universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Wirkungsprofil eines neu synthetisierten Thiazolderivates (MGdth10) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Hannes Höller

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Pharmazie
Betreut von:	Ao. Univ.- Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ich möchte mich vor allem für die Unterstützung bei meiner Diplomarbeit bei meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Christian Studenik bedanken. Er war stehts mit seiner freundlichen und hilfsbereiten Art bei allen Problemen behilflich.

Weiters möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir ermöglicht haben zu studieren, mich immer so gut wie nur möglich unterstützt haben und mir stets mit Geduld und Verständnis entgegengekommen sind.

Zuletzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mit denen ich den Weg des Studiums geteilt habe und die sowohl schöne Momente als schwere Situationen mit mir gemeinsam gemeistert haben.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1 Ziel der Diplomarbeit **1**

2 Einleitung **2**

2.1 Spasmolytika allgemein 2

2.1.1 Neurotrope Spasmolytika 2

2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika 4

2.1.3 Neurotrope-muskulotrope Spasmolytika 4

2.2 Körpereigene, endothelvermittelte Relaxation 5

3 Material und Methodik **7**

3.1 Substanz Mgdth10 7

3.2 Einwaage 7

3.3 Pipettierschema der Testsubstanz 8

3.4 Vermuteter Wirkmechanismus 9

3.5 Nitro-L-Arginin 9

3.6 Einwaage von Nitro-L-Arginin 10

3.7 DMSO 10

3.8 Datenauswertung allgemein 11

3.9 Datenauswertung Wirkmechanismus allgemein 11

3.10 Versuchstiere 12

3.11 Präparation der Organe 13

3.11.1 Atrium dextrum 14

3.11.2 Aorta descendens 14

3.11.3 Ileum terminalis 15

3.11.4 Musculus papillaris 15

3.11.5 Truncus pulmonalis 16

3.12 Anatomische Funktion der Organe 17

3.12.1 Atrium dextrum 17

3.12.2 Musculus papillaris 17
3.12.3 Truncus pulmonalis 17
3.12.4 Aorta descendens 19
3.12.5 Ileum terminalis 19
3.13 Nährstofflösung 21
3.13.1 Oxymix 22
3.13.2 Kaliumchloridlösungen 23
3.14 Apparaturen 24
3.14.1 Apparatur 1 24
3.14.2 Apparatur 2 26

4 Versuchsablauf 28
4.1 Versuchsablauf rechter Vorhof 28
4.2 Versuchsablauf Ileum terminalis 29
4.3 Versuchsablauf Aorta descendens 30
4.4 Versuchsablauf Truncus pulmonalis 30
4.5 Versuchsablauf Musculus papillaris 30
4.6 Versuchsablauf Wirkmechanismus 31

5 Ergebnis 33
5.1 Datenauswertung rechter Vorhof 33
5.2 Datenauswertung Ileum terminalis 37
5.3 Datenauswertung Musculus papillaris 41
5.4 Datenauswertung Aorta descendens 45
5.5 Datenauswertung Truncus pulmonalis 49

6 Testung des Wirkmechanismus 53
6.1 Testung des Wirkmechanismus allgemein 53
6.2 Ergebnis Wirkmechanismus am Ileum terminalis 53

7 Diskussion 60
7.1 Allgemein 60
7.2 Vergleich der Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur 61
7.3 Vergleich der Ergebnisse an der glatten Muskulatur 62

8 Zusammenfassung 64

9 Literaturverzeichnis **66**

10 Curriculum vitae **67**

Abbildungsverzeichnis

3.1 Strukturformel MGdth10 7
3.2 Microliterpipetten 8
3.3 Nitro-L-Arginin 9
3.4 DMSO 10
3.5 Versuchstiere 13
3.6 Präparationswerkzeug 13
3.7 rechter Vorhof 14
3.8 Aorta descendens 15
3.9 Ileum terminalis 15
3.10 Musculus papillaris 16
3.11 Truncus pulmonalis 16
3.12 Herzquerschnitt 18
3.13 Aortaverlauf 20
3.14 Oxymix 23
3.15 Apparatur 1 25
3.16 Apparatur 2 27

5.1 Originalabbildung Vorhof 34
5.2 Vorhof EC_{50} 36
5.3 Originalaabbildung Darm 38
5.4 Darm EC_{50} 40
5.5 Originalabbildung Papillar 42
5.6 Papillar EC_{50} 44
5.7 Orginalabbildung Aorta descendens 46
5.8 Aorta descendens EC_{50} 48
5.9 Orginalabbildung Truncus pulmonalis 50
5.10 Truncus pulmonalis EC_{50} 52

6.1 Originalabbildung Wirkmechanismus Darm 55

6.2 Originalabbildung Wirkmechanismus Darm nur mit DMSO 56
6.3 Balkendiagramm Wirkmechanismus 59

Tabellenverzeichnis

3.1 Pipettierschema 8
3.2 Stocklösungen 21
3.3 Mengenverhältnis 2 l Tyrode 22
3.4 Kaliumchloridlösungen 24

4.1 Schreibereinstellungen 28

5.1 Datenauswertung Vorhof 35
5.2 Datenauswertung Darm 37
5.3 Datenauswertung Papillarmuskel 43
5.4 Datenauswertung Aorta descendens 47
5.5 Datenauswertung Truncus pulmonalis 51

6.1 Pipettierschema Wirkmechanismus 53
6.2 Datenauswertung Wirkmechanimus mit Testsubstanz 57
6.3 Datenauswertung Wirkmechanimus mit DMSO 57

7.1 Ergebnis quergestreifte Herzmuskulatur 61
7.2 Ergebnisgegenüberstellung glatte Muskulatur 62

1 Ziel der Diplomarbeit

Das Ziel der Diplomarbeit ist die Untersuchung der Wirkstärke, der Gewebsspezifität und des möglichen Wirkmechanismus von neu synthetisierten Substanzen auf die glatte Muskulatur von Gefässen und den Darm und das Herz.

Gemessen wird in Bezug auf die glatte Muskulatur des Darmes, die Spasmolyse nach vorangegangener maximaler Kontraktion mit einer Kaliumchloridlösung und hinsichtlich der Gefäße, die dilatierende Wirkung, nachdem auch diese maximal mit einer Kaliumchloridlösung vorkontrahiert wurden.

Beim Herzen hingegen wird die Auswirkung der Substanzen auf die Chronotropie und auf die Inotropie gemessen.

Bei jedem Organ wird eine Versuchsreihe mit mindestens vier Versuchen duchgeführt. Anhand der erhaltenen Daten kann bei jedem Organ festgestellt werden ob die Substanz eine Wirkung aufweist und wie stark diese Wirkung ist.

Bei dem Organ mit der stärksten Wirkung, wird im Anschluss an die Versuchsreihen, ein möglicher Wirkmechanismus gesucht und vermessen.

Interessant sind nur Substanzen welche eine EC_{50} bis 30 µmol besitzen; je niedriger die EC_{50} desto potenter ist die Substanz. Bei Substanzen mit einer EC_{50} bis 30 µmol könnte man noch weiterforschen und z.B. die Pharmakodynamik und Toxikologie der Substanz untersuchen.

Substanzen mit einem EC_{50}-Wert weit über 30 µmol sind für weitere Untersuchungen nicht interessant, da die Menge an Substanz die eingesetzt werden muss um einen therapeutischen Effekt zu erzielen viel zu hoch ist.

2 Einleitung

2.1 Spasmolytika allgemein

Spasmolytika sind im Allgemeinen Substanzen, welche den Tonus der Muskulatur senken. Diese Wirkung kann entweder durch die Blockade der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (kompetitiver Antagonismus; Parasympatholytika) oder durch einen kompetitiven Agonismus an den β_2-Rezeptoren (Bronchospasmolytika) hervorgerufen werden (Mutschler 2008).
Je nach Wirkmechanismus unterscheidet man bei den Spasmolytika zwischen:

1. **neutrotrope Spasmolytika**
2. **muskulotrope Spasmolytika**
3. **neurotrop-muskulotrope Spasmolytika**

2.1.1 Neurotrope Spasmolytika

Die meisten Vertreter dieser Gruppe von Spasmolytika entfalten ihre Wirkung peripher über eine kompetitive Blockade der Acetylcholin-vermittelten Erregungsübertragung an m-Cholino-Rezeptoren. Dabei die Muscarinwirkung von Acetylcholin aufgehoben. Durch diese kompetitive Blockade kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur von Bronchien, des Gastrointestinal-Traktes, der Gallenwege, der Harnleiter und der Harnblase und auch zu einer verminderten Sekretion von Tränen-, Speichelflüssigkeit und Schweiß. Die Schleimproduktion in den Atemwegen und die Sekretion von Verdauungsdrüsen wird gesenkt. Im Bereich der Augen kommt es einerseits zu einer Pupillenerweiterung (Mydriasis) und einer Akkomodations-Störung aufgrund der Muskellähmung und andererseits zu einer Erhöhung des intraokularen Drucks. Im Bereich des Herzens kommt es zu einer Erhöhung der Herzfrequenz (Steinhilber et al. 2010).

Therapeutische Anwendung finden diese Stoffe vor allem bei Spasmen im GI-Trakt und Urogenitaltrakt, bei bradykarden Herzrhythmusstörungen und bei der Behalndlung der Plus-Symptomatik bei Morbus Parkinson. (Steinhilber et al. 2010).

Beispiele für verwendete Arzneistoffe:

Man unterscheidet zwischen N-tertiären Wirkstoffen wie Atropin und Scopolamin und N-quartären Wirkstoffen und synthetischen Analoga wie Trospiumchlorid, Butylscopolaminiumbromid. Der Unterschied der beiden Gruppen liegt darin, dass die N-tertiären Wirkstoffe ZNS gängig sind, während die N-quartären Wirkstoffe und synthetischen Analoga durch ihre ionische ladung die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und somit nur periphere Wirkung besitzen (Steinhilber et al. 2010).

Atropin:

Ist ein Tropan-Alkaloid aus der Tollkirsche (Atropa Belladonna) welches als neurotropes Spasmolytikum wirksam ist. Atropin ist das Racemat von (−)-Hyoscyamin, besitzt aber im Vergleich zu (−)-Hyoscyamin nur ein Zehntel der zentralen Wirkung und ist daher therapeutisch gesehen interessanter. Atropin wird heutzutage vorwiegend in Form von Atropinsulfat therapeutisch verwendet (Teuscher et al. 2012). Die frühere Anwendung als Antiemetikum, Anti-Parkinson-Mittel und als lokales Mydriatikum ist heute obsolet. Zentral wirkt Atropin erregend und es erhöht die Herzfrequenz (Steinhilber et. al, 2010).

Scopolamin:

Ist auch ein Tropan-Alkaloid, das in verschiedenen Nachtschattengewächsen zu finden ist. Es wirkt jedoch im Unterschied zu Atropin zentral dämpfend. Die periphere Wirkung ist ident mit der von Atropin. Es findet Anwendung in Form transdermaler therapeutischer Systeme als Antiemetikum bei Reisekrankheit (Steinhilber et al. 2010).

Butylscopolaminiumbromid:

Ist ein quartäres N-Derivat von Scopolamin, welches durch seinen ionischen Charakter die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr überwinden kann und somit nur periphere Wirkung zeigt. Es findet unter dem Handelsnamen Buscopan® Anwendung bei krampfartigen

Beschwerden im Magen-Darm-Trakt (Steinhilber et al. 2010).

2.1.2 Muskulotrope Spasmolytika

Muskulotrope Spasmolytika wirken direkt, also unabhängig von von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, spasmolytisch. Die Wirkung beruht auf einer unselektiven Hemmung der Phosphodiesterasen, was einen Anstieg des Second Messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) zur Folge hat. Durch den erhöhten cAMP-Spiegel kommt es im weiteren Verlauf zu einer intrazellulären Senkung des Kalzium-Spiegels in den Zellen der glatten Muskulatur. Dies führt zu einer Relaxation der glatten Muskeln. Bekannte Wirkstoffe sind Papaverin, Ethaverin und Tiropramid (Steinhilber et al. 2010).

Papaverin:

Papaverin ist ein Benzylisochiolin-Derivat und neben Morphin und Codein ein Hauptalkaloidbestandteil von Opium. Opium wird aus dem Schlafmohn (Papaver somniferum) gewonnen. Papaverin ist heutzutage aufgrund seiner geringen therapeutischen Breite obsolet. Es diente aber als leitsubstanz für zahlreiche heute verwendete Muskelrelaxantien (Mutschler 2008).

Tiropramid:

Wird vorwiegend angewandt bei Spasmen in den Gallengängen, dem Harnleiter und der glatten Muskulatur des Darmes. Man vermutet, dass die spasmolytische Wirkung in diesem Fall durch eine direkte Stimulation der Adenylylcyclase erfolgt. Die Stimulation der Adenylylcyclase führt im weiteren Verlauf zu einer Erhöhung von cAMP, was dann wie oben bereits beschrieben zur Spasmolyse führt (Steinhilber et al. 2010)

2.1.3 Neurotrope-muskulotrope Spasmolytika

Diese Gruppe von Spasmolytika hat einen dualen Wirkmechanismus; d.h dass die spasmolytische Wirkung einerseits durch die Blockade von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und andererseits durch eine zusätzliche direkte Einwirkung auf die glatten Muskelzellen zustande kommt. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. Denaverin, Mebeverin

und Oxybutynin (Steinhilber et al. 2010).

Denaverin:

Findet unter dem Handelsnamen Spasmalgan® Anwendung bei Spasmen im Gasrtointestinal- und Urogenitaltrakt (Steinhilber et al. 2010).

Mebeverin:

Mebeverin wird therapeutisch beim Reizdarm-Syndrom verwendet (Steinhilber et al. 2010).

Oxybutynin:

Ist vor allem bei der Behandlung der Dranginkontinenz und bei Spasmen im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt indiziert (Steinhilber et al. 2010).

2.2 Körpereigene, endothelvermittelte Relaxation

Die NO-Synthasen im menschlischen Körper sind Enzyme, welche die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure Arginin katalysieren. NO, welches ursprünglich auch als Endothelium-derived relaxing Factor bezeichnet wurde (EDRF), wirkt indirekt auf die glatte Muskulatur über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels (cyclisches Guanosinmonophosphat). Dafür bindet NO an die lösliche Guanylylzyklase welche dadurch veranlasst wird mehr cGMP zu produzieren. Der erhöhte cGMP-Spiegel widerum senkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration, was zu einer Verminderung der Kontraktionskraft und des Gefäßtonus führt. Es kommt zu einer Abnahme des peripheren Widerstandes und des Blutdruckes (Dellas 2011).

Prinzipiell unterscheidet man im Körper drei Isoformen der NO-Synthase. Man unterscheidet die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die neuronale NO-Synthase (nNOS) (Aktories et al. 2009)
In diesem Fall ist nur die endotheliale NO-Synthase von Interesse, welche im Laufe der Testung des Wirkmechanismus blockiert wird.

Die endotheliale NO-Synthase ist konstitutiv, d.h. ständig vorhanden und liegt im Endothel (innerste Schicht von Blutgefässen). Sie ist maßgeblich an der Relaxation von Gefässen und der glatten Muskulatur beteiligt (Aktories et al. 2009).

3 Material und Methodik

3.1 Substanz Mgdth10

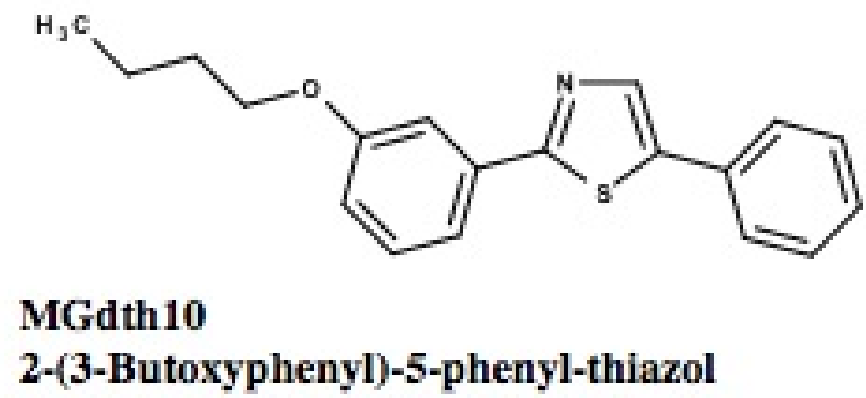

Abbildung 3.1: Strukturformel und chemische Nomenkltur von MGdth10

(Quelle: Departement für Pharmazeutische Chemie Wien)

3.2 Einwaage

Die Einwaage der Substanz erfolgt auf einer Analysewaage und wird mit dem Molekulargewicht der Testsubstanz und der Größe des Organbades (25ml) berechnet.

Berechnung:

$$g = \frac{MG(Mgdth10)}{100} : 4 \tag{3.1}$$

$$g = \frac{309,42g/mol}{100} : 4 = \mathbf{0{,}774g} \tag{3.2}$$

Der Rechnung zufolge wird diese Menge an Substanz dann jeweils in kleine Phiolen eingewogen und anschließend mit der entsprechenden Menge (100 μl) an Lösungsmittel (DMSO) gelöst.

3.3 Pipettierschema der Testsubstanz

Die vorher berechnete, eingewogene und gelöste Testsubstanz wird nach einem exakt vorgegebenem Pipettierschema und Zeitplan zugegeben:

Pipettiervolumen	**Zeitpunkt**	**Konzentration im Organbad**
3 µL	0 Minuten	3 µmol
7 µL	45 Minuten	10 µmol
20 µL	90 Minuten	30 µmol
70 µL	135 Minuten	100 µmol
/	180 Minuten	100 µmol

Tabelle 3.1: Pipettierschema der Testsubstanz MGdth10

Abbildung 3.2: Microliterpipetten zur Zugabe der Testsubstanz

(Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.4 Vermuteter Wirkmechanismus

Da das Molekül einen Thiazol-Ring besitzt besteht die Möglichkeit, dass durch das N-Atom im Ring die eNOS (endothelialie NO-Synthase) aktiviert wird, welche dann NO freisetzt.
NO aktiviert widerum die endothliale NO-Synthase. Das dabei entsehende NO fördert über die lösliche (zytosolische) Guanylatzyklase die Produktion von cyclischen GMP. Dies widerum führt zu einer Erniedrigung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und dadurch kommt zu einer Relaxation glatter Muskelzellen.

3.5 Nitro-L-Arginin

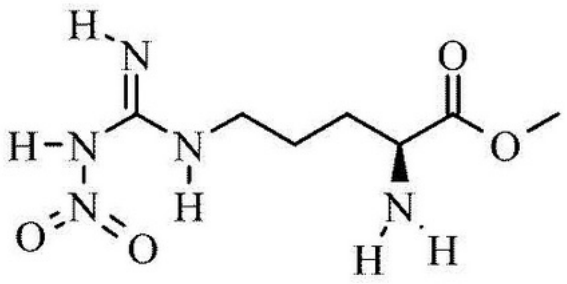

Abbildung 3.3: Strukturformel von Nitro-L-Arginin

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

Nitro-L-Arginin ein Nitro-Derivat der Aminosäure Arginin. Am N-terminalen Ende der Aminosäure wird eine Nitrogruppe (-NO2) angehängt. Dadurch kann die Aminosäure durch das Enzym eNOS nicht mehr zu NO abgebaut werden und es kommt zur Blockade der eNOS. Da so von der endothelialen NO-Synthase kein NO mehr gebildet und freigesetzt wird, kann es im Folgeschritt auch zu keiner Gefäßrelaxation kommen.

3.6 Einwaage von Nitro-L-Arginin

Die Einwaage von Nitro-L-Arginin erfolgte auf einer Analysewaage und wurde mit dem Molekulargewicht von Nitro-L-Arginin und der Größe des Organbades (25ml) berechnet.

Berechnung:

$$g = \frac{MG(Nitro - L - Arginin)}{100} : 4 \tag{3.3}$$

$$g = \frac{219.20 g/mol}{100} : 4 = \mathbf{0{,}548\ g} \tag{3.4}$$

Nitro-L-Arginin ist schwer löslich in Wasser, daher wird es in einer frisch bereiteten kaliumhältigen Tyrode-Lösung gelöst. Auch in diesem Lösungsmittel löst sich der Stoff jedoch nur relativ schwer und muss daher vor der Anwendung mindestens 30 Minuten im Ultraschallbad gestellt werden, damit er sich vollständig löst.

3.7 DMSO

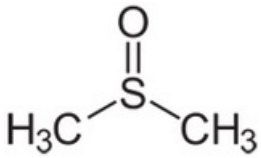

Abbildung 3.4: Strukturformel von DMSO

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

Bei Substanzen die nicht in Wasser löslich sind und daher mit DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst werden, muss bei der Auswertung der Daten ein Korrekturfaktor einberechnet werden, da DMSO eine gewisse vasodilatatorische und spasmolytische Eigenwirkung; v.a. auf Organe wie den Darm, die Aorta descendens und den Truncus pulmonalis, zeigt.

3.8 Datenauswertung allgemein

Die Datenauswertung erfolgt anhand der durch den Schreiber aufgezeichneten Kurven oder Amplituden. Dabei wird die Änderung der Kontraktion bzw. der Chronotropie oder Inotropie in Abhängigkeit von Zeit und Wirkstoffkonzentration bestimmt . Ausgehend vom konstatnen Wert (Konzentrtion im Organbad = 0 µmol) wird der Wert nach den 45 Minuten bei jeder Konzentration gemessen.

Die erhaltenen Werte werden dann für jedes einzelne Organ in Tabellen festgehalten und miteinander verglichen. Nach mindestens vier oder fünf Versuchen wird dann der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte der einzelnen Organe berechnet. Wenn die Standardabweichung unter 10 % liegt dann kann auf eine Wirkung der Testsubstanz am jeweiligen Organ geschlossen werden.

Am Ende werden die erhaltenen Daten mithilfe eines Computerprogramms (Sigmaplot 9) in eine Dosis-Wirkungs-Kurve umgewandelt und der EC_{50}-Wert bestimmt.

3.9 Datenauswertung Wirkmechanismus allgemein

Die Höhe der Kurve wird zum Zeitpunkt der Konstanz der Kontraktion, nach 45 Minutten mit Nitro-L-Arginin und nach 45 Minuten mit der Substanz abgemessen. Die beiden Werte nach den 45 Minuten werden dann jeweils in Bezug auf den Ausgangswert (Konstanz der Kontraktion) gesetzt.

Da mit Nitro-L-Arginin die eNOS blockiert wird kommt es zu keiner Spasmolyse der Darmmuskulatur, was bedingt, dass die Höhe Kurve nicht abnimmt, sondern entweder konstant bleibt oder durch die Blockade sogar leicht ansteigt.

Bei Zugabe der Testsubstanz wird anschliessend beobachtet, ob es trotz der Blockade der eNOS zu einer Abnahme der Höhe der Kurve (=Spasmolyse) im Vergleich zum Ausgangswert kommt.

Wenn es trotz der Blockade der eNOS zu einer Abnahme der Höhe der Kurve kommt, dann kann man davon ausgehen, dass die Testsubstanz unabhängig von der eNOS und dem dadurch produziertem NO zu einer Spasmolyse führt. Sollte die Höhe der Kurve

hingegen konstant bleiben, dann kann man davon ausgehen, dass die Substanz über genau diesen Mechanismus wirkt und aufgrund der vorangegangen Blockade der eNOS nun ihre spasmolytische Wirkung nicht entfalten kann.

3.10 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden Meerschweinchen verwendet, die aus sogenannten TRIK-Stämmen stammen; d.h sie weisen den geringsten Grad an Verwandschaft auf. Verwendet werden sowohl männliche als auch weibliche Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 300-500 Gramm.

Diese werden mit einem gezielten, stumpfen Schlag ins Genick getötet und anschließend werden die Versuchsorgane entnommen. Entnommen werden wie bereits erwähnt, das Herz, das terminale Ileum, die Aorta descendens und derTruncus pulmonalis.

Die Organentnahme erfolgt durch vorsichtiges öffnen der Bauchdecke, um eine Verletzung der Organe zu vermeiden. Danach wird zuerst das Herz mit der z.T. anhaftenden Lunge entnommen. Anschließend erfogt die Entnahme des terminalen Ileums (auch als Hüft- oder Krummdarm bezeichnet). Dieser wird an einem Ende mit einem Faden abgebunden, um den Anfang des Darmes zu markieren. Am Ende wird noch die Aorta descendens entlang des Rückgrats abgetrennt.

Um eine Unterversorgung der Organe zu vermeiden, werden diese sofort nach der Entnahme in die Nährstofflösung gegeben und mit dem Gasgemisch (Oxymix) begast.

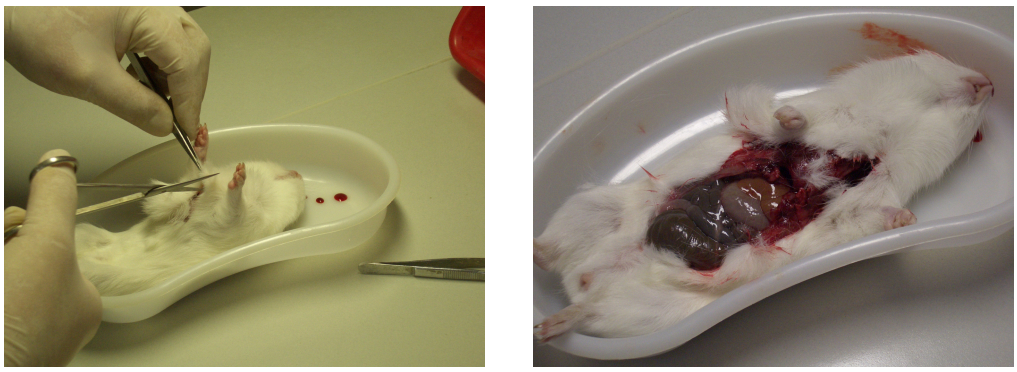

Abbildung 3.5: Organentnahme bei Meerschwein

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.11 Präparation der Organe

Dann werden die Organe präpariert. Dies erfolgt unter einer Stereolupe in einer Petrischale, in der sich ein Korkboden befindet, welcher mit einem Gummischlauch fixiert wird. Die Petrischale ist mit Nährstofflösung angefüllt um auch während der Präparation eine Unterversorgung der Organe zu vermeiden.

Man verwendet zum Präparieren grundsätzlich Spitzpinzetten, Scheren, Federscheren, Nadeln und einen handelsüblichen Faden, um die Silberhäckchen zu befestigen.

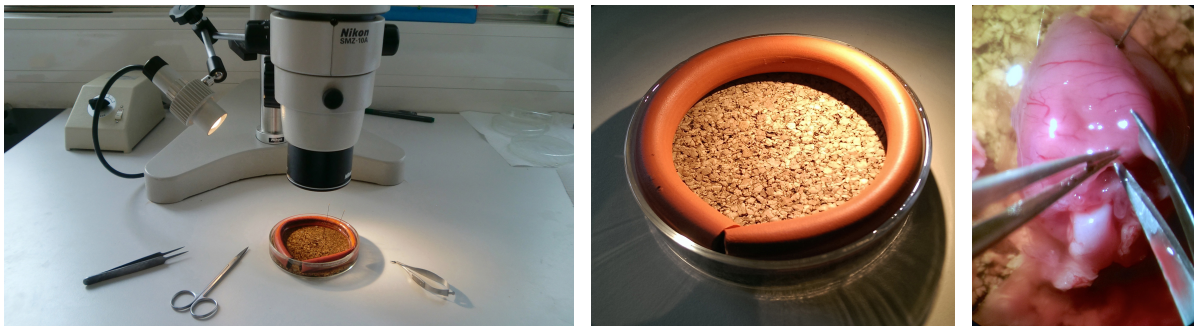

Abbildung 3.6: Stereolupe mit Präparationswerkzeug, Petrischale und ein entnommenes Herz

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.11.1 Atrium dextrum

Dafür wird der Vorhof vom restlichen Herzen isoliert und anschliessend präpariert.

Das Präparieren erfolgt in einer mit Tyrode befüllten Petrischale, welche mit einem Korkboden ausgelegt ist und an den Rändern durch einen Gummischlauch begrenzt ist. Auf diesem Korkboden wird der Vorhof mittels kleinen Nadeln befestigt. Dann werden an den beiden Enden des Vorhofs mit einem Faden kleine Haken befestigt. Über diese Haken wird der Vorhof dann an der Organhalterung befestigt.

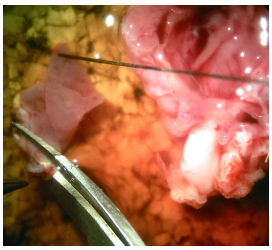

Abbildung 3.7: isolierter und präparierter rechter Vorhof

(Quelle: Eigenfotographie)

3.11.2 Aorta descendens

on der Aorta descendens wird nur der Teil der Aorta thoracica (Brustaorta) herausgeschnitten. Nachdem die Brustaorta vorsichtig entlang der Wirbelsäule abgetrennt wurde, wird sie anschließned vom anhaftenden Muskel-, Fett- und Bindegewebe, unter dem Mikroskop gereinigt. Dann wird sie in ca. 1,5 cm grosse Ringstücke geschnitten.

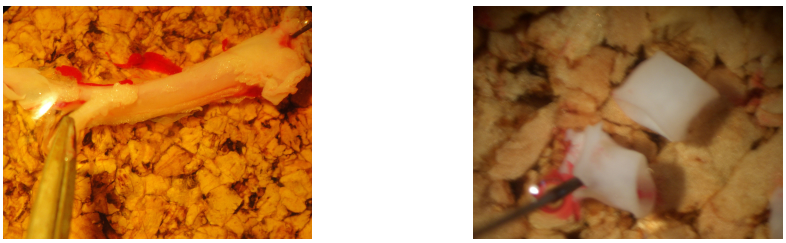

Abbildung 3.8: gesäuberte und geschnittene Aorta descendens

(Quelle: Eigenfotographie)

3.11.3 Ileum terminalis

Bei der Präparation des Darmes wird vom entnommenen Hüftdarm ein kleines Stück abgeschnitten und in der Petrischale mit der Tyrode-Lösung und dem Korkboden mit zwei kleinen Nadeln befestigt. Anschliessend werden auf den jeweils gegenüberliegenden Seiten mit einem Faden die zwei kleinen Haken befestigt. Diese dienen wie beim Darm dazu, dass man das Darmstück an die Silberdrähte der Organhalterung befestigen kann. Bei der Präparation des Darmes muss man darauf achten, dass beim Binden des Faden das Lumen des Darmes nicht vollständig abgebunden wird, da ansonsten keine Diffusion des Wirkstoffes durch das Lumen mehr möglich ist.

Abbildung 3.9: begaster Darm im Becherglas und ein Stück Darm unter der Stereolupe

(Quelle: Eigenfotographie)

3.11.4 Musculus papillaris

Dieser wird auch am Herzen isoliert. Nachdem der Vorhof abgetrennt ist, wird das Herz ausgehend von der Herzbasis entlang des Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten und

die Papillarmuskeln werden vorsichtig, zuerst nur an einem Ende abgetrennt. An diesem Ende wird mit einem Faden ein Haken befestigt. Anschliessend wird auch das zweite Ende des Papillarmuskels vorsichtig abgetrennt, wobei hier kein Haken mehr befestigt werden muss.

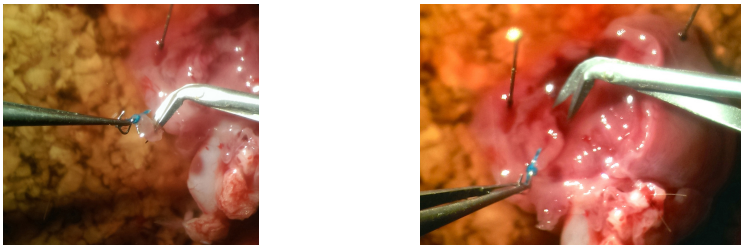

Abbildung 3.10: Papillarmuskel präpariert unter der Stereolupe

(Quelle: Eigenfotographie)

3.11.5 Truncus pulmonalis

Der Truncus pulmonalis wird an der Herzbasis isoliert, an dem meist auch noch ein kleiner Teil der Lunge hängt. Zuerst wird der Aortenbogen vorsichtig entfernt. Unter dem Aortenbogen liegt der Truncus pulmonalis, welcher dann mit einer Federpinzette abgetrennt wird. Man erhält dadurch einen ca. 1,5-2 cm langen Ring des Gefäßes.

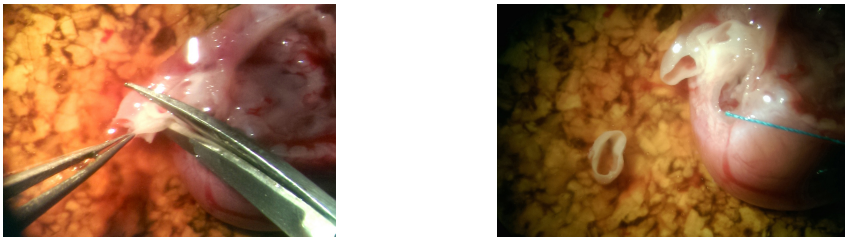

Abbildung 3.11: abgetrennter Ring des Truncus pulmonalis unter Stereolupe

(Quelle: Eigenfotographie)

3.12 Anatomische Funktion der Organe

3.12.1 Atrium dextrum

Der rechte Vorhof, oder auch Atrium dextrum (siehe Abb. 3.12) erhält das Blut aus den drei Venen, der oberen Hohlvene (Vena cava superior), der unteren Hohlvene (Vena cava inferior) und dem Sinus coronarius. Das sauerstoffarme Blut fließt dann vom rechten Vorhof über die Trikusspidalklappe in den rechten Ventrikel (Kammer) und von dort weiter in den Lungenkreislauf. Der rechte Vorhof unterscheidet sich deutlich an seiner Vorder- und Rückwand; während die Rückwand eine glatte Struktur besitzt, wirkt die Vorderwand stark zerklüftet durch die Musculi pectinati (Kamm-Muskeln). Durch eine schmale Trennwand, dem sogenannten interaterialem Septum wird der rechte Vorhof vom linken abgetrennt (Tortora et al. 2008).

3.12.2 Musculus papillaris

Die Papillarmuskeln gehören zum Erregungsleitungssystem des Herzens. Sie liegen als kleine warzenförmige Aussstülpungen des Herzmuskels auf der Innenseite der Herzkammer vor. In der rechten Herzkammer befinden sich drei Papillarmuskeln, während es in der linken Herzkammer nur zwei davon gibt. Die Papillarmuskeln sind über Sehnenfäden (sog. Chordae tendineae) mit den Spitzen der Herzklappen (Mitral- und Trikusspidalklappe) verbunden. Sie haben keinen wirklichen Einfluss auf die Öffnung und Schließung der Klappen, da dies durch Druckunterschiede geregelt ist, jedoch kann es bei einem Myokardinfarkt mit einem Papillarmuskelabriss zu Klappeninsuffizienz kommen und anschließend zu Herzinsuffizienz führen (Tortora et al. 2008).

3.12.3 Truncus pulmonalis

Der Truncus pulmonalis (Lungenschlagader) befindet sich an der Herzbasis und liegt unter dem Aortenbogen (Arcus aortae). Das sauerstoffarme Blut aus dem venösen Kreislauf gelangt von der rechten Kammer (Ventrikel) über den Truncus pulmonalis in die Lunge, genauer gesagt in die Alveolen (Lungensäckchen). Dort gibt das Blut Kohlenstoffdioxid ab und nimmt Sauerstoff auf (Thews et al. 1982).

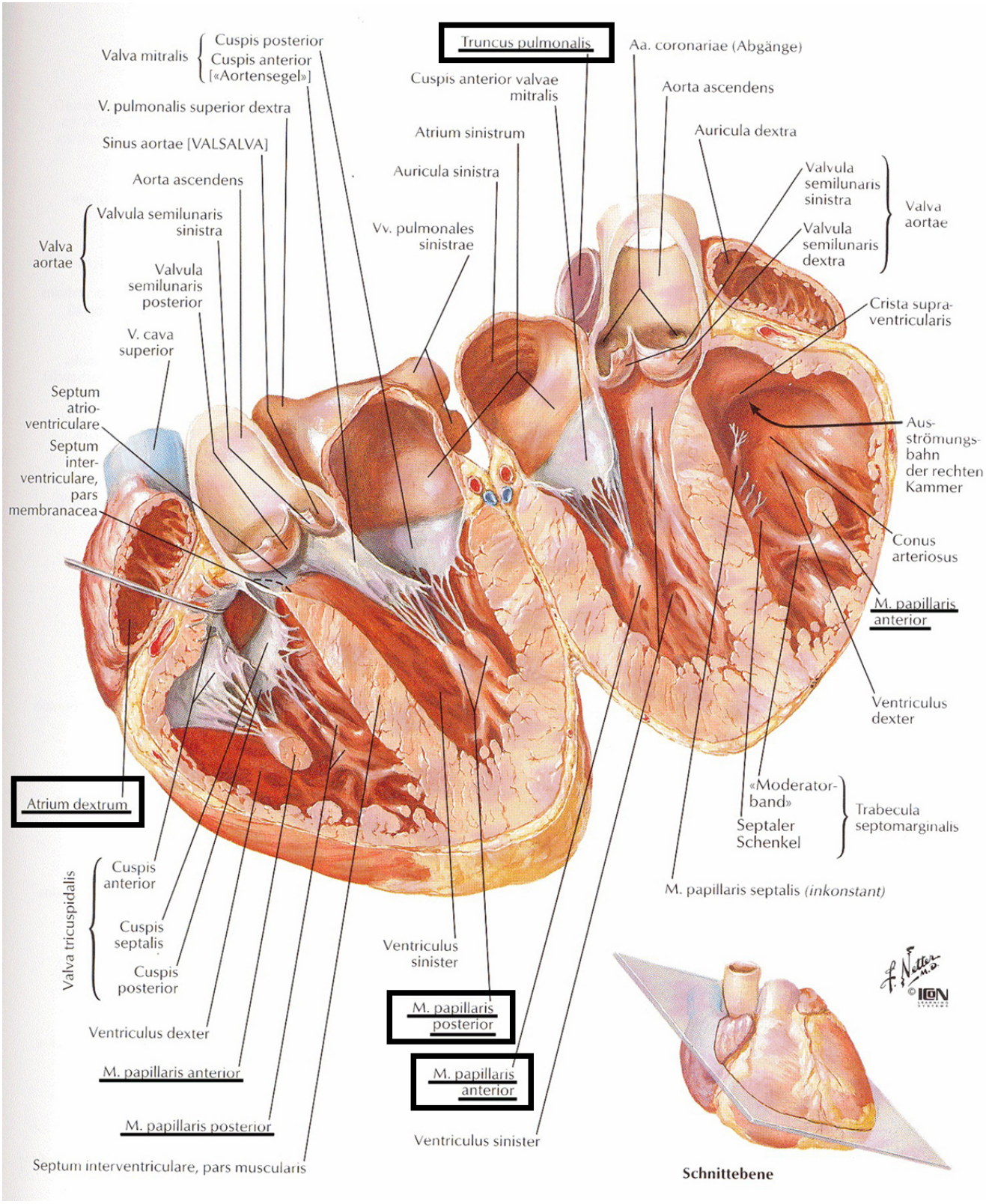

Abbildung 3.12: Querschnitt des Herzens

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.12.4 Aorta descendens

Die Aorta descendens schließt sich direkt dem Aortenbogen (Arcus aortae) an und verläuft vom vierten Brustwirbel an abwärts entlang der Wirbelsäule. Der absteigende Teil teilt sich im Bereich des Brustbereichs auf. Der Teil im Brustbereich wird als Aorta thoracica bezeichnet, während der Teil nach dem Durchtritt durch das Zwerchfell dann als Aorta abdominalis bezeichnet wird. Die Aorta abdominalis wiederum teilt sich in Höhe des vierten Lendenwirbles in die rechte und linke Aorta iliaca communis, während die Aorta thoracica sich in die Zwischenrippenarterien aufteilt. Die Aufgabe der Aorta ist es, das mit Sauerstoff gesättigte Blut aus dem linken Ventrikel, in die Äste des Körperkreislaufes zu befördern und damit den gesamten Organismus mit Sauerstoff zu versorgen (Thews et al. 1982).

3.12.5 Ileum terminalis

Das Ileum terminale (Hüft- oder Krummdarm) ist der letzte und längste Bereich des Dünndarmes. Es misst etwa zwei Meter und und endet im Dickdarm am Ileocaecalsphinkter. Der Dünndarm beginnt am Pylorussphinkter des Magens, zieht sich durch den Mittel- und Unterteil des Bauchraumes und mündet schlußendlich in den Dickdarm. Er wird unterteilt in drei verschieden lange Abschnitte: das Duodenum (Zwölffingerdarm), das Jejunum (leerdarm) und das bereits erwähnte Ileum (Krummdarm). Im Dünndarm finden die wichtigsten Verdauungs- und Resorptionsvorgänge statt. Dabei wird der Nahrungsbrei durch eine rhythmische Peristaltik der glatten Muskulatur des Dünndarmes langsam befördert. Während dieser Passage wird über die große Oberfläche des gesamten Dünndarmes, welche durch die sogenannten Kerckring-Falten (Plicae circulares), die Zotten (Villi) und die Mikrovilli noch weiter vergrößert die Resorption und Verdauung geregelt (Tortora et al. 2008)

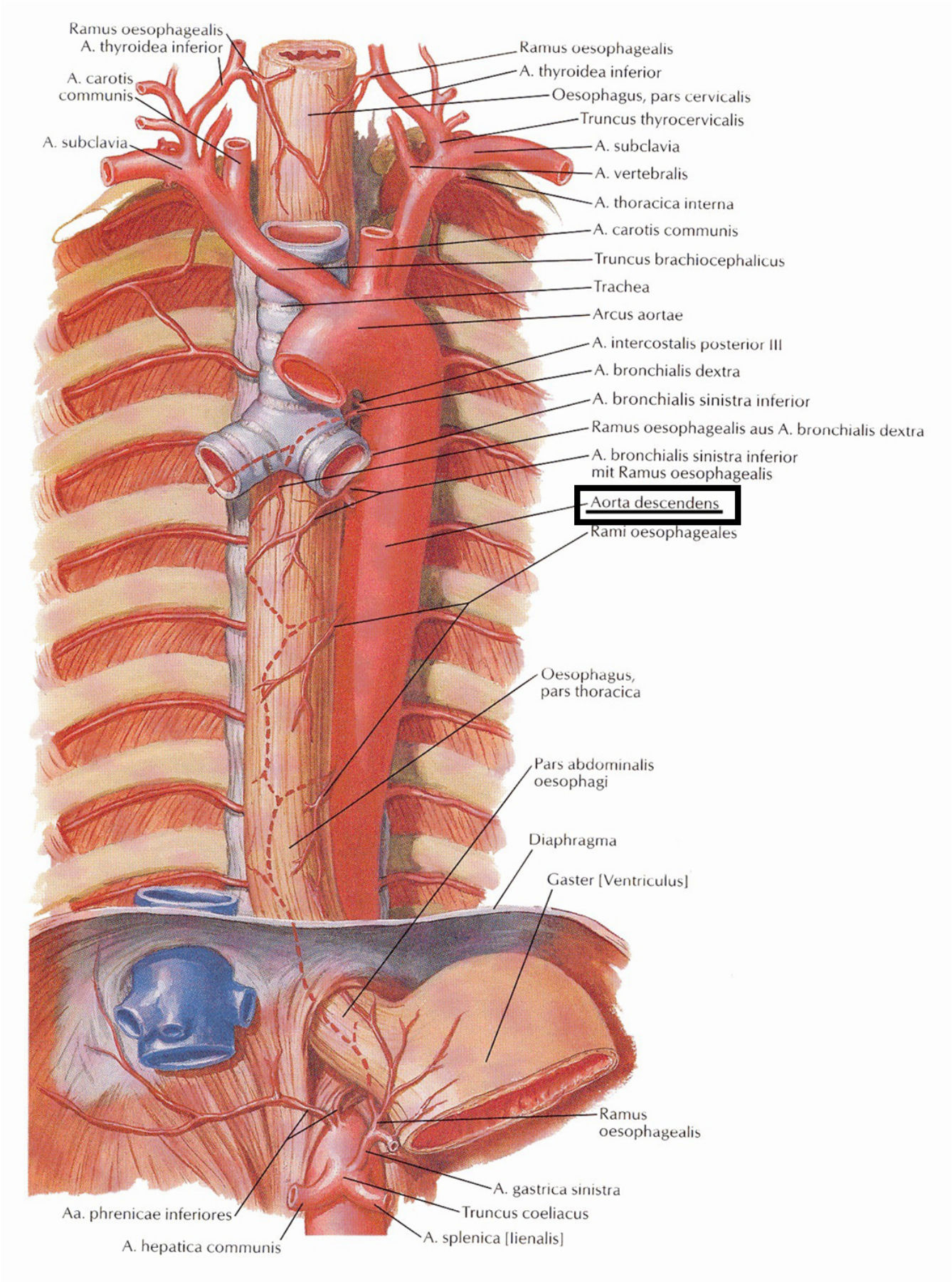

Abbildung 3.13: Verlauf der Aorta descendens

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.13 Nährstofflösung

Die Nährstofflösung ist eine physiologische Elektrolytlösung auf Wasserbasis die als Tyrode-lösung oder auch als Krebs-Henseleit-Lösung bezeichnet wird. Sie geht auf den amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode (1878 – 1930) zurück. Die Hauptionen der Lösung sind Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium, Chlorid und Phosphat. Diese Tyorde wurde verwendet:

1. **zur künstlichen Lebenserhaltung der isolierten Organe**
2. **zur Präparation der Organe in der Pertrischale**
3. **zur Befüllung der Organbäder**
4. **zur Spülung der Organbäder**
5. **zur Herstellung der KCl-Lösungen für Darm**
6. **zur Herstellung der KCl-Lösung für Aorta descendens und Truncus pulmonalis**

Die Herstellung erfolgt durch Stocklösungen, welche in grösseren Mengen bereitet werden und dann bis zum Ende verwendet werden können um jeden Tag die frische Tyrodemenge die man benötigt herzustellen.

Substanz	Stock-Lösungen	Menge pro Liter Tyrode
Natriumchlorid	1000,25 g/5l	33,60 ml
Kaliumchlorid	50,33 g/5l	35,00 ml
Natriumhydrogencarbonat	1225,00 g/5l	83,70 ml
Magnesiumsulfat	147,02 g/5l	1,18 ml
Kaliumhydrogenphosphat	62,00 g/5l	1,18 ml
Kalziumchlorid	34,00 g/5l	3,20 ml
Glucose	Reinsubstanz	1,98 g

Tabelle 3.2: verwendete Stocklösungen zur Herstellung der Tyrode

Die Lösung wird wie bereits erwähnt jeden Tag frisch bereitet. Dafür werden der Reihe nach NaCl, KCl, NaHCO3, MgSO4 und KH2PO4 in der vorgeschriebenen Volumen aus den Stocklösungen gemischt. Dann wird eine bestimmte Menge an Glucose eingewogen und dazugegeben und das ganze wird mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wird für mindestens 10 Minuten mit einem speziellen Gasgemisch (Oxymix) begast, bevor das Calciumchlorid tropfenweise zur Lösung zugegeben wird. Dies wird so handgehabt, weil das Calciumchlorid ansonsten in der Lösung ausfällt und es somit zu einer Trübung kommt.

Substanz	**Mengen für 2 Liter Tyrode**
Natriumchlorid	67,2 ml
Kaliumchlorid	70 ml
Natriumhydrogencarbonat	167,40 ml
Magnesiumsulfat	2,36 ml
Kaliumhydrogenphosphat	2,36 ml
Kalziumchlorid	6,4 ml
Glucose	3,96 g

Tabelle 3.3: verwendete Menge von Stocklösungen zur Herstellung von 2 Liter Tyrode

3.13.1 Oxymix

Ist ein spezielles Gasgemisch das aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid zusammengestzt ist und verwendet wird um die Organe weiterhin mit Sauerstoff zu versorgen. Weiterhin führt die Begasung mit Oxymix, dazu, dass sich der pH-Wert der Tyorode-Lösung zwischen 7,2 und 7,4 einstellt, was annähernd physiologischen Verhältnissen entspricht.

Abbildung 3.14: Gashahn zur Regulierung der Oxymix-zufuhr

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.13.2 Kaliumchloridlösungen

Für die maximale Vorkontraktion der beiden Gefässe (Aorta descendens und Aorta pulmonalis) und jener des Darms werden jeweils frische Kaliumchlorid-Lösungen hergestellt, welche eine bestimmte Molarität besitzten. Dafür wird eine bestimmte Menge an Kaliumchlorid eingewogen und in einem Messkolben mit Tyrode gelöst.

1. Kaliumchloridlösung für Aorta descendens und Truncus pulmonalis:

Dafür werden 0,67mg Kaliumchlorid eingewogen und in einem Messkolben mit Thyrode-Lösung auf 100ml aufgefüllt. Die Molarität dieser lösung beträgt dann 90mmol.

2. Kaliumchloridlösung für das terminale Ileum:

Es werden 0,45mg Kaliumchlorid eingewogen und in einem Messkolben mit Thyrode-Lösung auf 100ml aufgefüllt. Die Molarität beträgt hier 60mmol.

Substanz	Einwaage	Molarität	Organe
Kaliumchlorid	0,67g	90mmol	Aorta descendens Truncus pulmonalis
Kaliumchlorid	0,45g	60mmol	Ileum terminalis

Tabelle 3.4: Herstellung der Kaliumchloridlösungen und deren Molarität

Diese Konzentrationen wurden durch zahlreiche Versuche ermittelt, welche ergaben, dass bei der diesen Molaritäten der Lösung eine nahezu vollständige Kontraktion der Organe erreicht wird. Eine noch höhere Konzentration einzusetzten wäre sinnlos, da es ansonsten zu einer Hyperpolarisation kommen würde und die Kontraktion bzw. Spasmen nicht mehr antagonisierbar wären.

3.14 Apparaturen

Hier unterscheidet man im wesentlichen zwischen zwei Apparaturen: Apparatur 1 und Apparatur 2. Grundsätzlich ist der Aufbau der beiden Apparaturen ähnlich. Sie bestehen im Prinzip aus einem Organbad mit Glasfritte für die Gaszufuhr, einer Organhalterung, einem Kraftwandler, einem Verstärker (Amplifier) und einem Flachbettschreiber.

3.14.1 Apparatur 1

Die Apparatur 1 wird verwendet für den Vorhof, die Aorta descendens, den Truncus pulmonalis und den Darm.

Die Organe werden nach dem Präparieren an der Organhalterung befestigt und in das vorher mit Tyrode befüllte Organbad abgesenkt. Das Organbad besteht bei dieser aus einem Doppelmantelgefäss. Dies erfüllt den Zweck, dass das Organbad zischen den beiden Glasschichten mit temperiertem Wasser (37 Grad Celsius) aus dem Wasserbad durchspült wird. Dadurch wird auch die Tyrode die sich im Organbad befindet auf physiologische Temperatur-Bedingungen angewärmt.

Nach dem Einbringen der Organe in das Organbad, werden die Organe auf eine bestimmte Länge (in cm) vorgespannt, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu garantieren. Während der Messung wird über den Dehnungsmesssrteifen, welcher sich im

Kraftwandler befindet, die Kraft gemessen, mit der die Organe kontrahieren und die mechanische Kraft durch den Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses elektrische Signal wird durch den Amplifier um den Faktor 100 verstärkt und von einem Flachbettschreiber auf Endlos-Millimeterpapier aufgezeichnet.

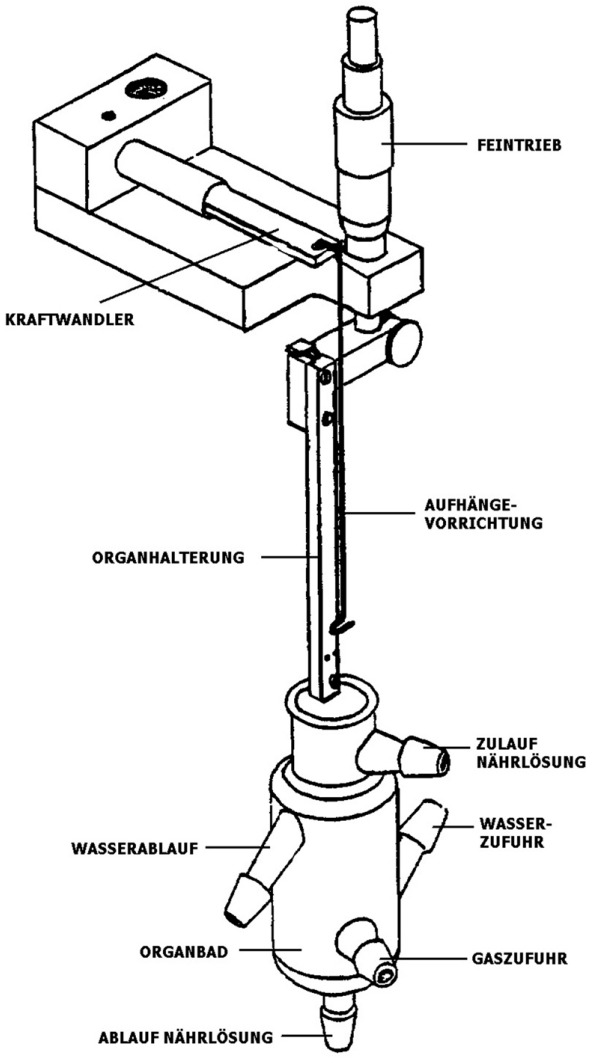

Abbildung 3.15: Grundaufbau der Apparatur 1

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

3.14.2 Apparatur 2

Die Apparatur 2 wird verwendet für den Papillarmuskel. Im Vergleich zur Apparatur 1 hat das Organbad kein Doppelmantelgefäss, sondern nur einen einfachen Glasmantel. Das Organbad ist in die Abdeckung des Wasserbades eingebaut. Das Wasserbad ist befüllt mit bidestilliertem Wasser welches durch eine Heizspirale auf 35 Grad Celsiuis temperiert ist (Reiter 1967).

Das Organbad befindet sich somit direkt im Wasserbad und die Tyrode wird dadurch auf physiologische Bedingungen erwärmt. Am unteren Ende des Organbades befindet sich eine Glasfritte, durch welche das Gasgemisch (Oxymix) eingebracht wird. An einem frei stehendem Stativ befindet sich eine Organhalterung aus Plexi-Glas, deren Höhe mittels Stativschlitten regulierbar ist. Am oberen Ende des Stativs befindet sich ein Kraftwandler.

Der Papillarmuskel wird mit einem Silberdraht an den Kraftwandler angehängt und dann zwischen einem Platinplättchen und einer Plexiglasscheibe befestigt. Da der Papillarmuskel keine spontane Erregungen aufweist muss er elektrisch gereizt werden. Dies geschieht durch einen sogenannten Anapulse Stimulator. Sobald der Papillarmuskel eingespannt ist wird er mittels Stativschlitten ins Organbad abgesenkt und anschließend vorgespannt.

Anschliessend wird wieder über den Dehnungsmessstreifen im Kraftwandler, die Kraft gemessen mit der der Papillarmusekl kontrahiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses elektrische Signal wird dann über den Amplifier wieder 100-fach verstärkt und über einen Flachbettschreiber auf Endlos-Millimeterpapier aufgezeichnet.

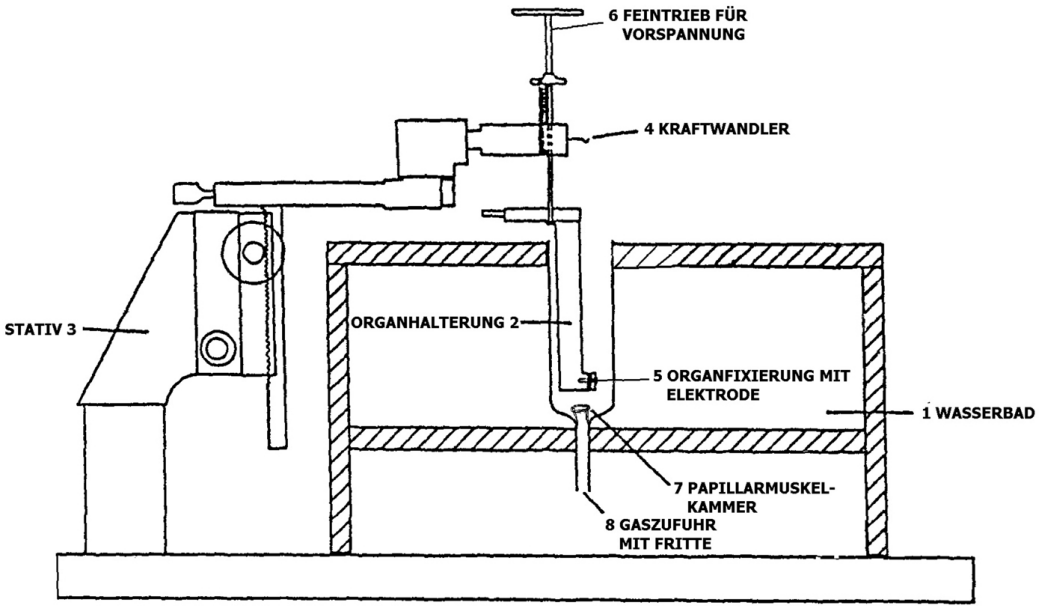

Abbildung 3.16: Grundaufbau der Apparatur 2

(Quelle: Departement für Pharmakologie und Toxikologie Wien)

4 Versuchsablauf

Prinzipiell basiert der Versuchsablauf auf der Messung der Kraft mit der die Organe kontrahieren. Dafür werden alle Organe mittels Silberdraht an den Kraftwandler der Organhalterung gehängt und auf eine gewisse Länge vorgespannt. Die Kraft mit der die Organe anschließend kontrahieren wird von einem Dehnungsmesssrteifen im Kraftwandler registriert und dann mittels Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches anschliessend durch den Verstärker auf das 100-fache verstärkt wird.

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

Tabelle 4.1: Einstellungen am Schreiber

4.1 Versuchsablauf rechter Vorhof

Der Versuch am rechten Vorhof wird mittels Apparatur 1 durchgeführt. Der präparierte Vorhof wird mit den beiden Haken an die Silberdrähte der Organhalterung gehängt, wobei der obere Silberdraht im Vergleich zum unteren nicht direkt an der Organhalterung befestigt ist, sondern am Kraftwandler.

Anschliessend wird die Organhalterung mit dem daran hängenden Vorhof in das Organbad abgesenkt. Dieses wurde vorher bereits schon mit Tyrode befüllt und temperiert auf 37 Grad Celsius um die physiologischen Bedingungen aufrecht zu erhalten. Zusätzlich erfolgt eine kontinuierliche Sauerstoffzugabe über die im Organbad eingebaute Glasfritte.

Der Vorhof wird im Organbad bei 5mV mittels Feintrieb der Organhalterung auf 10,4cm vorgespannt, was einer Kraft von 9,81mN entspricht.

Im Vergleich zu den anderen Organen, erlaubt die spontane regelmäßige Aktivität des Sinuskonten am rechten Vorhof eine Messung der Kontraktionsfrequenz ohne eine zusätzliche Reizung.

Nach einer Akklimatisierung von rund 20 Minuten kann die Messung starten. Gemessen wird hier in mm/s, im fünf Minuten-Takt. Jede Einzelmessung entspricht einer Zeit von 12 Sekunden, was am Millimeterpapier genau sechs Kästchen entsprechen. Die Probemessung wurde mindestens 45 Minuten durchgeführt um eine konstante Kontraktionsfrequenz zu erreichen. Sobald die Kontraktionsfrequenz konstant war, wurde die Wirksubstanz in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Dabei wurde bei jeder Konzentration für 45 Minuten im fünf Minuten-Takt für jeweils 12 Sekunden aufgezeichnet.

4.2 Versuchsablauf Ileum terminalis

Auch der Versuch am präparietem Stück des Hüftdarmes wurde mittels Apparatur 1 durchgeführt. Dabei wird der Darm an den Haken wie bereits beim Vorhof beschrieben an die Silberdrähte der Organhalterung gehängt und ins Organbad abgesenkt.

Hier wird der Darm im Vergleich zum Vorhof nicht auf 10,4cm vorgespannt, sondern nur auch 5cm bei 5mV. Das entspricht einer Kraft von 4,92mN.

Nach einer 20 minütigen Akllimatisierungsphase des Darmes in der Tyrode-Lösung bei genannter Vorspannung, wird der Schreiber auf Null gestellt und die Tyrode-Lösung durch eine frisch bereitete Kaliumchlorid-Lösung (60mmol) ausgetauscht (siehe KCl-Lösungen).Dadurch wird eine maximale Kontraktion des Darmes erreicht. Anschliessend wird nach dem Erreichen der Konstanz der Kontraktion; wobei man hier mindestens 45 Minuten abwarten muss und die Kontraktionskurve am Schreiber mindestens über 5cm liegen muss, die Wirksubstanz in den verschiedenen Konzentrationen zugegeben und jeweils kontinuierlich für 45 Minuten pro Konzentration in mm/min aufgezeichnet und gemessen.

4.3 Versuchsablauf Aorta descendens

Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Organen benötigt man hier keine Haken um das Organ zu befestigen. Hier werden die Ring-Stücke der Aorta direkt in die beiden Enden der Silberdrähte eingehängt. Dann wird die Organhalterung wieder in da Organbad abgesenkt.

Dann wird das Ring-Stück der Aorta bei 10mV auf 10cm vorgespannt, was einer Kraft von 19,6mN entspricht. Nach einer Akklimatisierung von 20 Minuten bei dieser Vorspannung werden zuerst die Millivolt vom 10mV auf 5mV umgestellt, dann der Schreiber auf Null gestellt und schlussendlich die Tyrode-lösung mit der frisch bereiteten 90mmolaren Kaliumchlorid-Lösung ausgetauscht.
Somit kommt es euch in diesem Fall zu einer maximalen Konzentration. Der restliche Versuchsablauf erfolgt wie bereits beim Darm beschrieben.

4.4 Versuchsablauf Truncus pulmonalis

Der Versuchsablauf beim Truncus pulmonalis ist mit jener der Aorta descendens ident, bis auf die Vorspannung am Anfang. Beim Truncus pulmonalis wird eine Vorspannung von 10cm bei 5mV, was einer Kraft von 9,81mV entspricht und somit im Vergleich zur Aorta descendens eine deutlich geringer ist.

4.5 Versuchsablauf Musculus papillaris

Dieser Versuch wird mit der Apparatur 2 durchgeführt. Dabei wird der Papillarmuskel am oberen Ende, wo der Haken befestigt ist, an den Silberdraht gehängt, welcher sich am Kraftwandler befindet. Im Gegensatz zur Apparatur 1, gibt es hier keinen unteren Silberdraht der an der Organhalterung hängt. Anstelle dessen wird der Papillarmuskel am untern Ende bis zu 2/3 zwischen das Platinplättchen und das Plexi-Glas-Plättchen geklemmt.
Mit dem Stativschlitten wird nun die Organhalterung in das Organbad (Temperatur 35 Grad Celsius) abgesenkt und mittels Feintrieb bei 5 mV auf 4 cm vorgespannt, was einer Kraft von 3,92mN entspricht.

Da der Papillarmuskel wie bereits erwähnt keine spontane regelmäßige Aktivität auf-

weist, muss dieser mit elektrischen Impulsen gereizt werden um eine Kontraktionsfrequenz zu erhalten. Daher wird der Muskel unmittelbar nach dem Vorspannen im Sekundentakt mit Stromschlägen über einen elektrischen Impulsgeber gereizt, damit es zu einer Kontraktion kommt.

Nach einer Akklimatisierung von rund 20 Minuten beginnt man mit der Messung. Dabei werden alle fünf Minuten für 12 Sekunden die Amplituden (= Kontraktionkraft) aufgezeichnet und die Höhe dieser abgemessen. Die Zugabe der Wirksubstanz erfolgt erst dann wenn die Höhe Amplituden innerhalb von 15 Minuten konstant bleibt; d.h um nicht mehr als ± 1cm abweicht.

Die Zugabe der Wirksubstanz erfolgt widerum nach dem vorgegebem Konzentrationsschema und pro Konzentration wird jeweils für 45 Minuten alle fünf Minuten aufgezeichnet und die Höhe abgemessen.

4.6 Versuchsablauf Wirkmechanismus

Für den Versuch wird ein Darmstück wie in Abschnitt 3.11 beschrieben präpariert und ins Organbad eingebracht. Die Vorspannung und die Einstellungen des Schreibers entsprechen auch der im Abschnitt 4.2 beschriebenen Versuchsanweisung.

Nach einer 20 minütigen Akklimatisierung wird die Tyrode-Lösung mit einer Kaliumchloridlösung (Herstellung siehe 3.13.2) ausgewechselt und auf Konstanz der Kontraktion gewartet. Auch hier muss die Kontraktionskurve am Schreiber mindestens über fünf Zentimeter liegen, damit der Darm verwendet werden kann und die Versuche reproduzierbar sind.

Bei Erreichen der Konstanz werden dann 100 μl der vorher gelösten Nitro-L-Arginin Lösung dazugegeben und für 45 Minuten gemessen. Durch die Blockade der eNOS, welche durch Nitro-L-Arginin erfolgt, bleibt die Kurve am Schreiber entweder unverändert oder steigt leicht an, d.h. der Darm kontrahiert noch leicht zusätzlich, weil keine NO-Produktion mehr erfolgen kann.
Nach den 45 Minuten werden 80 μl der Substanz (Mgdth10) dazupipettiert und auch für 45 Minuten vermessen.

Wichtig für die nachfolgende Auswertung der einzelnen Versuche ist auch, dass ein Korrekturfaktor miteinberechnet wird, der die spasmolytische Eingenwirkung von DMSO auf die glatte Muskulatur des Darmes beachtet.
Dazu führt man parallel zu den Versuchen mit Nitro-L-Arginin und der Substanz auch eine Versuchsreihe nur mit Nitro-L-Arginin und DMSO durch. Dies erfolgt mit dem selben Pipettierschema (siehe Tabelle 6.1), nur dass anstelle von MGdth10 nur DMSO allein zugegeben wird. So erhält man schlußendlich den Korrekturfaktor.

5 Ergebnis

5.1 Datenauswertung rechter Vorhof

Hier wird die Auswirkung auf die Chronotropie beobachtet. Dabei wird nach jeder Messung die Anzahl der Spitzen jeder einzelnen zwölf sekündigen Aufzeichnung abgezählt und damit kann man eine Zu- oder Abnahme der Schlagfrequenz bestimmen.
Nimmt die Schlagfrequenz zu, dann kann man von einer positiven Inotropie der Substanz sprechen, nimmt die Schlagfrequenz deutlich ab, dann spricht man hingegen von einer negativen inotropen Wirkung. Wenn die Schlagfrequenz gleichbleibend ist oder nur in einem sehr geringen Maß (± 2 Schläge mehr oder weniger), dann ist keine Wirkung vorhanden.

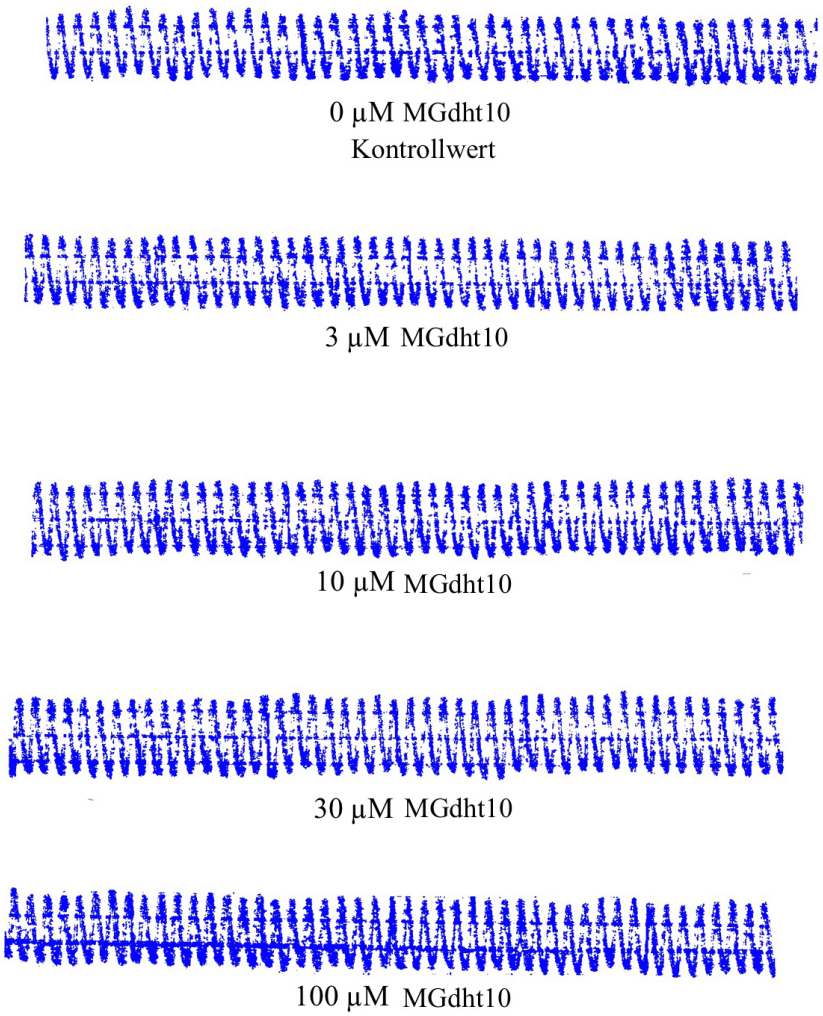

Abbildung 5.1: Originalabbildung der Frequenz des Vorhofs

In der folgenden Tabelle werden die Daten der einzelnen Versuche in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz durch den Mittelwert der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs (f), welcher jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert ist, angeführt. Dieser wird sowohl für die Schläge pro Zeiteinheit als auch in Prozent angegeben. Weiters sind die Anzahl der Versuche **(n)** und die Irrtumswahrscheinlichkeit [Signifikanztest] **(P)** in der Tabelle angeführt.

MGdth10	f ± **SEM (x/min)**	f ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µmol	7,79 ± 0,80	0,00 ± 0,00	6	–
3 µmol	7,42 ± 0,72	-4,53 ± 2,52	6	n.s.
10 µmol	6,58 ± 0,75	-15,49 ± 5,18	6	0,05
30 µmol	5,00 ± 0,80	-36,49 ± 7,44	6	0,01
100 µmol	3,49 ± 0,66	-56,13 ± 6,95	6	0,01

Tabelle 5.1: Datenauswertung vom Vorhof

Wie man in der Tabelle erkennen kann, kommt es mit steigender Konzentration der Testsubstanz zu einer leichten Zunahme der Schlagfrequenz des Vorhofs, jedoch ist dieser Anstieg nicht signifikant und es wird, wie man in Abbildung (siehe 5.2) erkennen kann, zu keiner Zeit ein EC_{50}-Wert erreicht.

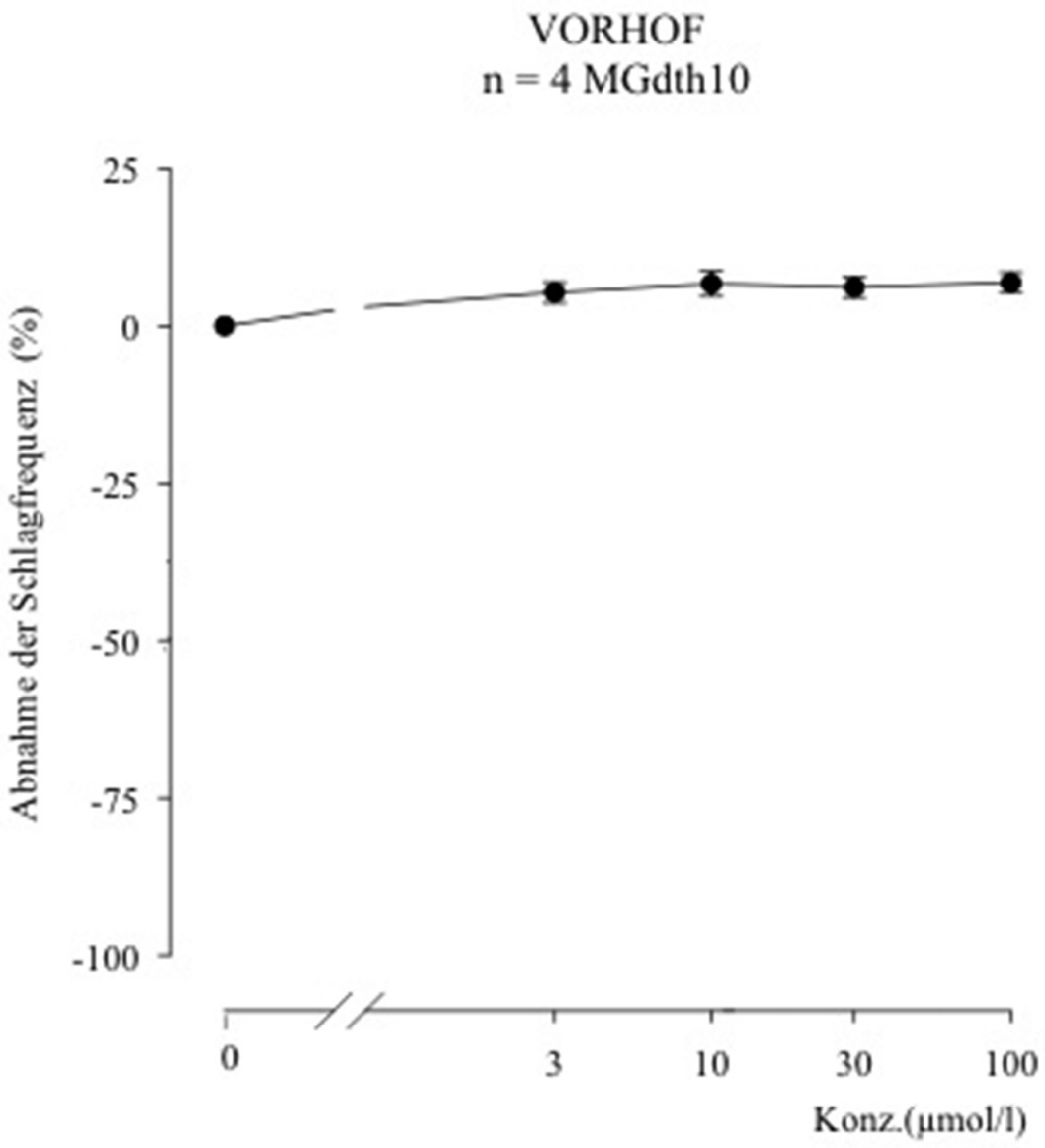

Abbildung 5.2: Konzentrations-Wirkungskurve des Vorhofs; auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Vorhofs in % angegeben und auf der x-Achse die Konzentration in μmol/l.

5.2 Datenauswertung Ileum terminalis

In diesem Fall erhält man eine Kontraktionskurve. Ausgehend vom konstanten Wert der als Startpunkt der Messung gilt, also einer Konzentration von 0 µL entspricht, ermittelt man die jeweiligen Werte der einzelnen Konzentrationen, indem man die Höhe der Kurve nach 45 Minuten abmisst und sie dann in Relation zum Ausgangswert setzt.
So kann man Bestimmen ob eine Abnahme der Kontraktion erfolgt ist oder ob die Kontraktion ident zum Ausgangswert geblieben ist und daher keine spasmolytischeWirkung vorhanden ist.

In der Tabelle werden die Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz (f_c) des terminalen Ileums, welche um den Standardfehler (SEM) korrigiert werden, sowohl in Millinewton (mN) als auch in Prozent angegeben. Weiters sind die Anzahl der Versuche **(n)** und die Irrtumswahrscheinlichkeit [Signifikanztest] **(P)** in der Tabelle angeführt.

MGdth10	f_c ± **SEM (mN)**	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µmol	7,79 ± 0,80	0,00 ± 0,00	6	–
3 µmol	7,42 ± 0,72	-4,53 ± 2,52	6	n.s.
10 µmol	6,58 ± 0,75	-15,49 ± 5,18	6	0,05
30 µmol	5,00 ± 0,80	-36,49 ± 7,44	6	0,01
100 µmol	3,49 ± 0,66	-56,13 ± 6,95	6	0,01

Tabelle 5.2: Datenauswertung der Wirkung am Darm

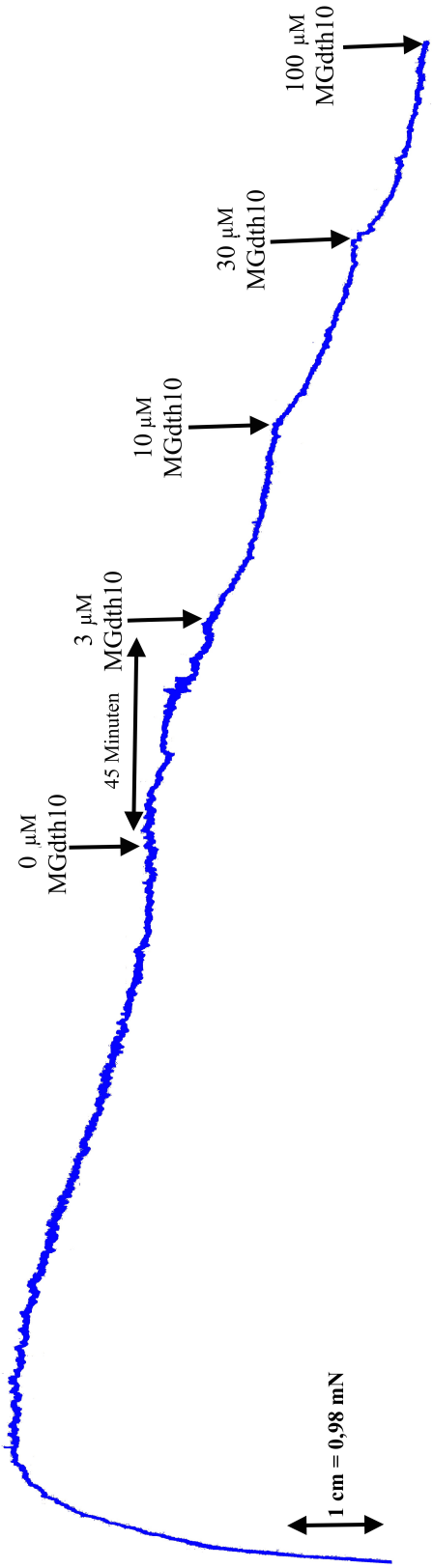

Abbildung 5.3: Originalabbildung der Kontraktionskurve des Darmes

Wie man auf der Orginalabbildung erkennen kann, zeigt die Substanz Mgdth10 eine Abnahme der Kontration des Darmes mit steigender Konzentration.
Diese Abnahme ist signifikant; d.h dass die Testsubstanz eine spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum besitzt.

Es wird eine EC_{50} erreicht, wie in der folgenden Grafik (siehe Abb. 5.4) gezeigt wird. Diese liegt bei 68 µmol L, was darauf schliessen lässt dass die Substanz eine relativ geringe Potenz aufweist und damit wahrscheinlich therapeutisch gesehen eher uninteressant für weitere Untersuchungen ist.

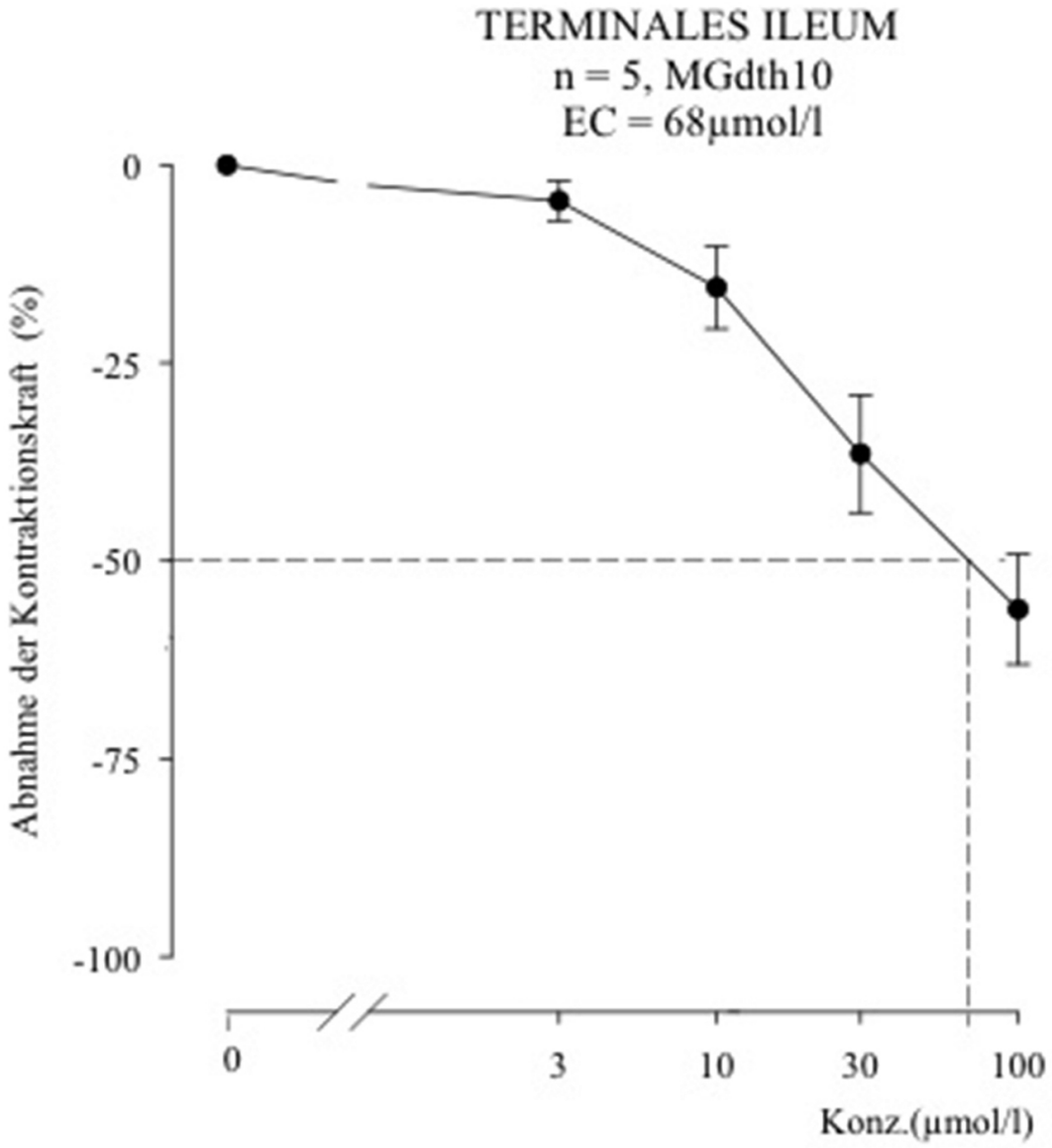

Abbildung 5.4: Konzentrations-Wirkungskurve des Darmes; auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft des terminalen Ileums in % angegeben und auf der x-Achse die Konzentration in μmol/l

5.3 Datenauswertung Musculus papillaris

Beim Papillarmuskel wird die Auswirkung auf die Inotropie gemessen; d.h die Zu- oder Abnahme der Kontraktionskraft. Dabei wird die Höhe der Amplituden abgemessen und in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Der Ausgangswert ist die Höhe der Amplitude die abgmessen wird bei Konstanz der Ausschläge. Ausschlaggebend ist immer der Wert nach 45 Minuten Messung. Dieser wird für die Bestimmung verwendet.
Kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Höhe der Amplituden spricht man von einer negativ inotropen Wirkung. Kommt es hingegen zu einer Zunahme der Höhe spricht man von einer positiv inotropen Wirkung.

Die Substanz Mgdth10 zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Höhe der Amplituden mit zunehmender Konzentration. Sie hat also eine negativ inotrope Wirkung.

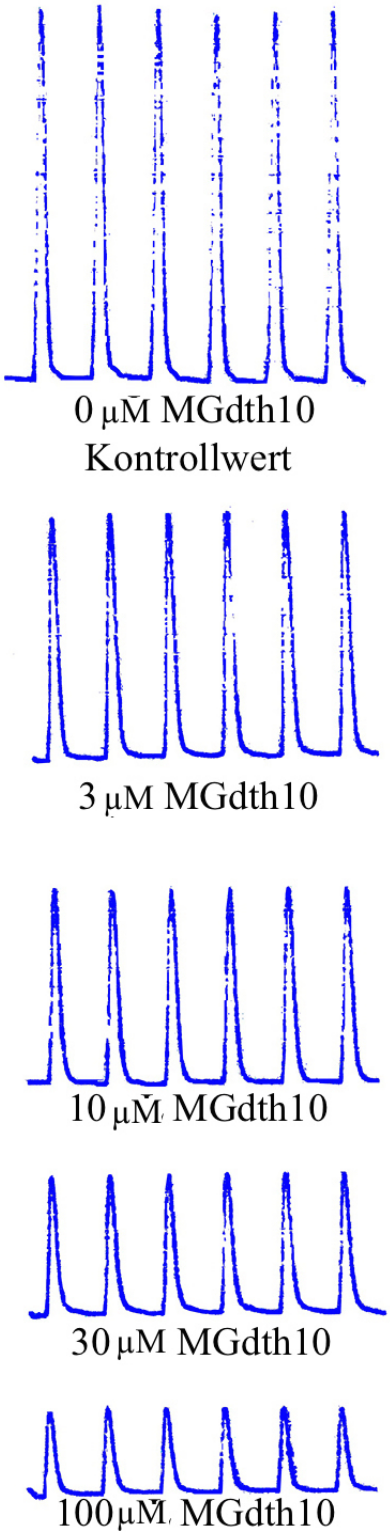

Abbildung 5.5: Originalabbildung der Amplituden des Papillarmuskel

In der folgenden Tabelle werden die Daten der einzelnen Versuche des Papillarmuskels in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz durch den Mittelwert der Kontraktionsfrequenz des Papillarmuskels (f_c), welcher jeweils um den Standardfehler (SEM) korrigiert ist, angeführt. Dieser wird sowohl für die Schläge pro Zeiteinheit als auch in Prozent angegeben. Weiters sind die Anzahl der Versuche **(n)** und die Irrtumswahrscheinlichkeit [Signifikanztest **(P)** in der Tabelle angeführt.

MGdth10	f_c ± **SEM (mN)**	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µmol	1,20 ± 0,15	0,00 ± 0,00	4	–
3 µmol	0,97 ± 0,14	-19,52 ± 3,36	4	0,05
10 µmol	0,96 ± 0,16	-20,61 ± 4,42	4	0,05
30 µmol	0,99 ± 0,16	-18,45 ± 6,05	4	0,05
100 µmol	0,96 ± 0,15	-19,88 ± 6,63	4	0,05

Tabelle 5.3: Datenauswertung der Wirkung am Papillarmuskel

Beim Zeichnen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve kann man aber erkennen, dass diese Auswirkung zu keiner Zeit einen EC_{50}-Wert erreicht und es somit keine nennenswerte Wirkung darstellt.

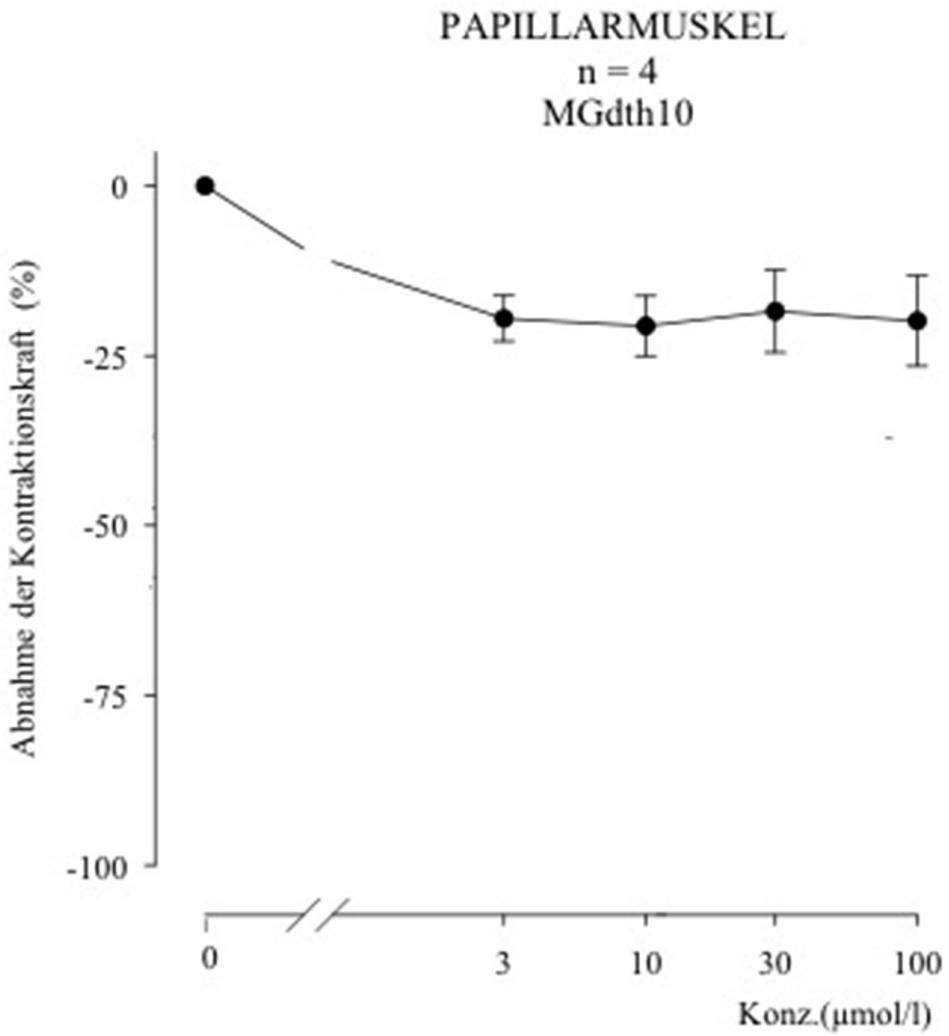

Abbildung 5.6: Konzentrations-Wirkungskurve des Papillarmuskels; auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels in % angegeben und auf der x-Achse die Konzentration in μmol/l

5.4 Datenauswertung Aorta descendens

Bei der Aorta descendens wird die Gefäß-Relaxation gemessen. Dafür wird bei jeder Konzentration die Höhe der einzelnen Werte (in Zentimeter) nach 45 Minuten abgmessen und auch hier wieder in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Somit kann man bestimmen ob und wie stark die Abnahme der Kontraktion bei dem Gefäß ist.

Mgdth10 zeigt keine nennswerte Wirkung auf die Aorta descendens. Die geringe Abnahme bei höheren Konzentrationen kann auch durch das Lösungsmittel DMSO zustande kommen und ist somit nicht eindeutig der Substanz zuzuordnen.

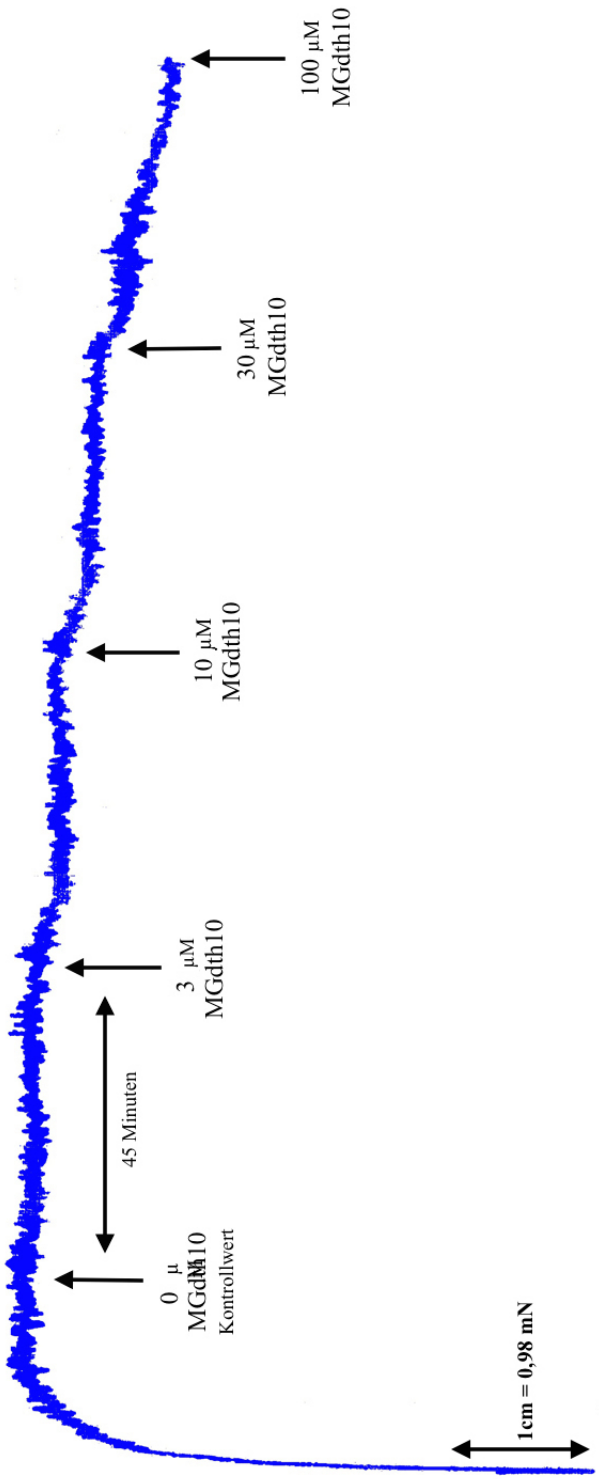

Abbildung 5.7: Originalabbildung einer Kontraktionskurve der Aorta descendens

In der folgenden Tabelle der Datenauswertung werden in Abhängigkeit der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz die Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz (f_c) der Aorta descendens, welche um den Standardfehler (SEM) korrigiert werden, sowohl in Millinewton (mN) als auch in Prozent angegeben. Weiters ist die Anzahl der Versuche **(n)** angeführt und die Irrtumswahrscheinlichkeit [Signifikanztest] **(P)**.

MGdth10	f_c ± **SEM (mN)**	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µL	13,48 ± 2,13	0,00 ± 0,00	5	–
3 µL	13,03 ± 2,09	-3,54 ± 0,34	5	n.s.
10 µL	12,77 ± 2,03	-5,40 ± 0,37	5	n.s.
30 µL	12,34 ± 1,98	-8,85 ±1,47	5	0,05
100 µL	11,18 ± 1,98	-18,36 ± 2,82	5	0,05

Tabelle 5.4: Datenauswertung der Wirkung an der Aorta descendens

Beim Zeichnen der Dosis-Wirkungs-Kurve wird ersichtlich, dass bei der Aorta descendens zu keiner Zeit ein EC_{50}-Wert erreicht wird (siehe Abb. 5.8) und man somit darauf schließen kann, dass keine Wirkung vorhanden ist.

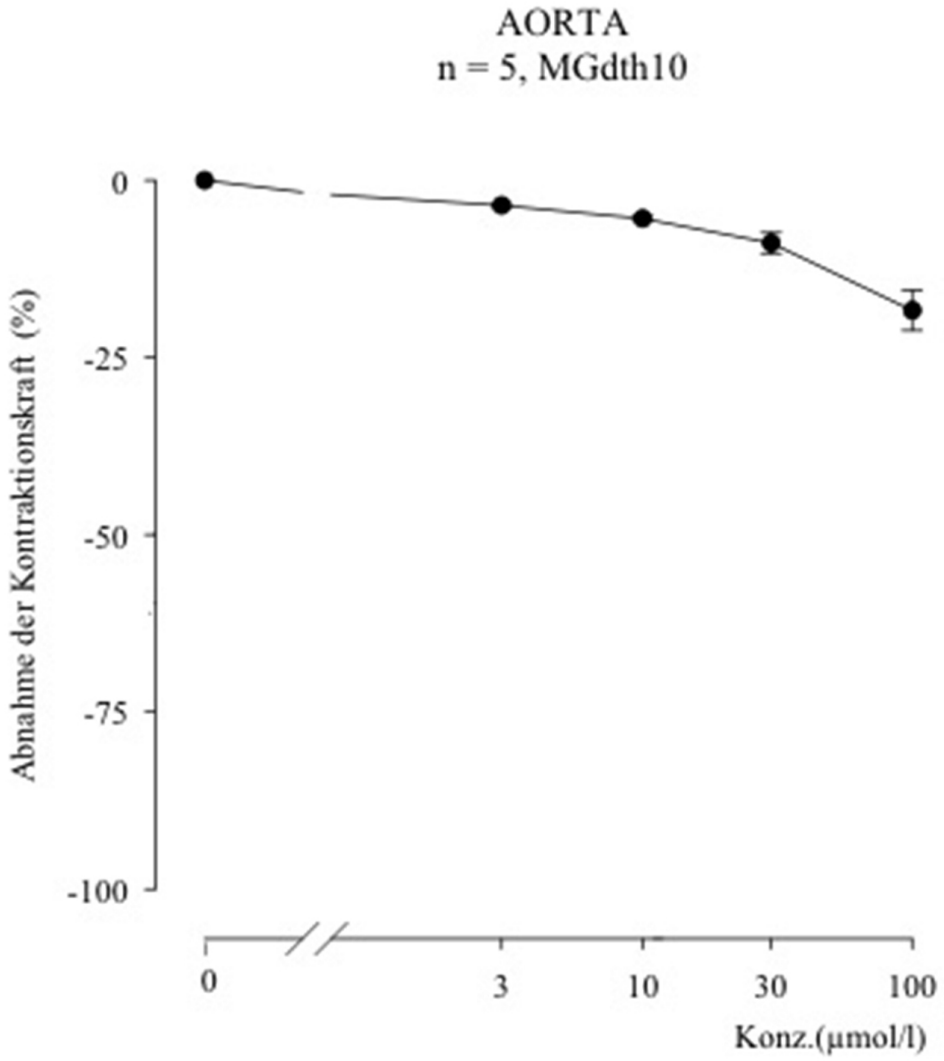

Abbildung 5.8: Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta descendens; auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Aorta in % angegeben und auf der x-Achse die Konzentration in μmol/l

5.5 Datenauswertung Truncus pulmonalis

Auch bei Truncus pulmonalis wird die Gefäß-Relaxation gemessen. Dafür wird, wie bei der Datenauswertung der Aorta descendens, bei jeder Konzentration die Höhe der einzelnen Werte (in Zentimeter) nach 45 Minuten abgmessen und auch hier wieder in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Somit kann man bestimmen ob und wie stark die Abnahme der Kontraktion bei dem Gefäß ist.

Mgdth10 zeigt keine nennswerte Wirkung auf den Truncus pulmonalis. Die geringe Abnahme bei höheren Konzentrationen kann auch auch hier durch das Lösungsmittel DMSO zustande kommen und ist somit nicht eindeutig der Substanz zuzuordnen.

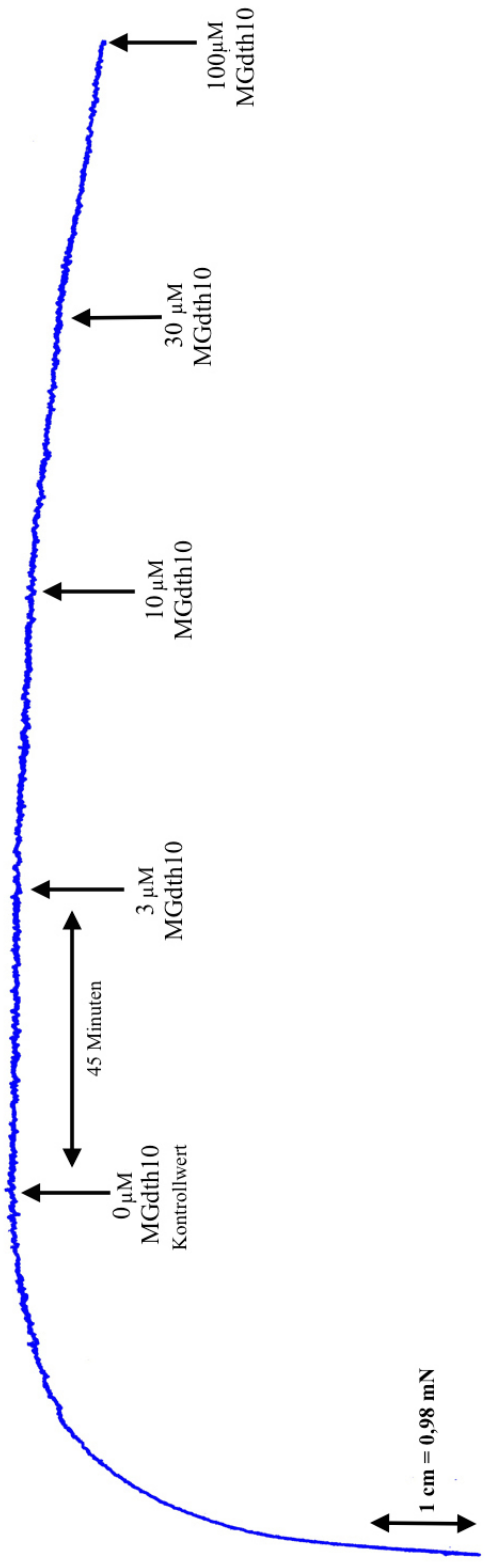

Abbildung 5.9: Originalabbildung einer Kontraktionskurve des Truncus pulmonalis

In der folgenden Tabelle der Datenauswertung werden in Abhängigkeit von den einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz die Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz (f_c) des Truncus pulmonalis, welche um den Standardfehler (SEM) korrigiert werden, sowohl in Millinewton (mN) als auch in Prozent angegeben. Weiters ist die Anzahl der Versuche **(n)** angeführt und die Irrtumswahrscheinlichkeit [Signifikanztest] **(P)**.

MGdth10	f_c ± **SEM (mN)**	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µL	12,06 ± 1,76	0,00 ± 0,00	5	–
0 µL	11,34 ± 1,61	-5,67 ± 0,86	5	n.s.
0 µL	10,87 ± 1,51	-9,29 ± 2,00	5	0,05
0 µL	9,82 ± 1,33	-17,43 ± 3,85	5	0,05
0 µL	8,54 ± 1,25	-27,77 ± 5,77	5	0,05

Tabelle 5.5: Datenauswertung der Wirkung am Truncus pulmonalis

Beim Zeichnen der Dosis-Wirkungs-Kurve wird ersichtlich, dass auch im Falle des Truncus pulmonalis zu keiner Zeit, ein EC_50-Wert erreicht wird (siehe Abb. 5.10) und man somit auch hier darauf schließen kann, dass keine nennenswerte Wirkung vorhanden ist.

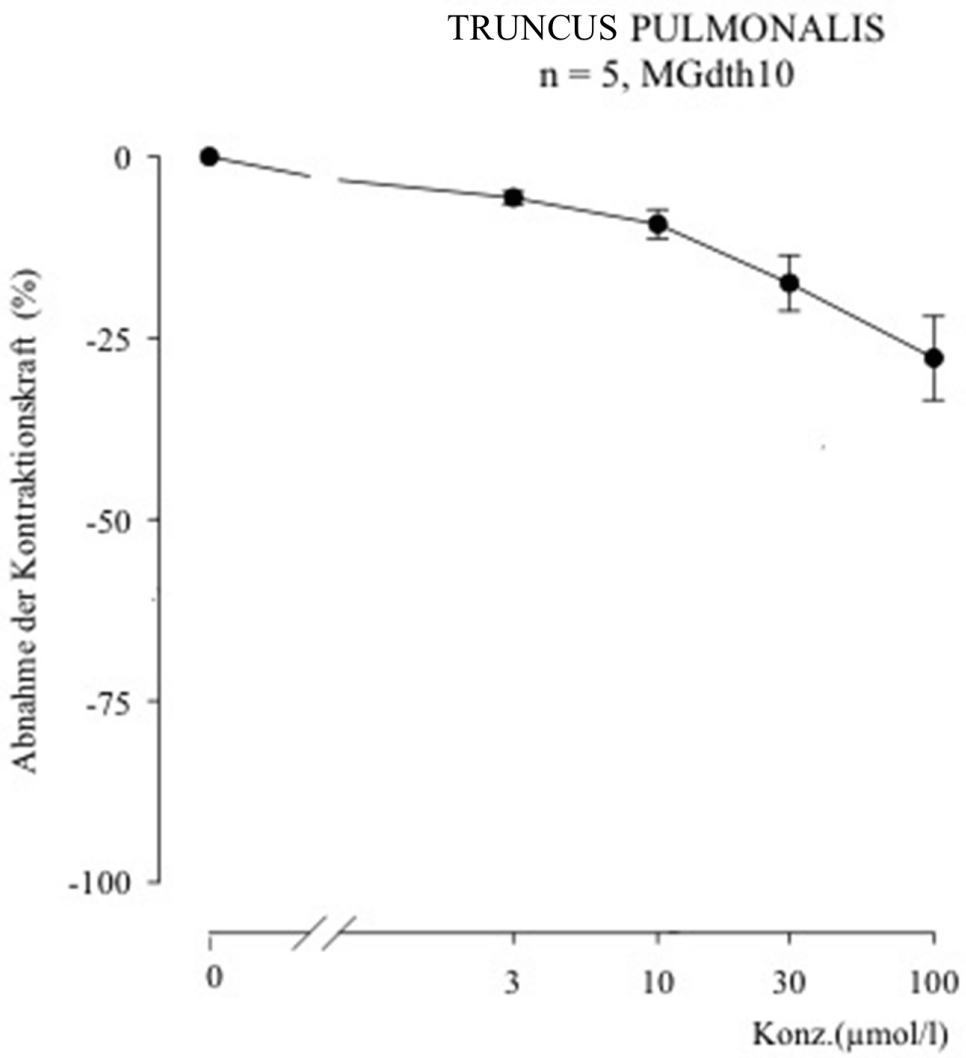

Abbildung 5.10: Konzentrations-Wirkungskurve des Truncus pulmonalis; auf der y-Achse wird die Abnahme der Kontraktionskraft des Truncus pulm. in % angegeben und auf der x-Achse die Konzentration in μmol/l

6 Testung des Wirkmechanismus

6.1 Testung des Wirkmechanismus allgemein

Die Testung des Wirkmechanismus erfolgt anhand eines der Organe, auf welche die Testsubstanz eine Wirkung gezeigt hat, die ausreichend war um einen EC_50-Wert zu erreichen. Im Falle der Testsubstanz MGdth10 ist die Testung des Wirkmechanismus am Ileum terminale erfolgt, da hier die stärkste Wirkung erzielt wird.

Der Unterschied zum Versuchsablauf der einzelnen Organe liegt in der Zeit der Messung und im Pipettierschema. Hier wird nämlich nur jeweils eine Konzenration von Nitro-L-Arginin und von Mgdth10 zugegeben und jede für 45 Minuten aufgezeichnet und gemessen.

Substanz	**lösungsmittel**	**Pipettiermenge**	**Messzeit**
Nitro-L-Arginin	KCl-Tyrode (60 mmol)	100 μl	45 min.
Dimethylsulfoxid	-	80 μl	45 min.

Tabelle 6.1: Pipettierschema bei der Testung des Wirkmechanismus

6.2 Ergebnis Wirkmechanismus am Ileum terminalis

Wie man in der folgenden Originalabbildung der Testung des Wirkmechanismus erkennen kann, steigt die Kontraktion der glatten Muskulatur des Darmes nach der Zugabe der 100 μl Nitro-L-Arginin leicht an. Dies geschieht durch die Blockade der endothelialen NO-Synthase, wodurch kein NO mehr produziert wird und somit die körpereigene Spasmolyse unterbunden wird.

Nach den 45 Minuten wird dann die 80 μl der Testsubstanz dazupipettiert und für

weitere 45 Minuten gemessen. Wie man beu der Originalabbildung deutlich erkennen kann, kommt es zu einem deutlichen Abfall der Kurve nach der Zugabe von MGdth10. Um auszuschließen, dass diese Wirkung nur aufgrund der Eigenwirkung vom lösungsmittel DMSO auf die glatte Muskulatur zusatnde kommt, werden parallel Versuche nur mit DMSO durchgeführt (siehe 4.6).

Wie man anhand der Originalabbildung (siehe Abb. 6.2) erkennen kann, ist die Abnahme der Kontraktion die allein durch DMSO erziehlt wird, um vieles geringer als jene, die mit der Testsubstanz MGdth10 erreicht wird.

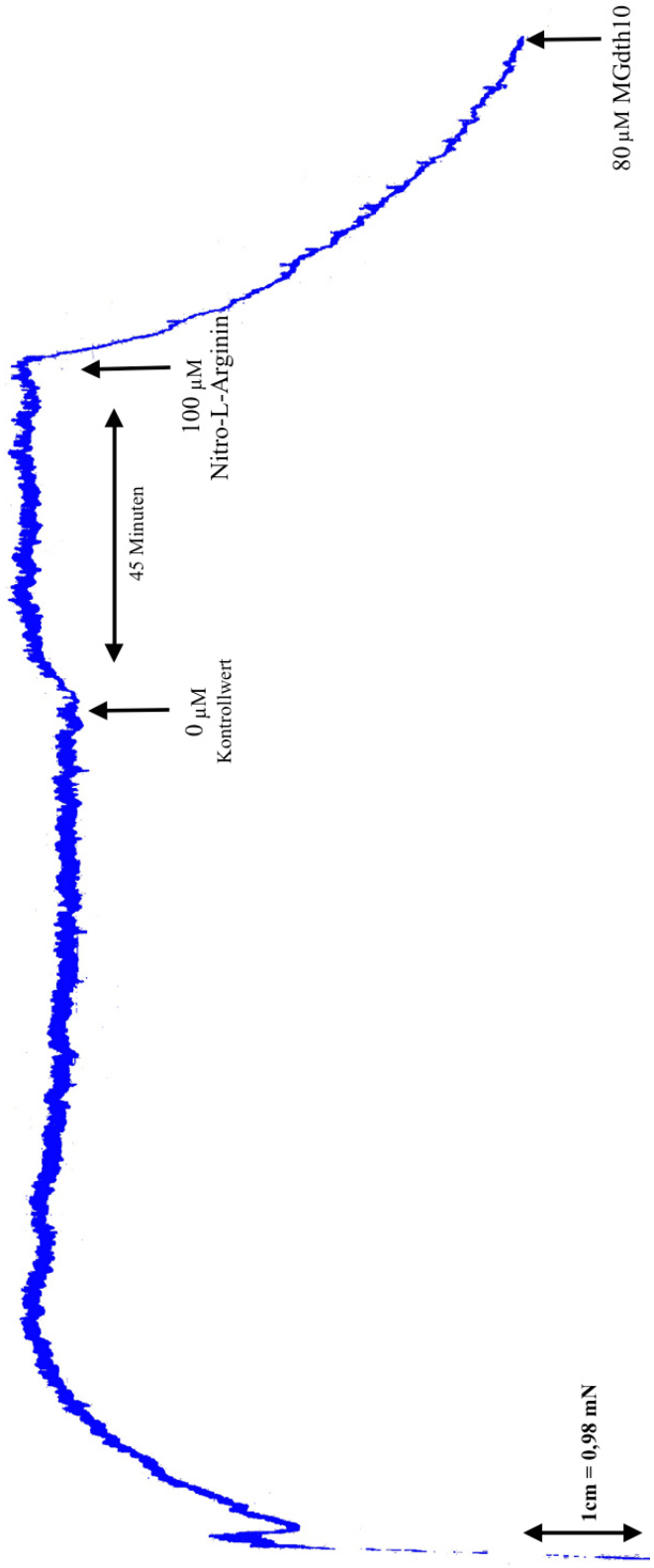

Abbildung 6.1: Originalabbildung des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz (MGdth10)

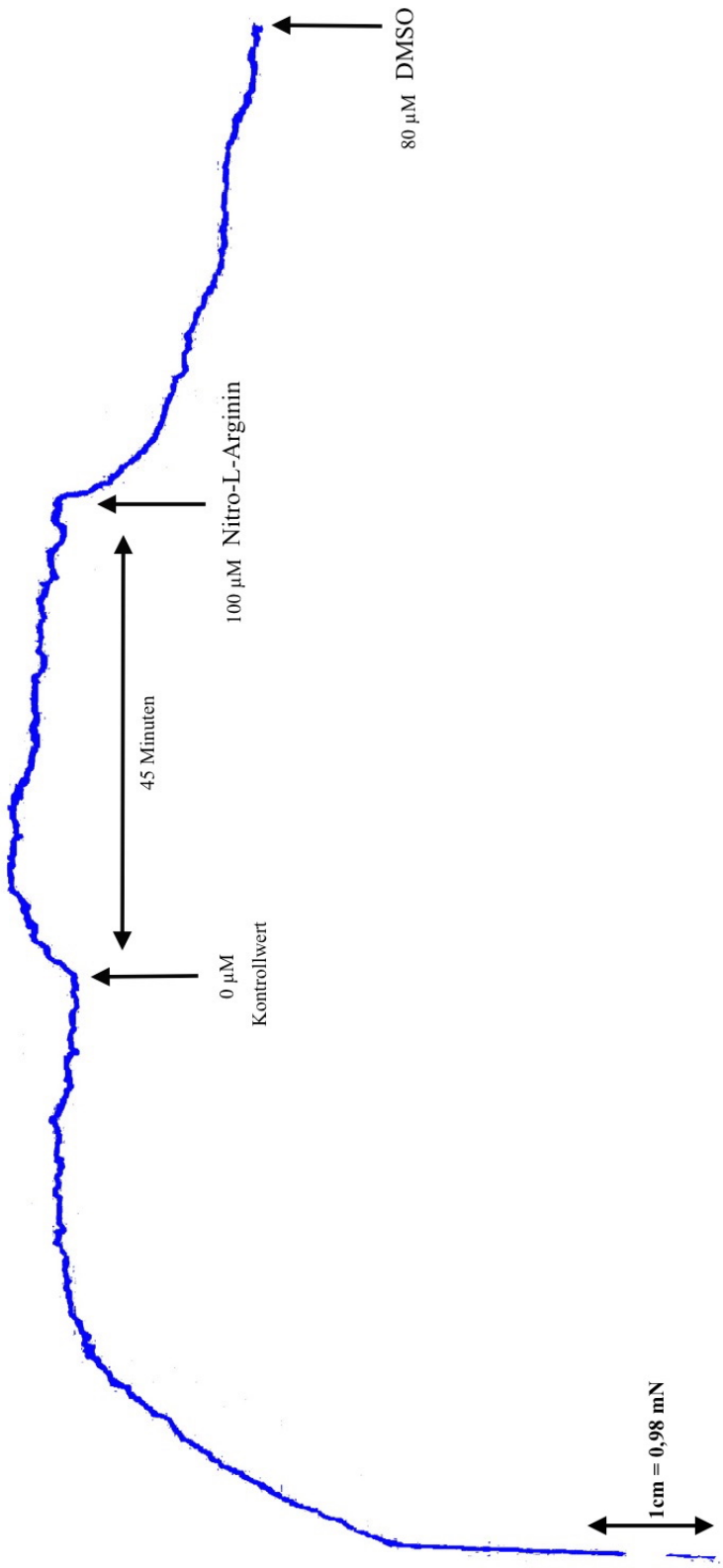

Abbildung 6.2: Originalabbildung des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe von DMSO

In den folgenden Tabelle werden die Ergebniswerte der Testung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum angegeben. Die Werte erscheinen als Mittelwert der Kontraktionsfrequenz (f_c) welcher um den Standardfehler (SEM) korrigiert wird und werden in Millinewton (gibt die Kontraktionskraft des Dames wieder) angegeben. Weiters sind in der Tabelle die Anzahl der Versuche **(n)** und die Irrtumswahrscheinlichkeit **(P)** angegeben.

Substanz	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µL	7,38 ± 0,86 mN	4	–
100 µL Nitro-L-Arginin	7,63 ± 1,05 mN	4	–
80 µL MGdth10	2,96 ± 0,65 mN	4	0,05

Tabelle 6.2: Datenauswertung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit Nitro-L-Arginin und MGdth10

Substanz	f_c ± **SEM (%)**	**Anzahl der Versuche (n)**	**Irrtums-wahrscheinlichkeit (P)**
0 µL	11,06 ± 1,73	4	–
100 µL Nitro-L-Arginin	10,89 ± 1,61	4	–
80 µL DMSO	9,08 ± 1,36	4	0,05

Tabelle 6.3: Datenauswertung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum mit Nitro-L-Arginin und DMSO, zur Feststellung des Ausmaßes der spasmolytischen Eigenwirkung von DMSO

Wie man nun anhand der Originalabbildungen und der Ergebnis-Werte erkennen kann, kommt die spasmolytische Wirkung von MGdth10 nicht nur über die Aktivierung der eNOS zustande kommt, sondern auch über andere Wege.
Mögliche andere Wirkmechanismen über die die Testsubsatnz MGdth10 wirken kann, wären die Blockade von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen, oder die Blockade von $\alpha_1 - Adrenozeptoren$. Eine weitere Möglichkeit besteht auch darin, dass das Molekül im Körper hydrolytisch gespalten wird und dadurch NO entsteht, welches dann unabhängig von eNOS zu einer spasmolytischen Wirkung führt.

In der folgenden graphischen Abbildung (siehe 6.3) wird nochmals zusammenfassend das Ergebnis des Wirkmechanismus anhand eines Balkendiagramms dargestellt.

Dabei sind auf der x-Achse die Konzentrationen in μmol/l und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des terminalen Ileum in Millinewton (mN) angegeben.

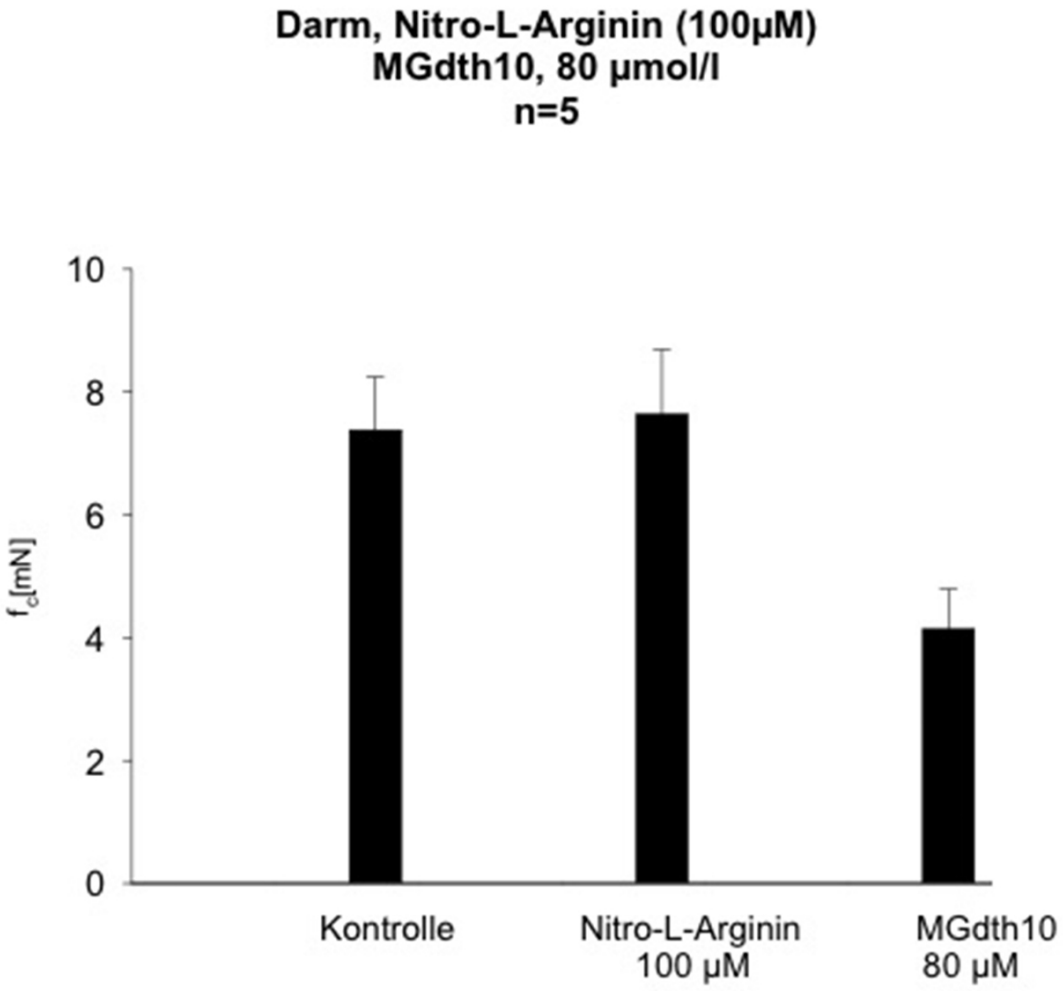

Abbildung 6.3: Balkendiagramm des Wirkmechanismus am Ileum terminale mit vorheriger Blockade der eNOS durch Nitro-L-Arginin und anschließender Zugabe der Testsubstanz (MGdth10)

7 Diskussion

7.1 Allgemein

In den durchgeführten Versuchen wird das primäre pharmakologische Wirkspektrum einer neu synthetisierten Substanz an isolierten Meerschweinchenorganen getestet.
Dafür werden das rechte Vorhof, das terminale Ileum, die Aorta descendens, der Truncus pulmonalis und der Papillarmuskel präpariert und in einem Organbad eingespannt und anschließend die Auswirkungen des neuen Wirkstoffes in verschiedenen Konzentrationen beobachtet.

Bei den beiden Präparaten der quergestreiften Herzmuskulatur, wird einerseits beim rechten Vorhof eine mögliche Auswirkung auf die Chronotropie (Schlagfrequenz) und beim Papillarmuskel eine mögliche Auswirkung auf die Inotropie (Kontraktionskraft) untersucht.

Bei den Organenpräparaten mit glatter Muskulatur, wird bei den beiden großen Widerstansgefäßen (Aorta descendens und Truncus pulmonalis) eine mögliche vasodilatative Wirkung und beim Hüftdarm eien mögliche spasmolytische Wirkung der neuen Substanz untersucht.

Anschließend kann man die einzelnen Ergebnisse der Organe jeweils nach der Art der Muskulatur gegenüberstellen und vergleichen und feststellen ob eine Wirkung vorhanden ist und wie stark ausgeprägt diese Wirkung ist.

7.2 Vergleich der Ergebnisse an der quergestreiften Herzmuskulatur

Wie bereits erwähnt wird die Wirkung von MGdth10 an der quergestreiften Herzmuskulatur mit dem rechten Vorhof und den Papillarmuskeln untersucht.

Dabei wird beim rechten Vorhof die positive oder negative Auswirkung von MGdth10 auf die Chronotropie untersucht, während bei den Papillarmuskeln die positive oder negative Auswirkung auf die Inotropie festgestellt wird.

In der folgenden Tabelle werden nun die Ergebnisse der Wirkung von MGdth10 bei einer Konzentration von 100 μmol in Form der Mittelwerte der Schlagfrequenz beim rechten Vorhof (f) und der Kotraktionsfrequenz beim Papillarmuskel (f_c), welche um den Standardfehler (SEM) korrigiert werden, gegenübergestellt. Somit kann allgemein die Wirkung auf die quergestreifte Herzmuskulatur festgestellt werden und ob eine stärkere Wirkung auf eines der beiden Organe vorhanden ist; d.h ob bei einem der beiden Organe ein EC_{50}-Wert erreicht wird.

Organ	f/f_c ± **SEM (%)**	EC_{50} **MGdth10** 100 µmol/**l**
rechter Vorhof	6,87 ± 1,65	>100
Papillarmuskel	-19,88 ± 6,63	>100

Tabelle 7.1: Ergebnisgegenüberstellung der Auswirkung von MGdth10 auf die zwei Organe der quergestreiften Herzmuskulatur

Wie man anhand der Werte in der Tabelle erkennen kann zeigt die Testsubstanz MGdth10 eine leichte positive Wirkung in Bezug auf die Chronotropie des rechten Vorhofs, d.h. die Anzahl der Schläge pro Minute steigt leicht an. Beim Erstellen der Dosis-Wirkungskurve kann man jedoch klar erkennen, dass es auch nach Zugabe von 100 µL kein EC-50 Wert erreicht wird.

In Bezug auf den Papillarmuskel kann man in der Tabelle erkennen, dass es zu einer leichten Abnahme der Inotropie kommt, d.h. die Kontraktionskraft des Papillarmuskels nimmt ab. Beim Erstellen der Dosis-Wirkungskurve wird auch hier nach Zugabe von 100 µL MGdth10 kein EC_{50}-Wert erreicht.

Daraus kann man ableiten, dass zwar eine leichte Wirkung auf die quergestreifte Herzmuskulatur vorhanden ist, diese aber nicht ausgeprägt genug ist um sie als signifikant zu betrachten.

7.3 Vergleich der Ergebnisse an der glatten Muskulatur

Hier wird die Wirkung von MGdth10 auf die glatte Muskulatur von Gefäßen und Darm untersucht.

Dabei wird bei den beiden Gefäßen, wie der Aorta descendens und dem Truncus pulmonalis, die vasodilatative Wirkung untersucht und beim Hüftdarm die spasmolytische Wirkung von MGdth10.

In der folgenden Tabelle werden nun die Ergebnisse der Wirkung von MGdth10 bei einer Konzentration von 100 μmol in Form der Mittelwerte der Kontraktionsfrequenz (f_c) bei der Aorta descendens, dem Truncus pulmonalis und dem Ileum terminalis, welche um den Standardfehler (SEM) korrigiert werden, gegenübergestellt. Somit kann allgemein die Wirkung auf die glatte Muskulatur von Gefäßen und Darm festgestellt werden und ob eine stärkere Wirkung auf einem der Organe vorhanden ist; d.h ob bei einem der Organe ein EC_{50}-Wert erreicht wird.

Organ	f_c ± **SEM (%)**	EC_{50} **MGdth10**
Aorta descendens	-18,36 ± 2,82	>100
Truncus pulmonalis	-27,77 ± 5,77	>100
Ileum terminalis	-56,13 ± 6,95	68 μmol/l

Tabelle 7.2: Ergebnisgegenüberstellung der Auswirkung von MGdth10 auf Aorta descendens, Truncus pulmonalis und Ileum terminalis

Anhand der Werte in der Tabelle kann man feststellen, dass die Substanz MGdth10 auf alle drei Organe mit glatter Muskulatur eine Wirkung besitzt, jedoch die Wirkungen unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

MGdth10 besitzt eine schwach ausgeprägte vasodilatative Wirkung auf die Aorta und eine etwas stärker ausgeprägt vasodilatative Wirkung auf den Truncus pulmonalis.

Bei keinem der beiden Gefäße ist die dilatierende Wirkung Wirkung stark genug, dass ein EC_{50}-Wert erreicht wird.

Im Gegensatz zu den beiden Gefäßen zeigt die Testsubstanz MGdth10 am terminalen Ileum eine deutlich ausgeprägte Wirkung, d.h. es kommt bei einer Konzentration von 100 µmol zu einer deutlichen spasmolytischen Wirkung.

Aufgrund der deutlichen spasmolytischen Wirkung von MGdth10 auf das terminale Ileum, kann man einen EC_{50}-Wert bestimmen. Dieser Wert, bei dem es zu einer halbmaximalen Wirkung der Testsubstanz kommt, liegt im Falle von MGdth10 bei 68 µmol/l.

Aufgrund des EC_{50}-Wertes kann man die Wirkstärke (=Potenz) von Substanzen bestimmen. Je höher die Wirkstärke einer Substanz ist, desto niedriger ist der EC_{50}-Wert und umgekehrt. Dies widerum bedingt, dass bei Substanzen mit einem hohen EC_{50}-Wert relativ hohe Dosen verabreicht werden müssen, damit ein therapeutischer Effekt erzielt wird. Optimal sind Substanzen mit einem EC_{50}-Wert < 30 μmol/l. Substanzen deren Wert darüber liegt, sind klinisch kaum relevant (Aktories et al. 2009).

Da der EC_{50}-Wert von MGdth10 mit 68 μmol/l weit über dem optimalen Wert von 30 μmol/l liegt, kann festgehalten werden, dass zwar eine Wirkung der Testsubstanz vorhanden ist, diese jedoch klinisch nicht relevant ist, aufgrund der hohen Dosen die verabreicht werden müssten um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

Weiters ist die Testsubstanz MGdth10 nicht Organselektiv. Sie zeigt zwar die stärkste Wirkung am Darm, jedoch kommt es auch an allen anderen Organen zu einer leichten, wenn auch nicht relevanten Wirkung. Diese Wirkung wird jedoch mit steigender Wirkstoffkonzentration zunehmen und daher zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.

8 Zusammenfassung

In der Diplomarbeit wird das primäre pharmakologische Wirkungsprofil einer neu synthetisierten Substanzen an isolierten Meerschweinchenorganen untersucht.

Die Organe welche für die Versuchsreihen verwendet werden sind: der rechte Vorhof, die Papillarmuskeln, die Aorta descendens, der Truncus pulmonalis und das terminale Ileum. Diese werden wie vorher erwähnt aus einem Meerschweinchen isoliert, das vorher durch einen gezielten, stumpfen Schlag ins Genick getötet wird.

Die isolierten Organe werden anschließend präpariert und in ein Organbad, weches mit einer Nährstofflösung (Tyrode-lösung) befüllt ist, eingespannt und nach einem genau bestimmten Versuchsablauf untersucht. Dieses Organbad ist an einem Kraftwandler gekoppelt, welcher mit einem integriertem Dehnungsmesstreifen die Änderungen der Organe registriert und in ein elektrisches Signal umwandelt. Dieses elektrische Signal wird durch einen Amplifier 100fach verstärkt und auf einem Flachbettschreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Wirkungen die untersucht werden sind die postive oder negative Auswirkung auf Chronotropie (Schlagfrequenz) beim rechten Vorhof, die positive oder negative Auswirkung auf die Inotropie (Kontraktionskraft) bei den Papillarmuskeln, die vasodilatative Wirkung auf die Gefäße wie die Aorta descendens und den Truncus pulmonalis und die spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum.

Es werden für jedes Organ mindestens vier Versuche durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu gewährleisten. Diese Ergebnisse werden anschließend dazu verwendet um eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für jedes Organ zu zeichnen. Anhand dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurve kann der EC_{50}-Wert der Substanz am Organ bestimmt werden, falls dieser errreicht wird. Falls kein EC_{50}-Wert erreicht wird ist die Wirkung an diesem Organ nicht klinisch relevant.

Im Falle der Testsubstanz MGdth10 kommt es nur beim terminalen Ileum zu einer ausreichend starken Wirkung, dass ein EC_{50}-Wert bestimmt werden kann. Bei allen anderen Organen kommt es zwar zu einer schwachen Wirkung, jedoch sind diese Wirkungen zu keinem Zeitpunkt groß genug um einen EC_{50}-Wert zu erreichen.

Da eine Wirkung vorhanden ist, wird auch der mögliche Wirkmechanismus bestimmt. Dafür wird die endotheliale NO-Synthase durch Nitro-L-Arginin blockiert und untersucht, ob es trotz der Blockade zu einer Spasmolyse nach Zugabe von MGdth10 kommt. Wenn es zu keiner Abnahme der Kontraktion kommt, kann man darauf schließen, dass die Substanz genau über diesen Wirkmechanismus läuft. Kommt es jedoch zu einer Abnahme der Kontraktion (=Spasmolyse), kann man darauf schließen, dass die Substanz nicht über diesen einen Weg oder nicht nur über diesen einen Weg wirkt.

Da der EC_{50}-Wert von MGdth10 beim terminalen Ileum bei 68 μmol/l liegt, ist diese Substanz nicht wirklich potent und daher wahrscheinlich klinisch nicht relevant. Außerdem ist durch die leichte, aber doch vorhandene Wirkung auf die anderen Organe auch keine Organselektivität gegeben.

Um mögliche andere Wirkungen oder Wirkmechanismen zu bestimmen müsste man weitere pharmakodynamische und toxikologische Untersuchungen mit der Testsubstanz durchführen.

9 Literaturverzeichnis

Aktories K, Föstermann U, Hofmann F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, 10. überarbeitete Auflage

Dellas C (2011) Crashkurs Pharmakologie. Urban & Fischer Verlag, 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

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

Steinhilber, Schubert-Zsilavecz, Roth (2010) Medizinische Chemie. Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie. Deutscher Apotheker Verlag, 2. Auflage

Teuscher, Melzig, Lindequist (2012) Biogene Arzneimittel. Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7. Auflage

Thews, Mutschler, Vaupel (1982) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. Lehrbuch für Pharmazeuten und Biologen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2. Auflage

Tortora GJ, Derrickson BH (2008) Anatomie und Physiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH und Co KGaA

10 Curriculum vitae

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Hannes Höller
Anschrift:	Liebhartsgasse 18/7; 1160 Wien
Geburstag:	05.03.1989
Geburtsort:	Brixen (IT)

Berufserfahrungen

März-Juli 2013:	Befristeter Arbeitsvertag Schlangen Apotheke Wien]
Sommer 2012:	Praktikum im Labor des Sennereiverband Südtirol]
Sommer 2011:	Chemienachhilfe bei Nachhilfeinstitut „Pegasus“]
Sommer 2011:	Praktikum St. Anna Apotheke]
Sommer 2010:	Aushilfe in einem Zeitungsgeschäft]
Sommer 2008:	Befristeter Arbeitsvertrag im Labor des Sennereiverband Südtirol]
Sommer 2007:	Praktikum im Labor des Sennereiverband Südtirol]
Sommer 2006:	Praktikum im Labor des Sennereiverband Südtirol]
Sommer 2005:	Praktikum im Labor des Sennereiverband Südtirol]

Schul- und Berufsbildung

2009:	Universität Wien (Pharmazie)
2004-2009:	Humanistisches Gymnasium Walther von der Vogelweide (Neusprachen)
2003-2004:	Realgymnasium Bozen
2000-2003:	Realgymnasium Bozen
1995-2000:	Volksschule Deutschnofen

Sprachen und sonstige Kentnisse

Muttersprache:	Deutsch
sonstige Sprachen:	Italienisch, Englisch, Französisch
sonstige Diplome:	A-Diplom der Zweisprachigkeitsprüfung (Deutsch, Italienisch)
Führerschein:	Klasse B

22. Juni 2015