und zu entsorgen ist. Abschließend wird der Messkolben bis zum Meniskus mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

3.3.2 Kaliumchlorid- Lösung

Es müssen täglich zwei unterschiedliche Konzentrationen von Kaliumchlorid- Lösungen zubereitet werden, um Versuche am terminalen Ileum, an der Aorta und der Arteria pulmonalis durchzuführen.

Mit Hilfe der KCl- Lösung kommt es zu einer maximalen Vasokonstriktion am entsprechenden Organ. Diese Vorkontraktion der Gefäße ist notwendig, um eine mögliche dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz herauszufinden.

Eine maximale Kontraktion wird am terminalen Ileum mit einer 60 mmolaren KCl- Lösung erreicht. Eine 90 mmolare KCl- Lösung ist hingegen notwendig um die Aorta und die Arteria pulmonalis vollständig zu kontrahieren. Dabei handelt es sich um empirische Werte.

Bereitung der 60 mmolaren Kaliumchlorid- Lösung

Es werden 0,45 g KCl mittels eines Wägeschiffchens eingewogen und in einen 100 ml Messkolben gegeben. Dieser wird mit Tyrodelösung bis zum Meniskus aufgefüllt und sorgfältig durchgeschüttelt, um eine vollständige Homogenität zu gewährleisten.

Bereitung der 90 mmolaren Kaliumchlorid- Lösung

Es werden 0,67 g KCl eingewogen und in einen 100 ml Messkolben transferiert. Dieser wird wieder mit Tyrodelösung auf 100 ml aufgefüllt und durchgemischt.

3.4 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um Meerschweinchen der Zuchtlinie TRIK. Sie weisen ein Körpergewicht von 400 - 600 g auf und sind in etwa acht bis zwölf Wochen alt.

Für die Durchführung der Versuche werden sowohl weibliche als auch männliche Meerschweinchen verwendet, welche durch einen Genickbruch getötet werden. Die Art und Weise der Tötung führt zu einem raschen und schmerzlosen Tod des Tieres und stellt somit eine ethisch vertretbare Variante der Tötung dar.

3.4.1 Organentnahme und Präparation

Organentnahme

Nachdem das Meerschweinchen getötet worden ist, wird das Abdomen und der Thorax durch einen Längsschnitt mittels einer Schere geöffnet und die zu untersuchenden Organe entnommen.

Zuerst wird das Herz entnommen.

Anschließend wird das Ende des terminalen Ileums mit einem etwa zehn Zentimeter langen Faden abgebunden und exziiert.

Die Aorta befindet sich auf Höhe des Brustkorbs entlang der Wirbelsäule und muss vorsichtig möglichst ohne Dehnung herausgeschnitten werden - zunächst durch einen Schnitt quer durch die Aorta und anschließend durch kleine Schnitte rechts und links des Gefäßes ins Fettgewebe.

Nach Entnahme der benötigten Organe werden diese in mit Tyrodelösung befüllte Bechergläser transferiert und mit Oxymix begast. Die Nährlösung und die Begasung dienen der Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen auch außerhalb des Organismus, um ein Absterben der entnommenen Organe zu verhindern.

Abbildung 5: Gerätschaften für die Organentnahme



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Präparation der Organe

Zum Präparieren der Organe werden Petrischalen aus Glas, ausgelegt mit einem dünnen Korkboden, durch einen Gummischlauch am Rand fixiert, verwendet. Die Präparation erfolgt unter einem Lichtmikroskop. Die Petrischale wird mit Tyrodelösung befüllt und die zu präparierenden Organe werden mit Hilfe von zwei Präpariernadeln befestigt.

Um den Dünndarm, den rechten Vorhof und den Papillarmuskel in die Versuchsapparatur einzuspannen, werden ein dünner Faden und Häkchen aus Silberdraht benötigt.

Weitere Arbeitsutensilien sind Pinzetten, Scheren und Federgriffscheren.

Während der gesamten Organpräparation ist darauf zu achten, dass die Organe möglichst wenig gedehnt werden, um somit eine Verletzung der Gefäße zu verhindern. Eine Überdehnung führt zur Zerstörung der Gefäße und der Muskulatur, wodurch der Versuch nicht mehr durchgeführt werden kann.

Abbildung 6: Präparierset, Besteck, Lichtmikroskop



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.4.1.1 Isolierung des rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter)

Für die Isolierung des rechten Vorhofes muss zunächst das Herz in einer Petrischale mit Präpariernadeln befestigt werden. Mit Hilfe einer Federgriffschere wird das Herz von über-

schüssigem Gewebe und teilweise auch Fettgewebe befreit. Die Bearbeitung des Präparates erfolgt unter einem Lichtmikroskop.

Nach der Isolierung des Atrium cordis dexter, wird dieses mit weiteren zwei Präpariernadeln fixiert, um weiter bearbeitet zu werden. Eine Präpariernadel befindet sich dabei am oberen Ende des rechten Vorhofes, welches durch weißes Fettgewebe gekennzeichnet ist. Die zweite Nadel wird am unteren Ende fixiert.

Nun wird an beiden Enden je ein kleines Häkchen aus Silberdraht mittels eines dünnen Fadens befestigt.

Das Organ wird unmittelbar nach der Präparierung in das Organbad, welches mit Tyrodelösung gefüllt ist und mit Oxymix begast wird, der Versuchsanordnung übergeführt. Die Häkchen dienen der Befestigung des Organs an der Apparatur. Das Einspannen des Vorhofs muss rasch erfolgen, da dieser sehr sensibel auf veränderte physiologische Bedingungen reagiert.

3.4.1.2 Isolierung der Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis)

Nach der Isolierung des rechten Vorhofs wird nun die Pulmonalarterie aus dem Herzen isoliert. Genauer gesagt wird der Truncus pulmonalis, der der rechten Herzkammer entspringt, verwendet.

Die Arteria pulmonalis wird nach Entfernung von überschüssigem Fettgewebe in etwa zwei bis drei Millimeter breite Ringe geschnitten und wiederum in ein mit Tyrodelösung befülltes Becherglas übergeführt. Bis zur Versuchsdurchführung muss eine Begasung mit Oxymix stattfinden.

3.4.1.3 Isolierung des Papillarmuskels (Musculus papillaris)

Nach der Isolierung des rechten Vorhofs und der Pulmonalarterie wird nun der Papillarmuskel aus dem Herzen isoliert.

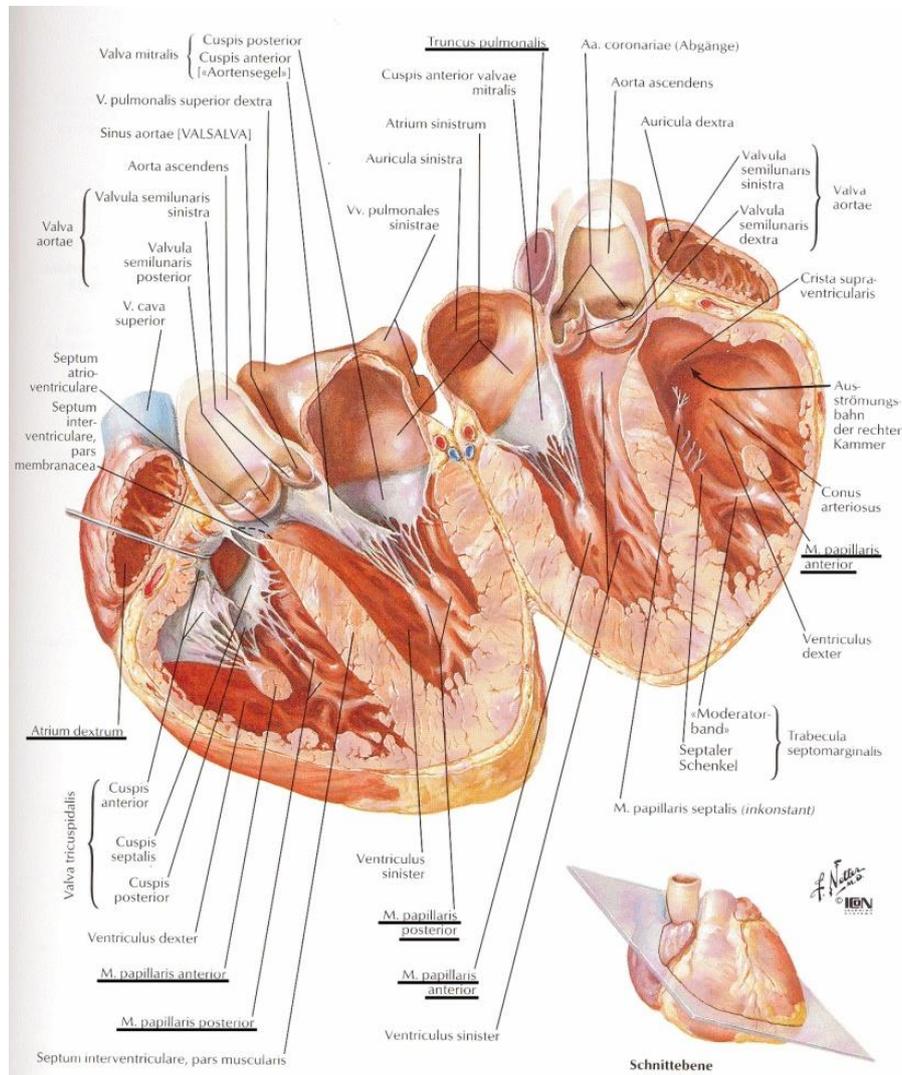
Der Papillarmuskel befindet sich zwischen Artrium (Vorhof) und Ventrikel (Herzkammer) und ist notwendig für die Öffnung und Schließung der Herzklappen.

Dieser schlägt nicht spontan, sondern muss durch nervliche Impulse innerviert werden.

Zur Isolierung des Papillarmuskels werden erneut kleine Häkchen aus Silberdraht und ein dünner Faden benötigt. Die Häkchen werden an den Sehnen des Papillarmuskels befestigt.

Nach erfolgter Präparation, muss der Papillarmuskel in einem mit Tyrodelösung befülltem Becherglas und unter Begasung mit Oxymix, aufbewahrt werden.

Abbildung 7: Querschnitt des Herzens



Quelle: (FH 2003)

3.4.1.4 Isolierung der Aorta (Aorta descendens)

Die Aorta befindet sich wie bereits erwähnt entlang des thorakalen Bereiches der Wirbelsäule und muss mit Hilfe einer Pinzette, die dem Abheben der Aorta von der Wirbelsäule dient, und einer Schere, mit der die Aorta vorsichtig herausgeschnitten wird, isoliert werden. Die Länge der Aorta beträgt ca. 4 cm.

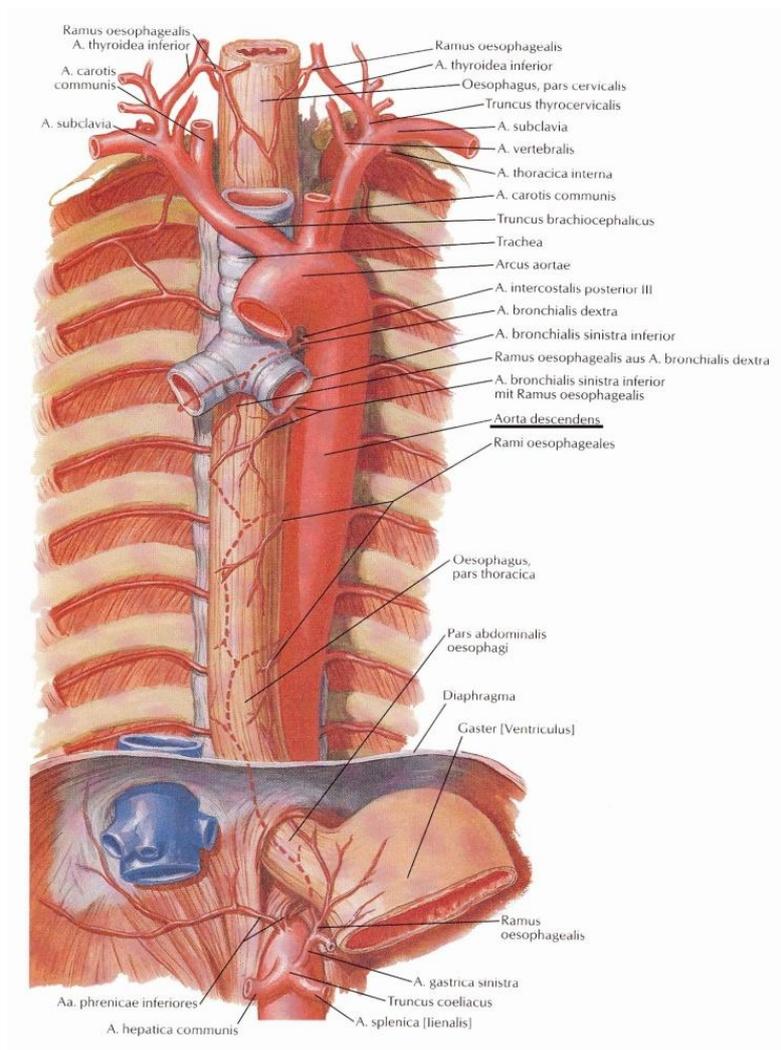
Anschließend wird diese wiederum in ein mit Tyrodelösung befülltes Becherglas gegeben und mit Oxymix begast, um die physiologischen Bedingungen aufrecht zu erhalten.

In einem weiteren Schritt muss die Hauptschlagader präpariert werden. Dazu wird sie mittels zweier Präpariernadeln in einer mit einem Korkboden ausgekleideten Petrischale fixiert. Die Fixierung sollte möglichst ohne Spannung des Gefäßes erfolgen, um es nicht zu zerstören.

Unter Zuhilfenahme einer Federgriffschere und einer Pinzette ist das überschüssige Fettgewebe zu entfernen, um eine mögliche Einlagerung der Testsubstanz in das Fettgewebe zu verhindern. Dabei wird das noch anhaftende Fettgewebe mittels einer Pinzette ein wenig weggezogen und unter Verwendung der Federgriffschere entfernt. Es ist darauf zu achten, dass beim Schneiden die Aorta selbst nicht verletzt wird.

Ist die Aorta fertig präpariert und weist diese eine glatte Struktur und eine hellrosa Färbung auf, wird sie in ungefähr 1 mm breite Ringe geschnitten und kann sofort in die Apparatur zur Versuchsdurchführung eingespannt werden.

Abbildung 8: Verlauf der Aorta



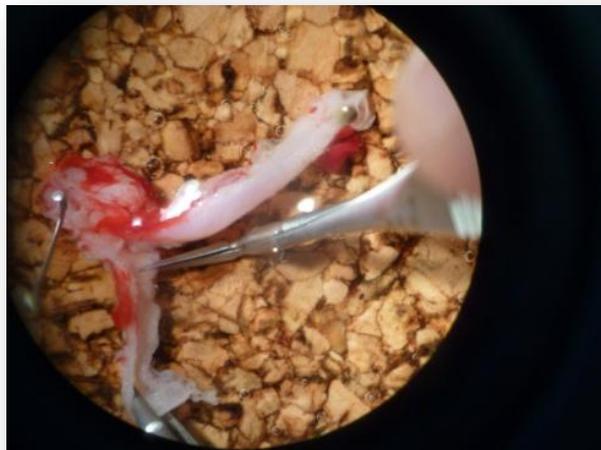
Quelle: (FH 2003)

Abbildung 9: Isolierte Aorta



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Abbildung 10: Präparation - Aorta



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

3.4.1.5 Isolierung des Dünndarms (terminales Ileum)

Das Ende des terminalen Ileums wird mit einem dünnen Faden durch einen einfachen Knoten abgebunden und abgeschnitten. Es weist eine ungefähre Länge von 20 cm auf.

Zur Herstellung des Präparates wird ein Stück des Dünndarms benötigt, welches eine Länge von 0,5 cm aufweist. Dazu wird der Darm am besten über den eigenen Finger gelegt und mit

einer Schere links und rechts ein passendes Stück abgeschnitten. Die Schnitte müssen schräg verlaufen, um anschließend gewährleisten zu können, dass das Lumen geöffnet bleibt.

Folglich wird das Stück Dünndarm in einer Petrischale mit zwei Präpariernadeln befestigt. Dabei ist darauf zu achten, dass jegliche Überdehnungen des Präparates vermieden werden.

An beiden Enden wird anschließend je ein kleines Häkchen aus Silberdraht mittels eines dünnen Fadens fixiert. Wichtig dabei ist, dass das Lumen des terminalen Ileums nicht zugebunden wird, sondern geöffnet bleibt, um eine Zirkulation der Nährlösung bzw. der Testsubstanz zu ermöglichen.

Wird das Organ nicht unmittelbar nach der Präparation in die Versuchsanordnung eingespannt, ist es in einem mit Tyrodelösung befüllten Becherglas unter Begasung mit Oxymix aufzubewahren.

Abbildung 11: Isoliertes terminales Ileum



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

Abbildung 12: Präparation - terminales Ileum



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

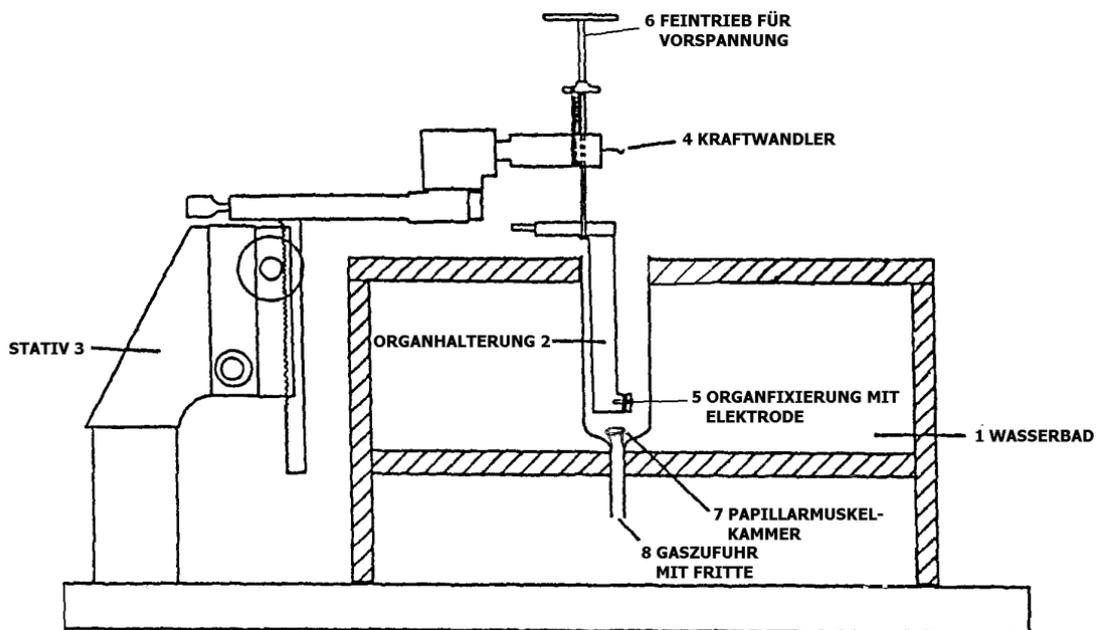
3.5 Versuchsanordnung und Apparaturen

Um reproduzierbare Versuche durchzuführen und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig konstante Bedingungen hinsichtlich der physiologischen Verhältnisse zu schaffen. Darunter fallen die Einhaltung einer konstanten Temperatur, eine ständige Nährstoffzufuhr, eine kontinuierliche Gasversorgung mit O_2 und CO_2 , sowie ein gleichbleibender physiologischer pH- Wert während des gesamten Versuchs.

Zur Durchführung der Versuche werden zwei unterschiedliche Apparaturen verwendet.

3.5.1 Apparatur A

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Versuchsapparatur A



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Abbildung 14: Originalabbildung der Apparatur A



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

Die Apparatur A wird benutzt um Versuche am Papillarmuskel durchzuführen.

Das Wasserbad (1) ist ein Behältnis aus Kunststoff, welches stets bis zur Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt werden muss. Das darin befindliche Wasser wird mittels einer Herzspirale auf 35 °C erhitzt.

Am Ende der Organhalterung (2) ist das Organ einzuspannen. Dort befindet sich eine Elektrode (5) und eine Plexiglasscheibe, zwischen die 2/3 des Papillarmuskels eingeklemmt werden. Die Elektrode und die Plexiglasscheibe werden mittels einer Schraube zusammengehalten und fixiert. Dadurch ist eine elektrische Stimulation des Papillarmuskels gewährleistet.

Die Papillarmuskelkammer (7) entspricht einem Organbad, in welches die Organhalterung mit eingespanntem Organ eingetaucht wird. Das Organbad wird zuvor mit 25 ml Tyrodelösung befüllt. Eine kontinuierliche Gaszufuhr (8) von Oxymix ist ständig aufrechtzuerhalten. Die Apparatur ist so einzustellen, dass sich 2/3 des Papillarmuskels in der Tyrodelösung befinden.

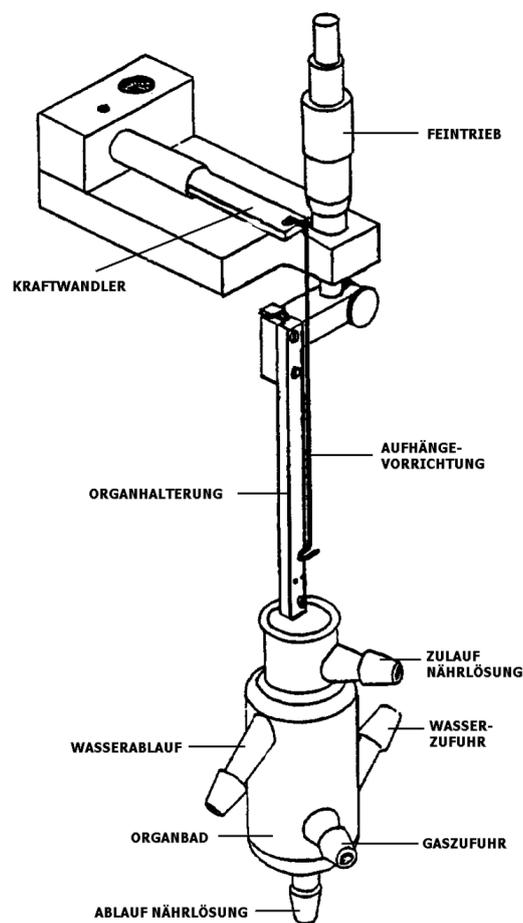
Vom Kraftwandler (4) ausgehend ist der Papillarmuskel mit einem Draht verbunden. Dieser wird mittels des kleinen Silberhäkchens am Organpräparat befestigt.

Der Feintrieb (6) dient der Einstellung der Vorspannung.

Das Stativ (3) stellt die Halterung der Versuchsanordnung dar.

3.5.2 Apparatur B

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung B



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Die Apparatur B wird für die Versuchsdurchführung an der Aorta, am terminalen Ileum, am rechten Vorhof sowie an der Pulmonalarterie verwendet.

Diese Apparatur weist einen Feintrieb auf, mit Hilfe dessen wiederum die vorgeschriebene Vorspannung eingestellt wird.

Am Kraftwandler ist ein Draht, als Aufhängevorrichtung befestigt, um das jeweilige Organ in die Apparatur einzuspannen. Beim Einspannen des Organs wird das Organpräparat mittels des Silberhäkchens am Ende des Drahtes eingehängt und mit der Organhalterung verbunden. Dies erfolgt mittels des zweiten Silberhäkchens.

Wird die Pulmonalarterie bzw. die Aorta eingespannt sind keine Silberhäkchen zur Fixierung erforderlich, sondern diese Organpräparate werden direkt eingespannt.

Die Organhalterung wird nun in das Organbad, welches aus einem doppelwandigen Glaszylinder besteht, und mit 25 ml (großes Organbad) bzw. 8 ml (kleines Organbad) Tyrodelösung befüllt ist, eingetaucht. Das Organ muss sich dabei vollständig in der Tyrodelösung befinden. Der doppelwandige Glaszylinder bietet die Möglichkeit einer Wasserzirkulation, die der Erwärmung des Organbads dient.

Es ist darauf zu achten, dass das Organ nicht an der Wand des Organbads anstoßt, da es sonst zu einer Verfälschung der Aufzeichnung kommt.

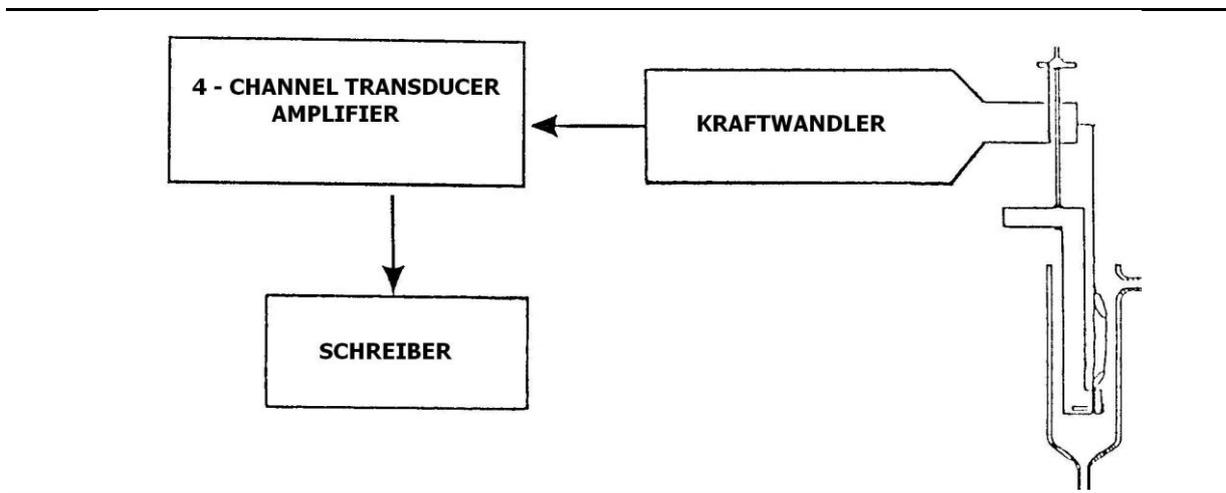
Im kleinen Organbad, welches ein Fassungsvermögen von 8 ml aufweist, können aufgrund des Platzangebotes nur Versuche an der Aorta und der Pulmonalarterie durchgeführt werden.

Die Einwaage der Testsubstanz ist entsprechend zu wählen.

Das Organbad verfügt über eine Gaszufuhr, um die Nährlösung mit Oxymix zu begasen.

3.5.3 Kraftwandler

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Sowohl die Apparatur A, als auch die Apparatur B weisen einen Kraftwandler auf, welcher die mechanische Aktivität der Organe in elektrische Signale umwandelt.

Diese elektrischen Signale werden dann durch einen Amplifier (4- Channel Transducer Amplifier, Firma WPI) verstärkt und mit Hilfe eines Schreibers (Flatbed Recorder BD112, Firma Kipp & Zonen) auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

3.5.4 Gasversorgung

Um physiologische Bedingungen während des gesamten Versuchs zu gewährleisten, ist es notwendig die Organe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen.

Dies wird mittels eines Gases, namens Oxymix, bewerkstelligt. Dabei handelt es sich um ein Gasmisch, das zu 95 % aus O_2 und zu 5 % aus CO_2 besteht. Es wird auch als Carbogen bezeichnet.

Es ist immer darauf zu achten, dass die Organe ausreichend begast werden, allerdings muss man damit effizient umgehen, da dieses Gas sehr teuer ist.

Abbildung 17: Gashahn



Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Abbildung 18: Begasung der entnommenen Organe



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

3.6 Durchführung der Versuche

Die Durchführung der Versuche am Papillarmuskel erfolgt mit Hilfe der Apparatur A. Dabei wird durch elektrische Stimulation der Papillarmuskel zum Schlagen gebracht.

Zur Versuchsdurchführung am rechten Vorhof und am Dünndarm, sowie an der Aorta und an der Pulmonalarterie wird die Apparatur B verwendet.

3.6.1 Versuchsaufbau am rechten Vorhof (Atrium cordis dextrum)

Der zuvor präparierte rechte Vorhof wird nun in die Apparatur eingespannt, wobei das obere Ende, gekennzeichnet durch weißes Fettgewebe, oben eingehängt wird.

Anschließend wird das Atrium cordis dextrum in das Organbad, welches mit 25 ml Tyrodelösung befüllt ist, eingetaucht.

Am Gerät ist die Spannung auf 5 mV einzustellen und eine Geschwindigkeit von speed 5 zu wählen.

Folglich wird das Organ auf 10,4 cm Vorspannung gebracht und danach wird für 45 Minuten eine Kontrolle durchgeführt. Dabei ist alle fünf Minuten eine Kurve über sechs Kästchen zu zeichnen. Die Schläge müssen abgezählt werden und dürfen bei den letzten drei Messungen maximal ein bis zwei Schläge voneinander abweichen; das heißt der Vorhof muss eine konstante Schlagfrequenz aufweisen.

Anschließend wird mit dem Versuchsdurchlauf gestartet und die einzelnen Konzentrationen (3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM) der gelösten Testsubstanz werden im Abstand von 45 Minuten hinzu pipettiert. Der Versuch dauert insgesamt drei Stunden, wobei alle fünf Minuten eine Messung durchzuführen ist.

3.6.2 Versuchsaufbau an der Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis)

Die Pulmonalarterie weist bereits eine ringförmige Struktur auf und kann somit sofort in die Apparatur eingespannt werden.

Das Präparat wird anschließend in das Organbad, welches mit 25 ml Tyrodelösung befüllt ist, eingetaucht und bei einer Einstellung von 5 mV, speed 1 und einer Vorspannung von 10 cm für 20 Minuten in der Nährlösung belassen.

Nach vergangenen 20 Minuten wird die Nährlösung entfernt und 25 ml der 90 mmolaren KCl-Lösung hinzugegeben, um eine maximale Kontraktion des Gefäßes zu erzielen.

Die Pulmonalarterie wird nun für mindestens 45 Minuten, bis zur Einstellung einer Konstanz, in der KCl-Lösung belassen. Dabei wird bereits eine Kurve mittels des Schreibers aufgezeichnet.

Ist das Organ konstant, wird mit der Einspritzung der einzelnen Konzentrationen (3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM) der gelösten Testsubstanz im Abstand von 45 Minuten begonnen. Der Versuch dauert insgesamt drei Stunden, wobei durchgehend eine Kurve aufgezeichnet wird.

3.6.3 Versuchsaufbau am Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Nach Präparation des Papillarmuskels wird dieser in die Versuchsanordnung eingespannt. Der Papillarmuskel ist nicht in der Lage selbst zu schlagen und muss daher elektrisch stimuliert werden. Diese elektrische Stimulation ist ausschließlich an der Apparatur A möglich.

Der Musculus papillaris wird nun in die Versuchsanordnung eingespannt, indem dieser zuerst mittels des Silberhäkchens eingehängt wird. Anschließend wird ca. 2/3 des Papillarmuskels zwischen die Elektrode und die Plexiglasscheibe geklemmt.

Ist das Organ gut befestigt wird es in das Organbad, welches mit 25 ml Tyrodelösung befüllt ist, eingetaucht.

Am Gerät sind die Einstellungen von 5 mV, speed 5 und eine Vorspannung von 4 cm zu wählen. Die Spannung kann gegebenenfalls, wenn die Amplitude nicht von ausreichender Größe ist, auf 2 bzw. 1 mV umgestellt werden.

Nach Auswahl der korrekten Einstellungen wird der Papillarmuskel mittels elektrischer Reize stimuliert um zu schlagen. Dabei wird zunächst die höchst mögliche Stromstärke gewählt, welche in weiterer Folge reduziert wird, um den Muskel nicht zu überreizen und dadurch zu zerstören.

Nun wird 45 Minuten lang eine Kontrolle durchgeführt, wobei alle fünf Minuten eine Kurve über sechs Kästchen zu zeichnen ist und die Amplitude abgemessen werden muss. Bei den letzten drei Messungen darf die Größe der Amplitude maximal einen Millimeter voneinander abweichen; das heißt der Papillarmuskel muss eine konstante Schlagamplitude aufweisen.

Anschließend wird mit dem Versuchsdurchlauf begonnen und die einzelnen Konzentrationen (3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM) der gelösten Testsubstanz werden im Abstand von 45 Minuten hinzu pipettiert. Die Dauer des Versuchs beträgt drei Stunden, wobei alle fünf Minuten eine Messung durchzuführen ist.

3.6.4 Versuchsablauf an der Aorta (Aorta descendens)

Die Aorta weist nach Präparation eine ringförmige Struktur auf und kann somit, wie die Pulmonalarterie, ad hoc in die Versuchsapparatur eingespannt werden.

Nach dem Einspannen der Aorta in die Apparatur, wird diese in ein mit 25 ml Tyrodelösung befülltes Organbad eingetaucht und bei einer Einstellung von 10 mV, speed 1 und einer Vorspannung von 10 cm für 20 Minuten in der Tyrodelösung belassen.

Nach 20 Minuten wird auf 5 mV umgestellt und anschließend die Nährlösung entfernt und 25 ml der 90 mmolaren KCl- Lösung hinzugegeben, um eine maximale Kontraktion des Gefäßes zu erzielen.

Die Aorta wird nun für mindestens 45 Minuten, bis zur Einstellung einer Konstanz, in der KCl- Lösung belassen. Dabei wird bereits eine Kurve mittels des Schreibers aufgezeichnet.

Ist das Organ konstant, wird mit der Einspritzung der einzelnen Konzentrationen (3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) der gelösten Testsubstanz im Abstand von 45 Minuten begonnen. Der Versuch dauert insgesamt drei Stunden, wobei durchgehend eine Kurve aufgezeichnet wird.

Abbildung 19: Organbad - Aorta



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

3.6.5 Versuchsablauf am Dünndarm (terminales Ileum)

Nach erfolgter Präparation des Dünndarms wird dieser mittels der beiden Silberhäkchen in die Versuchsapparatur eingespannt.

Das Organ wird nun in ein mit 25 ml Tyrodelösung befülltes Organbad eingetaucht und bei einer Einstellung von 5 mV, speed 1 und einer Vorspannung von 5 cm für 20 Minuten in der Tyrodelösung belassen.

Nach Ablauf der 20 Minuten wird die Nährlösung entfernt und 25 ml der 60 mmolaren KCl-Lösung hinzugegeben, um eine maximale Kontraktion des terminalen Ileums zu erzielen.

Der Dünndarm wird nun für mindestens 45 Minuten, bis zur Einstellung einer Konstanz, in der KCl-Lösung belassen. Dabei wird bereits eine Kurve mit Hilfe des Schreibers aufgezeichnet.

Ist das Organ konstant, wird mit der Einspritzung der einzelnen Konzentrationen (3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM) der gelösten Testsubstanz im Abstand von 45 Minuten begonnen. Der Versuch dauert insgesamt drei Stunden, wobei durchgehend eine Kurve aufgezeichnet wird.

Abbildung 20: Organbad - Dünndarm



Quelle: Eigene Darstellung, 2014

3.7 Versuchsablauf zur Testung des Wirkmechanismus

Im Laufe der ersten Analyse der Testsubstanz wird neben der allgemeinen pharmakologischen Wirkung auf die einzelnen Organe auch eine Testung hinsichtlich eines möglichen Wirkmechanismus durchgeführt.

3.7.1 Versuchsablauf mit Nitro- L- Arginin

Zur Durchführung des Versuchs, muss wiederum der Dünndarm präpariert werden und mittels zwei Silberhäkchen in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

Das Organ wird nun in ein mit 25 ml Tyrodelösung befülltes Organbad eingetaucht und bei einer Einstellung von 5 mV, speed 1 und einer Vorspannung von 5 cm für 20 Minuten in der Tyrodelösung belassen.

Nach 20 Minuten wird die Nährlösung entfernt und 25 ml der 60 mmolaren KCl- Lösung hinzugegeben.

Der Dünndarm wird nun für mindestens 45 Minuten, bis zur Einstellung einer Konstanz, in der KCl- Lösung belassen.

Ist das Organ konstant, wird nun eine Konzentration von 30 μM bzw. in einem weiteren Versuch 100 μM Nitro- L- Arginin Lösung hinzu pipettiert.

Nach einer Zeitdauer von 45 Minuten wird jeweils eine Konzentration von 100 μM der gelösten Testsubstanz hinzugegeben.

Nach weiteren 45 Minuten ist der Versuch beendet und die Gesamtdauer der Testung beschränkt sich somit auf 1,5 Stunden.

3.8 Datenauswertung und Statistik

3.8.1 Datenauswertung am rechten Vorhof

Die Versuchsdurchführung am rechten Vorhof dient der Ermittlung einer chronotropen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Es ist sowohl eine positiv als auch negativ chronotrope Wirkung möglich. Auch ein neutraler Effekt ist möglich.

Es erfolgt eine Messung im fünf Minutentakt über 6 cm am Millimeterpapier, bei einer Geschwindigkeit von 5 mm / sec. Dies entspricht einer Zeitspanne von 12 Sekunden.

Die Schläge über 6 cm werden nun abgezählt und müssen anschließend mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um die Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten.

Nach Einstellung der Konstanz wird der letzte Wert als Referenzwert (100%) gesetzt und die Stammlösung der Testsubstanz wird hinzupipettiert. Dabei kommt es zu einer Kumulation der Testsubstanz.

3.8.2 Datenauswertung am Papillarmuskel

Die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel dient der Ermittlung einer inotropen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese Wirkung kann in einem positiv bzw. negativ inotropen, oder neutralen Effekt resultieren.

Im Fünfminutentakt erfolgt dazu eine Messung über 6 cm am Millimeterpapier.

Anschließend sind die Amplituden der Schläge mit Hilfe eines Lineals auf 0,1 cm genau abzumessen und in Abhängigkeit der eingestellten elektrischen Spannung mit folgenden Faktoren zu multiplizieren.

Tabelle 7: Multiplikationsfaktoren in Abhängigkeit der elektrischen Spannung

Elektrische Spannung	Multiplikationsfaktor
1 mV	0,2
2 mV	0,2
5 mV	0,98

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Nach Einstellung der Konstanz wird der letzte Wert als Referenzwert (100%) gesetzt und die Stammlösung der Testsubstanz wird hinzupipettiert. Dabei kommt es zu einer Kumulation der Testsubstanz.

3.8.3 Datenauswertung an der Aorta, Pulmonalarterie und am terminalen Ileum

Die Versuchsdurchführung an der Aorta und an der Pulmonalarterie dient der Ermittlung einer vasodilatierenden Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl.

Mit Hilfe der Versuche am terminalen Ileum wird eine spasmolytische Wirkung der Testsubstanz herausgefunden.

Bei all diesen Organen wird zunächst mittels einer KCl- Lösung eine maximale Kontraktion der Gefäße erzielt.

Ab dem Zeitpunkt der Zugabe der KCl- Lösung bis zum Ende des Versuchs wird eine durchgehende Kurve gezeichnet. Der Kurvenverlauf muss dabei mindestens 5 cm vom Nullpunkt entfernt sein, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten.

Nach Einstellung der Konstanz, wobei die Kurve über mindestens ein Kästchen gerade verlaufen muss, wird die Stammlösung von MGpy4.HCl zu den entsprechenden Zeitpunkten hinzu pipettiert. Es kommt zu einer Kumulation der Testsubstanz.

Zum Zeitpunkt jeder einzelnen Einspritzung der Testsubstanz wird der Abstand der Kurve vom Nullpunkt mittels eines Lineals auf 0,1 cm genau vermessen.

Die abgemessenen Strecken werden anschließend mit folgenden Eichfaktoren multipliziert.

Tabelle 8: Eichfaktoren in Abhängigkeit der elektrischen Spannung

Elektrische Spannung	Eichfaktor
10 mV	1,2
5 mV	0,98
2 mV	0,2

Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

3.8.4 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgt mittels eines Programms, das die Bezeichnung "Sigma Plot 9.0" trägt. Mittels dieses Programms werden Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und in weiterer Folge der EC_{50} Wert anhand einer Dosis- Wirkungskurve ermittelt.

Weiters wird ein Signifikanztest, auch bezeichnet als "Student- t- Test", durchgeführt. Dabei werden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($P < 0,05$) als signifikant und Ergebnisse kleiner 1 % als hochsignifikant angegeben.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Wirkungen der Testsubstanz MGpy4.HCl auf die fünf verschiedenen Organe mit Hilfe von Tabellen und Konzentrations- Wirkungskurven dargestellt.

Pro Organ sind mindestens vier Versuche durchzuführen, um eine Aussagekraft über die Wirkung zu erhalten.

Bei der Testsubstanz MGpy4.HCl kommt es am terminalen Ileum zu einer Wirkung und daher wird an besagtem Organ der Wirkmechanismus getestet. Dies erfolgt mittels des Arzneistoffs Nitro- L- Arginin. Für die Testung eines möglichen Wirkmechanismus sind mindestens drei Versuche erforderlich.

4.1 Testergebnis von MGpy4.HCl am rechten Vorhof (Atrium cordis dexter)

Die Versuchsdurchführung am rechten Vorhof dient der Ermittlung einer chronotropen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese wird anhand von vier durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle angeführt sind.

Tabelle 9: Wirkung von MGpy4.HCl am rechten Vorhof

MGpy4.HCl (μM)	fc \pm SEM (x/min)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	201,25 \pm 5,54	0,00 \pm 0,00	4	--
3	203,75 \pm 5,54	1,25 \pm 0,72	4	n.s.
10	207,5 \pm 6,61	3,07 \pm 0,53	4	n.s.
30	206,25 \pm 6,57	2,46 \pm 1,00	4	n.s.
100	201,25 \pm 8,26	-0,09 \pm 1,77	4	n.s.

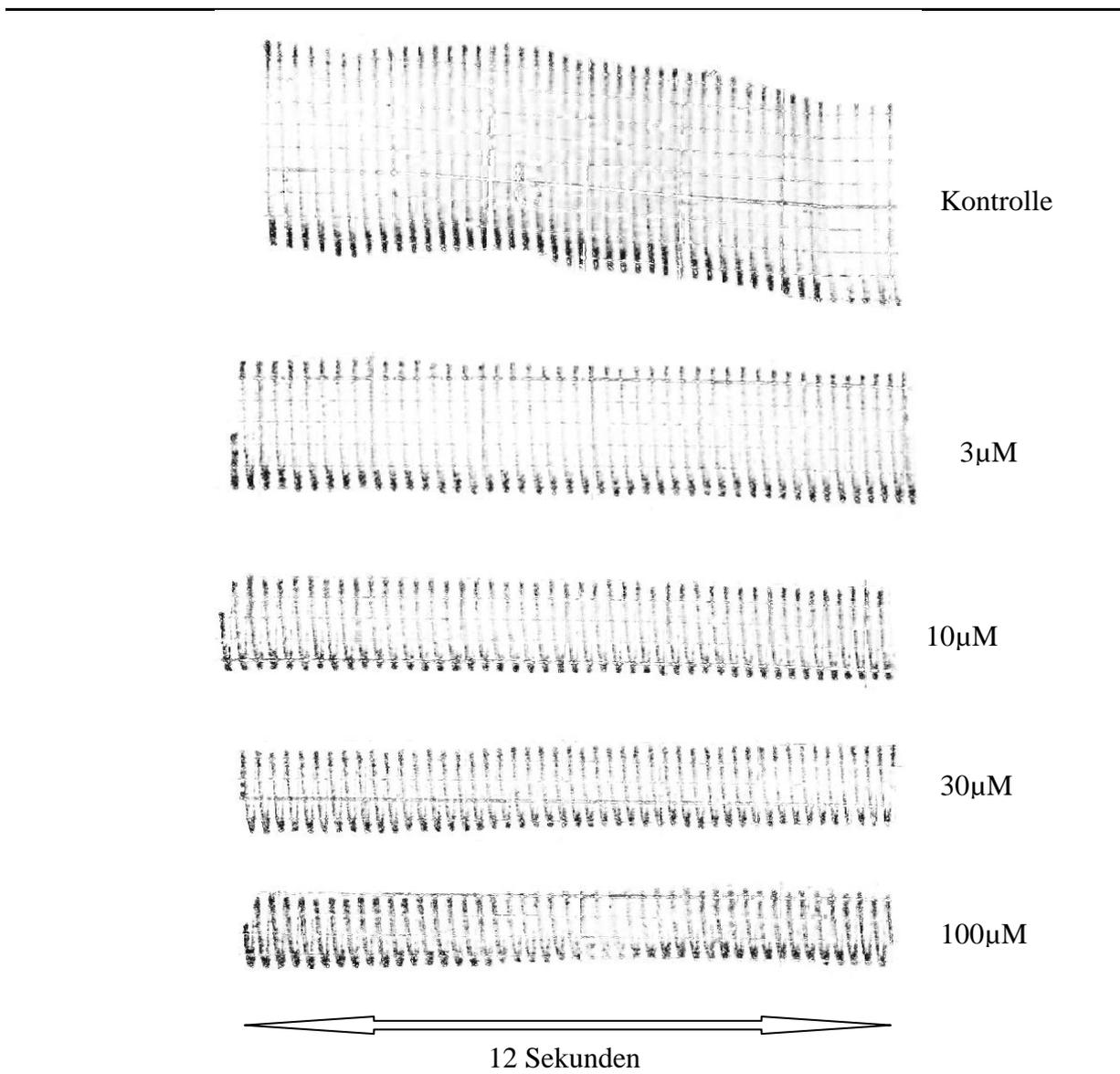
Anhand der in der Tabelle dargestellten Versuche wird nun der Mittelwert (fc) errechnet. Die Darstellung erfolgt sowohl in Form der Anzahl der Schläge pro Minute (x/min) als auch in

Prozent (%). Die Mittelwerte scheinen jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert auf. Weiters wird die Irrtumswahrscheinlichkeit (P), auch bezeichnet als Signifikanztest, in der Tabelle dargestellt.

Bei einer genauen Analyse der Ergebnisse ist festzustellen, dass sich bis zu einer Konzentration von 30 μM eine minimale positiv chronotrope Wirkung zeigt. Bei einer Konzentration von 100 μM strebt diese allerdings wieder gegen Null.

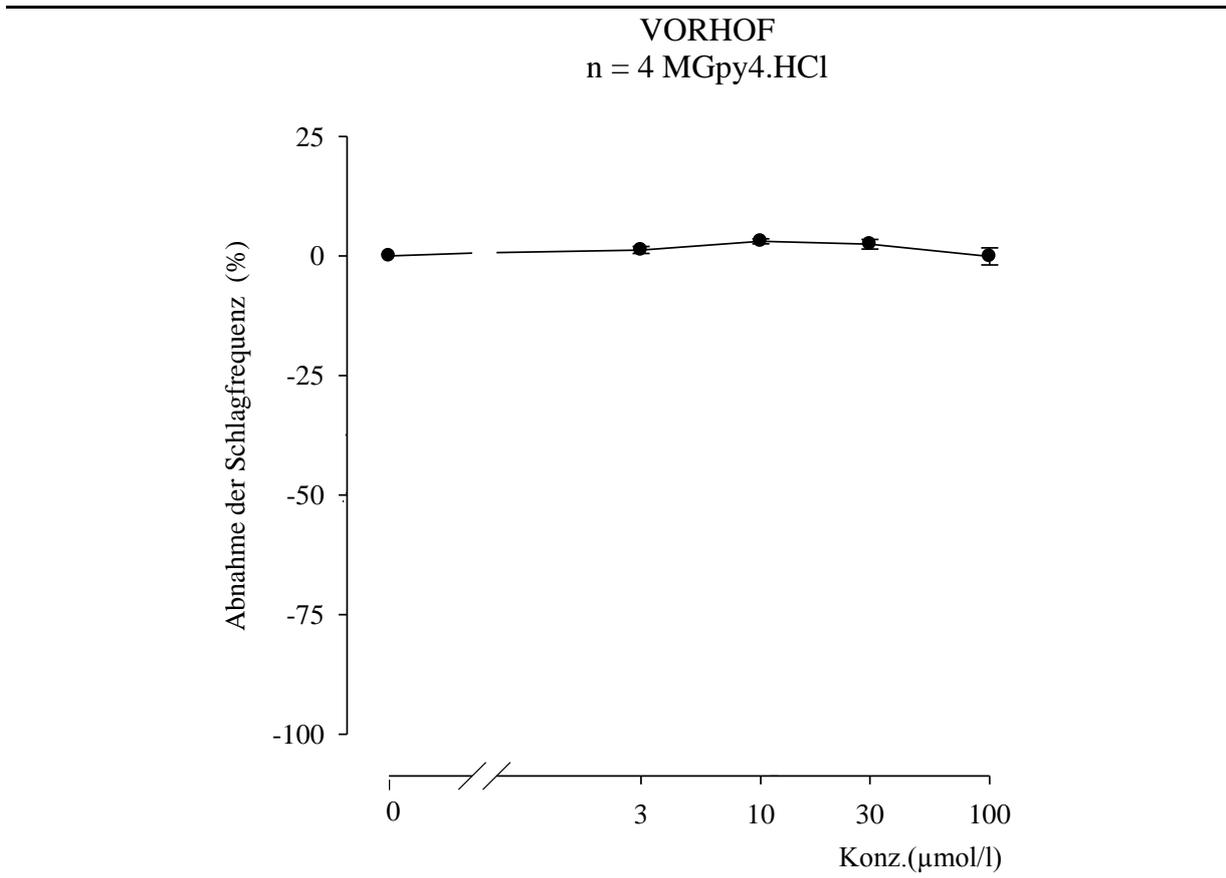
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Substanz MGpy4.HCl am rechten Vorhof zu keiner Wirkung führt. Folglich kann keine EC_{50} berechnet werden.

Abbildung 21: Originalabbildung der Wirkung von MGpy4.HCl am rechten Vorhof



Die Originalabbildung stellt die grundsätzlich gleichbleibende Schlagfrequenz dar. Die Messung erfolgt über 6 cm und dies entspricht einer Zeitspanne von 12 Sekunden. Um die Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten, müssen die Schläge über 6 cm mit dem Faktor 5 multipliziert werden.

Abbildung 22: Konzentrations- Wirkungskurve von MGpy4.HCl am rechten Vorhof



Die Konzentrations- Wirkungskurve bestätigt das Ergebnis, dass keine Wirkung auftritt. Auf der x-Achse wird die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Die y-Achse stellt die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent dar.

4.2 Testergebnis von MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis)

Die Versuchsdurchführung an der Pulmonalarterie dient der Ermittlung einer vasodilatierenden Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese wird anhand von vier durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle angeführt sind.

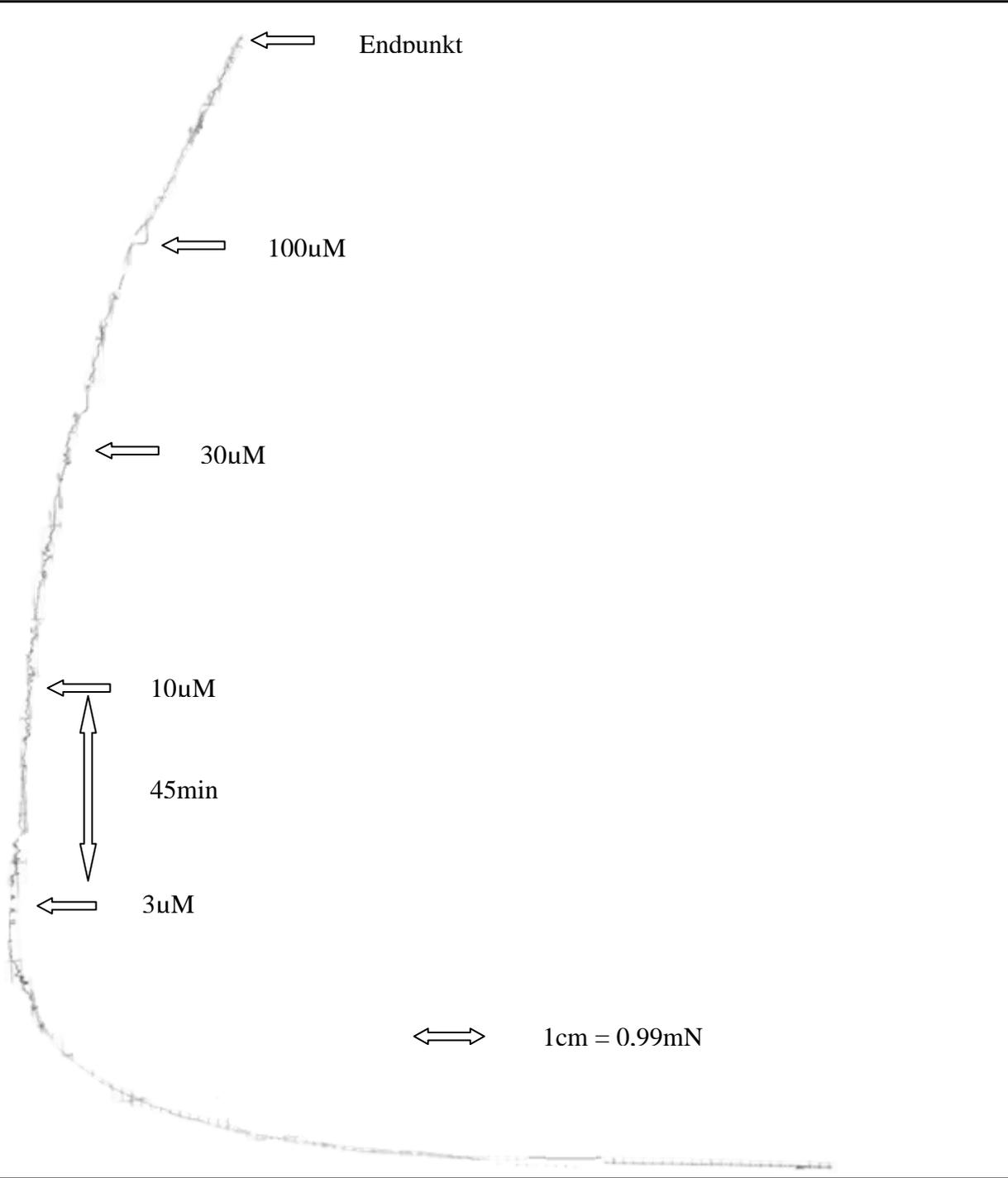
Tabelle 10: Wirkung von MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie

MGpy4.HCl (μM)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	13,17 \pm 1,82	0,00 \pm 0,00	4	--
3	12,10 \pm 1,75	-8,43 \pm 0,86	4	n.s.
10	11,53 \pm 1,78	-13,00 \pm 2,10	4	0,05
30	10,56 \pm 1,71	-20,47 \pm 3,37	4	0,05
100	8,9 \pm 1,61	-33,32 \pm 4,15	4	0,01

In der Tabelle wird das arithmetische Mittel (fc) angeführt. Die Darstellung erfolgt sowohl in Form der Kontraktionskraft der Pulmonalarterie in mN als auch in Prozent (%). Die Mittelwerte scheinen jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert auf. Weiters wird die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) in der Tabelle dargestellt.

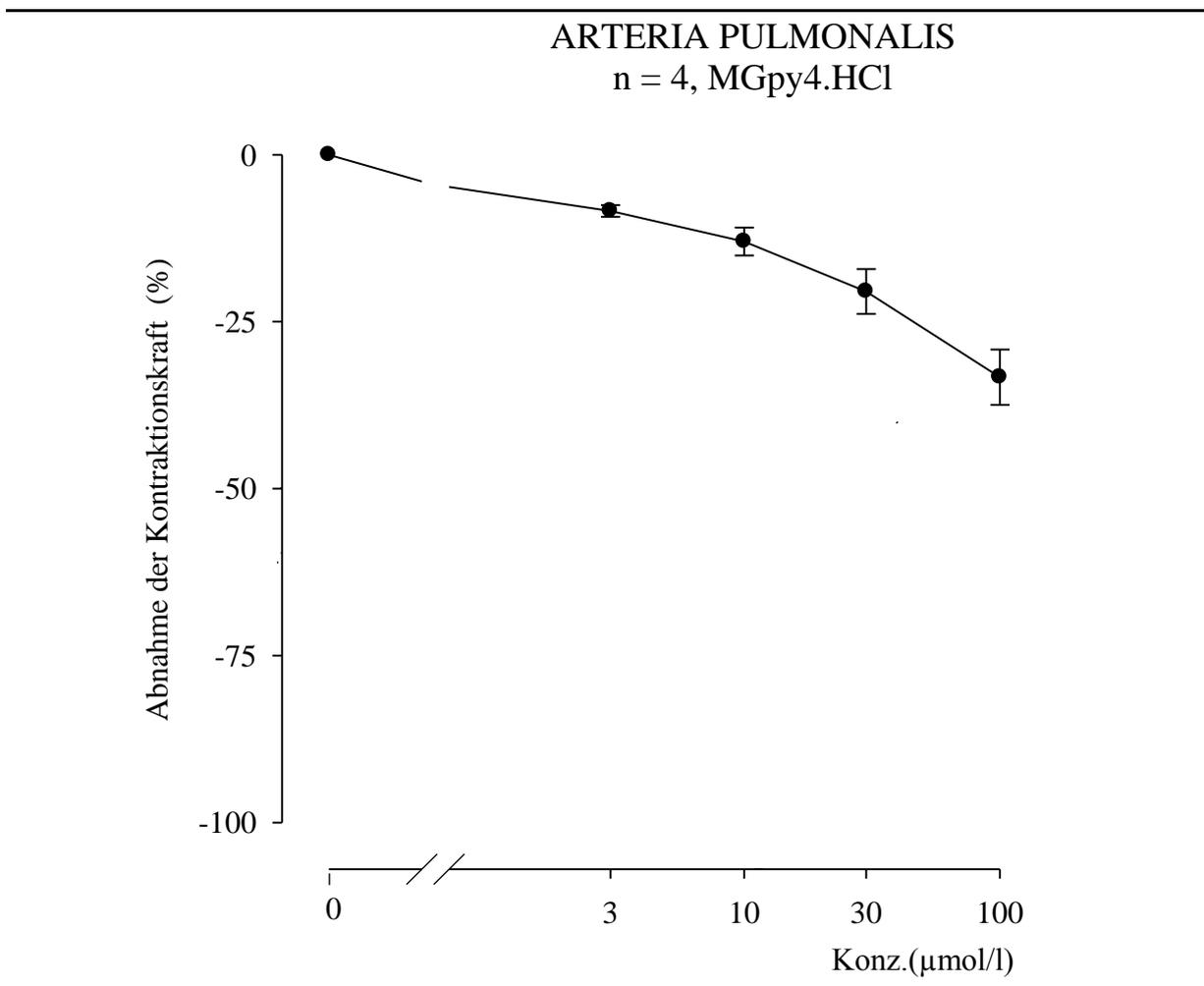
Mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz ist eine schwache Dilatation feststellbar, allerdings ist diese zu gering und die EC₅₀ ist nicht ermittelbar.

Abbildung 23: Originalabbildung der Wirkung von MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie



Die Originalabbildung verdeutlicht eine minimale Dilatation der Pulmonalarterie bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz MGpy4.HCl.

Abbildung 24: Konzentrations- Wirkungskurve von MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie



Die Konzentrations- Wirkungskurve bestätigt das Ergebnis, dass es zu einer minimalen Dilatation der Pulmonalarterie kommt. Allerdings ist diese Wirkung zu gering und somit kann auch keine EC_{50} ermittelt werden.

Zur Kurve an sich ist festzuhalten, dass auf der x-Achse die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen ist, und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt wird.

4.3 Testergebnis von MGpy4.HCl am Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Die Versuchsdurchführung am Papillarmuskel dient der Ermittlung einer inotropen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese wird anhand von vier durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle angeführt sind.

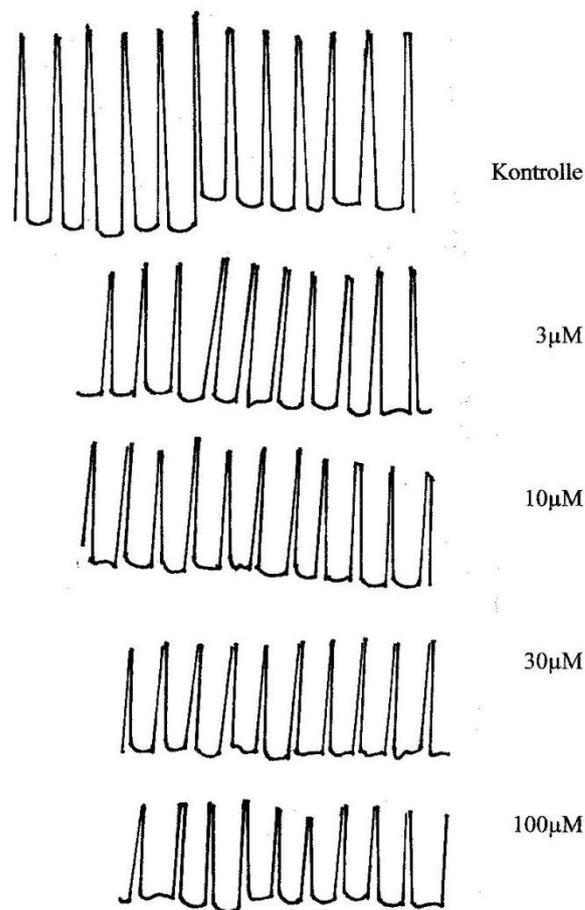
Tabelle 11: Wirkung von MGpy4.HCl am Papillarmuskel

MGpy4.HCl (μM)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	2,07 \pm 0,37	0,00 \pm 0,00	4	--
3	2,00 \pm 0,42	-4,15 \pm 10,60	4	n.s.
10	1,81 \pm 0,30	-11,8 \pm 7,89	4	n.s.
30	1,94 \pm 0,31	-4,21 \pm 9,00	4	n.s.
100	1,80 \pm 0,35	-11,73 \pm 9,87	4	n.s.

In der Tabelle wird der Mittelwert (fc) angeführt. Die Darstellung erfolgt sowohl in Form der Kontraktionskraft des Papillarmuskels in mN als auch in Prozent (%). Die Mittelwerte scheinen jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert auf. Weiters wird die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) in der Tabelle dargestellt.

Mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz wird eine sehr leichte negativ inotrope Wirkung ersichtlich. Diese ist jedoch zu niedrig um eine EC₅₀ zu ermitteln.

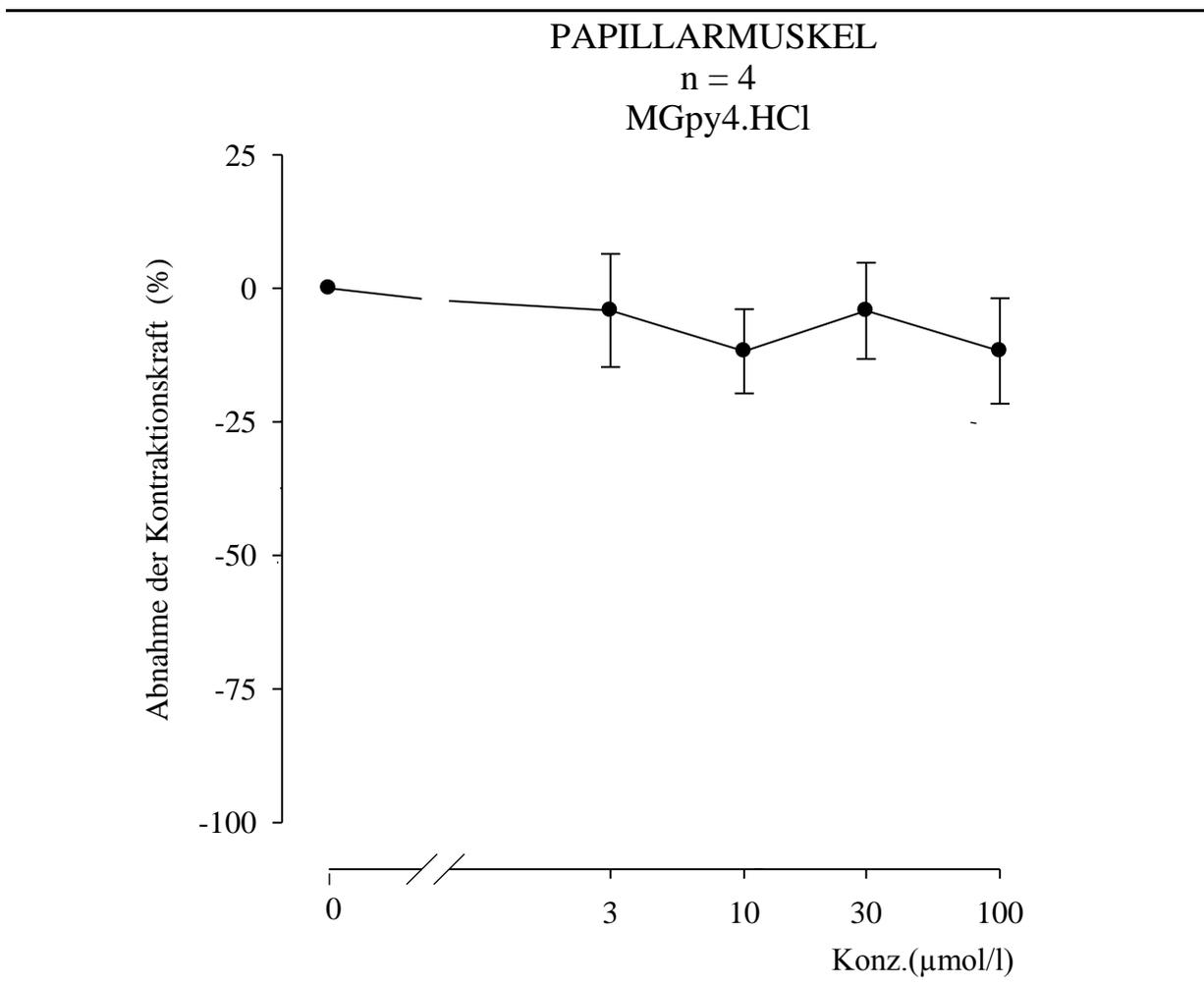
Abbildung 25: Originalabbildung der Wirkung von MGpy4.HCl am Papillarmuskel



Die Originalabbildung bringt die minimale negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz auf den Papillarmuskel zum Ausdruck.

Die Messungen erfolgen im Fünfminutentakt über 6 cm. Anschließend werden die Amplituden der Schläge abgemessen und in Abhängigkeit der eingestellten elektrischen Spannung mit Multiplikationsfaktoren multipliziert. Umso größer die Amplitude, desto stärker ist die Inotropie.

Abbildung 26: Konzentrations- Wirkungskurve von MGpy4.HCl am Papillarmuskel



Die Konzentrations- Wirkungskurve bestätigt das Ergebnis, dass es nur zu einer minimalen negativ chronotropen Wirkung am Papillarmuskel kommt. Diese geringe Wirkung ist zu vernachlässigen und es ist auch nicht notwendig bzw. möglich eine EC_{50} zu bestimmen.

Zur Kurve an sich ist festzuhalten, dass auf der x-Achse die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen ist, und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt wird.

4.4 Testergebnis von MGpy4.HCl an der Aorta (Aorta descendens)

Die Versuchsdurchführung an der Aorta dient der Ermittlung einer vasodilatierenden Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese wird anhand von sechs durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle angeführt sind.

Tabelle 12: Wirkung von MGpy4.HCl an der Aorta

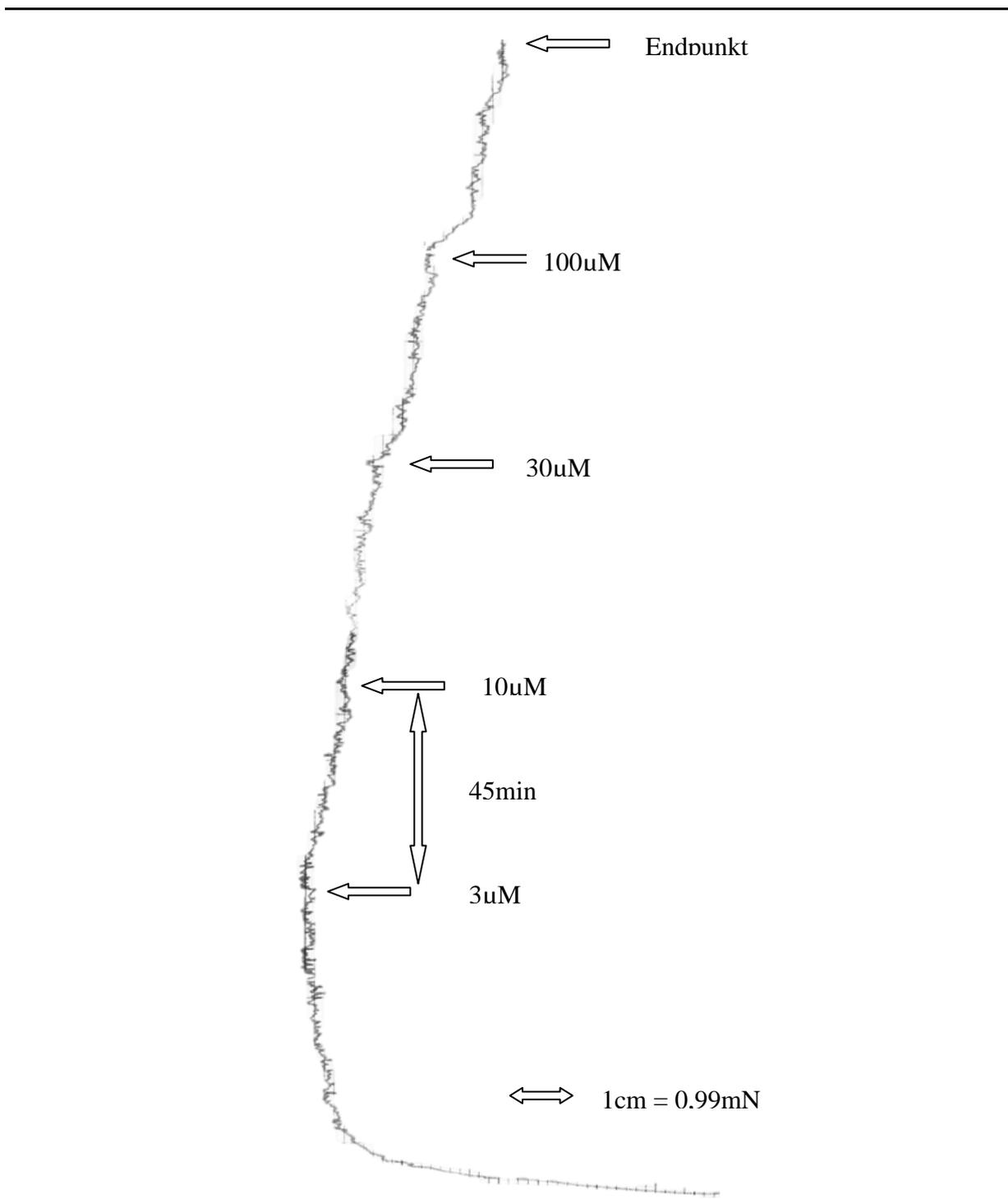
MGpy4.HCl (μM)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	8,77 \pm 1,61	0,00 \pm 0,00	6	--
3	8,81 \pm 1,46	2,14 \pm 2,96	6	n.s.
10	8,95 \pm 1,28	5,88 \pm 6,24	6	n.s.
30	8,59 \pm 1,12	2,99 \pm 7,99	6	n.s.
100	7,83 \pm 0,89	-4,21 \pm 9,82	6	n.s.

In der Tabelle wird der Mittelwert (fc) angeführt. Die Darstellung erfolgt sowohl in Form der Kontraktionskraft der Aorta in mN als auch in Prozent (%). Die Mittelwerte werden jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert. Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) in der Tabelle zu sehen.

Bei den Konzentrationen von 3 und 10 μM ist eine minimale kontrahierende Wirkung der Testsubstanz ersichtlich. Bei den Konzentrationen von 30 und 100 μM tritt eine geringe dilatierende Wirkung auf.

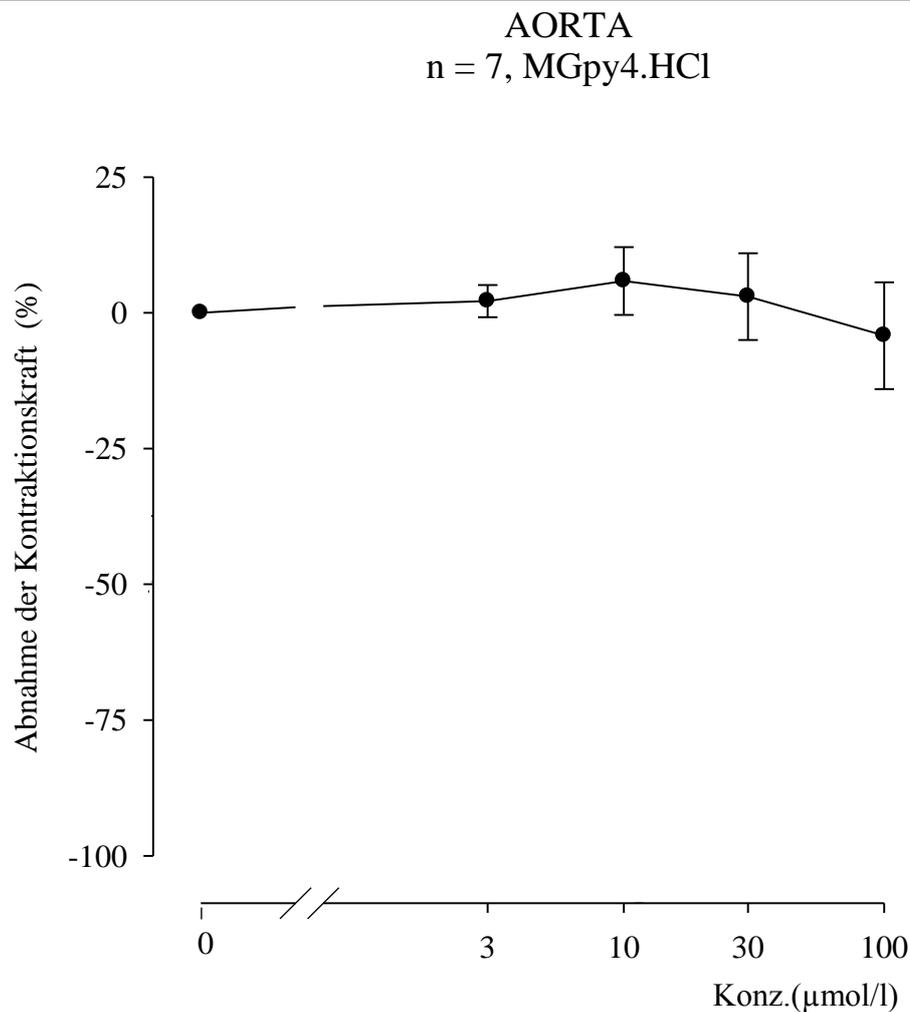
Die Dilatation ist allerdings zu gering, um die EC_{50} zu ermitteln.

Abbildung 27: Originalabbildung der Wirkung von MGpy4.HCl an der Aorta



Die Originalabbildung verdeutlicht zunächst eine minimale kontrahierende Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl an der Aorta. Mit steigender Konzentration der Testsubstanz stellt sich eine geringe Dilatation des Gefäßes ein.

Abbildung 28: Konzentrations- Wirkungskurve von MGpy4.HCl an der Aorta



Die Konzentrations- Wirkungskurve bestätigt das Ergebnis, dass es bei steigender Konzentration von MGpy4.HCl zu einer minimalen Dilatation der Aorta kommt. Allerdings ist diese Wirkung zu gering und somit eine Ermittlung der EC_{50} nicht möglich.

Auf der x-Achse der Konzentrations- Wirkungskurve ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$, und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen.

4.5 Testergebnis von MGpy4.HCl am Dünndarm (terminales Ileum)

Die Versuchsdurchführung am terminalen Ileum dient der Ermittlung einer spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl. Diese wird anhand von fünf durchgeführten Versuchen ermittelt, welche in der Tabelle zu sehen sind.

Tabelle 13: Wirkung von MGpy4.HCl am Dünndarm

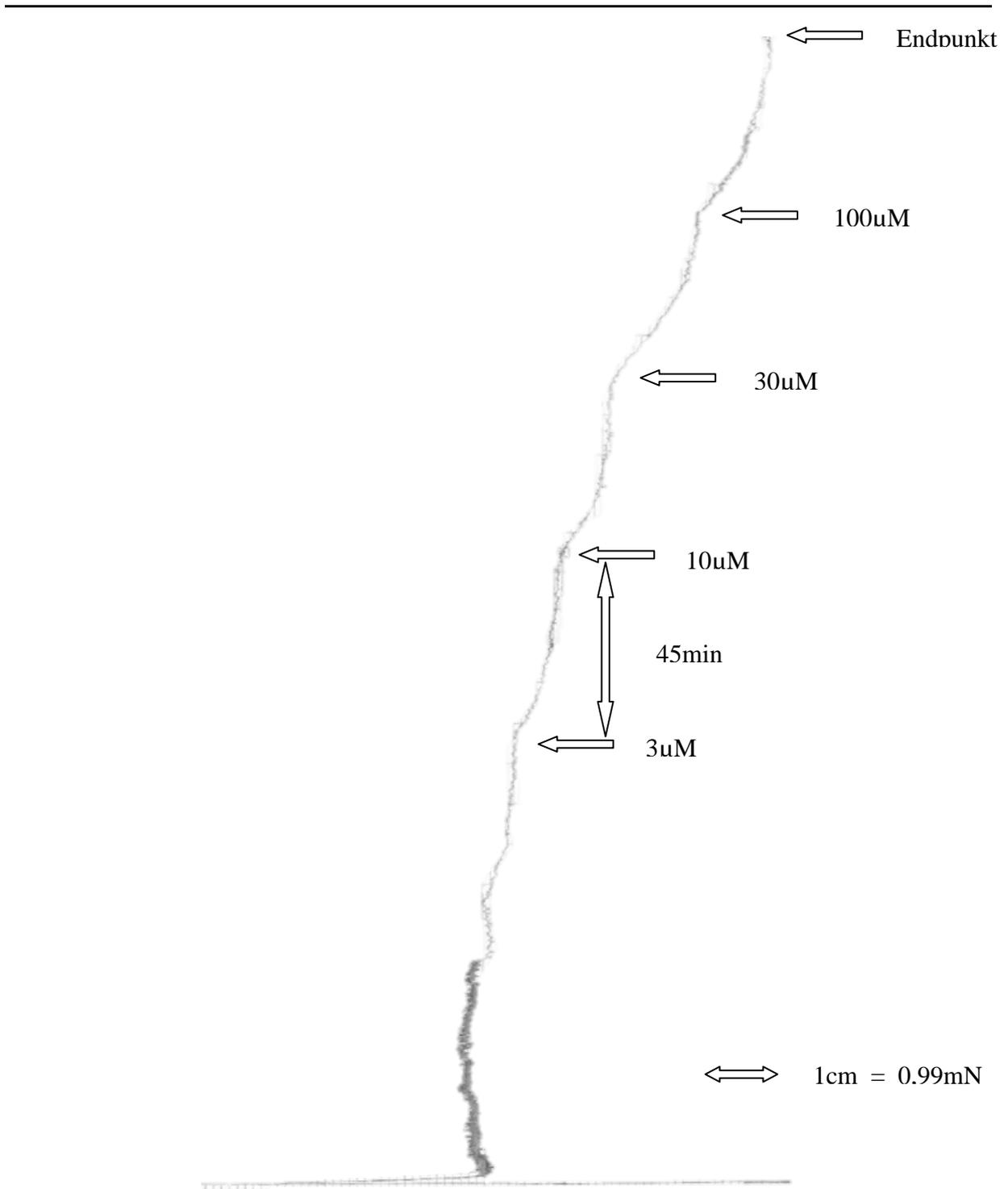
MGpy4.HCl (μM)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	8,44 \pm 1,21	0,00 \pm 0,00	5	--
3	8,24 \pm 1,14	-1,63 \pm 5,65	5	n.s.
10	7,36 \pm 1,19	-13,01 \pm 5,61	5	0,05
30	5,42 \pm 0,99	-36,62 \pm 4,79	5	0,01
100	3,71 \pm 0,70	-56,68 \pm 4,16	5	0,01

In der Tabelle wird der Mittelwert (fc) angeführt. Dieser wird sowohl in Form der Kontraktionskraft des Dünndarms in mN als auch in Prozent (%) angegeben. Bei den Mittelwerten erfolgt eine Korrektur um den Standardfehler (SEM). Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) in der Tabelle aufgelistet.

Mit steigender Konzentration der Testsubstanz MGpy4.HCl kommt es zu einer immer stärker werdenden spasmolytischen Wirkung am terminalen Ileum.

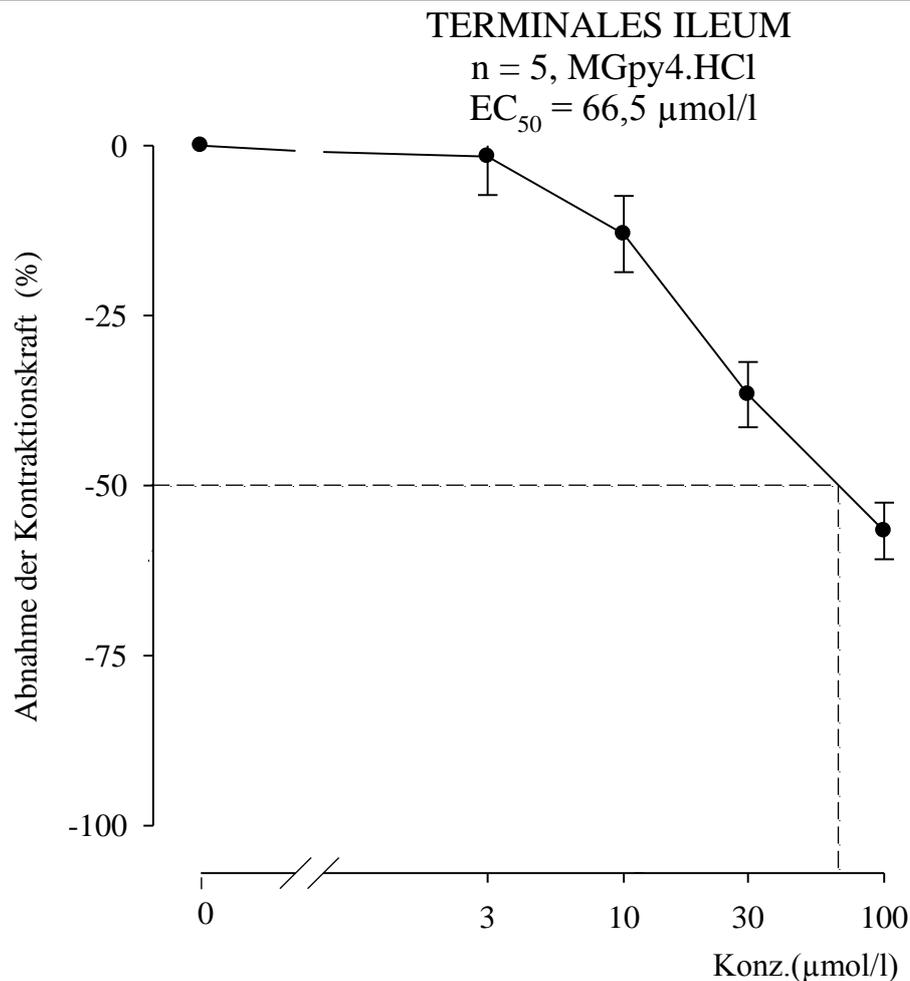
Aufgrund der starken Wirksamkeit kann folglich die EC₅₀ berechnet werden.

Abbildung 29: Originalabbildung der Wirkung von MGpy4.HCl am terminalen Ileum



Die Originalabbildung bringt die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl am terminalen Ileum zum Ausdruck, welche mit steigender Konzentration zunimmt.

Abbildung 30: Konzentrations- Wirkungskurve von MGpy4.HCl am terminalen Ileum



Die Konzentrations- Wirkungskurve bestätigt das Ergebnis, dass es bei zunehmender Konzentration der Testsubstanz zu einer spasmolytischen Wirkung am terminalen Ileum kommt.

Folglich wird die EC₅₀ berechnet. Diese beträgt 66,5 µmol/l.

Auf der x-Achse der Konzentrations- Wirkungskurve ist dabei die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent dargestellt.

4.6 Testergebnisse zur Bestimmung des Wirkmechanismus am Dünndarm (terminales Ileum)

Die Bestimmung des Wirkmechanismus wird am Dünndarm durchgeführt, da die Testsubstanz MGpy4.HCl ausschließlich an diesem Organ eine deutliche Wirkung hervorruft.

Zur Bestimmung des Wirkmechanismus wird der Arzneistoff Nitro- L- Arginin, welcher die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) blockiert, verwendet. Mit Hilfe dieser Substanz kann herausgefunden werden, ob die eNOS an der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl am terminalen Ileum beteiligt ist.

Nach Einstellung der Konstanz am terminalen Ileum werden zunächst 30 µM bzw. in einem weiteren Versuch 100 µM des eNOS- Antagonisten Nitro- L- Arginin hinzu pipettiert. Nach exakt 45 Minuten erfolgt dann die Testsubstanzzugabe von jeweils 100 µM MGpy4.HCl.

In diesem Fall wird nach Versuchsdurchführung festgestellt, dass die eNOS nicht an der spasmolytischen Wirkung von MGpy4.HCl beteiligt ist.

Tabelle 14: Ergebnis der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 30 µM Nitro- L- Arginin

MGpy4.HCl (µM)	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	9,80 ± 0,95	4	--
30 µM Nitro-L- Arginin	9,28 ± 0,76	4	--
+100 µM MGpy4.HCl	4,48 ± 0,20	4	0,05

Tabelle 15: Ergebnis der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 100 µM Nitro- L- Arginin

MGpy4.HCl (µM)	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	7,71 ± 1,22	5	--
100 µM Nitro-L- Arginin	6,61 ± 1,44	5	--
+100 µM MGpy4.HCl	1,52 ± 0,64	5	0,05

In den beiden Tabellen wird der Mittelwert (f_c) korrigiert um den Standardfehler (SEM) in mN angegeben. Die Einheit mN steht für die Kontraktionskraft des Dünndarms. Außerdem ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) in der Tabelle angeführt.

Abbildung 31: Originalabbildung der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 30 μ M Nitro- L- Arginin

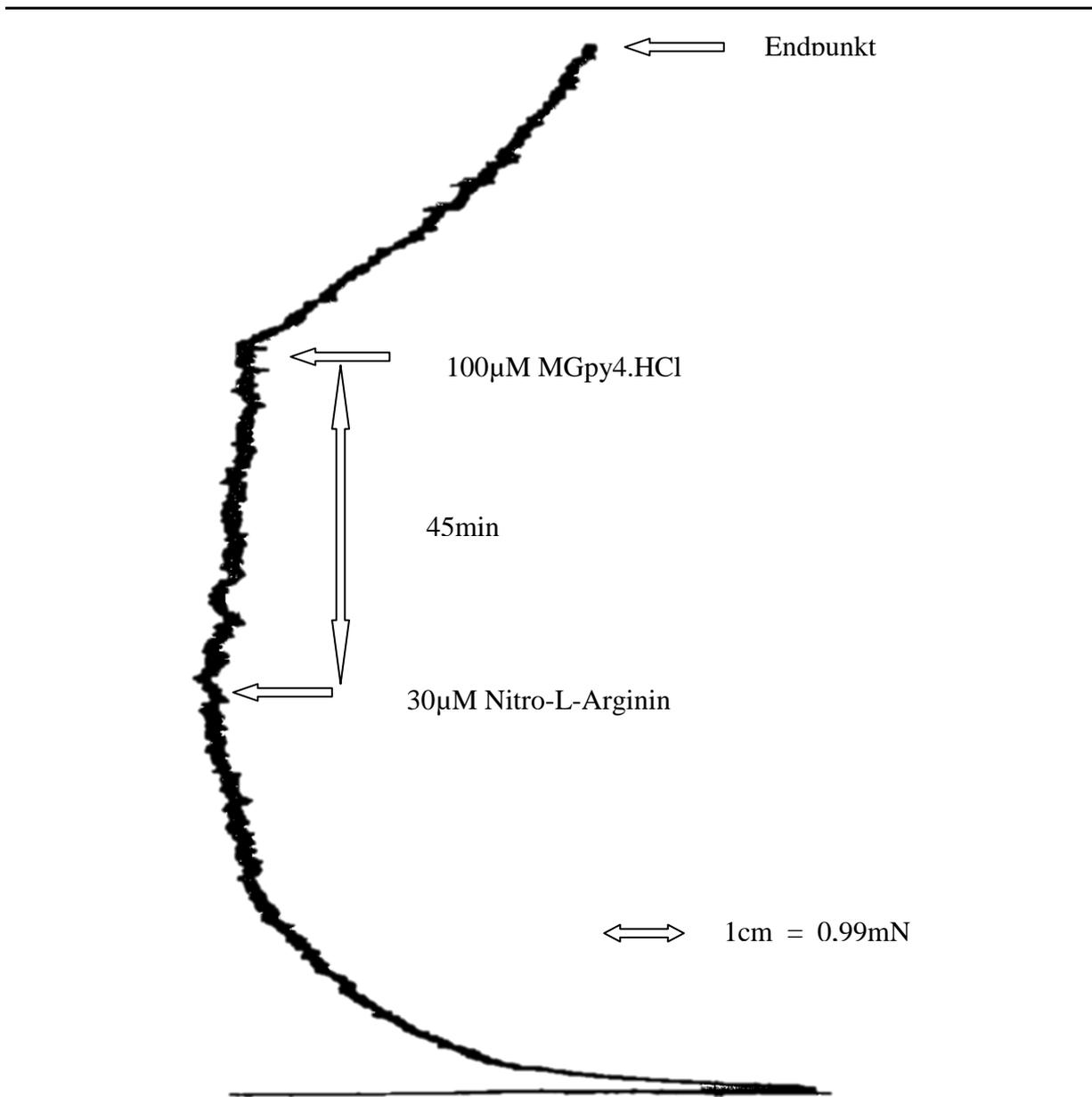
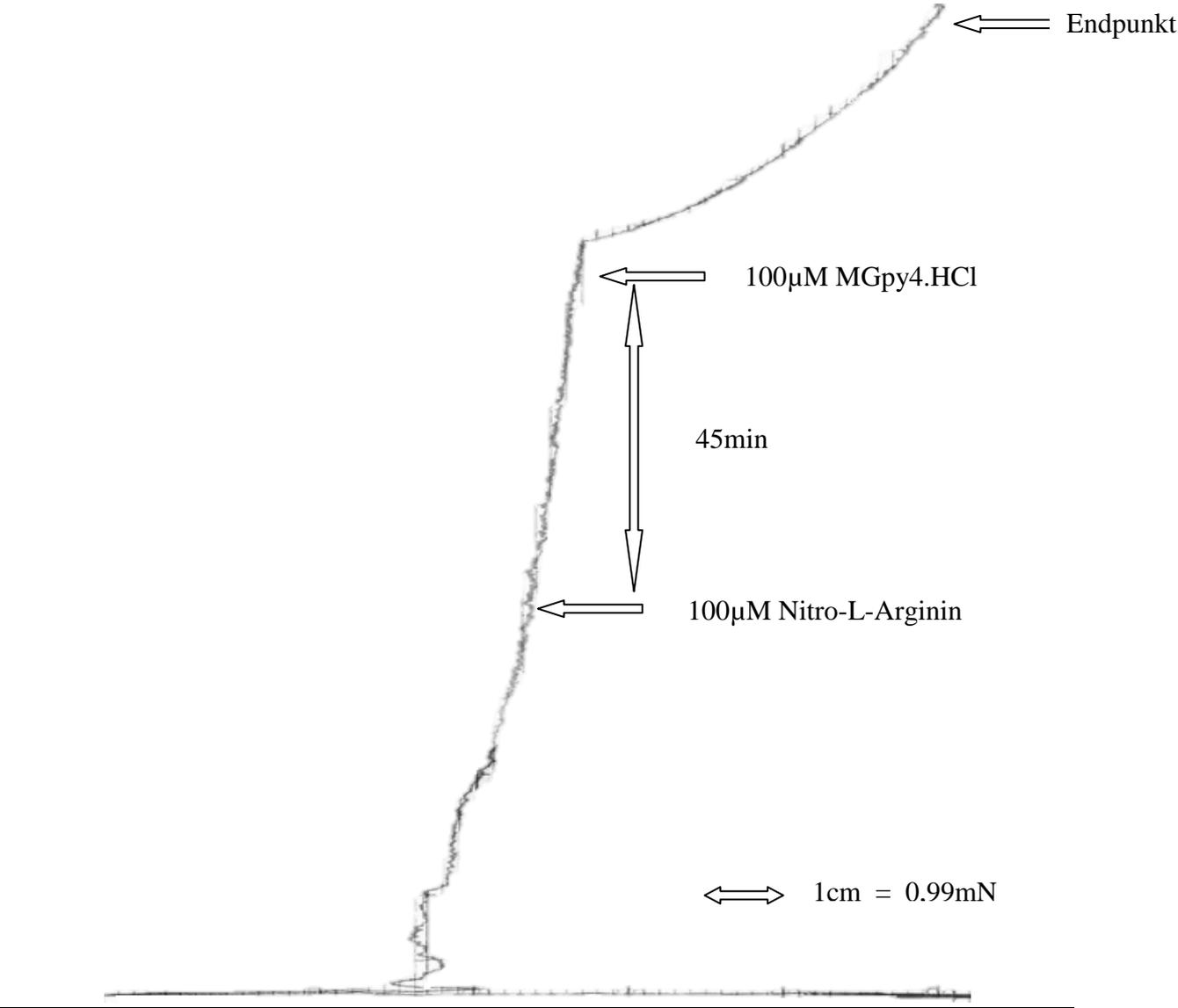


Abbildung 32: Originalabbildung der Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 100 μ M Nitro- L- Arginin



Die beiden Originalaufzeichnungen bestätigen das Ergebnis, dass es trotz Blockade der eNOS mittels Nitro- L- Arginin zu einer spasmolytischen Wirkung am terminalen Ileum kommt. Folglich ist festzuhalten, dass die eNOS nicht bzw. nur geringfügig für die spasmolytische Wirkung von MGpy4.HCl verantwortlich ist.

Abbildung 33: Balkendiagramm zur Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 30 μ M Nitro- L- Arginin

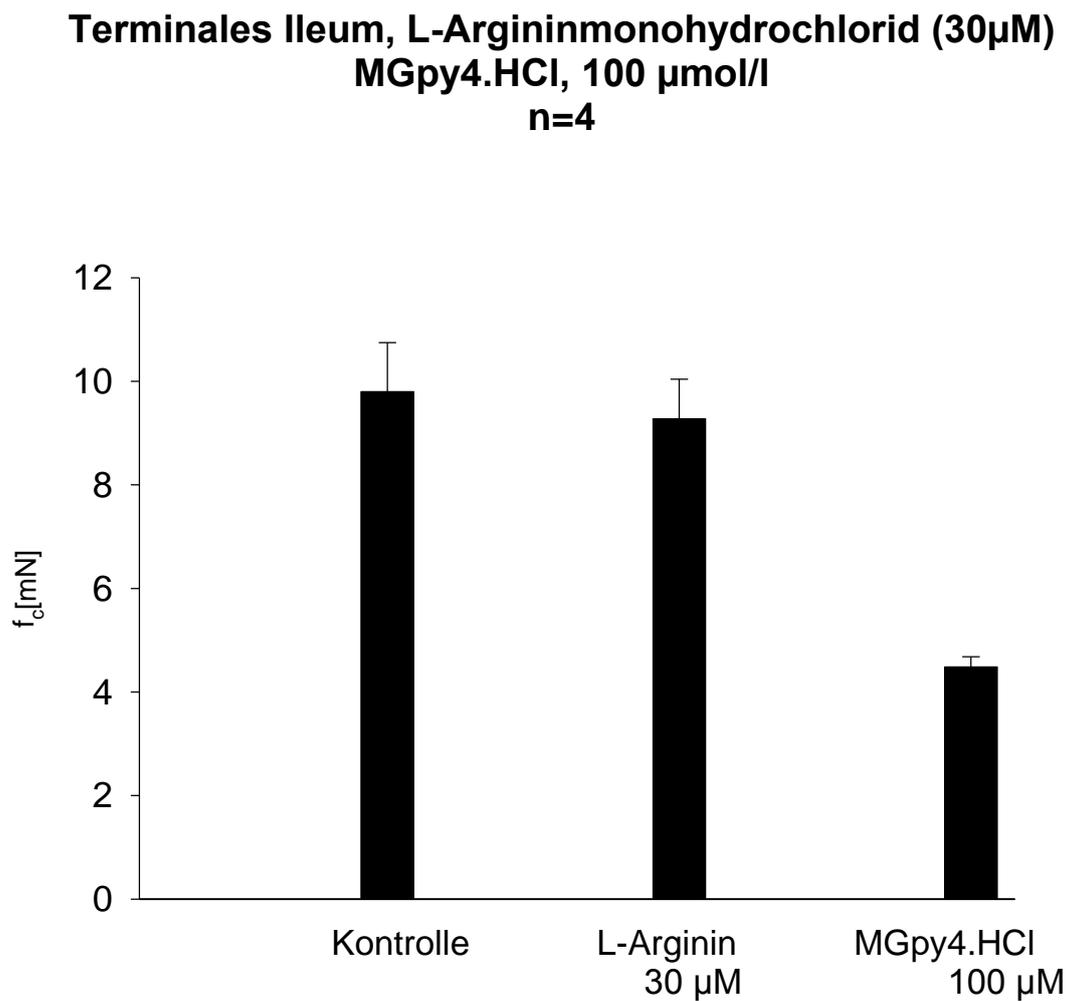
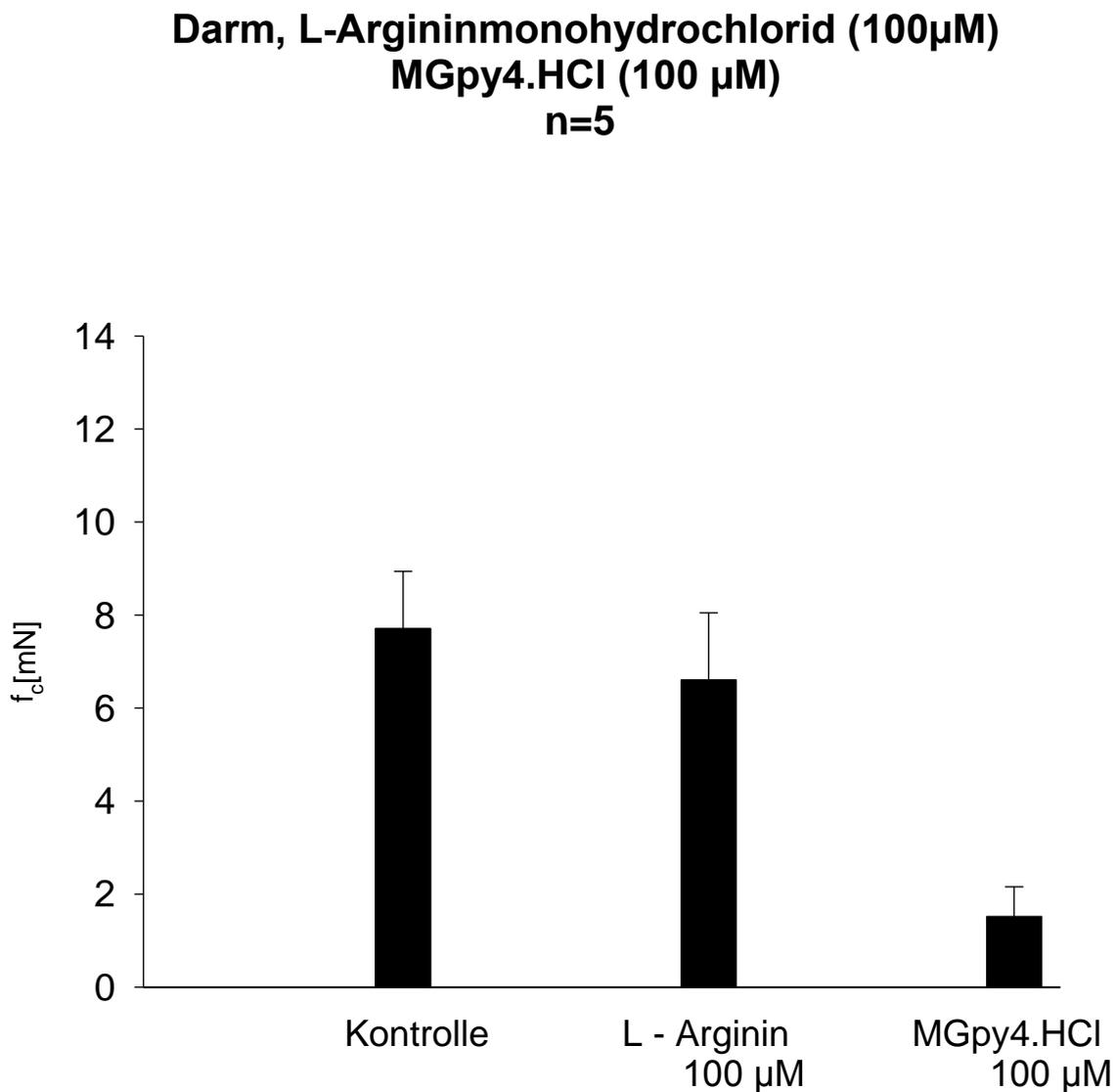


Abbildung 34: Balkendiagramm zur Bestimmung des Wirkmechanismus von MGpy4.HCl bei einer Konzentration von 100 μ M Nitro- L- Arginin



In den beiden Balkendiagrammen wird die spasmolytische Wirkung von MGpy4.HCl am terminalen Ileum nach Zugabe von Nitro- L- Arginin dargestellt.

Auf der x-Achse des Balkendiagramms ist dabei die Konzentration in μ mol/l aufgetragen. Auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft in mN dargestellt.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden die Wirkungen und der Wirkmechanismus der neu synthetisierten Substanz MGpy4.HCl auf fünf unterschiedliche Organe untersucht.

Die Organe stammen von Meerschweinchen und werden verwendet um ein erstes pharmakologisches Wirkprofil der Testsubstanz zu erstellen.

Es werden Wirkungen auf die quergestreifte Herzmuskulatur mit Hilfe von Präparaten des rechten Vorhofs und des Papillarmuskels untersucht. Die Versuchsdurchführung am rechten Vorhof dient dabei der Ermittlung einer chronotropen Wirkung. Am Papillarmuskel wird eine eventuell vorhandene inotrope Wirkung erforscht.

Das terminale Ileum, die Pulmonalarterie und die Aorta werden verwendet, um Wirkungen von MGpy4.HCl auf die glatte Muskulatur herauszufinden. Die Versuche am terminalen Ileum dienen dabei dem Herausfinden einer spasmolytischen Wirkung. An der Pulmonalarterie und an der Aorta wird jeweils eine vasodilatierende Wirkung analysiert.

In diesem Kapitel wird nun näher auf die erforschten Ergebnisse eingegangen und die Wirkungen der Testsubstanz MGpy4.HCl auf die fünf Organpräparate werden miteinander verglichen.

5.1 Vergleich der Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur

Um die Wirkung der Substanz MGpy4.HCl auf die quergestreifte Herzmuskulatur zu analysieren, werden Präparate des rechten Vorhofs und des Papillarmuskels verwendet.

Die Versuchsdurchführung am rechten Vorhof dient dabei der Ermittlung einer positiven bzw. negativen chronotropen Wirkung. Eine positive bzw. negative inotrope Wirkung wird anhand des Papillarmuskels untersucht.

Tabelle 16: Wirkung von MGpy4.HCl auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Organ	fc ± SEM (%) MGpy4.HCl bei Endkonzentration von 100µM	EC₅₀ MGpy4.HCl (µmol/l)
Atrium cordis dexter	-0,09 ± 1,77	>100
Musculus papillaris	-11,73 ± 9,87	>100

Anhand der in der Tabelle dargestellten Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass die Testsubstanz MGpy4.HCl kaum eine Wirkung an der quergestreiften Herzmuskulatur hervorruft.

Die Wirkung am rechten Vorhof ist dabei so gut wie nicht vorhanden. Am Papillarmuskel kann eine minimale negative chronotrope Wirkung erkannt werden. Allerdings ist die Ausprägung einer chronotropen bzw. inotropen Wirkung von MGpy4.HCl an den Organen der Herzmuskulatur zu gering, um in weiterer Folge eine EC₅₀ berechnen zu können.

5.2 Vergleich der Ergebnisse an der glatten Muskulatur

Um die Wirkungen der Testsubstanz MGpy4.HCl an der glatten Muskulatur herauszufinden, werden Präparate der Pulmonalarterie, der Aorta und des Dünndarms verwendet.

Anhand der Versuche an der Pulmonalarterie und der Aorta wird analysiert, ob die Testsubstanz an den beiden Organen eine vasodilatierende Wirkung hervorruft. Die Versuchsdurchführung am terminalen Ileum dient der Ermittlung einer spasmolytischen Wirkung von MGpy4.HCl.

Tabelle 17: Wirkung von MGpy4.HCl auf die glatte Muskulatur

Organ	fc ± SEM (%) MGpy4.HCl bei Endkonzentration von 100µM	EC₅₀ MGpy4.HCl (µmol/l)
Arteria pulmonalis	-33,32 ± 4,15	>100
Aorta descendens	-4,21 ± 9,82	>100
Terminales Ileum	-56,68 ± 4,16	66,5

Anhand der Ergebnisse in der Tabelle wird ersichtlich, dass die Testsubstanz MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie zu einer minimalen dilatierenden Wirkung führt. Diese ist allerdings zu gering, um in weiterer Folge die EC₅₀ berechnen zu können.

Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die Testsubstanz somit keine 100%ige Organselektivität aufweist und daher für den therapeutischen Einsatz eher ungeeignet ist.

Die Ergebnisse an der Aorta liefern eine minimal ausgeprägte dilatierende Wirkung. Die auftretende Wirkung ist allerdings zu gering um die EC₅₀ zu ermitteln.

Anhand der Ergebnisse in der Tabelle ist zu erkennen, dass die Testsubstanz MGpy4.HCl am terminalen Ileum eine deutlich ersichtliche Wirkung hervorruft. Bei der Endkonzentration von 100µM kommt es zu einem spasmolytischen Effekt auf den Dünndarm. Das terminale Ileum wird somit durch MGpy4.HCl relaxiert.

Aufgrund der deutlichen Wirksamkeit kann folglich der EC₅₀- Wert ermittelt werden. Die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt, beträgt 66,5 µmol/l.

Jedoch ist festzuhalten, dass eine EC₅₀ von 66,5 µM für einen therapeutischen Einsatz eher ungeeignet ist. Im Falle einer per oralen Gabe müssten sehr große Substanzmengen verabreicht werden, um einen therapeutisch wirksamen Effekt zu erzielen.

Generell ist ein Wirkstoff umso besser anwendbar, je niedriger die effektive Konzentration ist. Klinisch relevante Arzneistoffe sollten eine EC₅₀ von weniger als 30µM aufweisen.

Der spasmolytische Effekt der Testsubstanz MGpy4.HCl auf den Dünndarm stellt in weiterer Folge die Grundlage für die Untersuchung des Wirkmechanismus dar.

5.3 Ergebnisse der Versuche von MGpy4.HCl in Kombination mit 30µM Nitro- L- Arginin

Nitro- L- Arginin wird verwendet, um den Wirkmechanismus am terminalen Ileum zu untersuchen.

Die Substanz Nitro- L- Arginin blockiert dabei die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) und ermöglicht dadurch das Herausfinden, ob die eNOS an der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz MGpy4.HCl am terminalen Ileum beteiligt ist.

Insgesamt werden vier Versuche bei einer Konzentration von 30µM Nitro- L- Arginin durchgeführt.

Dabei wird zunächst der Dünndarm mittels einer 60 mmolaren KCl- Lösung maximal kontrahiert. Anschließend werden 30 µM des Arzneistoffs Nitro- L- Arginin hinzu pipettiert, was zu einer minimalen Dilatation am Dünndarm führt. Der Kontrollwert liegt bei 9,80mN. Nach Zugabe von 30 µM sinkt dieser minimal auf 9,28 mN.

Nach exakt 45 Minuten werden 100 µM von MGpy4.HCl hinzugegeben, was zur Folge hat, dass der Wert auf 4,48 mN sinkt.

Folglich kann gesagt werden, dass die eNOS nur zu einem kleinen Teil an der spasmolytischen Wirkung beteiligt ist und andere Mechanismen ebenfalls zur dilatierenden Wirkung führen müssen.

5.4 Ergebnisse der Versuche von MGpy4.HCl in Kombination mit 100µM Nitro- L- Arginin

Insgesamt werden fünf Versuche bei einer Konzentration von 100µM Nitro- L- Arginin durchgeführt.

Dabei wird zunächst der Dünndarm mittels einer 60 mmolaren KCl- Lösung maximal kontrahiert. Anschließend werden 100 µM des Arzneistoffs Nitro- L- Arginin hinzu pipettiert. Dadurch kommt es zu einer minimalen Dilatation am Dünndarm. Der Kontrollwert liegt bei 7,71 mN. Nach Zugabe von 100 µM sinkt dieser minimal auf 6,61 mN.

Nach exakt 45 Minuten werden 100 µM von MGpy4.HCl hinzugegeben, wodurch folglich der Wert auf 1,52 mN sinkt.

Die Werte bestätigen das Ergebnis, dass die eNOS nur zu einem geringen Teil an der spasmodischen Wirkung beteiligt ist. Die dilatierende Wirkung wird somit durch andere Mechanismen hervorgerufen.

Eine Vasodilatation kann unter anderem durch einen Ca^{2+} -Kanal-Antagonismus, eine ACE-Hemmung oder durch eine Öffnung von ATP-abhängigen K^{+} -Kanälen zu Stande kommen.

Diesbezüglich müssten weitere Analysen durchgeführt werden.

6 Resümee

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird ein erstes pharmakologisches Wirkprofil einer neu synthetisierten Substanz erstellt. Die Testsubstanz MGpy4.HCl wird dabei Untersuchungen unterzogen, um Wirkungen und einen Wirkmechanismus herauszufinden.

Für die Versuchsdurchführung werden fünf verschiedene, von Meerschweinchen stammende, Organe verwendet.

Die Organe werden täglich frisch entnommen und anschließend präpariert. Folglich werden diese in die Versuchsaapparaturen eingespannt. Die Versuchsaapparaturen sind mit Organbädern ausgestattet, um einen Versuchsablauf bei physiologischen Bedingungen zu garantieren. Die Organpräparate müssen sich immer in einer Nährlösung befinden, welche grundsätzlich eine Temperatur von 37°C aufweist. Zusätzlich werden diese begast, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Um Wirkungen auf die quergestreifte Herzmuskulatur zu analysieren, werden Präparate des rechten Vorhofs sowie des Papillarmuskels verwendet. Am rechten Vorhof wird dabei so gut wie keine Wirkung festgestellt. Auch am Papillarmuskel tritt lediglich eine sehr geringe negativ inotrope Wirkung auf.

Zur Ermittlung der Wirkungen von MGpy4.HCl auf die glatte Muskulatur, werden Organpräparate der Pulmonalarterie, der Aorta und des Dünndarms herangezogen. Anhand der Versuchsdurchführung hat sich gezeigt, dass MGpy4.HCl an der Pulmonalarterie eine minimale dilatierende Wirkung hervorruft. Die Wirkung der Testsubstanz an der Aorta ist vernachlässigbar. Am terminalen Ileum kommt es dabei zu einem deutlich ersichtlichen spasmolytischen Effekt.

Da es ausschließlich am terminalen Ileum zu einer deutlichen Wirkung kommt, kann nur hier eine EC_{50} von 66,5 $\mu\text{mol/l}$ berechnet werden.

Weiters werden Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit Hilfe von Nitro- L- Arginin durchgeführt. Nitro- L- Arginin blockiert dabei die eNOS und es kann analysiert werden, ob dieses für die Wirkung verantwortlich ist.

Folglich wird festgestellt, dass die eNOS nur zu einem kleinen Teil an der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz beteiligt ist und somit andere Wirkmechanismen dafür verantwortlich sein müssen.

7 Literaturverzeichnis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8 Curriculum vitae

MICHAELA HEBEIN

geboren am 10. Juli 1989 in Villach
österreichische Staatsbürgerschaft

AUSBILDUNG

Okt. 2008 - Nov. 2014	Universität Wien Studium der Pharmazie
Jun. 2008	Bundesgymnasium , Villach St. Martin Matura, neusprachlicher Zweig
Jun. 2008	Musikschule , Villach, Klavier

UNIVERSITÄRE ZUSATZAUSBILDUNG

Freie Wahlfächer - Universität Wien

Dezember 2013	TCM - Neue Herausforderung für den Pharmazeuten
Oktober 2013	Einführung in die pflanzliche Zell- und Gewebekultur
Februar 2013	Spezielle Methoden der pharmazeutischen Chemie (4)
Juni 2011	Spezielle Methoden der pharmazeutischen Chemie (2)
Februar 2011	Pharmazeutisch technologisches Seminar
Dezember 2010	Informatik für Pharmazeuten

Wirtschaftsuniversität Wien

Jänner 2010	Auffrischkurs Französisch
November 2009	Einführung in die Betriebswirtschaft

Medizinische Universität Wien

Mai 2011	Neue Impfstoffe und Impfstrategien
April 2011	Sexuell übertragbare Krankheiten
März 2011	Funktionelle Phlebologie
Dezember 2010	Medizinische Virologie

B E R U F S E R F A H R U N G

Okt. - Nov. 2014	Apotheke zur Spinnerin am Kreuz , Wien, Mitarbeit
Aug. 2013	Lind Apotheke , Villach, Ferialarbeit
Jul. - Aug. 2012	G.L.Pharma GmbH , Lannach, Praktikum, Labor für Qualitätskontrolle
Aug. - Okt. 2010	Krankenhausapotheke - LKH Villach , Praktikum
Jul. - Aug. 2010	Anstaltsapotheke - Klinikum Klagenfurt am Wörthersee , Praktikum
Sep. 2009	Obere Apotheke , Villach, "Schnuppertage"
Jän. 2008	St. Anna Kinderspital , Wien, Zentrum für Kinder und Jugendheilkunde, OP - Bereich, "Schnuppertage"
Aug. 2007	Krankenhaus der Barmherzigen Brüder , Wien, Station für Gynäkologie, Pflegepraktikum
Mär. - Jul. 2006	Sozialprojekt „kummts zsamm“ , Villach, in Kooperation mit dem Pensionistenwohnheim St.Martin der Volkshilfe Kärnten
Jul. - Aug. 2006	Pro Curand Pflegeheim Julienhöhe , Treffen bei Villach, Pflegepraktikum

Z U S A T Z Q U A L I F I K A T I O N E N

Ausbildungen	Rettungssanitäterin (Jun.2007 - Dez.2013) Österreichisches Rotes Kreuz
--------------	--

S P R A C H E N ; E D V - U N D S O N S T I G E K E N N T N I S S E

Deutsch	Muttersprache
Französisch	gute Kenntnisse (Au pair Aufenthalt , Jul.-Sep. 2011, Frankreich)
Englisch	gute Kenntnisse
PC	MS Office (Word, Excel, Power Point)
Führerschein	Klasse B