



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Pharmakologisches Screening eines neu synthetisierten  
Thiazol-Derivats (MGdth6) an isolierten Organen von  
Meerschweinchen“

verfasst von / submitted by

Manuel Vrhel

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

Wien, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes, sowie für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre während der praktischen Arbeit bedanken. Bei jedem Problem stand er mir sofort mit Rat und Tat zur Seite und hat dadurch maßgeblich zum Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen.

Für die Synthese und Bereitstellung meiner Testsubstanz danke ich dem Department für Pharmazeutische Chemie, besonders Herrn DI(FH) Mario Gabriel aus der Arbeitsgruppe von Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Erker.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Peter Höflich für die gute und fürsorgliche Betreuung der Meerschweinchen, sowie für seine immer gute Laune an jedem Arbeitstag.

Meinen Eltern, Maria und Gerhard Vrhel, sowie meinen Großeltern, Maria und Kurt Wintersberger, möchte ich ganz besonders für die emotionale und finanzielle Unterstützung in den vergangenen Jahren danken, ohne diese mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Vanessa für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe während meines Studiums bedanken, ohne diese mein Studium wesentlich länger gedauert hätte.

**DANKE**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZIEL DER DIPLOMARBEIT</b> .....	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
2.1 COLON IRRITABILE.....	2
2.1.1 <i>Spasmolytika</i> .....	2
2.1.2 <i>Stickstoffmonoxid</i> .....	5
2.2 ARTERIELLE HYPERTONIE .....	6
2.3 PULMONALE HYPERTONIE.....	6
2.4 KORONARE HERZKRANKHEITEN.....	7
2.4.1 <i>Herzinsuffizienz</i> .....	7
2.4.2 <i>Angina pectoris und Myokardinfarkt</i> .....	9
2.3 ANATOMIE DER ORGANE .....	10
2.3.1 <i>Anatomie des Herzens</i> .....	10
2.3.2 <i>Physiologie des Darms</i> .....	12
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
3.1 VERSUCHSTIERE .....	13
3.2 MGDTH6 .....	14
3.3 LÖSUNGSMITTEL .....	15
3.4 LÖSUNGEN FÜR DIE VERSUCHE .....	17
3.4.1 <i>Tyrode</i> .....	17
3.4.2 <i>Kaliumchloridlösung</i> .....	18
3.5 ISOLIERUNG DER ORGANE .....	19
3.5.1 <i>Isolierung und Präparation des terminalen Ileums</i> .....	19
3.5.2 <i>Isolierung und Präparation der Aorta descendens</i> .....	20
3.5.3 <i>Isolierung und Präparation des Atrium dextrum</i> .....	21
3.5.4 <i>Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln</i> .....	22
3.5.5 <i>Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis</i> .....	23
3.6 VERWENDETE APPARATUREN .....	24
3.6.1 <i>Apparatur A</i> .....	25
3.6.2 <i>Apparatur B</i> .....	27
3.6.3 <i>Kraftwandler</i> .....	29

3.7 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE.....	30
3.7.1 <i>Atrium dextrum</i> .....	30
3.7.2 <i>Musculus papillaris</i> .....	32
3.7.3 <i>Aorta descendens</i> .....	33
3.7.4 <i>Arteria pulmonalis</i> .....	34
3.7.5 <i>Terminales Ileum</i> .....	35
3.7.6 <i>Untersuchung des Wirkmechanismus von MGdth6</i> .....	36
3.8 AUSWERTUNG UND STATISTIK .....	37
3.8.1 <i>Atrium dextrum und Musculus papillaris</i> .....	37
3.8.2 <i>Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum</i> .....	38
3.8.3 <i>Statistik</i> .....	38
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
4.1 ERGEBNISSE DER TESTSUBSTANZ MGDTH6.....	39
4.1.1 <i>Atrium dextrum</i> .....	39
4.1.2 <i>Musculus papillaris</i> .....	42
4.1.3 <i>Aorta descendens</i> .....	45
4.1.4 <i>Arteria pulmonalis</i> .....	48
4.1.5 <i>Terminales Ileum</i> .....	51
4.2 UNTERSUCHUNG DES WIRKMECHANISMUS VON MGDTH6 AM TERMINALEN ILEUM.....	54
4.2.1 <i>Effekt von MGdth6 in zusammen mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum</i>	54
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
5.1 EINFLUSS VON MGDTH6 AUF ORGANE MIT GLATTER MUSKULATUR .....	58
5.1.1 <i>Einfluss von MGdth6 auf die Aorta descendens</i> .....	59
5.1.2 <i>Einfluss von MGdth6 auf die Arteria pulmonalis</i> .....	59
5.1.3 <i>Einfluss von MGdth6 auf das terminale Ileum</i> .....	59
5.2 EINFLUSS VON MGDTH6 AUF DIE HERZMUSKULATUR .....	60
5.2.1 <i>Einfluss von MGdth6 am Atrium dextrum</i> .....	60
5.2.2 <i>Einfluss von MGdth6 am Musculus papillaris</i> .....	60
5.3 UNTERSUCHUNG DES MÖGLICHEN WIRKMECHANISMUS VON MGDTH6.....	61
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>63</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>
<b>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>

<b>10. DIAGRAMMVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>11. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>68</b>

## 1. Ziel der Diplomarbeit

Das Ziel der Diplomarbeit war es, die biologische Aktivität einer neu synthetisierten Substanz (MGdth6), welche vom Department Pharmazeutische Chemie zur Verfügung gestellt wurde, an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen.

Zur Durchführung der Versuche, wurden isolierte Organe der quergestreiften und der glatten Muskulatur verwendet. Als Organe der glatten Muskulatur fanden Aorta descendens, Arteria pulmonalis und das terminale Ileum Verwendung. Bei der quergestreiften Muskulatur kamen der rechte Vorhof sowie die Papillarmuskeln zum Einsatz.

Sowohl die Aorta descendens, als auch die Arteria pulmonalis wurden nach Zugabe der Testsubstanz auf einen vasodilatierenden Effekt getestet. Beim Darm hingegen wurde auf einen spasmolytischen Effekt geachtet. Am Vorhof stand die Änderung der Chronotropie im Vordergrund und am Papillarmuskel die Änderung der Ionotropie.

Optimal wäre, wenn eine Wirkung an nur einem Organ nachzuweisen ist, da jegliche Wirkung auf andere Organe, Nebenwirkungen darstellen würden.

Das Testen der einzelnen Organe, mittels der neuen Substanz, ermöglicht eine Weiterentwicklung beziehungsweise Verbesserung der Leitstruktur, sollte diese eine gewünschte Wirkung an einem der Organe zeigen. Zudem wird eine wirkungslose, oder eine an zu vielen Organen wirkende Leitstruktur früh erkannt und die Weiterentwicklung dieser Substanz kann beendet werden.

Ein weiterer positiver Effekt dieser Vorgehensweise ist, dass nur Substanzen mit gesicherter positiver Wirkung im Tierversuch getestet werden, wodurch eine Verringerung der Lebendversuchstiere erzielt werden kann.

## **2. Einleitung**

Eine Wirkung von MGdth6 an einem der zuvor genannten Organe, könnte eine weitere Untersuchung und möglichen medizinischen Einsatz der Substanz bedeuten. Aufgrund der untersuchten Organe könnte eine Verwendung der Testsubstanz für folgende Bereiche in Betracht gezogen werden:

### **2.1 Colon irritabile**

Das Reizdarmsyndrom gehört zu den häufigsten gastroenterologischen Krankheiten, wobei Frauen etwa zweimal häufiger betroffen sind als Männer. Unter diesem Krankheitsbild versteht man vom Dickdarm ausgehende Funktionsstörungen und Schmerzen, denen keine organische Ursache zu Grunde liegen (Mutschler et al 2012). Häufig sind die Beschwerden mit psychischen Störungen, wie zum Beispiel einer Somatisierungsstörung assoziiert. Neben Schmerzen und Funktionsstörungen kann es auch zu geringgradigen Entzündungen der Mucosa, erhöhter Durchlässigkeit der Mucosa und einem gestörten Immungleichgewicht kommen (Aktoris et al 2013).

Die Therapie ist symptomorientiert und oft probatorisch, bis es zu einer Besserung kommt. Bei Obstipationen können Füll- und Quellmittel, osmotische und stimulierende Laxantien und Linaclotid die Beschwerden lindern. Diarrhöen lassen sich durch Loperamid oder Probiotika behandeln. Sind abdominale Schmerzen das vorherrschende Syndrom, so können Spasmolytika zum Einsatz kommen (Aktoris et al 2013).

#### **2.1.1 Spasmolytika**

Als Spasmolytika werden Arzneimittel bezeichnet, welche krampflösende Eigenschaften besitzen. Durch ihre Anwendung werden Spannungszustände beziehungsweise Verkrampfungen der glatten Muskulatur gelöst. Daraus ergeben sich als Anwendungsgebiete Spasmen im Bereich der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, der Galle, der Harnwege, der Bronchien und der Gefäße. Es wird in neurotrope und myotrope Spasmolytika unterschieden (Mutschler et al 2012).

Muskeltrope Spasmolytika zeigen einen direkten Angriff an der glatten Muskulatur (Estler 1989). Die Wirkung muskeltroper Spasmolytika beruht auf der Unterdrückung phasischer sowie tonischer Kontraktionen glattmuskulärer Organe. Diese Pharmaka zeigen weder eine stimulierende, noch eine hemmende Wirkung auf die Rezeptoren der Transmitter des vegetativen Nervensystems (Estler et al 2007).

Es gibt allerdings Verbindungen, welche sowohl eine anticholinerge als auch eine muskulotrop spasmolytische Komponente im gleichen Molekül vereinigen. Im weiteren werden ausgewählte muskeltrope Spasmolytika behandelt:

Bei Papaverin handelt es sich um ein Alkaloid, welches durchschnittlich zu 0,8% im Opium enthalten ist. Ebenso wie Morphin leitet es sich vom Isochinolin ab, zeigt aber keine zentrale Wirkung. Aufgrund der Phosphodiesterase-Hemmung wirkt es erschlaffend auf die glatte Muskulatur, so sprechen die Gefäßmuskeln einschließlich Koronar- und Hirngefäße, die Muskulatur der abführenden Harn- und Gallenwege, die Bronchial- und Darmmuskulatur mit einer Verminderung ihres Tonus auf Papaverin an. Obwohl Papaverin aus dem Intestinaltrakt resorbiert wird, ist eine parenterale Zufuhr in einer Dosierung von 0,05-0,2 mg mehrmals täglich vorzuziehen. Aufgrund eines geringeren Nebenwirkungsprofil sollte die Injektion langsam erfolgen, da kardiovaskuläre Nebenwirkungen auftreten können. Papaverin wirkt am Herzmuskel negativ dromotrop, daraus resultiert eine Verlängerung der Refraktärzeit mit etwaigen Arrhythmien. Durch eine periphere Dilatation wirkt Papaverin blutdrucksenkend. Heutzutage ist die Anwendung von Papaverin aufgrund des Nebenwirkungsprofil obsolet (Kuschinsky & Lüllmann 1971 & 1998).

Triopramid ist ein neueres Spasmolytikum, welches ebenfalls über die Phosphodiesterase wirkt. Nebenwirkung treten vor allem im Bereich des Zentralnervensystems auf. Es kann zu Schläfrigkeit, Benommenheit und Schwindel kommen. Weiteres ist auch auf einen Abfall des Blutdrucks zu achten (Oberdisse 2002).

Neben den bereits erwähnten Spasmolytika gibt es noch Mebeverin, Drofefin und Oxybutznin, welche zur Behandlung von Spasmen im Magen-Darm-Trakt verwendet werden (Oberdisse 2002).

Neurotrope Spasmolytika hemmen muskarine Acetylcholin-Rezeptoren, wodurch Acetylcholin nicht mehr am Rezeptor binden kann. Durch die Hemmung des Parasympathikus werden sie auch als Parasympathomimetika bezeichnet (Forth et al 2013).

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, welcher unter anderem für den Speichelfluss, Schwitzen und auch für die Darmperistaltik verantwortlich ist. Durch die Hemmung dieses Transmitters kommt es folglich zu einer spasmolytischen Wirkung auf den Darm.

Atropin und Scopolamin sind Tropan-Alkaloide von Vertretern der Familie der Solanaceae. Typische Vertreter sind *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* und *Datura stramonium*. Atropin besitzt eine spasmolytische Wirkung im Bereich des Magen-Darm-Traktes und kann sowohl oral als auch intravenös appliziert werden. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Kontraktion der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, der Gallenwege und der Harnblase sowie zur Hemmung der Magensäuresekretion. Atropin hemmt auch andere Muskarinrezeptoren, wodurch es zu den für Atropin typische Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit und Tachykardie kommt (Mutschler et al 2012).

Scopolamin wirkt bereits in kleiner Dosierung zentraldämpfend und wird hauptsächlich bei Reisekrankheit eingesetzt. Neben der zentraldämpfenden Wirkung besitzt Scopolamin auch eine antiemetische Wirkung. Atropin wirkt in therapeutischer Dosierung nur wenig auf das Zentralnervensystem, aber in höherer Dosierung erregend mit Orientierungsproblematik sowie Halluzinationen (Mutschler et al 2012).

Bei Butylscopolamin handelt es sich um ein Derivat des Tropan-Alkaloids Scopolamin und bei Ipratropium um ein Derivat des Atropins. Durch die Blockade von muscarinen Acetylcholin-Rezeptoren kommt es zur gefäßerweiternden Wirkung (pharmawike.ch). Diese beiden Substanzen können die Bluthirnschranke kaum durchdringen, wodurch kaum mit zentralnervösen Nebenwirkungen zu rechnen ist, im Gegensatz zum Scopolamin.

### 2.1.2 Stickstoffmonoxid

Durch Aktivierung der Guanylylcyclase, kommt es zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid, welches an die löslichen Isoform der Guanylylcyclase (GC-S) binden kann. Dieser Enzymrezeptor bildet aus GTP den Second Messenger cGMP und in weiterer Folge kommt es über die Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G zu einer Gefäßrelaxation (Aktories et al 2013).

Die Freisetzung sowie die Bildung von NO wird von der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase gesteuert. Bei der durch die eNOS katalysierten Reaktion wird die Guanidin-Gruppe der Aminosäure L-Arginin in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert. Es entstehen die beiden Produkte Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin in gleichen Mengen (Aktories et al 2012).

Stickstoffmonoxid ist ein stark vasodilatierender Stoff, welcher unter anderem bei Asthma, COPD und Angina Pectoris eingesetzt wird.

Substanzen, welche über die Freisetzung von NO gefäßerweiternd wirken, sind unter anderen Glycerolnitrat, Isosorbidmononitrat und Isosorbiddinitrat. Eine Sonderstellung hat Molsidomin, welches ein Prodrug ist und ohne Enzymbeteiligung in der Leber zum Linsidomin verstoffwechselt wird. Davon wird Stickstoffmonoxid abgespalten welches vasodilatierend wirkt.

Bei allen Substanzen, außer Molsidomin, kommt es zur sogenannten Nitrattoleranz. Dies bedeutet, dass die Gefäße unempfindlich gegenüber Stickstoffmonoxid werden. Um dies zu verhindern sollte immer ein NO freies Intervall eingehalten werden.

## 2.2 Arterielle Hypertonie

Als Hypertonie bezeichnet man eine die Norm überschreitende, anhaltende Steigerung des arteriellen Blutdrucks. Als optimal ist ein systolischer Blutdruck von <120 mm Hg und ein diastolischer Blutdruck von <80 mm Hg anzusehen. Ab einem systolischen Wert von 140 mm Hg und einem diastolischen von 90 mm Hg spricht man von Hypertonie. Alle Werte, welche zwischen den optimalen Werten und den erhöhten Werten liegen, können als normaler Blutdruck angesehen werden. Bekannte Folgen einer nicht behandelnden Hypertonie sind Schlaganfall, koronare Herzkrankheiten, Herzinsuffizienz sowie eine Niereninsuffizienz.

Zur Behandlung einer Hypertonie werden neben der in erster Linie eingesetzten ACE-Hemmer und Aldosteronantagonisten auch  $\alpha$ -Adrenozeptorblocker,  $\beta$ -Adrenozeptorblocker, Antisymphotonika und Calciumkanalblocker eingesetzt (Mutschler et al 2012).

## 2.3 Pulmonale Hypertonie

Unter pulmonaler Hypertonie versteht man eine Zunahme des Gefäßwiderstandes und des Blutdruckes im Lungenkreislauf, dass eine Rechtsherzinsuffizienz zu Folge hat. Sie ist durch einen mittleren pulmonalarteriellen Blutdruck von > 21 mm Hg in Ruhe oder > 28mm Hg unter Belastung gekennzeichnet. Warum es zu dieser Erkrankung kommt ist weitgehend ungeklärt. Pathophysiologisch kommt es zu einer Proliferation von Endothel und glatter Muskulatur und zu einem Überwiegen von vasokonstriktorisches Faktoren. Eine Möglichkeit, welche durch den Arzneistoff Bosentan bereits genutzt wird, ist die Hemmung des Endothelin 1. Dieses gilt als der stärkste Vasokonstriktor und ist an der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie beteiligt. Alle vasodilatierenden Substanzen sind somit potentielle Wirkstoffe einer pulmonalen arteriellen Hypertonie.

Die pulmonale Hypertonie ist ein schweres Krankheitsbild mit einer schlechten Prognose für den Betroffenen, da die 5-Jahres-Überlebensrate mit 30-50% sehr gering ist (Mutschler et al 2012).

## **2.4 Koronare Herzkrankheiten**

Wie alle Arterien des Körpers können auch Koronararterien und zwar vor allem die größeren Koronararterienäste von einer Arteriosklerose betroffen sein. Die Koronarsklerose ist die wichtigste Ursache für koronare Herzkrankheiten, es kommt zur Einengung der koronaren Strombahn oder, durch zusätzliche Thrombenbildung zu teilweisem oder auch vollständigen Verschluss von Koronararterien. Etwa 1/3 aller Todesfälle sind auf koronare Herzerkrankungen zurück zu führen. Als gesicherte Risikofaktoren gelten Rauchen, Übergewicht, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und Diabetes mellitus. Diese genannten Faktoren treten oft gemeinsam in Form eines metabolischen Syndroms auf (Mutschler et al 2012).

### **2.4.1 Herzinsuffizienz**

Von einer Herzinsuffizienz spricht man ab einer Ejektionsfraktion von 0,45. Dies hat eine eingeschränkte körperliche Belastbarkeit aufgrund der kardialen Funktionsstörung zur Folge. Das bedeutet, dass das Herz trotz ausreichendem venösem Angebot keine ausreichende Pumpleistung aufweisen kann, um den Körper mit Blut und dadurch mit Sauerstoff zu versorgen. Je nachdem in welchem Teil des Herzens eine Insuffizienz auftritt wird von einer Rechts-, Links-, oder Rechts-Links-(=global) Insuffizienz gesprochen. Je nachdem in welchem Zeitraum sich die Herzinsuffizienz entwickelt unterscheidet man eine akute und eine chronische Herzinsuffizienz. Je nach Schwere der Erkrankung wird in 4 Klassen eingeteilt, den sogenannten NYHA I-IV Klassen (nach der New York Heart Association).

**Tabelle 1:** NYHA - Klassen

NYHA I	Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe aber bei stärkerer körperlicher Belastung (siehe NYHA I).
NYHA III	Herzerkrankung mit hochgradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung löst Störungen aus (siehe NYHA I).
NYHA IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe.

Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung im Alter. Nahezu 10% der über 80-jährigen leiden an einer Herzinsuffizienz. Bei erkrankten Personen mit einer schweren von NYHA IV beträgt die Letalität bis zu 50% und ist damit mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen vergleichbar. Ursachen einer chronischen Herzinsuffizienz sind vor allem koronare Herzkrankheiten, Hypertonie und Herzrhythmusstörungen. Eine akute Form kann nach einem Myokardinfarkt, einem Klappenriss, einer Myokarditis oder einer Lungenembolie auftreten. Aufgrund der verminderten Auswurfleistung kommt es zu einer Aktivierung des RAAS-Systems und des Sympathikus, wodurch ein Teufelskreis entsteht. Die Therapie richtet sich nach der Schwere der Erkrankung und wird mit ACE-Hemmern, Sartanen, Betablockern und Herzwirksamen Glykosiden behandelt (Mutschler et al 2012).

## 2.4.2 Angina pectoris und Myokardinfarkt

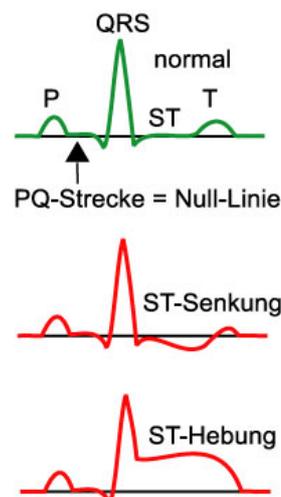
Bei der Angina pectoris kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch bei reduzierter Koronarreserve. Bei einem Anfall tritt ein charakteristisches Druckgefühl hinter dem Brustbein auf sowie ein Schmerz, welcher oft in die linke Schulter und den Oberarm ausstrahlt.

Besonders betroffen sind bei einem Anfall die endokardnahen Schichten des linken Herzens, da der linksventrikuläre enddiastolische Ventrikeldruck ansteigt, wodurch der Koronarwiderstand zunimmt und die Durchblutung sinkt.

Die Ursache einer Angina pectoris ist fast immer eine Koronarsklerose. Im Allgemeinen wird zwischen einer stabilen, einer instabilen und einer Sonderform, der vasospastischen Angina pectoris unterschieden. Für die Therapie werden vor allem Nitrate eingesetzt.

Tritt ein Myokardinfarkt auf, so wird die Koronardurchblutung in einem Teil des Herzens akut unterbrochen, dass zu Myokardnekrosen führt. Symptome sind ein Druck- und Schmerzgefühl im Brustkorb, Blutdruckfall, Fieber, Leukozytose, Blutzuckeranstieg, Übelkeit und erhöhte Muskelenzymkonzentrationen. Im Gegensatz zur Angina pectoris wo es im EKG zu einer ST-Strecken Senkung kommt, tritt beim Myokardinfarkt eine ST-Strecken Erhöhung auf. Die Behandlung erfolgt durch eine Sedierung des Patienten, Gabe von Fibrinolytika oder einen chirurgischen Eingriff (Mutschler et al 2012).

**Abbildung 1:** EKG ST-Strecke



(<http://www.rudolf-deiml.homepage.t-online.de>)

## **2.3 Anatomie der Organe**

### **2.3.1 Anatomie des Herzens**

Das Herz, das Organ das uns am Leben hält ist, gemessen an seiner Bedeutung, relativ klein. Ein passender Vergleich wäre, dass das Herz in etwa so groß ist wie die geballte Faust des jeweiligen Menschen. Die Länge beträgt in etwa 12 cm, die Breite 9 cm und die dickste Stelle ist in etwa 6 cm dick. Das Gewicht des menschlichen Herzens beträgt 250-300 Gramm (Tortora & Derrickson 2006).

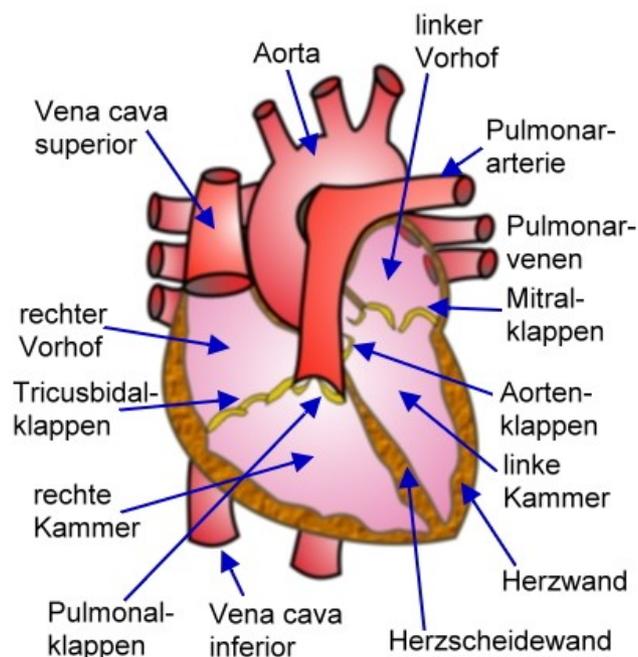
Das Herz liegt im vorderen unteren Teil des Mittelfellraums, das beidseits von den äußeren Pleurablättern der Lungenflügel begrenzt ist. Unten wird das Herz vom Diaphragma begrenzt, dem das Herz teilweise aufliegt. An der Vorderseite berührt das Herz das Brustbein und die anschließenden Rippenknorpel und hinten ist der Ösophagus angelagert (Thews et al 2007).

Das Herz gliedert sich in das rechte und das linke Herz, welches jeweils aus einem Vorhof und einer größeren Kammer besteht. In den rechten Vorhof gelangt das sauerstoffarme Blut aus den großen Hohlvenen und wird weiter in die rechte Herzkammer geleitet. Von der rechten Herzkammer wird das Blut über den Truncus pulmonalis (Lungenschlagader) in die Lunge transportiert. Die Arteria pulmonalis ist eine Abzweigung der Truncus pulmonalis. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt über vier Lungenvenen in den linken Vorhof und weiter über die linke Herzkammer in die Aorta und in den Körper beziehungsweise in den großen Kreislauf (Silbernagel et al 2009).

Die Herzwand ist aus drei Schichten aufgebaut, dem Epikard als äußerste Schicht, dem Myokard in der Mitte und der innersten Schicht, dem Endokard. Das Myokard besteht aus Herzmuskelgewebe und ist als Hauptbestandteil der Herzwand für die Pumpleistung verantwortlich. Das Herz besteht aus vier Kammern, die beiden oberen werden als Atrien (Vorhöfe) bezeichnet und die beiden unteren als Ventrikel. Das Herz wird von einem Herzbeutel, dem Perikard umschlossen (Tortora & Derrickson 2006).

Die rhythmischen Aktionen des Herzens werden von Erregungen ausgelöst, deren Ursprung normalerweise im Sinusknoten zu finden ist, welcher sich im rechten Vorhof befindet. Genauer gesagt an der Einmündung der Vena cava superior. Die Fähigkeit dieser Zellen, in bestimmten Zeitabfolgen spontan Erregung zu bilden, ist die Grundlage für die Selbststeuerung der Herzschlagfolge. Die Erregung breitet sich über das Arbeitsmyokard beider Vorhöfe aus und greift dann auf den Atrioventrikularknoten über, der sich am Boden des rechten Vorhofs in Septumnähe befindet. Vom AV-Knoten aus erreicht die Erregung den Stamm des His-Bündels, der das bindegewebige Herzskelett durchbricht und die einzige erregungsleitende Verbindung zwischen Vorhöfen und Kammern darstellt. Das His-Bündel teilt sich in den rechten und linken Kammerschenkel, welche unter dem Endokard zur Basis der Papillarmuskeln ziehen. Die Endaufzweigung des Systems bilden die Purkinje-Fasern, welche keine deutlichen Grenzen zum Arbeitsmyokard haben. Die Erregung gelangt nahezu gleichzeitig zu vielen Orten der subendokardialen Myokardschichten und von dort breitet sie sich langsam über das gesamte Arbeitsmyokard aus (Thews et al 2007).

**Abbildung 2:** Anatomie des Herzens



(<http://www.eurocatfancy.de>)

### 2.3.2 Physiologie des Darms

Die wichtigsten Verdauungs- und Respirationsvorgänge finden im Dünndarm statt und deshalb ist seine Struktur speziell dieser Aufgabe angepasst. Nicht nur seine 3 Meter Länge verschaffen dem Dünndarm eine beachtliche Oberfläche, sondern auch Kerckring-Falten, Zotten (Villi) und Mikroville, die seine Oberfläche noch weiter vergrößern. Der Dünndarm beginnt am Pylorusphinkter beim Magen, windet sich durch den oberen und mittleren Bauchraum und mündet in den Dickdarm. Er wird in drei Bereiche unterteilt, das Duodenum (Zwölffingerdarm), welches am Pylorusphinkter des Magens beginnt und nach etwa 25 cm mit dem Jejunum (Leerdarm) verschmilzt. Das Jejunum ist etwa einen Meter lang und erstreckt sich bis zum Ileum. Das Ileum ist mit etwa zwei Meter der längste Teil des Dünndarms und endet in den Dickdarm (Silbernagel et al 2009).

Die Wand des Dünndarms besteht aus vier Schichten, der Mucosa, Submucosa, Muscularis und Serosa. Die Epithelschicht der Dünndarmmucosa besteht aus vielen verschiedenen Zellarten. Die Resorptionszellen resorbieren und verdauen Nährstoffe im Dünndarmspeisebrei, die Becherzellen produzieren Schleim (Muzine). Die Dünndarmmucosa ist übersät mit vielen Spalten, welche mit Drüsenepithel ausgekleidet sind, die sogenannten Darmdrüsen, die den Darmsaft sezernieren. Die Brunner-Drüsen in der Submucosa sezernieren einen alkalischen Schleim, der die Magensäure im Speisebrei neutralisieren soll (Tortora & Derrickson 2006).

Durch die Bewegung des Dünndarms wird die Nahrung beziehungsweise der Nahrungsbrei mit den Verdauungssäften aus Pankreas und Galle in Kontakt gebracht und intensiv durchmischt. Die Durchmischungsbewegung im Dünndarm wird in erster Linie durch die Schrittmacher-Automatie geregelt. Die Frequenz nimmt immer weiter ab, wodurch die Verschiebung des Darminhaltes gewährleistet wird (Thews et al 2007).

Für peristaltische Wellen, welche den Inhalt zum Caecum befördern sind vor allem motorische Aktivitäten des enterischen Nervensystems verantwortlich und werden durch Dehnung der Darmwand ausgelöst. Auch die Zotten bewegen sich um den Darminhalt besser zu durchmischen (Thews et al 2007).

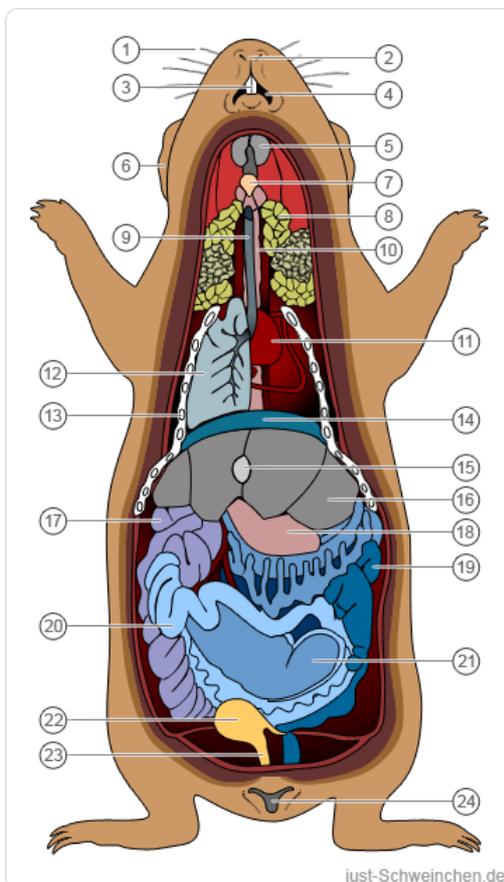
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sowohl männliche, als auch weibliche Meerschweinchen im Alter von 4 bis 12 Wochen verwendet. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 300 und 600 Gramm. Bei den Versuchen wurden Meerschweinchen verwendet, da die Proportionen der Organe, bezogen auf die Körpergröße, mit denen des Menschen vergleichbar sind. Ebenfalls sehr ähnlich sind die Ionenkanäle an den jeweiligen Organen.

Jeden Morgen, nach dem herstellen der Nährlösung, wurde ein Meerschweinchen durch einen gezielten Genickschlag getötet, welcher durch geschultes Personal durchgeführt wurde. Diese Art der Tötung eignet sich besonders gut, da der Exitus sofort Eintritt und das Tier weder Schmerz noch Stress verspürt.

**Abbildung 3:** Organe des Meerschweinchens

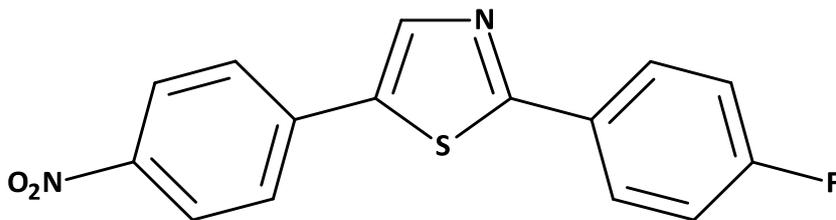


- 1 : Schnurr-/Tasthaare
- 2 : Nase
- 3 : Zähne (obere Schneidezähne)
- 4 : Mundhöhle
- 5 : Lymphdrüsen
- 6 : Ohren
- 7 : Kehlkopf
- 8 : Speicheldrüsen
- 9 : Luftröhre (hier verkürzt dargestellt)
- 10 : Speiseröhre (liegt hinter Luftröhre)
- 11 : Herz
- 12 : Lungenflügel (2. fehlt in Abb.)
- 13 : Rippen/Brustkorb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

### 3.2 MGdth6

Die Testsubstanz MGdth6 wurde am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien von Herrn DI(FH) Mario Gabriel aus der Arbeitsgruppe von Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Erker synthetisiert. Das Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien übernahm die Aufgabe, ein pharmakologisches Screening der Testsubstanz zu erstellen.

**Abbildung 4:** Chemische Struktur von MGdth6



MG = 300,31 g/mol

Nomenklatur: 2-(4-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)thiazol

### 3.3 Lösungsmittel

Um mit der zu testenden Substanz arbeiten zu können, musste diese in Lösung gebracht werden. Als Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO), ein organisches Lösungsmittel verwendet. DMSO kann selbst eine leichte Vasodilatation bewirken, worauf bei der Auswertung der Ergebnisse zu achten war.

Die Lösung der Testsubstanz wurde den Organbädern kumulativ zugegeben, bis eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol}$  erreicht war. Die Einwaage der Testsubstanz war für das jeweilige Fassungsvermögen der Organbäder zu berechnen. Es standen Organbäder mit einem Fassungsvermögen von 5 ml und 25 ml zur Verfügung.

**Tabelle 2:** Stammlösung

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Volumen Organbad	Einwaage Substanz (100 $\mu\text{mol/l}$ )
MGdth6	300,31	25 ml	0,75 mg
MGdth6	300,31	5 ml	0,18 mg

Von der bereiteten 100  $\mu\text{l}$  Stammlösung wurden zuerst 3  $\mu\text{l}$  entnommen und dem Organbad zugesetzt. Im Abstand von jeweils 45 Minuten wurden 7  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$  und 70  $\mu\text{l}$  zugegeben, sodass sich nach 180 Minuten 100  $\mu\text{l}$  der Stammlösung im Organbad befunden haben. Es wurde zwischen dem zugeben der Konzentrationen eine Zeitspanne von 45 Minuten gewählt, da davon auszugehen war, dass sich innerhalb dieser Zeitspanne ein Fließgleichgewicht eingestellt hatte.

Es wurde der Effekt gemessen, der von der jeweiligen Konzentration der Stammlösung auf die jeweiligen Organe des Meerschweinchens ausgeübt wurde. Die Konzentration lag nach der Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Stammlösung bei 3  $\mu\text{mol/l}$  und in weiterer Abfolge bei 10  $\mu\text{mol/l}$ , 30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tabelle 3:** Pipettierschema für eine Endkonzentration von 100 µmol/l

<b>Zugegebene Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>100 µl (MGdth6)</b>	<b>100 µmol/l</b>
3 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

### 3.4 Lösungen für die Versuche

#### 3.4.1 Tyrode

Zu Beginn der Arbeit wurde täglich eine physiologische Nährlösung, genannt Tyrode, hergestellt. Darin wurden die isolierten Organe des Meerschweinchens aufbewahrt, um diese optimal mit den benötigten Elektrolyten zu versorgen. Tabelle 1 veranschaulicht die Zusammensetzung der Tyrode im Detail.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der Tyrode

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

**Tabelle 5:** Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

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

Zu Beginn wurde die Glucose in einen 2 Liter fassenden Messkolben gefüllt und durch Zugabe der Lösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumhydrogencarbonat und Kaliumhydrogenphosphat gelöst. Im Anschluss wurde der Kolben etwas über die Hälfte mit Aqua destillata befüllt und geschüttelt, bevor er für 10 Minuten mit Carbogen beziehungsweise Oxymix begast wurde. Carbogen ist eine Mischung aus 95% Kohlenstoffdioxid und 5% Sauerstoff. Nach dem begasen, wurde Calciumchlorid langsam zu getropft, um das Ausfallen von schwerlöslichen Calciumsalzen zu verhindern. Bleibt die Lösung klar, haben sich keine Calciumsalze gebildet und der Kolben kann bis zur Markierung mit Aqua destillata aufgefüllt und geschüttelt werden. Bilden sich durch zu schnelle Zugabe von Calciumchlorid Calciumkristalle, so ist die Nährlösung zu verwerfen.

### 3.4.2 Kaliumchloridlösung

Für Versuche an der Aorta, der Arteria pulmonalis und dem terminalen Ileum wurde ebenfalls jeden Morgen eine Kaliumchloridlösung hergestellt. Durch Zugabe dieser Lösung erreicht man eine Vorkontraktion der jeweiligen Organe. Der Papillarmuskel wird durch elektrische Reize zur Kontraktion gebracht, der Vorhof durch den Sinusknoten, somit ist bei diesen beiden Organen die Zugabe einer Kaliumchloridlösung nicht vorgesehen. Es mussten zwei verschiedene Lösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt werden, eine für Aorta und Arteria pulmonalis und eine für das terminale Ileum.

**Tabelle 6:** Kaliumchloridlösung

Organ	KCl pro 100 ml	Lösungsmittel
terminales Ileum	0,45 g	Tyrode
Aorta	0,67 g	Tyrode
Arteria pulmonalis	0,67 g	Tyrode

KCl wurde mit Hilfe eines Wägeschiffchens genau gewogen und in einen 100 ml Messkolben übergeführt. Zum Auffüllen wurde die zuvor bereitete Nährlösung verwendet.

### 3.5 Isolierung der Organe

Unmittelbar nach Eintreten des Todes, wurde der Thorax des Tieres mit einer Operationszange geöffnet, das noch schlagende Herz samt Lungengewebe entnommen und in ein Becherglas mit Nährlösung übergeführt. Es war besonders wichtig, dass dieser Schritt schnell abläuft, da das Blut sonst im Herz stocken würde und dies die Präparate unbrauchbar machen würde.

**Abbildung 5:** Operationsbesteck



#### 3.5.1 Isolierung und Präparation des terminalen Ileums

Im nächsten Schritt wurde der Bauchraum des Tieres geöffnet und ein langes, in etwa 25 cm, Stück des terminalen Ileums isoliert. Zur besseren Orientierung wurde das jejunal gelegene Ende mit einem Faden abgebunden. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Darm in die Nährlösung transferiert und mit Carbogen begast.

**Abbildung 6:** terminales Ileum



Zur Durchführung eines Versuches, wurde vom Darm ein etwa 1 cm langes Stück schräg abgeschnitten und in eine Petrischale mit Korkplatte und Nährlösung übergeführt. Um Verfälschungen des Ergebnisses durch Verunreinigungen im Darm zu verhindern, wurde der Darm mit Hilfe einer Pipette kurz mit Tyrode gespült. Durch die zuvor schräg geschnittenen Enden wurden Stecknadeln gestochen und mit Hilfe eines Fadens Silberhacken daran befestigt. Es war darauf zu achten, dass das Loch des Darms nicht abgebunden wird, da die Versuche in diesem Fall nicht funktioniert hätten. Die Hacken dienten dazu, den Darm in der Apparatur zu befestigen.

### **3.5.2 Isolierung und Präparation der Aorta descendens**

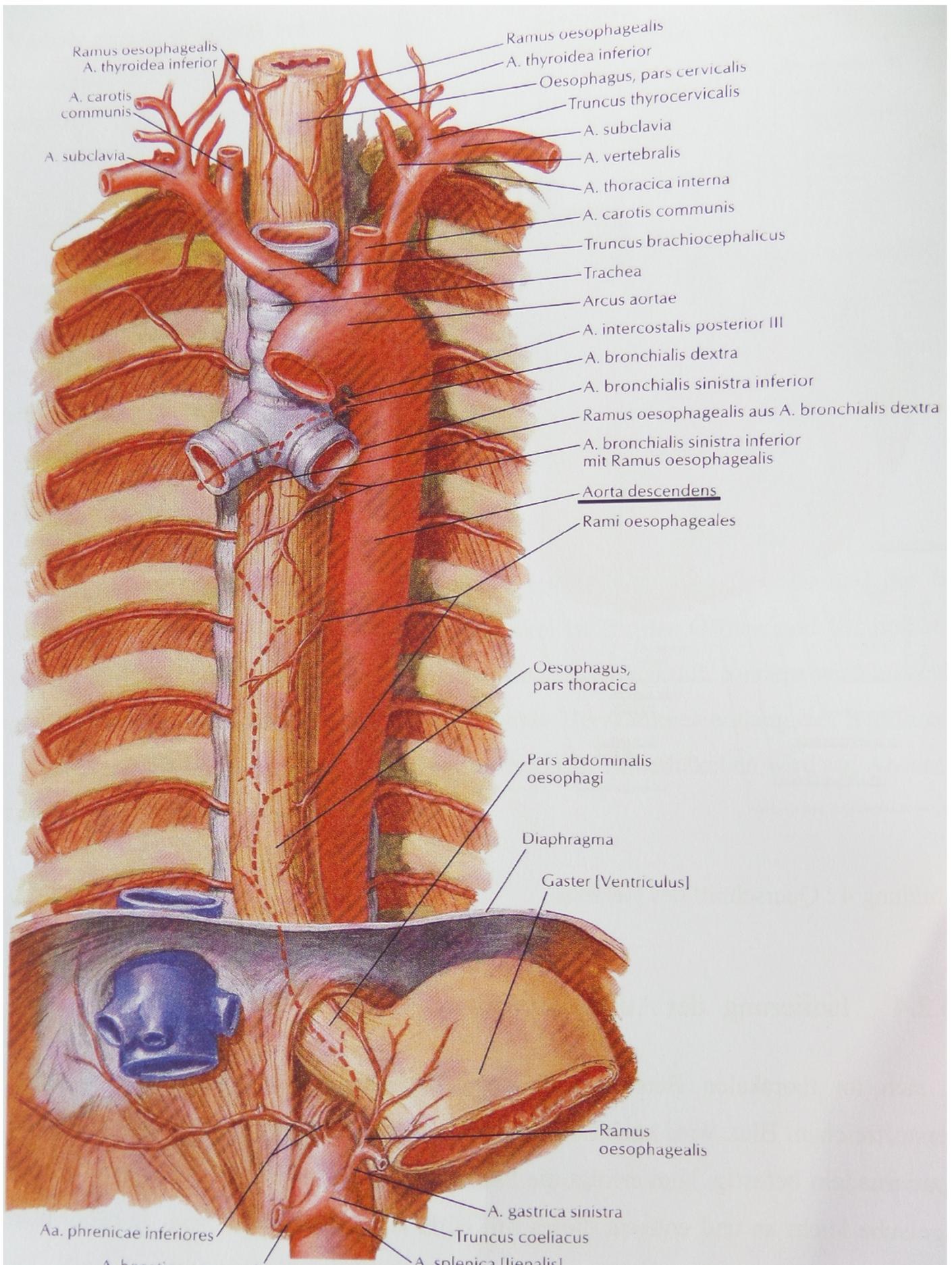
Nach der Entnahme des Herzens und des Darms, war es möglich die Aorta, welche entlang der Wirbelsäule liegt, aus dem Meerschweinchen zu extrahieren. Hierzu wurden die Rippen des Tieres gespreizt und die Wirbelsäule nach oben gedrückt. Es war besonders darauf zu achten die Aorta, welche ziemlich fest mit der Wirbelsäule verwachsen und von Fettgewebe umgeben ist, beim Extrahieren mit der Schere nicht zu Beschädigen.

Weiter musste die Aorta unter der Stereolupe mit Hilfe einer Federschere von Gewebsresten befreit werden, da jegliche Reste einen Störfaktor bei den darauffolgenden Versuchen dargestellt hätten. Die Aorta wurde in kleine Stücke geschnitten, welche in etwa die selbe Länge, wie Breite hatten und durch das Loch wurden sogenannte Dreieckshacken befestigt. Diese waren nötig, um die Aorta im weiteren Arbeitsverlauf in der Apparatur zu befestigen.

**Abbildung 7:** Aorta descendens



**Abbildung 8: Aorta descendens schematische Darstellung (Netter FH 2003)**



### 3.5.3 Isolierung und Präparation des Atrium dextrum

Das Herz wurde aus der Nährlösung entnommen und unter dem Mikroskop wurde Lungen- und Fettgewebe entfernt. Es war darauf zu achten den Sinusknoten, welcher sich im rechten Vorhof befindet nicht zu beschädigen, da dieser für den weiteren Versuch essentiell war. Es erfolgte die Abtrennung des rechten Vorhofes samt Sinusknoten und an beiden Enden wurde jeweils ein Silberhacken befestigt.

**Abbildung 9:** Atrium dextrum



### 3.5.4 Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln

Um zu den Papillarmuskeln zu gelangen, musste der rechte Ventrikel über der Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet werden. Es ist wichtig die Papillarmuskeln von den Pukinjefasern abzutrennen, da diese durch ihre Schrittmacheraktivität die weiteren Versuche stören würden. Am Ansatz des Papillarmuskel wurde einen Hacken befestigt und der Papillarmuskel isoliert.

**Abbildung 10:** Papillarmuskel



### 3.5.5 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis

Die Arteria pulmonalis wurde unter dem Mikroskop vom Truncus pulmonalis (=Lungenstamm) entnommen, welcher dem rechten Ventrikel entspringt. In der Regel lagen nur kleine Stücke der Arterie frei, wodurch nur ein bis zwei 2-3 mm lange Stücke verwendet werden konnten. Die Arterie wurde von Gewebsresten befreit und zur weiteren Verarbeitung an Dreieckshacken befestigt.

**Abbildung 11:** Auflichtmikroskop zur Präparation



**Abbildung 12:** Arteria pulmonalis



### **3.6 Verwendete Apparaturen**

Zur Durchführung der Versuche standen zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. Jeder Versuch am Papillarmuskel wurde an der Apparatur A durchgeführt, alle anderen Organe wurden an der Apparatur B getestet.

Durch die zuvor am jeweiligen Organ befestigten Silberhacken, war es möglich die Organe mit dem Kraftwandler zu verbinden, welcher ein mechanisches Signal in ein elektrisches umwandelt, an einen Verstärker weiterleitet und durch einen Schreiber auf Millimeterpapier zeichnet. Erst diese Abfolge macht eine weitere Analyse der Versuche möglich.

Es war von großer Bedeutung, die Temperatur und den pH-Wert, welcher durch eine exakte Zusammensetzung der Tyrode gesichert war, konstant zu halten, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Außerdem war es nötig die Organe im Organbad vorzuspannen und mit Sauerstoff zu versorgen, da auch dies Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Versuche hatte.

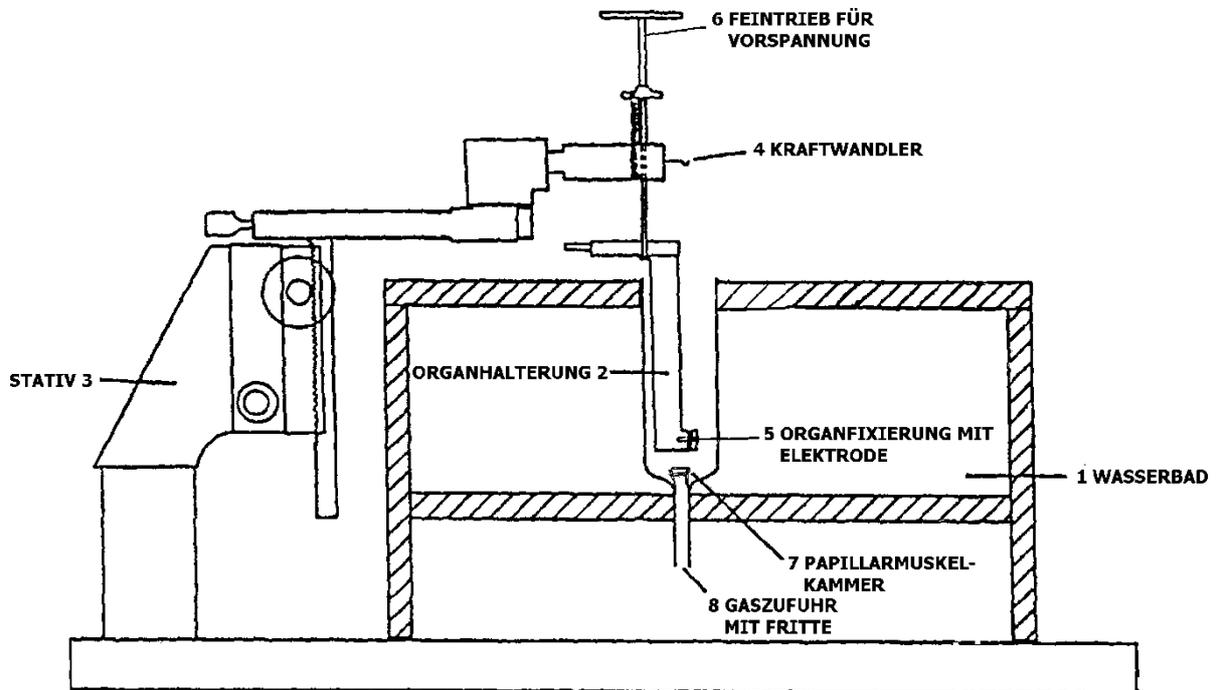
### 3.6.1 Apparatur A

Diese Apparatur wurde zur Durchführung von Versuchen am Papillarmuskel verwendet. Die Apparatur bestand aus einem Wasserbad und einer Muskelkammer, welche in das Wasserbad eintauchte. Dies war einer der Unterschiede zur Apparatur B, welche über ein externes Wasserbad verfügte. Der Feintrieb, die Organhalterung sowie der Kraftwandler waren an einem Stativ, welches sich neben dem Wasserbad befand, angebracht.

Abbildung 13: Apparatur A



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Apparatur A



Die Muskelkammer hatte ein Fassungsvermögen von 25 ml und bestand aus Acrylglas. Um zu Beginn des Versuches bereits physiologische Bedingungen gewährleisten zu können, wurde bereits 15 Minuten vor Beginn des Versuches die Muskelkammer mit Tyrode befüllt, mit Carbogen begast und durch das Wasserbad auf 35°C temperiert.

Durch den Silberhacken, welcher am Papillarmuskel befestigt war, konnte der Papillarmuskel an der Organhalterung, welche mit dem Kraftwandler verbunden war, befestigt werden. Das andere Ende des Papillarmuskel wurde zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen vorsichtig eingeklemmt. Der gesamte Muskel konnte nun in die Nährlösung eingetaucht und vorgespannt werden. Durch einen Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) konnte der Papillarmuskel elektrisch gereizt und zur Kontraktion angeregt werden. Die Ionotropie wurde über den Kraftwandler und durch einen Flachbettschreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

### 3.6.2 Apparatur B

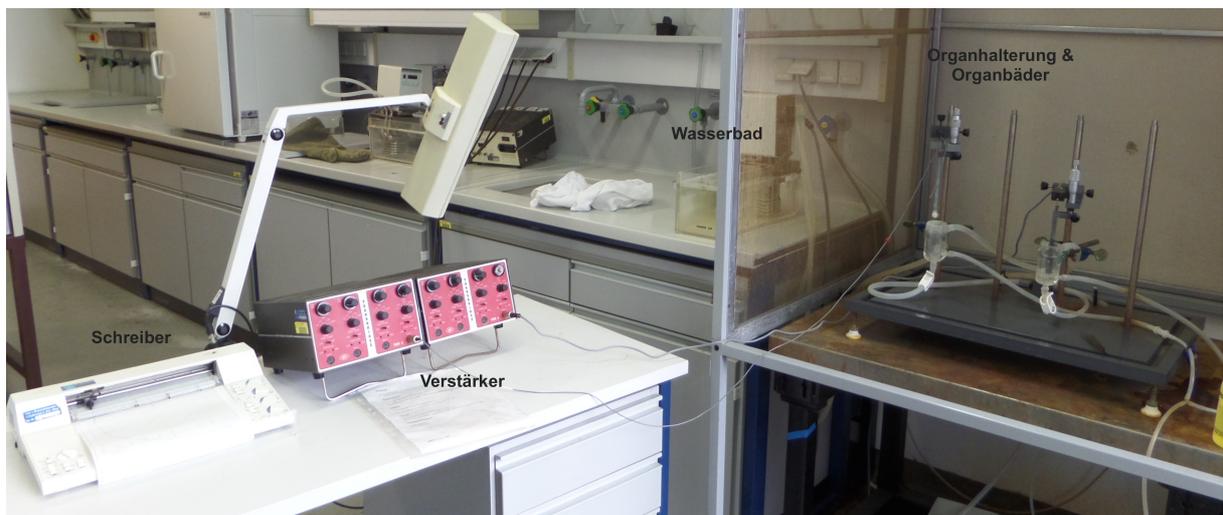
Für die restlichen Organe, sprich Atrium dextrum, terminales Ileum, Arteria pulmonalis und Aorta descendens fand die Apparatur B Verwendung. Mithilfe der Silberhacken beziehungsweise bei den Gefäßen mithilfe der Dreieckshacken, wurden die Organe an der Apparatur befestigt. Wie bei Apparatur A wurden auch hier vor Beginn des Versuches physiologische Bedingungen geschaffen, mit dem Unterschied, dass die Temperatur hier 37°C betrug.

Die Silberhacken beziehungsweise die Dreieckshacken sind auch hier mit einem Kraftwandler und in weiterer Folge mit einem Flachbettschreiber verbunden.

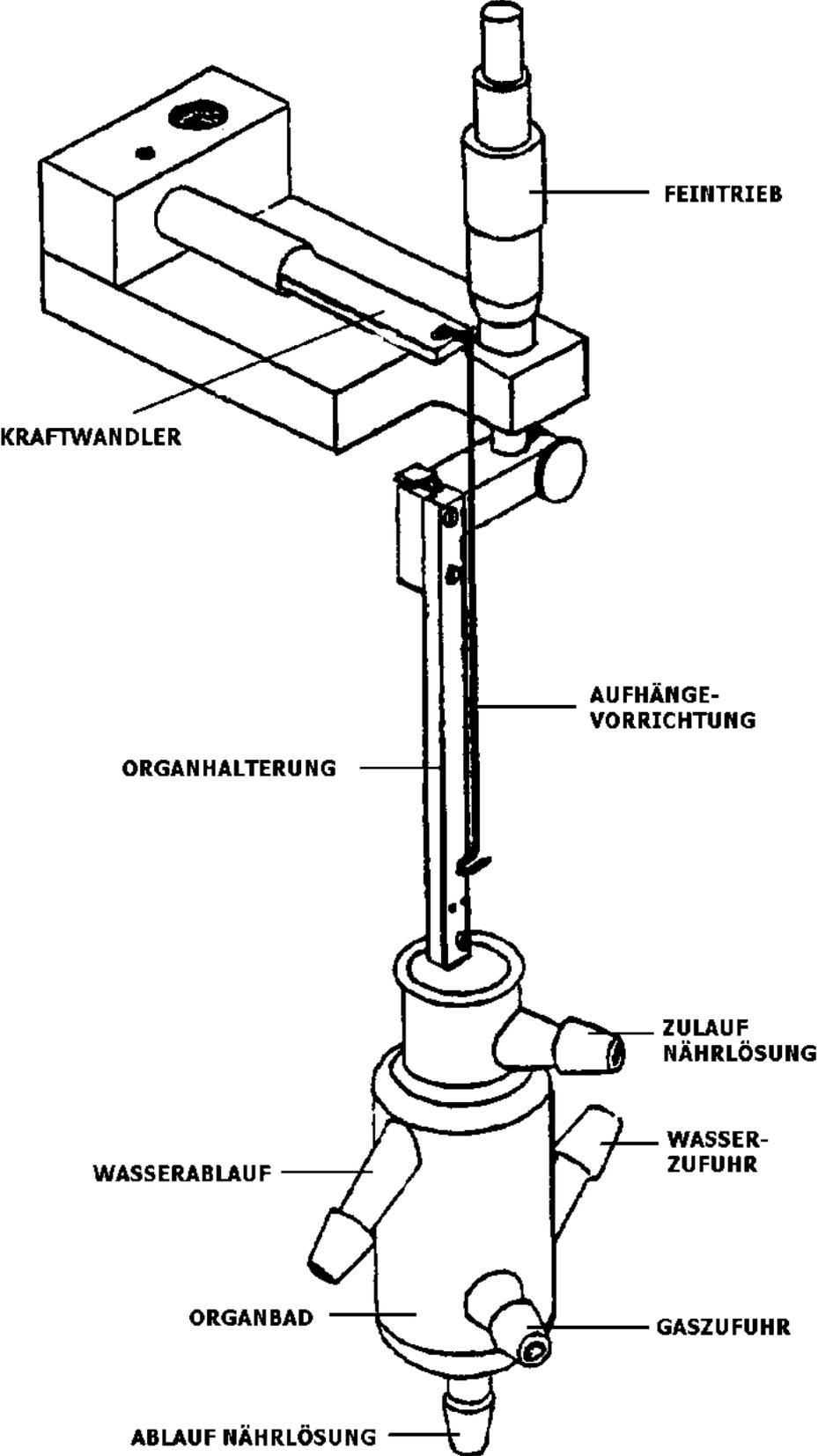
Beim Darm war es somit möglich auf eine spasmolytische Wirkung der Testsubstanz zu prüfen, bei Aorta descendens und Arteria pulmonalis auf eine vasodilatierende und beim Atrium dextrum konnte ein Einfluss auf die Chronotropie bestimmt werden.

Wie beim Papillarmuskel mussten die Organe auch hier vorgespannt werden um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

**Abbildung 15:** Apparatur B



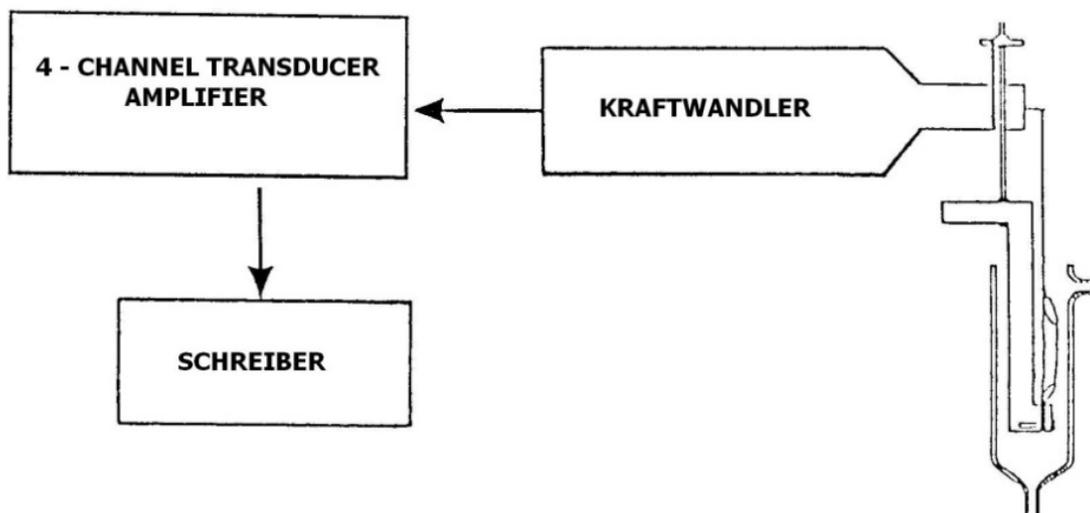
**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der Apparatur B



### 3.6.3 Kraftwandler

Mechanische Signale, welche vom jeweiligen Organ in der Apparatur auf den Kraftwandler übertragen werden, werden durch diesen in elektrische Signale umgewandelt. Dies ist durch eine Veränderung des Dehnungsstreifens möglich, welcher auf mechanische Kontraktion reagiert. Durch einen Widerstandswandler entsteht eine Veränderung im Stromfluss. Es kommt ein Verstärker der Firma WPI zum Einsatz, welcher es ermöglicht die mechanischen Signale schlussendlich durch einen Flachbettschreiber auf Millimeterpapier zu zeichnen.

**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des Kraftwandlers



### **3.7 Durchführung der Versuche**

In den folgenden Kapiteln werden die Abläufe der Versuche näher geschildert und erklärt. Bevor mit einem Versuch begonnen werden konnte, war es wichtig die Organbäder mit Wasser und Tyrode zu spülen, um etwaige Verunreinigungen die zu Störungen während eines Versuches hätten führen können, zu entfernen. Im Anschluss konnte das Organbad mit Tyrode befüllt und das jeweilige Organ eingespannt werden. Nach jedem Versuch wurde das Organbad mit Wasser gespült, mit verdünnter HCl gesäubert und im Anschluss mit Wasser und Tyrode gespült.

#### **3.7.1 Atrium dextrum**

Nachdem der Vorhof präpariert wurde (Kapitel 3.5.3), konnte er mithilfe der Silberhaken in die Organhalterung eingespannt werden. Wichtig war es den Vorhof nicht zu sehr zu spannen, da er sonst seine Spontanaktivität durch die Sinuszellen verloren hätte. Im Anschluss konnte der Vorhof in das mit Nährlösung befüllte und auf 37°C temperierte Organbad hinabgesenkt werden, sowie die Geräte und die Gaszufuhr gestartet werden.

Für jedes Organ mussten bestimmte Voreinstellungen getroffen werden um mit den Aufzeichnungen beginnen zu können. Beim rechten Vorhof wurde der Flachbettschreiber auf 5 mV und einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 5 mm/sec eingestellt. Der Schreiber wurde am Schreiber auf den Nullpunkt gestellt und durch einen Kippschalter mit dem Amplifier verbunden.

Durch Drehung am Feintrieb, welcher mit der Organhalterung verbunden war, konnte das Organ vorgespannt werden. Beim rechten Vorhof betrug diese Vorspannung 10,4 mN. Dies war wichtig um immer unter den gleichen Bedingungen zu arbeiten und dadurch reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Danach wurde der Schreiber wieder auf Null gesetzt.

In den meisten Fällen war bereits eine Spontanaktivität des Vorhofes zu sehen. Trotzdem war es notwendig 45 Minuten zu warten bevor mit dem Versuch begonnen werden konnte, damit sich das Organ an die Bedingungen gewöhnen konnte. Diese Zeit wurde genutzt, um die Testsubstanz einzuwiegen und in Lösung zu bringen.

Alle fünf Minuten folgte eine Aufzeichnung, indem der Schreiber gesenkt und die Schlagfrequenz beziehungsweise die Chronotropie für zwölf Sekunden am Millimeterpapier aufgezeichnet wurde. Dies entsprach bei einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 5 mm/sec, 6 Kästchen am Millimeterpapier.

Ergaben drei aufeinanderfolgende Aufzeichnungen die gleiche Schlagfrequenz, so konnte mit dem Versuch begonnen und die Testsubstanz in der ersten Konzentration zugegeben werden. Für 45 Minuten wurde alle 5 Minuten aufgezeichnet, bevor die nächste Konzentration der Testsubstanz zugegeben wurde. Es wurde mit der niedrigsten Konzentration begonnen und dann kumulativ erhöht, bis eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreicht wurde.

Wurde die Schlagfrequenz des Vorhofes zu schwach um am Schreiber noch brauchbare Werte ablesen zu können, war es möglich den Schreiber von 5 mV auf 2 mV und im letzten Schritt noch auf 1 mV umzustellen.

**Abbildung 18:** Atrium dextrum in Apparatur B

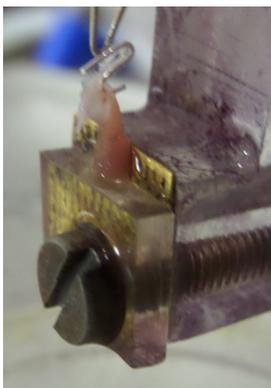


### 3.7.2 Musculus papillaris

Der präparierte Papillarmuskel wurde am oberen Ende mit dem Silberhaken an der Organhalterung der Apparatur A befestigt und am unteren Ende zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen eingeklemmt. Im Anschluss konnte das Organ in die mit Tyrode befüllte und auf 35°C temperierte Muskelkammer abgesenkt werden. Die Geräte wurden in Betrieb genommen und die nötigen Einstellungen vorgenommen. Der Flachbetschreiber wurde auf 5 mV und einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 5 mm/sec eingestellt. Die Vorspannung betrug beim Papillarmuskel 3,92 mN. Der Schreiber wurde nach dem Vorspannen auf den Nullpunkt gesetzt und im Falle einer Abnahme der Spannung nachjustiert.

Anders als der Vorhof weist der Papillarmuskel keine Spontanaktivität auf und musste durch einen Accupulser (Firma WPI) gereizt und zur Kontraktion gebracht werden. Es kam vor, dass der Papillarmuskel gleich nach dem Einspannen eine Spontanaktivität zeigte, was auf das Vorhandensein einer Purkinjefaser hindeutete. Nach einer gewissen Zeit ging diese Faser in der Regel zugrunde und es konnte mit dem Versuch begonnen werden.

Die Stimulation des Papillarmuskel erfolgte durch Rechteckimpulse mit einer Länge von  $3 \text{ ms}^{-1}$  und einer Frequenz von 1 Hz. Es folgte eine 45-minütige Gewöhnungsphase. Die Messung erfolgte, indem 6 Amplituden, die Ionotropie, auf Millimeterpapier aufgezeichnet wurden. Bei drei aufeinanderfolgenden Messungen mit gleichen Amplituden, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen und alle fünf Minuten für 45 Minuten pro Konzentration aufgezeichnet werden. Bei zu schwacher Kontraktion war es möglich von 5 mV auf 2 mV und 1 mV zu reduzieren, allerdings nur, wenn noch keine Testsubstanz zugegeben wurde.



**Abbildung 19:** Papillarmuskel in Apparatur A

### 3.7.3 Aorta descendens

Nachdem die Aorta von Gewebe befreit und in etwa gleich lange, wie breite Stücke geschnitten wurde, konnte sie an Dreieckshaken befestigt werden, um diese dann an der Organhalterung zu befestigen. Nachdem das Organ in die auf 37°C temperierte Nährlösung abgesenkt wurde, konnten die nötigen Einstellungen vorgenommen werden. Der Schreiber wurde auf 10mV gestellt und die Aufzeichnungsgeschwindigkeit betrug 1 mm/min. Die Vorspannung war bei der Aorta auf 19,6 mN festgelegt. Auch hier wurde nach dem Vorspannen der Schreiber auf den Nullpunkt gesetzt und es folgte eine 20-minütige Gewöhnungsphase. Im Anschluss wurde der Schreiber auf 5 mV umgestellt, dies entsprach einer Kraft von 9,81 mN. Nach diesem Schritt war es notwendig den Schreiber erneut auf den Nullpunkt zu justieren und anzuschalten. Nachdem die Nährlösung abgelassen wurde, befüllte man das Organbad mit 25ml KCl-Lösung (Kapitel 3.4.2), um eine maximale Vorkontraktion des Gefäßes zu erreichen. Erst nach Erreichen der Plateauphase konnte mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz im Abstand von 45 Minuten begonnen werden.

**Abbildung 20:** Aorta descendens in Apparatur B



### 3.7.4 Arteria pulmonalis

Der Ablauf des Versuchs entspricht dem der Aorta descendens, mit der Ausnahme, dass während des gesamten Versuchs mit einer Spannung von 5 mV gearbeitet wird. Ebenso wie bei der Aorta, wurde auch hier auf eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz geprüft.

**Abbildung 21:** Arteria pulmonalis in Apparatur B



### 3.7.5 Terminales Ileum

Der Darm wurde nach der Präparation an Silberhaken befestigt und in die Organhalterung eingespannt. Diese wurde, wie bei den anderen Organen, in die temperierte Nährlösung getaucht und eine Vorspannung von 4,92 mN angelegt. Es folgte eine 20-minütige Gewöhnungsphase. Der Schreiber wurde auf 5 mV eingestellt bei einer Schreibgeschwindigkeit von 1 mm/min. Sollte es während der Gewöhnungsphase zu Veränderungen der Peristaltik kommen, so waren diese am Schreiber sichtbar und es konnte entsprechend nachjustiert werden. Vor Beginn des Versuches war der Schreiber auf den Nullpunkt zu setzen und die Nährlösung durch 25 ml KCl-Lösung (Kapitel 3.4.2) zu ersetzen. Durch die so herbeigeführte chemische Kontraktion des Darms war es möglich auf eine spasmolytische Wirkung zu testen.

Die Kontraktion des Darms erfolgte sehr schnell, fiel aber auch schnell wieder ab und stabilisierte sich meist in etwa bei der Hälfte der zuvor erreichten maximalen Kontraktion. Nun musste auf die Konstanz der Kontraktion gewartet werden, wobei mindestens 45 Minuten abzuwarten waren, bevor mit dem bereits erwähnten Pipettierschema begonnen wurde.

Ein nicht für den Versuch geeignetes Organ war daran zu erkennen, dass nach erfolgter Kontraktion diese wieder gegen Null absank oder mit der Zeit proportional immer weiter abnahm.

**Abbildung 22:** terminales Ileum in Apparatur B

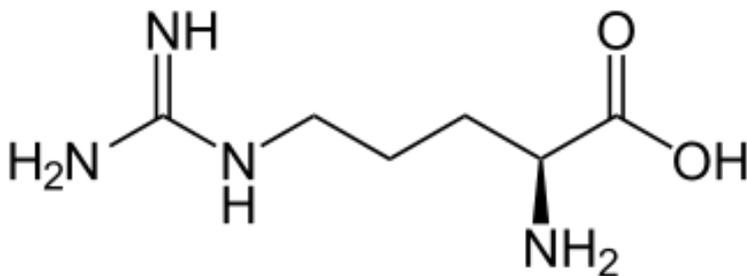


### 3.7.6 Untersuchung des Wirkmechanismus von MGdth6

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus wurde das terminale Ileum herangezogen, da an diesem Organ die stärkste Wirkung der Testsubstanz zu sehen war, wenngleich diese nur sehr schwach ausgeprägt war.

Um auf den Wirkmechanismus der Testsubstanz zu prüfen wurde der Darm präpariert (Kapitel 3.5.1) und mithilfe der Silberhaken in die Apparatur B eingespannt. Bis zum Erreichen der Plateauphase unterschied sich die Vorgehensweise nicht von der unter 4.5 beschriebenen. Sobald eine Konstanz erreicht war, wurden 100 µl Nitro-L-Arginin zugegeben. Nach weiteren 45 Minuten wurden 100 µl der Testsubstanz zugegeben und 45 Minuten wirken gelassen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt im Kapitel 4.

**Abbildung 23:** Struktur von Nitro-L-Arginin



MG = 219,2 g/mol

Durch Stimulation der Guanylylcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur, kommt es zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Dies bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylylcyclase (GC-S). Dieser Enzymrezeptor bildet aus GTP den Second Messenger cGMP. Über die Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G kommt es zur Gefäßrelaxation (Aktories et al 2013).

Die Freisetzung sowie die Bildung von NO wird von der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (= eNOS) gesteuert. Bei der durch die eNOS katalysierten Reaktion wird die Guanidin-Gruppe der Aminosäure L-Arginin in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert. Dabei entstehen die beiden Produkte Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin in gleichen Mengen (Aktories et al 2013).

Durch die Zugabe von Nitro-L-Arginin kommt es zur Blockade der eNOS und eine Freisetzung von NO ist nicht mehr möglich. Würde MGDth6 über NO eine vasodilatierende Wirkung bewirken, so dürfte sich im Anschluss an die Vorkontraktion durch die KCl-Lösung und durch die Zugabe von Nitro-L-Arginin, nach der Zugabe der Testsubstanz keine vasodilatierende Wirkung zeigen. Die Kontraktion, welche am Schreiber abzulesen ist, müsste konstant bleiben, sprich eine gerade Linie ergeben.

### **3.8 Auswertung und Statistik**

#### **3.8.1 Atrium dextrum und Musculus papillaris**

Versuche am Vorhof dienten dazu, Veränderungen der Chronotropie festzustellen. Als Chronotropie wird die Frequenz der Erregungsbildung des Schrittmachers, also die Schlagfrequenz des Herzens bezeichnet. (Silbernagel et al 2009)

Während des Versuches konnten etwaige Veränderungen der Chronotropie festgestellt werden. Alle fünf Minuten wurden die Schläge für 12 Sekunden aufgezeichnet, gezählt und mit fünf multipliziert, um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten. Je nachdem wie sich die Schlagfrequenz änderte, war bei gleichbleibender Anzahl, eine neutrale, bei steigender Anzahl, eine positive und bei sinkender Anzahl, eine negative Schlagfrequenz beziehungsweise Chronotropie zu sehen. Die konstante Schlagfrequenz ohne Substanzzugabe wurde mit 0% angegeben um nachfolgende Änderungen prozentuell Vergleichen zu können.

Beim Papillarmuskel wurde die Inotropie, also die Kontraktionskraft gemessen und beurteilt. Die Ionotropie, welche in mN angegeben war, wurde zur bessern Veranschaulichung in Prozent ausgedrückt. Wie beim Vorhof wurde auch beim

Papillarmuskel alle fünf Minuten aufgezeichnet, allerdings wurden hier jeweils sechs Schläge aufgezeichnet. Die Höhe der Amplitude wurde gemessen und in cm angegeben. Die konstante Amplitude ohne Zugabe von Testsubstanz wurde auch hier mit 0% angegeben um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

### **3.8.2 Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum**

Bei Untersuchungen des Darms stand die spasmolytische Wirkung im Vordergrund, während bei den Gefäßen die vasodilatierende Wirkung vorherrschte. Alle diese Organe wurden nach der 20-minütigen Gewöhnungsphase durch Zugabe der Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert und die Testsubstanz nach dem bereits erwähnten Pipettierschema kumulativ zugesetzt. Wichtig war es am Millimeterpapier den Zeitpunkt der Substanzzugabe zu notieren, da dieser für die Auswertung von Bedeutung war. Am Ende des Versuches wurde die Strecke vom Nullpunkt bis zur Plateauphase in cm angegeben und als 100% angenommen. Dadurch war es möglich bei allen weiteren Messungen nach den Substanzgaben, vergleichbare, prozentuelle Ergebnisse zu erhalten. Ein Eichfaktor musste für die Berechnung miteinbezogen werden. Bei einer Einstellung von 5 mV am Schreiber wurde pro cm mit 0,98 multipliziert.

### **3.8.3 Statistik**

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm „Sigma Plot 9.0“ verwendet. Für jedes Organ wurde der Mittelwert, sowie der Standardfehler und wenn möglich die  $EC_{50}$  berechnet. Unter  $EC_{50}$  einer Substanz versteht man die Konzentration, bei der es zu einer 50%igen Veränderung kommt. Im Fall der Testsubstanz MGdth6 war an keinem Organ ein Wirkungsabfall unter 50% zu sehen und somit konnte kein  $EC_{50}$  Wert berechnet werden. Die  $EC_{50}$  würde die Konzentration von MGdth6 zeigen, bei der es zu einer 50%igen Veränderung bezogen auf den angegebenen 100%-Wert kommt. Durch den „Student-T-Test“ wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet. Werte  $<5\%$  ( $P<0,05$ ) und  $<1\%$  ( $P<0,01$ ) galten als signifikant und Werte  $<0,1\%$  ( $P<0,001$ ) als hochsignifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Testsubstanz MGdth6

#### 4.1.1 Atrium dextrum

Die Wirkung der zu testenden Substanz MGdth6 wurde in fünf Versuchen auf eine chronotrope Wirkung untersucht. Der durch die Sinuszellen spontan aktive rechte Vorhof wurde in die Organhalterung der Apparatur B eingespannt und für 20 Minuten zur Eingewöhnung in die Nährlösung getaucht, bevor mit dem Aufzeichnen der Schläge begonnen wurde. Bei Konstanz wurde mit der Zugabe der Testsubstanz nach bekannten Schema begonnen. Mit Hilfe eines Programmes wurde der Mittelwert, sowie der Standardfehler der durchgeführten Versuche berechnet.

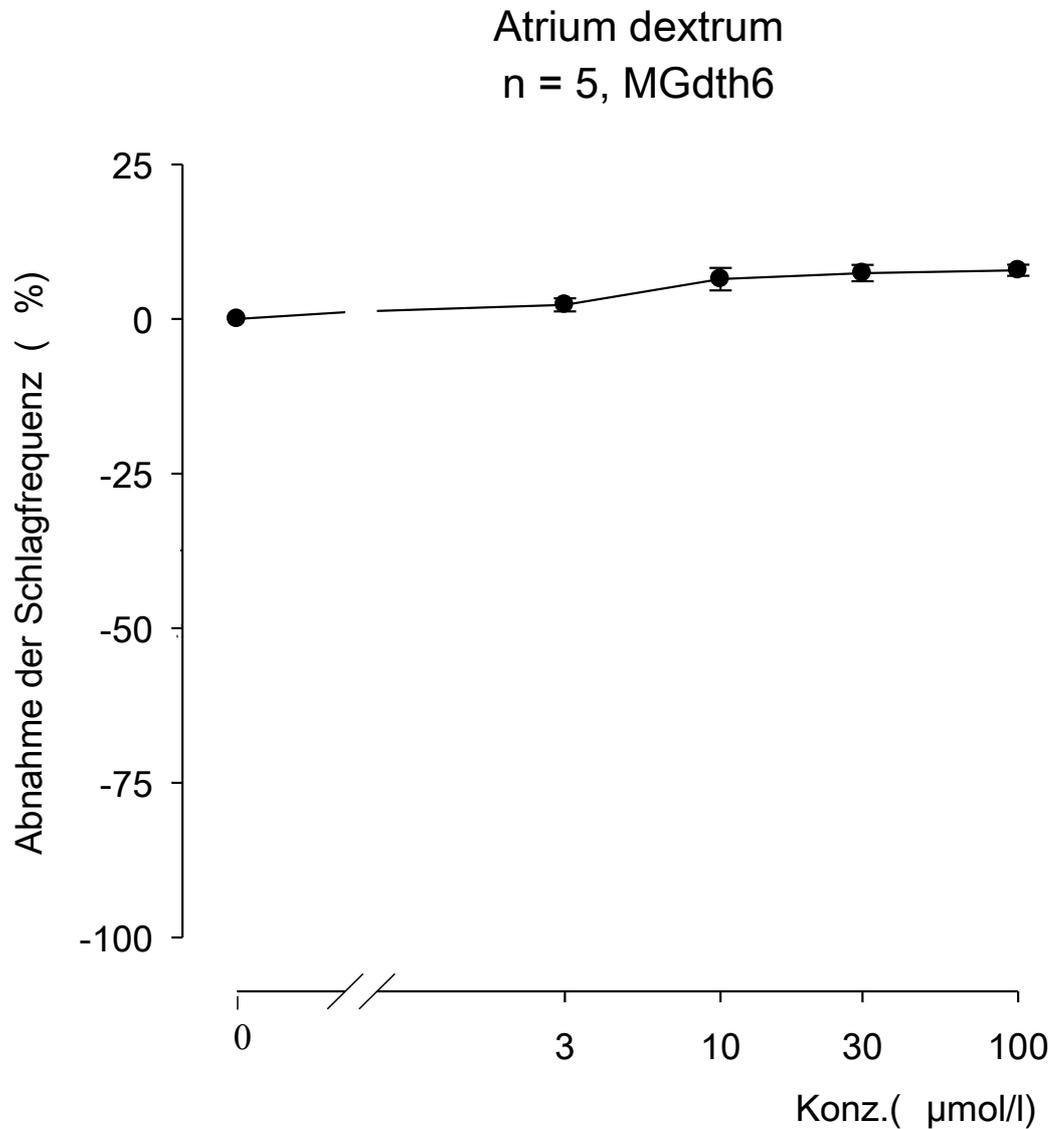
Die getestete Substanz MGdth6 wies am Vorhof eine sehr schwache, nicht relevante positive chronotrope Wirkung auf. Die spontane Aktivität des Vorhofs war bis zum Ende des Versuchs mit kaum veränderter Chronotropie gegeben.

**Tabelle 7:** Versuchsergebnisse von MGdth6 am Atrium dextrum

MGdth6 µmol/l	f ± SEM (x/min)	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	215 ± 6,52	0 ± 0	5	-
3	220 ± 7,25	2,31 ± 1,05	5	n.s.
10	229 ± 8,86	6,45 ± 1,83	5	n.s.
30	231 ± 7,97	7,41 ± 1,32	5	n.s.
100	232 ± 7,52	7,89 ± 0,89	5	n.s.

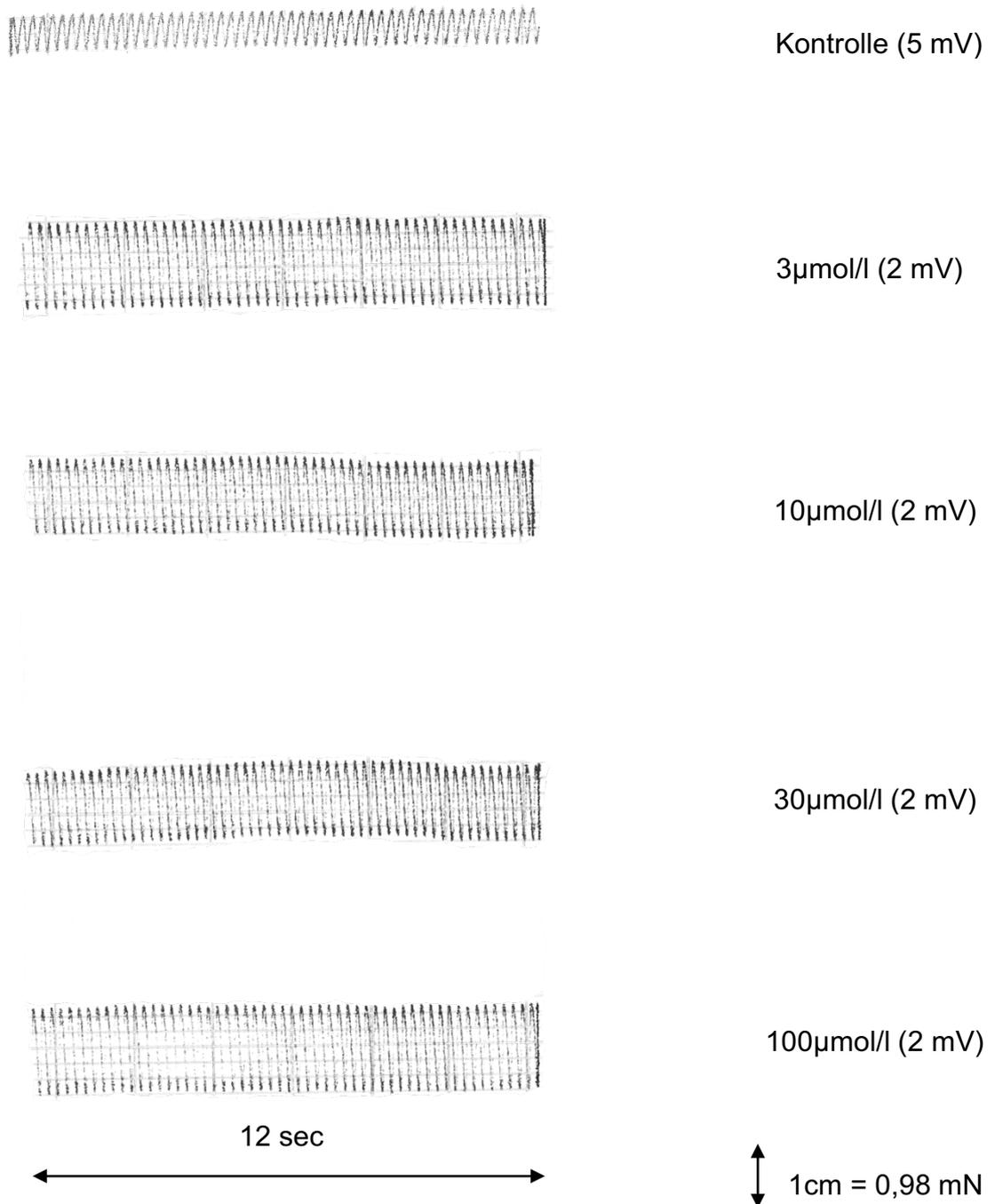
In Tabelle 7 wird der Standardfehler als SEM bezeichnet und die Anzahl der Schläge pro Minute als f angegeben. Die Anzahl der Versuche entspricht n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P.

**Diagramm 1:** Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am Atrium dextrum



Das Diagramm zeigt den Einfluss der Testsubstanz MGdth6 auf die Chronotropie des rechten Vorhofs. Die Konzentration in µmol/l, ist auf der x-Achse angegeben und die prozentuelle Änderung der Schlagfrequenz auf der y-Achse des Diagramms aufgetragen. Die Schwarzen Punkte entlang der Konzentration-Wirkungskurve zeigen den jeweiligen Mittelwert eines Versuchs, während die ober und unter den Punkten waagrecht liegenden Punkte den Standardfehler zeigen.

**Abbildung 24:** Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MGdth6



Die Kontrolle wurde bei 5 mV aufgezeichnet, alle anderen Aufzeichnungen aufgrund der nachlassenden Schlagkraft bei 2 mV. In der Aufzeichnung sieht man, eine sehr schwache positive chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof durch MGdth6. Da die Schlagkraft nur minimal durch Substanzzugabe zunimmt, ist diesem Effekt keine weitere Bedeutung zu geben.

#### 4.1.2 Musculus papillaris

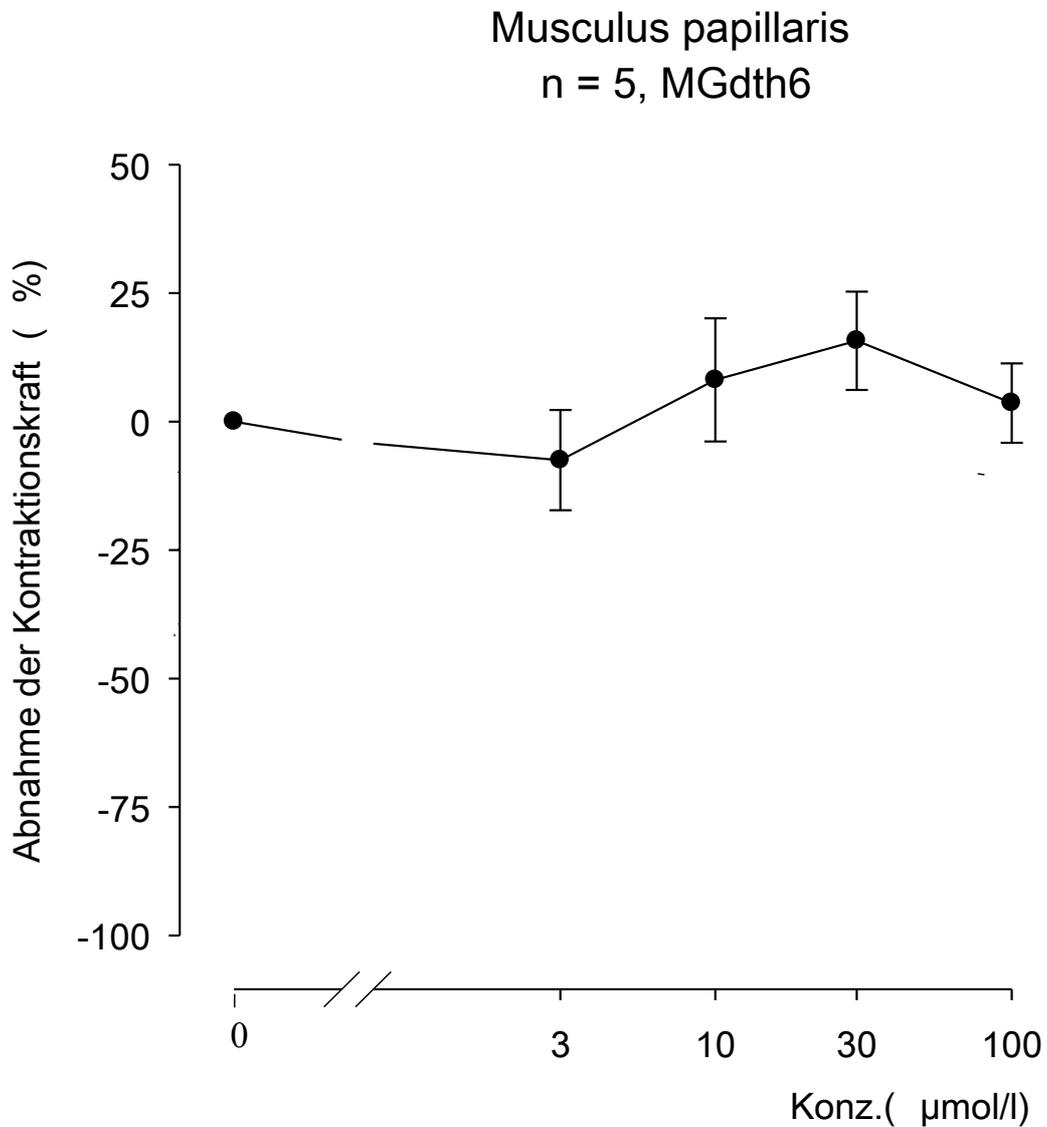
Um die ionotrope Wirkung von MGdth6 auf den Papillarmuskel zu testen wurden fünf Versuche unter Verwendung von Apparatur A durchgeführt. Es konnte durch Zugabe niedriger Konzentrationen von MGdth6 eine leichte Zunahme der Ionotropie gemessen werden, während es in höheren Konzentrationen zu einer schwach negativen ionotropen Wirkung kam. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass es keine bedeutsame Wirkung von MGdth6 auf die Ionotropie des Papillarmuskels gibt.

**Tabelle 8:** Versuchsergebnisse von MGdth6 am Papillarmuskel

MGdth6 μmol/l	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,25 ± 0,11	0 ± 0	5	-
3	1,16 ± 0,17	-7,49 ± 9,74	5	n.s.
10	1,33 ± 0,13	8,12 ± 11,98	5	n.s.
30	1,44 ± 0,17	15,73 ± 9,57	5	n.s.
100	1,29 ± 0,14	3,60 ± 7,72	5	n.s.

Die Kontraktionskraft in mN wird mit fc angegeben, der Standardfehler mit SEM. Die Anzahl der durchgeführten Versuche entspricht n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P.

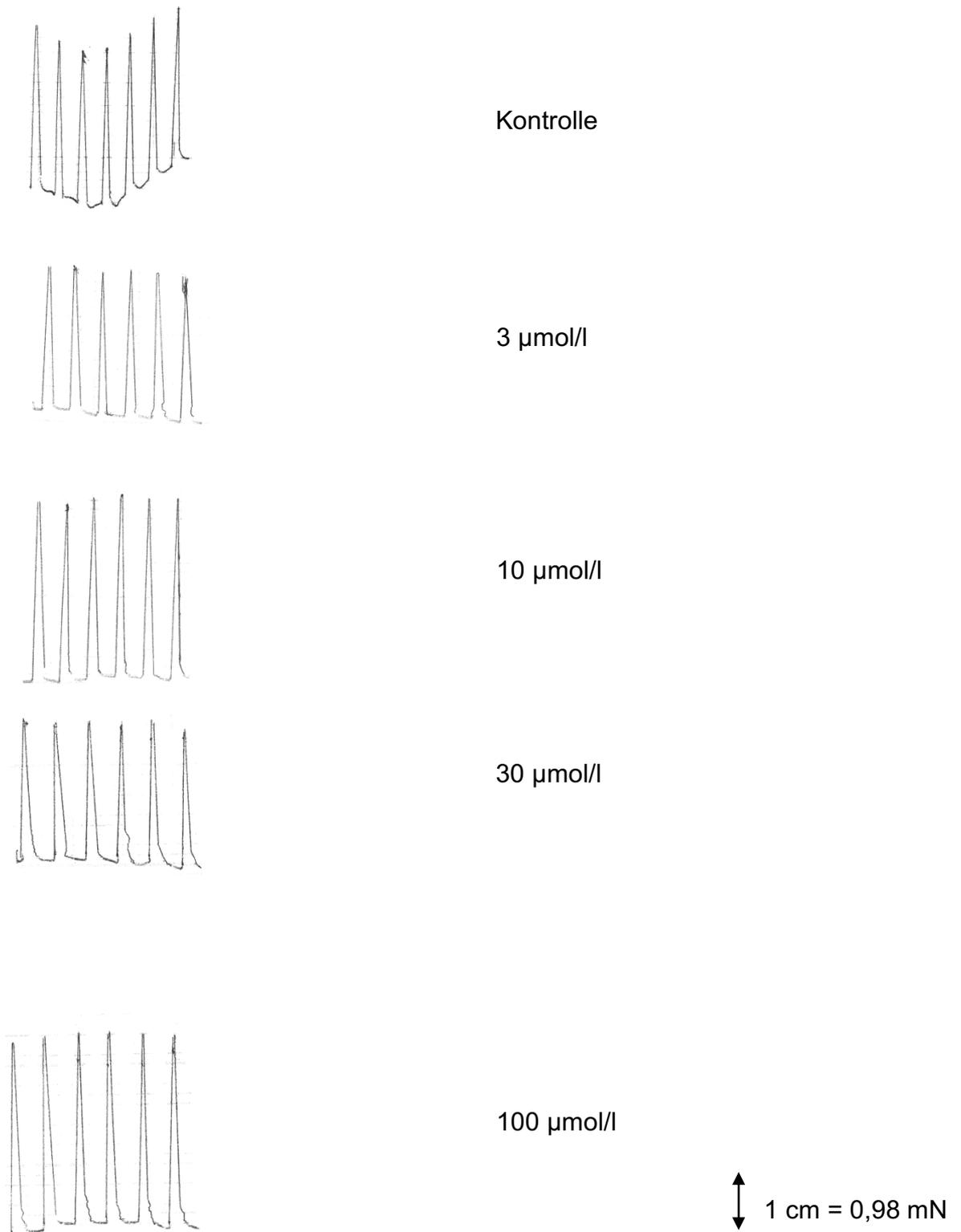
**Diagramm 2:** Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am Papillarmuskel



In der Abbildung sieht man die zunächst leichte Zunahme der Kontraktion, während es im späteren Versuchsverlauf zu einer Abnahme der Inotropie kommt.

Die x-Achse zeigt die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l, die y-Achse die Kontraktionskraft in Prozent.

**Abbildung 25:** Originalaufzeichnung der ionotropen Wirkung von MGdth6



An der Amplitudengröße kann die Veränderung der Ionotropie gemessen werden. Bei niedriger Konzentration war eine leichte Zunahme zu sehen und in höheren Konzentrationen eine leichte Abnahme der Ionotropie.

### 4.1.3 Aorta descendens

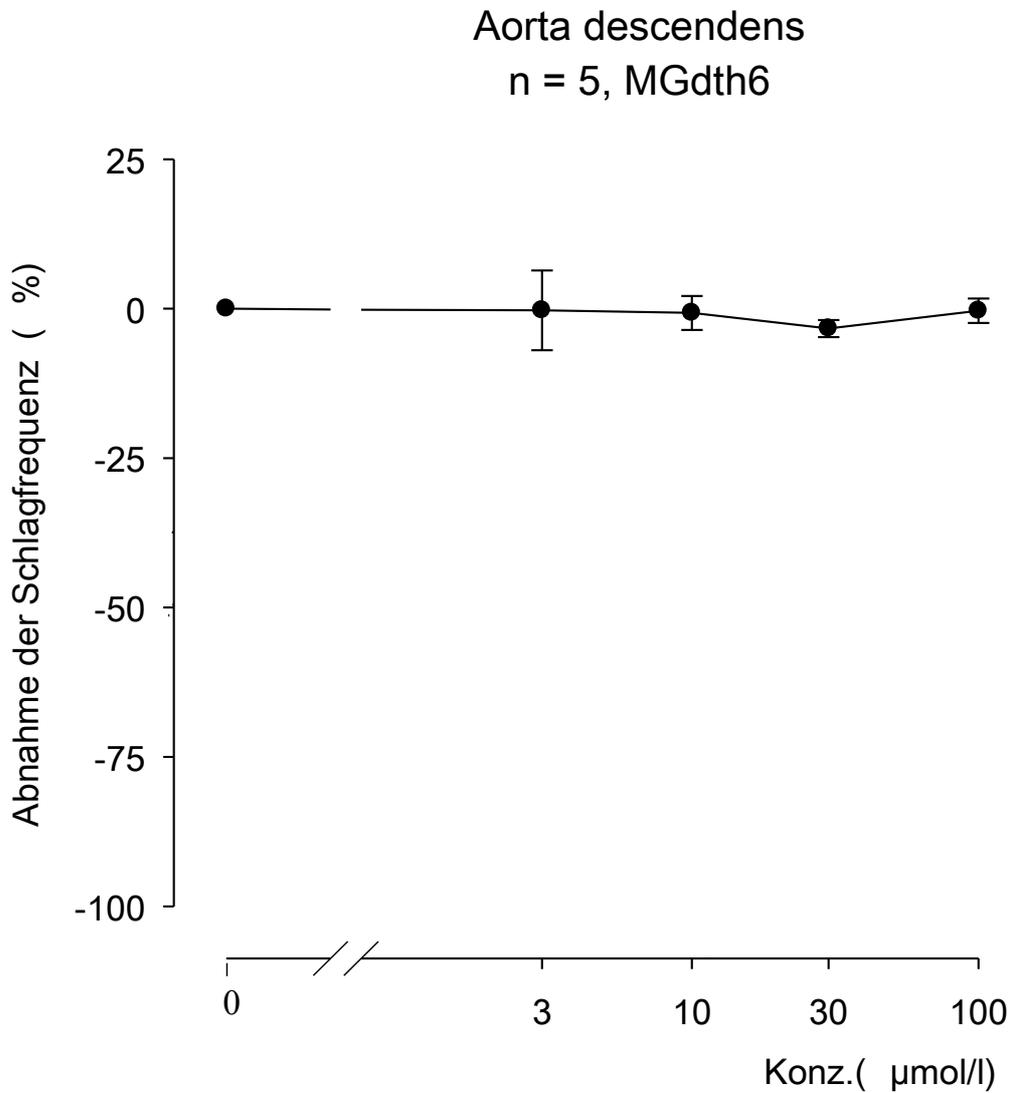
An der Aorta wurde in fünf Versuchen die vasodilatierende Wirkung von MGdth6 untersucht. Am Ende dieser Versuchsreihe konnte in keiner Weise eine vasodilatierende Wirkung für MGdth6 nachgewiesen oder beobachtet werden.

**Tabelle 9:** Versuchsergebnisse von MGdth6 an der Aorta descendens

MGdth6 $\mu\text{mol/l}$	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	13,19 $\pm$ 3,57	0 $\pm$ 0	5	-
3	12,33 $\pm$ 2,80	-0,28 $\pm$ 6,66	5	n.s.
10	13,00 $\pm$ 3,37	-0,71 $\pm$ 2,84	5	n.s.
30	12,65 $\pm$ 3,28	-3,32 $\pm$ 1,42	5	n.s.
100	13,33 $\pm$ 3,78	-0,34 $\pm$ 2,05	5	n.s.

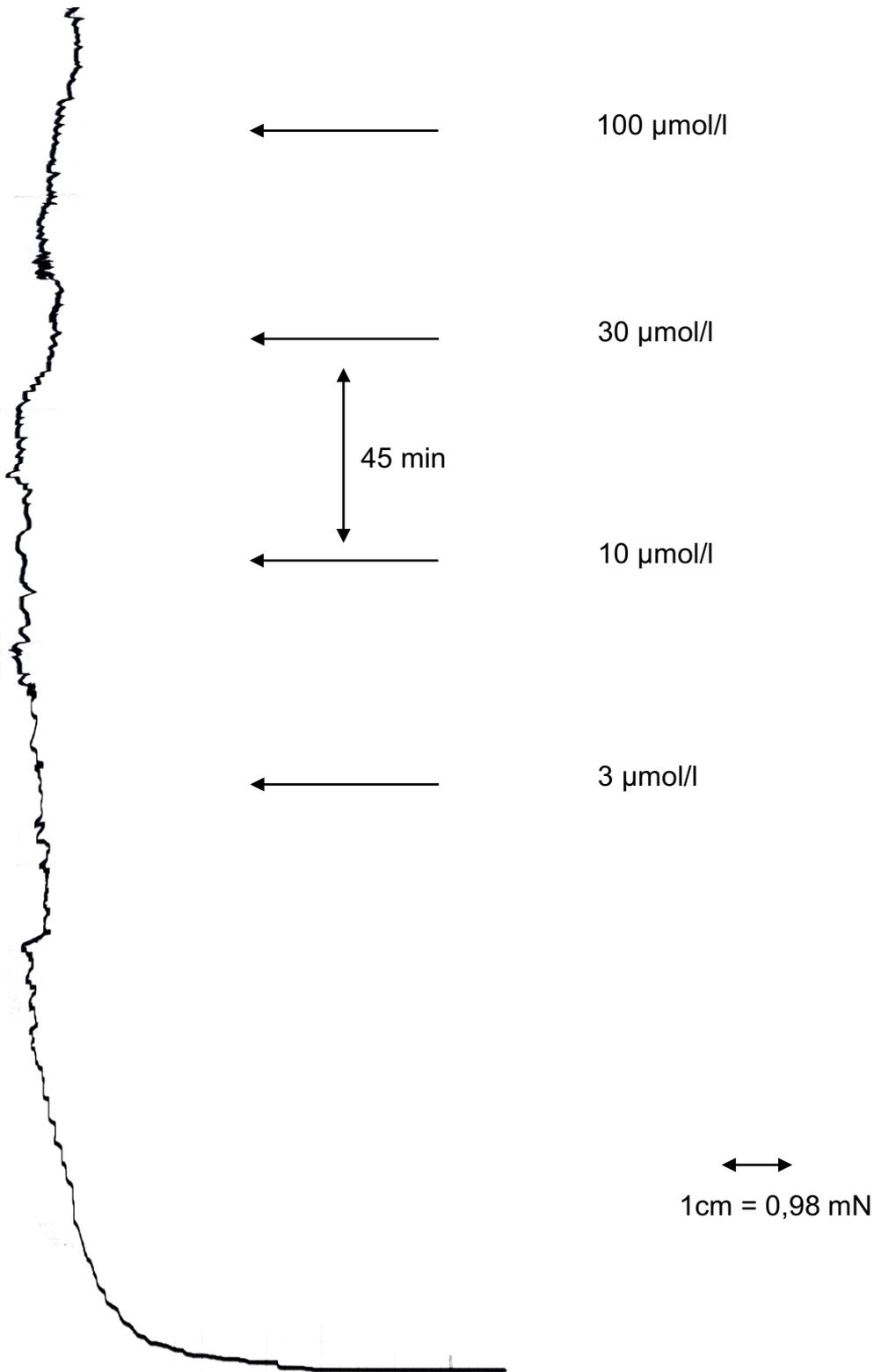
Die Tabelle stellt die berechneten Mittelwerte (fc) in mN inklusive Standardfehler (SEM) dar. Zusätzlich sind die Ergebnisse in Prozent angegeben und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angeführt.

**Diagramm 3:** Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta descendens



Im Diagramm ist die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz abgebildet. Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

**Abbildung 26:** Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MGdth6



An der Abbildung ist die vasodilatierende Wirkung, also die Erweiterung der Gefäße sichtbar. Der Zeitpunkt an dem eine Substanzzugabe erfolgte ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Zeitdauer zwischen zwei Pfeilen entspricht jeweils 45 Minuten.

#### 4.1.4 Arteria pulmonalis

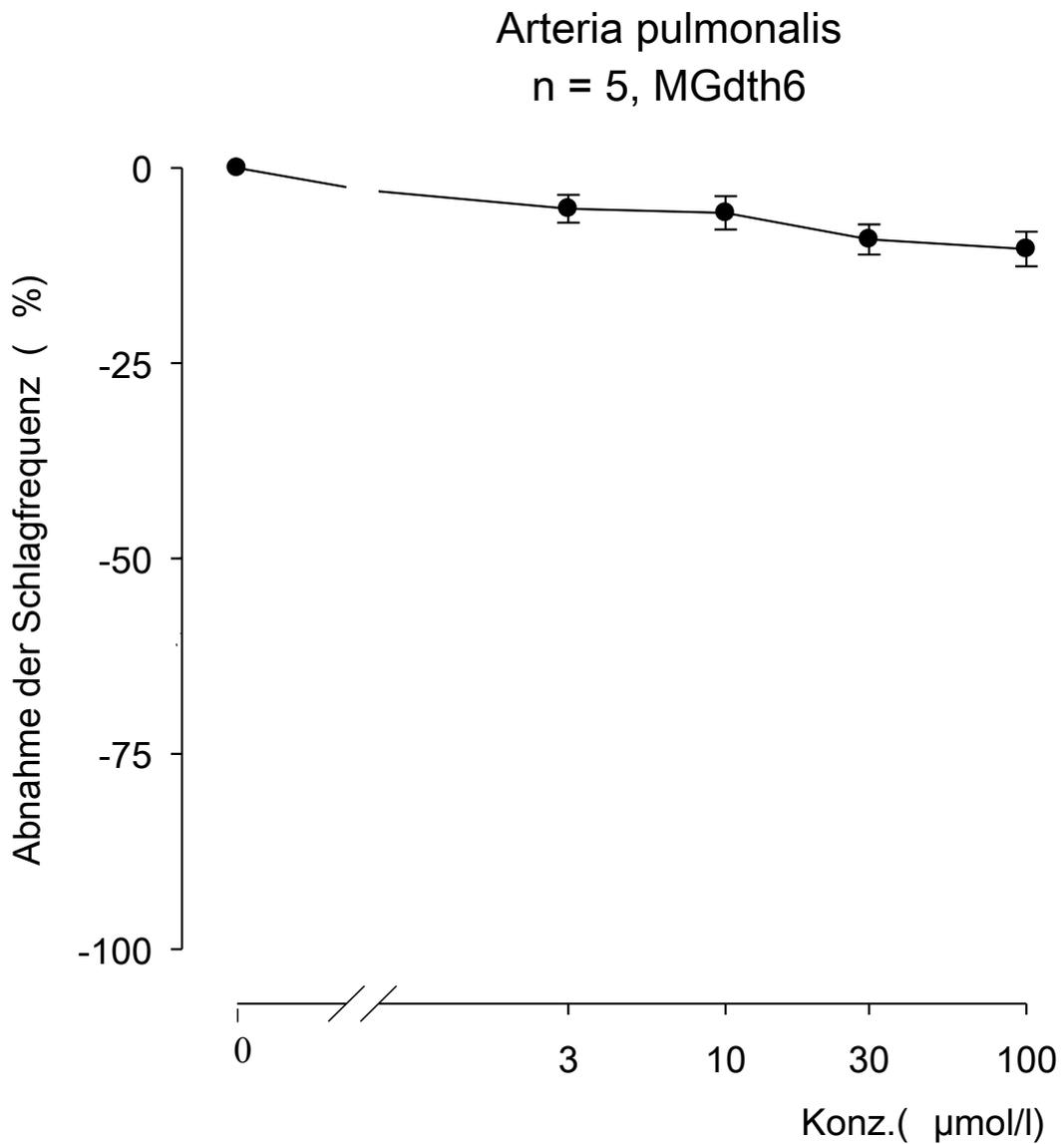
Es wurden fünf Versuche durchgeführt um die gefäßerweiternde Wirkung von MgDth6 auf die Lungenarterie zu testen. Bei keinem dieser fünf Versuche war, bei Erreichen der Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ , eine vasodilatierende Wirkung zu erkennen.

**Tabelle 10:** Versuchsergebnisse von MGdth6 an der Arteria pulmonalis

MGdth6 $\mu\text{mol/l}$	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versucher (n)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	10,13 $\pm$ 1,56	0 $\pm$ 0	5	-
3	9,57 $\pm$ 1,40	-5,25 $\pm$ 1,78	5	n.s.
10	9,50 $\pm$ 1,35	-5,76 $\pm$ 2,13	5	n.s.
30	9,13 $\pm$ 1,24	-9,17 $\pm$ 1,94	5	0,05
100	9,00 $\pm$ 1,20	-10,40 $\pm$ 2,22	5	0,05

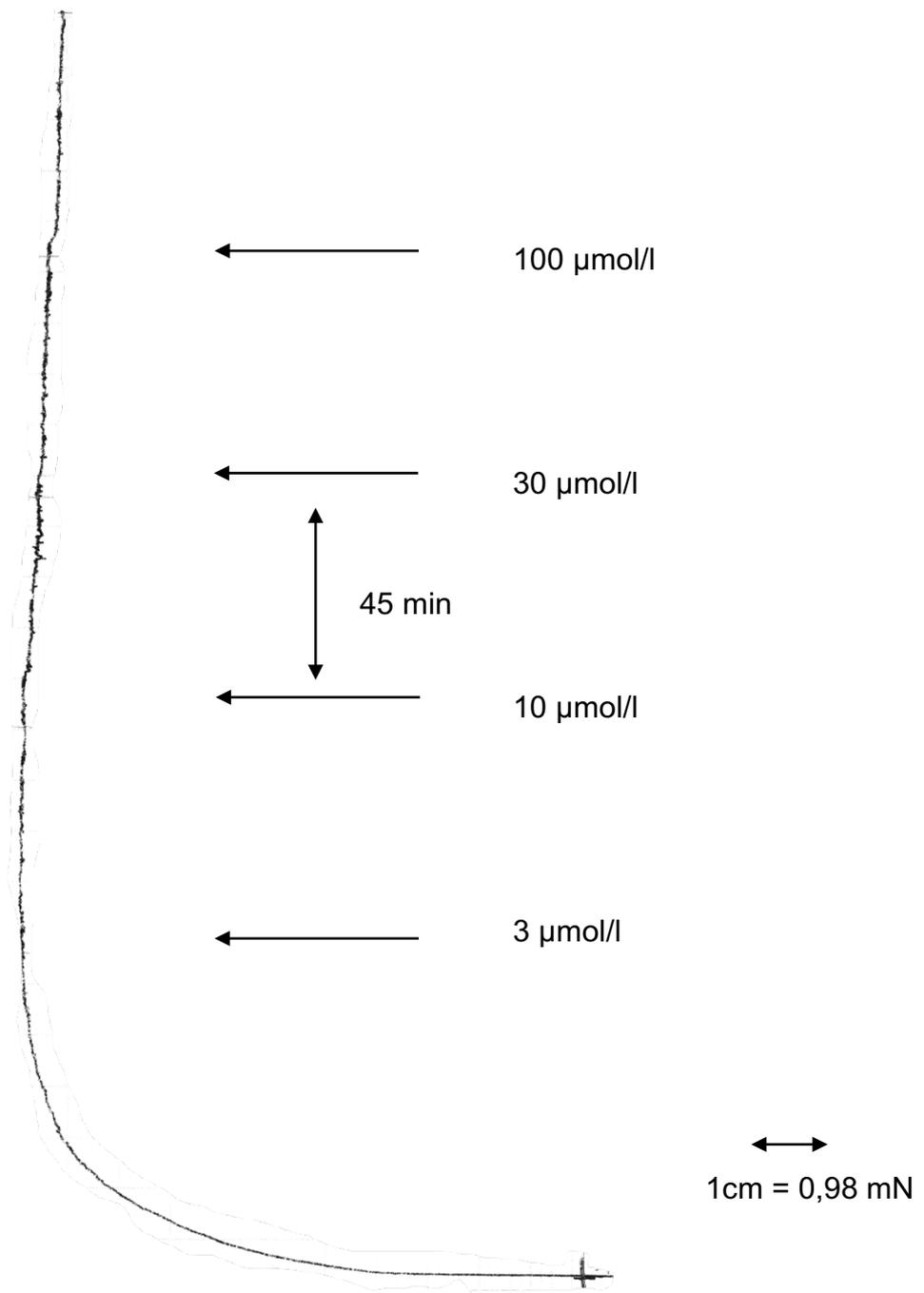
Die Tabelle stellt die berechneten Mittelwerte (fc) in mN inklusive Standardfehler (SEM) dar. Zusätzlich sind die Ergebnisse in Prozent angegeben und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angeführt.

**Diagramm 4:** Konzentrations-Wirkungskurve der Arteria pulmonalis



Im Diagramm ist die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz abgebildet. Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

**Abbildung 27:** Originalaufzeichnung der vasodilierenden Wirkung von MGdth6



An der Abbildung ist die vasodilatierende Wirkung sichtbar. Der Zeitpunkt an dem eine Substanzzugabe erfolgte ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Zeitdauer zwischen zwei Pfeilen entspricht jeweils 45 Minuten.

### 6.1.5 Terminales Ileum

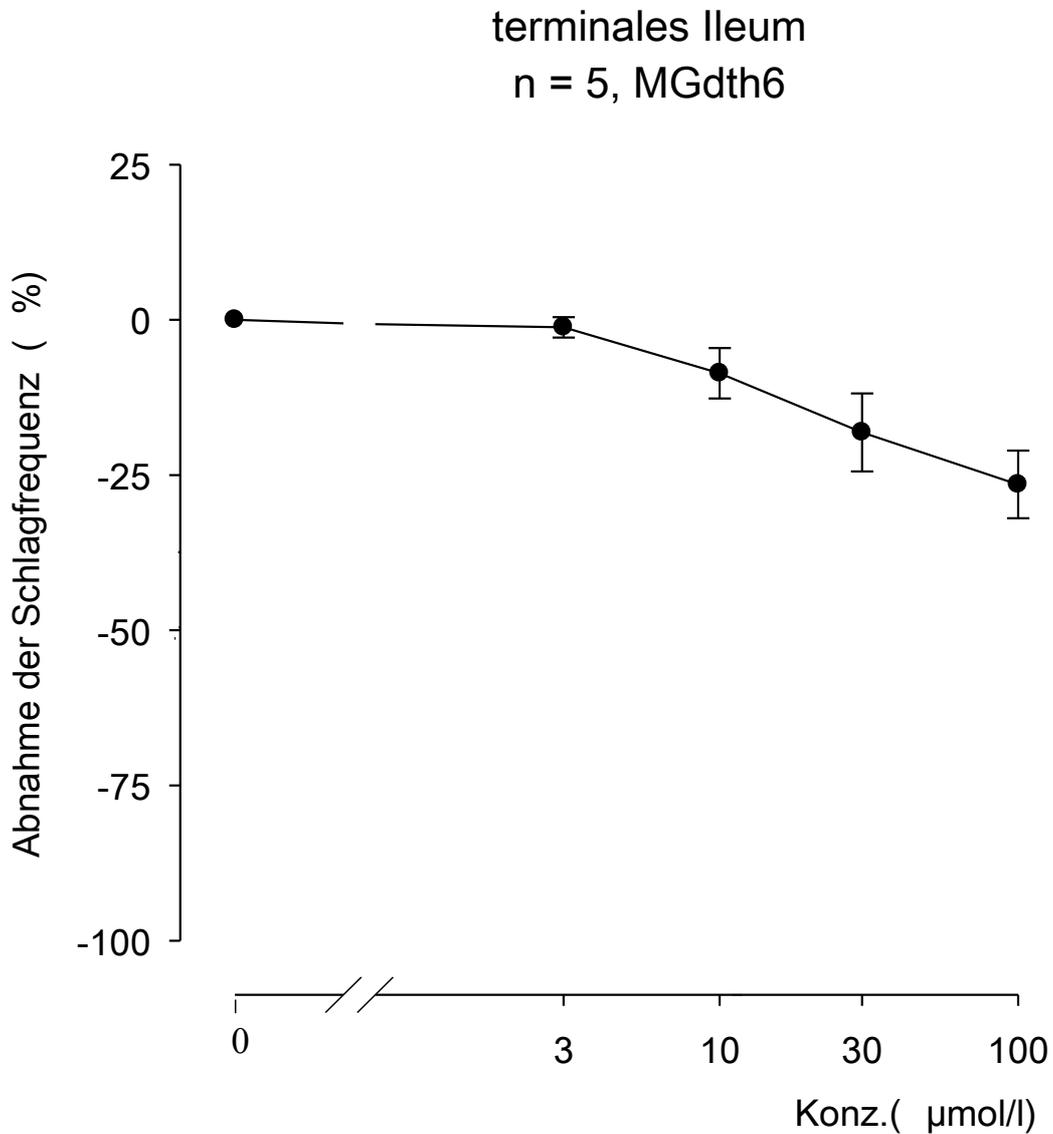
Am terminalen Ileum wurden zur Bestimmung der spasmolytischen Wirkung von MGdth6 fünf Versuche durchgeführt. Es konnte dadurch eine leichte spasmolytische Wirkung nachgewiesen werden, wobei angemerkt werden muss, dass auch das als Lösungsmittel verwendete DMSO eine spasmolytische Wirkung besitzt, diese aber bei der Berechnung berücksichtigt wurde. Am terminalen Ileum war zwar die stärkste Wirkung von MGdth6 im Vergleich zu den anderen Organen gegeben, trotzdem nicht stark genug, um eine  $EC_{50}$  zu berechnen.

**Tabelle 11:** Versuchsergebnis von MGdth6 am terminalen Ileum

MGdth6 $\mu\text{mol/l}$	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche (N)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	6,92 $\pm$ 0,99	0 $\pm$ 0	5	-
3	6,84 $\pm$ 0,98	-1,21 $\pm$ 1,65	5	n.s.
10	6,39 $\pm$ 1,05	-8,62 $\pm$ 4,05	5	0,05
30	5,78 $\pm$ 1,06	-18,13 $\pm$ 6,27	5	0,05
100	5,19 $\pm$ 0,95	-26,51 $\pm$ 5,46	5	0,05

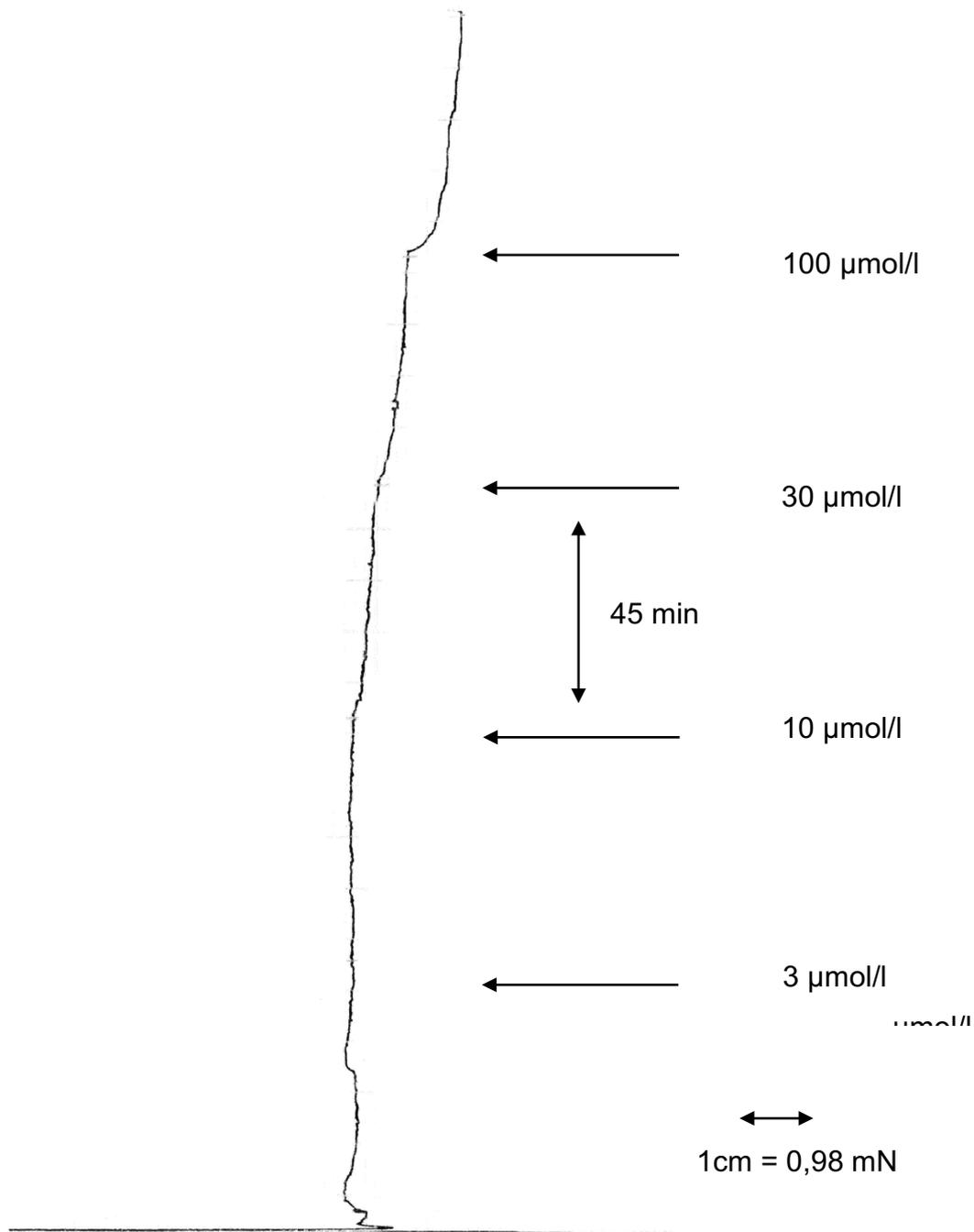
Die Tabelle stellt die berechneten Mittelwerte (fc) in mN inklusive Standardfehler (SEM) dar. Zusätzlich sind die Ergebnisse in Prozent angegeben und die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) angeführt.

**Diagramm 5:** Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am terminalen Ileum



Das Diagramm zeigt die spasmolytische Wirkung von MGdth6, welche mit zunehmender Konzentration verstärkt auftritt. Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

**Abbildung 28:** Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von MGdth6



In der Grafik ist die Abnahme der Kontraktionskraft des Darms, also die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz sichtbar. Der Zeitpunkt an dem die Zugabe der Substanz erfolgte, wurde mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Abstand zwischen den einzelnen Substanzzugaben entspricht 45 Minuten.

## **4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MGdth6 am terminalen Ileum**

Die zu testende Substanz zeigte die stärkste Wirkung an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums. Bei 100  $\mu\text{mol/l}$  war ein Abfall der Kontraktionskraft von  $-26,51\% \pm 5,46$  zu beobachten, wodurch eine Berechnung der  $\text{EC}_{50}$  nicht möglich war.

Da diese Wirkung, trotz ihrer schwachen Ausprägung, die stärkste im Vergleich zu den jeweiligen anderen Organen war, wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum getestet.

### **4.2.1 Effekt von MGdth6 in zusammen mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum**

Durch die am Darm aufgetretene spasmolytische Wirkung der Testsubstanz, wurde die Vermutung angestellt, dass diese mit Stickstoffmonoxid in Zusammenhang stünde. Wie bereits im Kapitel 4.6.1 erklärt, kommt es über eNOS zur Freisetzung von NO und in weiterer Folge zur spasmolytischen beziehungsweise zur gefäßerweiternden Wirkung im Organismus.

Durch Zugabe von Nitro-L-Arginin werden die eNOS gehemmt und somit ist eine Freisetzung von NO nicht mehr möglich. Dies hat zur Folge, dass wenn MGdth6 über eNOS wirkt und die Zugabe der Testlösung erst nach der Zugabe von Nitro-L-Arginin erfolgt, keine spasmolytische Wirkung mehr auftreten dürfte.

Das Molekulargewicht von Nitro-L-Arginin beträgt 219,2 g/mol. Da das für den Versuch verwendete Organbad ein Fassungsvermögen von 25 ml hatte wurden 0,55 mg Nitro-L-Arginin in 100  $\mu\text{l}$  KCl-hältiger Tyrode gelöst. Die Testsubstanz wurde wie bei den Versuchen am terminalen Ileum beschrieben eingewogen und in DMSO gelöst.

Die Durchführung der Versuche unterschied sich nur wenig von den bereits beschriebenen Versuchen am terminalen Ileum. Das terminale Ileum wurde in Apparatur B eingespannt, in die Nährlösung getaucht, vorgespannt und 20 Minuten ruhen gelassen. Im Anschluss wurde die Nährlösung gegen KCl-Lösung getauscht um eine maximale Vorkontraktion des Darms zu erreichen und 45 Minuten gewartet.

Nach Ablauf der 45 Minuten wurden 100 µl Nitro-L-Arginin Lösung zugegeben, um die eNOS zu deaktivieren. Damit sich vor Zugabe der Testsubstanz ein Gleichgewicht einstellen kann, wurde erneut 45 Minuten gewartet. Als optimal war anzusehen, wenn sich die vom Schreiber aufgezeichnete Kurve nicht in ihrer Höhe veränderte, sprich die Kontraktion des Darms konstant blieb. Anschließend wurden 100 µl der Testsubstanz zugesetzt und es war eine leicht, aber nicht starke spasmolytische Wirkung wie ohne Nitro-L-Arginin zu sehen.

Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass die eNOS, wenn auch nicht als einzige Angriffsstelle der Testsubstanz, möglicherweise an der spasmolytischen Wirkung von MGdth6 beteiligt sind.

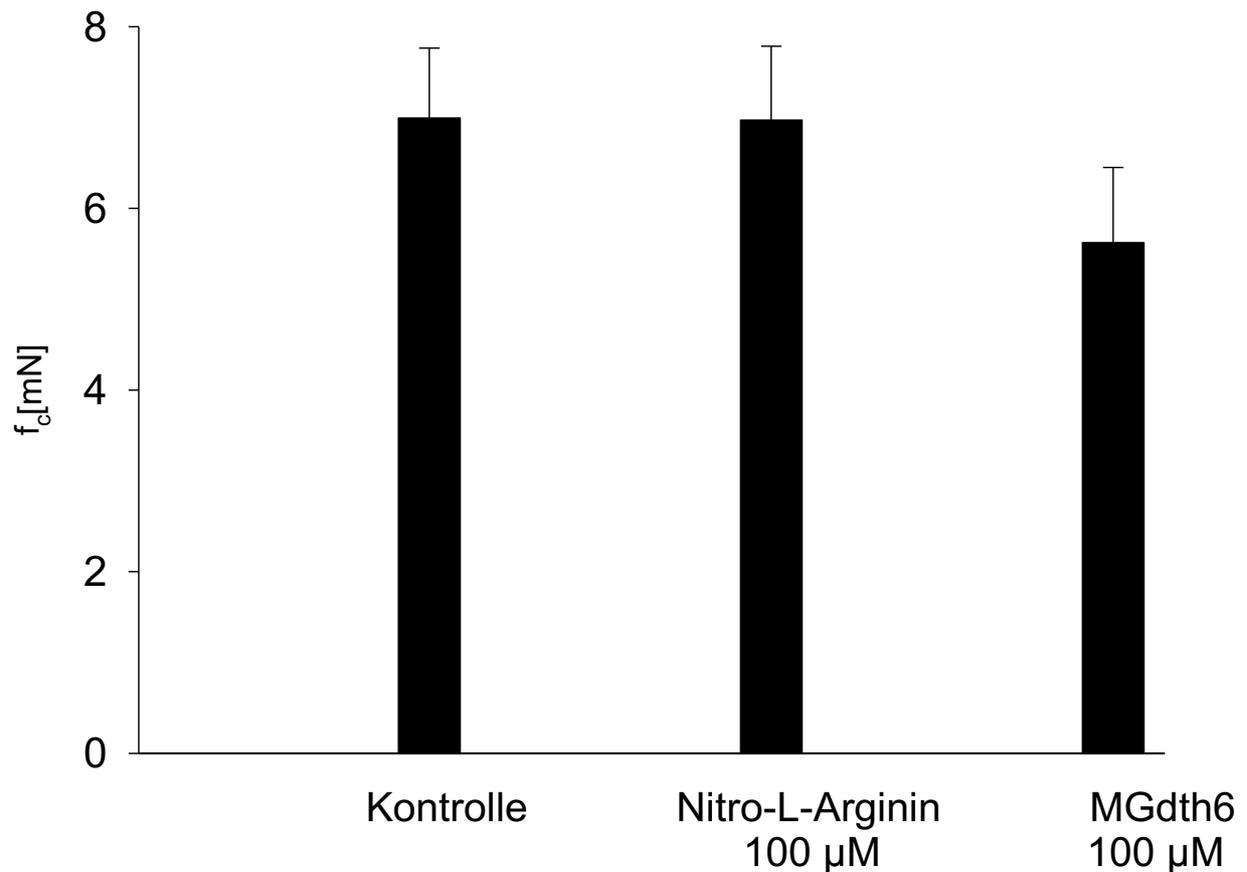
**Tabelle 12:** Resultat des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin und MGdth6

Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$6,99 \pm 0,77$	4	-
100 µM Nitro-L-Arginin	$6,97 \pm 0,81$	4	-
+ 100 µM MGdth6	$5,62 \pm 0,83$	4	n.s.

Die Konzentration der Testsubstanz, sowie die der Lösung von Nitro-L-Arginin ist in µmol/l angegeben. Der Mittelwert ist als  $f_c$  angegeben, der Standardfehler als SEM. Zusätzlich zeigt die Tabelle die Anzahl der durchgeführten Versuche n, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit P.

**Diagramm 6:** Grapische Darstellung des Wirkmechanismus

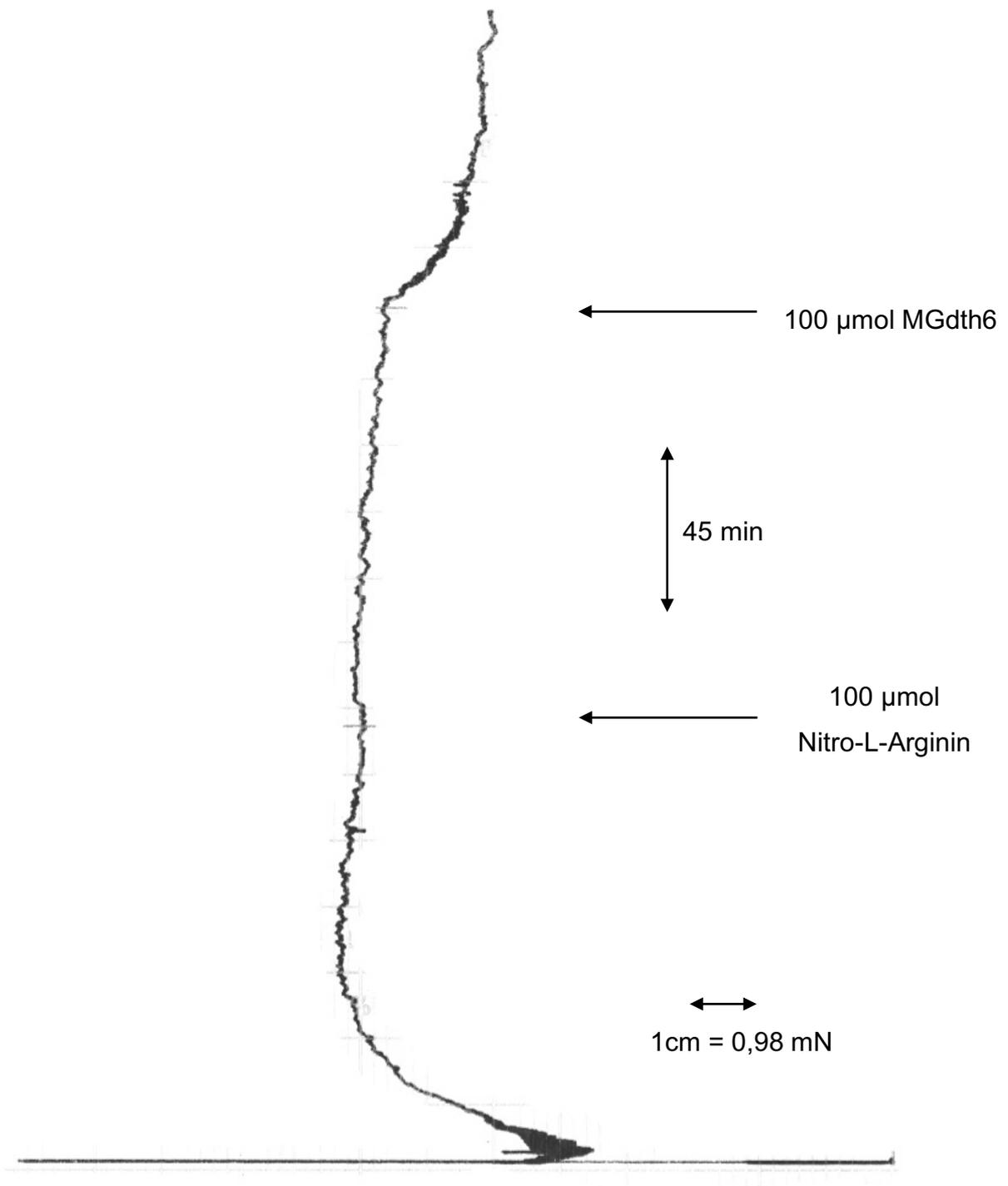
**Darm, Nitro-L-Arginin (100 $\mu$ M)  
MGdth6, 100  $\mu$ mol/l  
n=4**



Die senkrechten Balken im Diagramm zeigen die Kontraktionsstärke des terminalen Ileums in mN und die darüber aufsitzenden schmalen Striche den Standardfehler der durchgeführten Versuche. Auf der x-Achse sind der Kontrollwert und Konzentration von Nitro-L-Arginin und MGdth6 aufgetragen, während die y-Achse die Kontraktionskraft in mN zeigt.

Da es zu einer leichteren, aber doch auftretenden spasmolytischen Wirkung kommt, ist davon auszugehen, dass eNOS zwar an der Wirkung beteiligt sind, jedoch auch andere Mechanismen eine Rolle spielen dürften.

**Abbildung 29:** Originalaufzeichnung des Wirkmechanismus



Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt an dem die Zugabe von Nitro-L-Arginin und der Testsubstanz in das Organbad zugegeben wurden. Zwischen den Substanzzugaben liegt ein Zeitintervall von 45 Minuten.

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Vasodilatationsfähigkeit der neu synthetisierten Substanz MGdth6 an der Aorta descendens, der Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum zu testen. Weiteres lautete die Fragestellung ob und in welchem Ausmaß MGdth6 die Inotropie des Papillarmuskels, sowie die Chronotropie des Atrium dextrum beeinflussen kann.

### 5.1 Einfluss von MGdth6 auf Organe mit glatter Muskulatur

Zu den Organen mit glatter Muskulatur zählen die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum.

**Tabelle 13:** Wirkung von MGdth6 an glattmuskulären Organen

Organpräparat	MGdth6 Kontraktionskraft $f_c$ (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	$EC_{50}$ bei ( $\mu\text{mol/l}$ )
Aorta descendens	$-0,34 \pm 2,05$	> 100
Arteria pulmonalis	$-10,40 \pm 2,22$	> 100
terminales Ileum	$-26,51 \pm 5,46$	> 100

Vergleicht man alle Organe, welche eine glatte Muskulatur aufweisen, so kommt es am terminalen Ileum zur stärksten Abnahme der Kontraktionskraft beziehungsweise zur stärksten spasmolytischen Wirkung. Obwohl die Wirkung von MGdth6 auch am Darm nicht stark genug war um eine  $EC_{50}$  zu berechnen, wurde dieses Organ zur Überprüfung des Wirkmechanismus von MGdth6 herangezogen.

### **5.1.1 Einfluss von MGDth6 auf die Aorta descendens**

Der Mittelwert aller durchgeführten Versuche (n=5) ergab, dass nach maximaler Substanzkonzentration von 100µmol/l ein Abfall der Kontraktionskraft des Gefäßes von  $-0,34\% \pm 2,05\%$  nachgewiesen werden konnte. Da dieses Ergebnis weit von einem 50%igen Wirkungsabfall entfernt ist, war es nicht möglich eine EC<sub>50</sub> an diesem Organ zu bestimmen.

### **5.1.2 Einfluss von MGDth6 auf die Arteria pulmonalis**

Nach einer Versuchsreihe, bestehend aus fünf Versuchen (n=5), konnte der Mittelwert für die Abnahme der Gefäßkontraktion nach maximaler Substanzkonzentration von 100 µmol/l, bestimmt werden. Der Abfall der Kontraktionskraft war mit  $-10,40\% \pm 2,22\%$  zwar deutlich stärker als bei der Aorta, aber trotzdem zu schwach für die Berechnung einer EC<sub>50</sub>.

### **5.1.3 Einfluss von MGDth6 auf das terminale Ileum**

Am Darm konnte nach fünf (n=5) erfolgreich durchgeführten Versuchen die stärkste spasmolytische Wirkung beziehungsweise der stärkste Abfall der Kontraktionskraft bestimmt werden. Die Abnahme betrug durchschnittlich  $-26,51\% \pm 5,46\%$ . Dies ist im Vergleich zur Aorta fast 80-mal und zur Arteria pulmonalis mehr als doppelt so stark, aber immer noch zu schwach für die Berechnung der EC<sub>50</sub>.

## 5.2 Einfluss von MGdth6 auf die Herzmuskulatur

**Tabelle 14:** Einfluss von MGdth6 an der Herzmuskulatur

Organpräparat	MGdth6 Kontraktionskraft $f_c$ (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu\text{mol}$	EC50 bei ( $\mu\text{mol/l}$ )
Atrium dextrum	$7,89 \pm 0,89$	> 100
Musculus papillaris	$6,76 \pm 8,25$	> 100

Die Versuche an der Herzmuskulatur zeigten, dass MGdth6 keinen signifikanten Einfluss auf die Ionotropie des Papillarmuskels und auf die Chronotropie des rechten Vorhofs hatte. Bei beiden Organen war eine  $EC_{50}$  Berechnung nicht möglich.

### 5.2.1 Einfluss von MGdth6 am Atrium dextrum

Nach fünf Versuchen ( $n=5$ ), ergab die Berechnung des Mittelwertes eine Zunahme der Chronotropie von  $7,89\% \pm 0,89\%$ , bei einer Substanzkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . Die Berechnung der  $EC_{50}$  war nicht möglich.

### 5.2.2 Einfluss von MGdth6 am Musculus papillaris

Am Papillarmuskel konnte nach den Versuchen ( $n=5$ ) eine Zunahme der Ionotropie von  $6,76\% \pm 8,25\%$  bei 100  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz im Organbad beobachtet werden.

Zusammenfassend kam ich zu dem Ergebnis, dass die von mir zu testenden Substanz MGdth6 an keinem der getesteten isolierten Organe eine therapeutisch relevante Wirkung zeigte. Die stärkste Wirkung war am terminalen Ileum sichtbar, allerdings für einen therapeutischen Einsatz zu gering beziehungsweise müssten für eine therapeutische Verwendung viel zu hohe Dosen eingesetzt werden.

### 5.3 Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus von MGdth6

Da am terminalen Ileum, mit einer Abnahme der Kontraktionskraft von  $-26,51\% \pm 5,46\%$ , die stärkste Wirkung der Substanz MGdth6 festgestellt wurde, wurde dieses Organ zur Überprüfung des Wirkmechanismus herangezogen.

Da es an allen Organen, aber besonders am terminalen Ileum, zu einer gefäßerweiternden Wirkung kam, wollte ich überprüfen, ob von eNOS freigesetztes NO an dieser Gefäßerweiterung beteiligt ist.

Durch Aktivierung der Guanylylcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur, kommt es zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid, welches an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylylcyclase (GC-S) binden kann. Dieser Enzymrezeptor bildet aus GTP den Second Messenger cGMP und in weiterer Folge kommt es über die Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G zur Gefäßrelaxation. (Aktories et al 2013)

Die Freisetzung sowie die Bildung von NO wird von den endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthasen gesteuert. Bei der durch die eNOS katalysierten Reaktion wird die Guanidin-Gruppe der Aminosäure L-Arginin in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert. Es entstehen die beiden Produkte Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin zu gleichen Mengen. (Aktories et al 2013)

Das Ergebnis dieser Untersuchung wurde in Kapitel 6.2.1 beschrieben und im Diagramm 6 graphisch dargestellt. Meine Schlussfolgerung ist, dass eNOS, wenn auch nicht allein, an der spasmolytischen Wirkung von MGdth6 beteiligt sein können, dies aber noch eine nähere Abklärung durch weitere Versuche bräuchte.

## 6. Zusammenfassung

Während meiner Diplomarbeit war das Ziel, die pharmakologische Wirkung einer neu synthetisierten Substanz (MGdth6) aufzuklären und deren Wirkmechanismus zu untersuchen. Zur Durchführung der Versuche wurden isolierte Organe verwendet, welche von 4-8 Wochen alten Meerschweinchen stammten und jeden Morgen frisch entnommen wurden. Als Organe der glatten Muskulatur wurden die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum verwendet. Der Papillarmuskel sowie das Atrium dextrum wurden für Untersuchungen an der quergestreiften Muskulatur herangezogen.

An den glattmuskulären Organen war es möglich auf eine gefäßerweiternde Wirkung der Testsubstanz zu prüfen. Am Atrium dextrum konnte eine mögliche Veränderung der Chronotropie gemessen werden, am Papillarmuskel eine mögliche Ionotropieänderung.

Die Testsubstanz MGdth6 wurde zur Durchführung der Versuche in DMSO gelöst und unter Lichtschutz aufbewahrt. Während der Versuche wurde die Substanz in vier unterschiedlichen Konzentrationen in das temperierte Organbad eingebracht. Das Organ, welches an einer Organhalterung befestigt wurde, musste zur Reproduzierbarkeit der Versuche vorgespannt werden.

Durch einen Kraftwandler war es möglich, das erhaltene mechanische Signal in ein elektrisches Signal umzuwandeln und dass durch einen Verstärker verstärkte Signal mittels Flachbetschreiber aufzeichnen zu lassen.

An keinem der getesteten Organe konnte MGdth6 eine therapeutisch relevante Wirkung erzielen. Am terminalen Ileum konnte bei einer Konzentration von 100 µmol/l die stärkste Wirkung beobachtet werden, da es hier zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von  $-26,51\% \pm 5,46\%$  kam.

Der mögliche Wirkmechanismus wurde am terminalen Ileum getestet. Eine Beteiligung der NO-Synthetase an der Wirkung von MGdth6 ist möglich, allerdings müssen auch noch andere Faktoren an der Wirkung beteiligt sein.

## 7. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2013) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer München. 11. Auflage

Estler CJ (1989) Lehrbuch der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer Verlag

Estler CJ, Schmidt H (2007) Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis. 6. Auflage. Schattauer Verlag

Kuschinsky G, Lüllmann H (1971) Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 5. Auflage

Kuschinsky G, Lüllmann H (1989) Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 12. Auflage

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2010) Pharmakologie und Toxikologie. Thieme Verlag. 17. Auflage

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Menzel S, Ruth P (2012) Arzneimittelwirkungen Pharmakologie Klinische Pharmakologie Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 10. Auflage

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

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

<http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Ipratropiumbromid> (abgerufen am 04.07.16)

Silbernagel S, Klinker R, Pape HC, Kurtz A (2009) Physiologie. Thieme Verlag

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (2007) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 6. Auflage

Tortora GJ, Derrickson BH (2006) Anatomie und Physiologie. Wiley-Blackwell Verlag

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
cGMP	cyclische Guanosinmonophosphat
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EKG	Elektrokardiographie
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
F	Mittelwert von...
GC-S	lösliche Guanylylcyclase
GTP	Guanosintriphosphat
KCl	Kaliumchlorid
MG	Molekulargewicht
mm Hg	mm Quecksilbersäule
mN	Millinewton
ms <sup>-1</sup>	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SEM	Standardfehler

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: EKG ST-Strecke .....	9
Abbildung 2: Anatomie des Herzens .....	11
Abbildung 3: Organe des Meerschweinchens .....	13
Abbildung 4: Chemische Struktur von MGdth6 .....	14
Abbildung 5: Operationsbesteck .....	19
Abbildung 6: terminales Ileum .....	19
Abbildung 7: Aorta descendens .....	20
Abbildung 8: Aorta descendens schematische Darstellung (Netter FH 2003) .....	21
Abbildung 9: Atrium dextrum .....	22
Abbildung 10: Papillarmuskel .....	22
Abbildung 11: Auflichtmikroskop zur Präparation.....	23
Abbildung 12: Arteria pulmonalis.....	23
Abbildung 13: Apparatur A .....	25
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Apparatur A .....	26
Abbildung 15: Apparatur B .....	27
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Apparatur B .....	28
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Kraftwandlers.....	29
Abbildung 18: Atrium dextrum in Apparatur B .....	31
Abbildung 19: Papillarmuskel in Apparatur A .....	32
Abbildung 20: Aorta descendens in Apparatur B .....	33
Abbildung 21: Arteria pulmonalis in Apparatur B.....	34
Abbildung 22: terminales Ileum in Apparatur B .....	35
Abbildung 23: Struktur von Nitro-L-Arginin .....	36
Abbildung 24: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MGdth6 .....	41
Abbildung 25: Originalaufzeichnung der ionotropen Wirkung von MGdth6.....	44
Abbildung 26: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MGdth6 ...	47
Abbildung 27: Originalaufzeichnung der vasodiltierenden Wirkung von MGdth6 .....	50
Abbildung 28: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von MGdth6 .....	53
Abbildung 29: Originalaufzeichnung des Wirkmechanismus .....	57

## 10. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am Atrium dextrum.....	40
Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am Papillarmuskel.....	43
Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve der Aorta descendens.....	46
Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve der Arteria pulmonalis.....	49
Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von MGdth6 am terminalen Ileum.....	52
Diagramm 6: Grapische Darstellung des Wirkmechanismus.....	56

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NYHA - Klassen.....	8
Tabelle 2: Stammlösung.....	15
Tabelle 3: Pipettierschema für eine Endkonzentration von 100 µmol/l .....	16
Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode.....	17
Tabelle 5: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode.....	17
Tabelle 6: Kaliumchloridlösung .....	18
Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MGdth6 am Atrium dextrum .....	39
Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MGdth6 am Papillarmuskel .....	42
Tabelle 9: Versuchsergebnisse von MGdth6 an der Aorta descendens .....	45
Tabelle 10: Versuchsergebnisse von MGdth6 an der Arteria pulmonalis .....	48
Tabelle 11: Versuchsergebnis von MGdth6 am terminalen Ileum.....	51
Tabelle 12: Resultat des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin und MGdth6 .....	55
Tabelle 13: Wirkung von MGdth6 an glattmuskulären Organen .....	58
Tabelle 14: Einfluss von MGdth6 an der Herzmuskulatur .....	60