



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten  
Imidazolderivats (MGim1) an isolierten Organen von  
Cavia porcellus“

verfasst von / submitted by

Rafael Maier

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

Wien, 2016 / Vienna, 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:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

# Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern, bedanken. Sie sind immer hinter mir gestanden, waren nicht nur finanziell eine große Stütze und haben mir so überhaupt erst ermöglicht so weit zu kommen.

Ein dickes Dankeschön geht auch an meinen Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ-Prof. Dr. Christian Studenik für seine permanente Hilfsbereitschaft, Geduld und überaus freundliche Art. Danke für diese großartige Zeit.

Herzlich bedanke ich mich auch bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker, Dipl.-Ing. (FH) Mario Gabriel und der Arbeitsgruppe vom Department für Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Testsubstanz.

Zuletzt sage ich danke an alle Freunde für eine wirklich tolle Zeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Physiologische Grundlagen der Kontraktionskraft des Herzens.....	1
1.2	Positiv inotrope Substanzen.....	1
1.2.1	Mögliche Ansatzpunkte positiv inotroper Substanzen.....	2
1.2.2	Vertreter und therapeutischer Einsatz.....	3
1.2.2.1	Herzglykoside.....	3
1.2.2.2	$\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten.....	5
1.2.2.3	Phosphodiesterase-Hemmer.....	5
1.2.2.4	Calciumsensitizer.....	6
1.2.2.5	Klasse-III-Antiarrhythmika.....	6
1.2.2.6	Veratrum-Alkaloide.....	7
1.2.2.3	Omecamtiv mecarbil.....	7
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik.....</b>	<b>9</b>
3.1	Physiologische Nährlösung.....	9
3.2	Kaliumchloridlösung.....	10
3.3	Versuchstiere.....	11
3.4	Isolierung der Organe.....	11
3.5	Präparation der Organe.....	11
3.5.1	Präparation des rechten Vorhofs.....	13
3.5.2	Präparation des Papillarmuskels.....	14

3.5.3	Präparation des Truncus pulmonalis.....	15
3.5.4	Präparation der Aorta.....	16
3.5.5	Präparation des terminalen Ileums.....	17
3.6	Versuchsapparaturen.....	17
3.6.1	Apparatur 1.....	18
3.6.2	Apparatur 2.....	19
3.6.3	Kraftwandler, Amplifier und Schreiber.....	20
3.7	Testsubstanz und Stammlösung der Testsubstanz.....	21
3.8	Durchführung der Versuche.....	22
3.8.1	Allgemeines Pipettierschema.....	22
3.8.2	Versuchsablauf am Vorhof.....	23
3.8.3	Versuchsablauf am Papillarmuskel.....	24
3.8.4	Versuchsablauf an den Gefäßen Aorta und Truncus pulmonalis.....	25
3.8.5	Versuchsablauf am terminalen Ileum.....	26
3.8.6	Versuchsablauf Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum.....	26
3.9	Auswertung.....	28
3.9.1	Auswertung rechter Vorhof.....	28
3.9.2	Auswertung Papillarmuskel.....	28
3.9.3	Auswertung terminales Ileum, Aorta und Truncus pulmonalis.....	29
3.9.4	Auswertung Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin an terminalem Ileum.....	29

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
4.1	Wirkung von MGim1 auf den Vorhof.....	31
4.2	Wirkung vom MGim1 auf den Papillarmuskel.....	34
4.3	Wirkung von MGim1 an Truncus pulmonalis.....	37
4.4	Wirkung von MGim1 an der Aorta.....	40
4.5	Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum.....	43
4.6	Wirkmechanismus am terminalem Ileum.....	46
4.6.1	Wirkung von 20 µmol/l MGim1 nach 30 µmol/l Nitro-L-Arginin.....	46
4.6.2	Wirkung von 20 µmol/l MGim1 nach 100 µmol/l Nitro-L-Arginin.....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	Effekt von MGim1 auf die Herzmuskulatur.....	52
5.2	Effekt vom MGim1 auf die glatte Muskulatur.....	54
5.2.1	MGim1 an Gefäßen.....	54
5.2.2	MGim1 am Darm.....	55
5.2.3	Vergleich des Effekts von MGim1 an Darm und Gefäßen.....	56
5.3	EC <sub>50</sub> -Werte im Vergleich.....	58
5.4	Wirkung von MGim1 in Kombination mit Nitro-L-Arginin.....	58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische Grundlagen der Kontraktionskraft des Herzens

Muskelkontraktion am Herzen beschreibt den Prozess der Verkürzung der kontraktilen Einheiten des Actomyosin-Systems. Dies ist abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bzw. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität. Ab einem gewissen Schwellenwert an Kalzium-Ionen kommt es zur Aktivierung, wobei eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über dieser Schwelle während der Systole mit einer Steigerung der Kontraktionskraft einhergeht. Bei Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter den Schwellenwert kommt es zur Erschlaffung der Muskulatur (Lüllmann und Mohr 1999).

Physiologische Mechanismen, die der Regulierung der Kontraktionskraft dienen, sind der Frank-Starling-Mechanismus und die Regulation durch den Herzsymphathikustonus. Der bereits Anfang des 20. Jahrhunderts begründete Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die Spannungsentwicklung in Abhängigkeit von der Vordehnung des Herzmuskels. Innerhalb eines bestimmten Bereiches erhöht sich die Kontraktionskraft des Myokards durch steigende Vordehnung. Die Bedeutung des Mechanismus liegt in der Feinabstimmung von venösem Rückstrom und Herzpumpleistung. Zusätzlich ist er an der Anpassung der Kontraktilität an den Aortendruck beteiligt. Die Regulation der Kontraktionskraft durch den Sympathikustonus erfolgt unbeeinflusst von der Vordehnung. Die Steuerung erfolgt in diesem Fall durch den Neurotransmitter Noradrenalin. Bei steigender Noradrenalin-Ausschüttung folgt ein vergleichsweise rascher Anstieg der Kraftentwicklung (Pape et al. 2014).

Erbringt das Herz so über längeren Zeitraum eine erhöhte Pumpleistung kommt es zur strukturellen Anpassung in Form von Hypertrophie (Pape et al. 2014).

## 1.2 Positiv inotrope Substanzen

Inotrope Stoffe sind definiert als *die Schlagstärke oder Kontraktionskraft (Inotropie) des Herzmuskels beeinflussend* (Pschyrembel 2007).

Der generelle pharmakologische Ansatz erfolgt dabei über eine Erhöhung des freien intrazellulären Kalziums bzw. durch Sensitivierung der Muskelfilamente gegenüber Kalzium

(Aktories et al. 2013). Im Folgenden werden die grundlegenden zur Verfügung stehenden Mechanismen aufgezählt und kurz erklärt.

### **1.2.1 Mögliche Ansatzpunkte positiv inotroper Substanzen**

Durch Bindung an die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und einhergehender Blockade der Enzymaktivität lässt sich der Auswärtsstrom von Natrium und der Einwärtsstrom von Kalium an der Myokardmembran senken. Am ohne Energieverbrauch arbeitenden  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) bewirkt die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Natrium einen verminderten Auswärtsstrom von Kalzium (Aktories et al. 2013).

Eine zweite Möglichkeit besteht in der verlängerten Öffnung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle. Wie im Mechanismus zuvor beschrieben führt der erhöhte  $\text{Na}^+$ -Einstrom zu einer Verringerung des Auswärtstransports von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Herzmuskelzelle (Aktories et al. 2013).

Die Öffnung der langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirkt ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Konzentration. Die Aktivierung erfolgt dabei unabhängig von cAMP (Aktories et al. 2013).

Des Weiteren lässt sich an den repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Kanälen durch Blockade der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  verlängern (Aktories et al. 2013).

Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Muskelzelle führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, welche durch Phosphorylierung eine Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und eine gesteigerte Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  im sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt. Die Konzentration von cAMP lässt sich zum einen rezeptorvermittelt über die Adenylylcyclase, zum anderen über eine Hemmung der Phosphodiesterase, einem cAMP-abbauenden Enzyms, steigern (Aktories et al. 2013).

Gegenüber den genannten Möglichkeiten zur Erhöhung des intrazellulären Calciums besteht eine weitere Option darin, die Filamente gegen  $\text{Ca}^{2+}$  zu sensitivieren. Hierbei wird die Schlagkraft durch Erhöhung der Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  gesteigert (Aktories et al. 2013).

## 1.2.2 Vertreter und therapeutischer Einsatz

Durch ihr definitionsgemäß gemeinsames Prinzip der Steigerung der Kontraktionskraft liegt der Haupteinsatz der positiv inotropen Arzneistoffe in der Therapie der Herzinsuffizienz. Herzinsuffizienz ist definiert als eine Herzmuskelschwäche. In der Folge ist das Herz durch Funktionseinschränkung nicht mehr im Stande die benötigte Förderleistung zu erbringen (Ammon 2004). Nach der New York Heart Association (NYHA) werden 4 Klassen der Herzinsuffizienz anhand des Schweregrads der körperlichen Einschränkung unterschieden: 1) Keine Beschwerden bzw. keine Einschränkung der Leistungsfähigkeit 2) Beschwerden durch ungewohnte Belastung 3) Beschwerden bei alltäglichen Belastungen und 4) Beschwerden bei Ruhe (Scholz und Schwabe 2005).

Das Prinzip der Steigerung der Kontraktionskraft als Therapieansatz bei der Herzinsuffizienz hat allerdings in der heutigen Zeit an Bedeutung verloren. Es hat sich gezeigt, dass die erhöhte Stimulation der ohnehin schon geschwächten Herzmuskulatur deren Untergang beschleunigt und so die Mortalitätsrate erhöht. Abgesehen von den Herzglykosiden ist der Einsatz bei Herzinsuffizienz auf akute Formen limitiert (Aktories et al. 2013).

### 1.2.2.1 Herzglykoside

Historisch betrachtet sind die Herzglykoside ein bedeutendes Pharmakon. Schon aus dem 18. Jahrhundert existieren Abhandlungen über den Einsatz von rotem Fingerhut (*Digitalis purpurea*) bei Herzinsuffizienz (Freissmuth et al. 2012).

Strukturell bestehen Herzglykoside aus einem Steroidgrundgerüst und drei glykosidisch verknüpften Desoxyzucker. Therapeutische Verwendung finden heute nur mehr Digitoxin und Digoxin inklusive der Derivate Acetyldigoxin und Methyldigoxin (Aktories et al. 2013).

Herzglykoside wirken über den zuvor beschriebenen Mechanismus der Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zu verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Ein positiv inotroper Effekt am Herzmuskel ist die Folge. Durch Überdosierung verschieben sich die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen derart, dass eine Abnahme des diastolischen Membranpotentials und somit Senkung der Reizschwelle die Folge ist. Resultat ist eine gesteigerte Erregbarkeit mit

möglichen Herzrhythmusstörungen. Als indirekter Effekt am Herzen erweist sich die Steigerung des parasympathischen Tonus sowie die Senkung des Tonus des Sympathikus. Negative Chronotropie und negative Dromotropie sind die Folge. Dieser Effekt ist bereits bei geringer Dosis zu beobachten und es wird ihm eine bedeutende Rolle in der positiven Wirkung von Herzglykosiden bei der Behandlung der Herzinsuffizienz zugeschrieben, da die Patienten hier generell unter erhöhtem Tonus des Sympathikus leiden. Als weitere Folge kommt es in der Gefäßmuskulatur ebenfalls zur Abnahme sympathischen Aktivierung und somit zu Vasodilatation. Hierbei ist zu beachten dass dieser Effekt zwar beim Herzinsuffizienten auftritt, beim Gesunden mit normalem Sympathikustonius allerdings der  $Ca^{2+}$ -Anstieg in der glatten Muskulatur Vasokonstriktion hervorruft (Freissmuth et al. 2012).

Die Wirkung bei Herzinsuffizienz ist somit Steigerung des Schlagvolumens und des Herzzeitvolumens bei Senkung der Herzfrequenz und des peripheren Gefäßwiderstands.

Der klinische Anwendungsbereich besteht in fortgeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz und tachyarrhythmischem Vorhofflimmern. In der DIG-Langzeitstudie von 1997 wird Digoxin als Zusatzgabe zu ACE-Hemmern und Diuretika kein Effekt auf die Gesamtmortalität zugeschrieben, allerdings zeigte sich eine verringerte Hospitalisierung der Patienten. Die Indikation bei tachyarrhythmischem Vorhofflimmern ist aus der negativ chronotropen und dromotropen Wirkung abgeleitet (Freissmuth et al. 2012).

Eine neuere Metaanalyse aus dem Jahr 2015 basierend auf 19 Studien mit insgesamt über 300.000 Patienten mit Herzinsuffizienz oder Vorhofflimmern zeigt eine erhöhte Gesamtmortalität von 21 % durch Digoxinbehandlung. Wobei aufgeschlüsselt der Prozentsatz bei Herzinsuffizienz-Patienten weniger drastisch erhöht ist als bei den Patienten mit Vorhofflimmern. Der Grund dafür könnte in den vorher beschriebenen positiven Effekten auf die Hämodynamik und neuronale Mechanismen bei Herzinsuffizienz liegen, welche bei Vorhofflimmern anscheinend kaum zum Tragen kommen (Vamos et al. 2015).

Der große Nachteil der herzwirksamen Glykoside ist ihre therapeutische Breite. Die Therapie muss individuell eingestellt werden und anhand von Serumspiegelanalysen ständig überwacht werden. Gegenüber den anfangs (zu Zeiten der DIG-Studie) angewendeten Spiegeln von  $> 1,2$  ng/ml bei Herzinsuffizienz sieht man heute deutlich niedrigere Spiegel von Digoxin im Bereich von 0,5-0,8 ng/ml als therapeutischen Bereich an (Karow und Lang-Roth 2016).

### **1.2.2.2 $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten**

Natürliche Vertreter dieser Stoffgruppe sind Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Synthetische Abwandlungen sind beispielsweise Isoprenalin, Dobutamin und Dopexamin. Ihre positiv inotrope Wirkung liegt in der vorher beschriebenen rezeptorvermittelte Erhöhung von cAMP via Stimulierung der Adenylylcyclase begründet. Der Effekt auf die Kontraktionskraft ist, verglichen mit den Herzglykosiden, schneller einsetzend und stärker ausgeprägt. Zudem ist er besser steuerbar. Dennoch bestehen erheblich Nachteile: Starke Steigerung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs, Begünstigung von Tachyarrhythmien, erhöhtes Risiko von Herzmuskelnekrosen und Desensitivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren mit folgendem Wirkungsverlust bei längerer Anwendung. Aus diesen Gründen sind die genannten Catecholamine, wenn überhaupt, nur in der niedrigsten möglichen Dosierung anzuwenden (Aktories et al. 2013).

Die künstlichen Catecholamine Dobutamin und Dopexamin finden Anwendung bei Herzinsuffizienz. Allerdings besteht diese Indikation nur für akute Formen. Adrenalin ist Mittel der Wahl bei Reanimation, Noradrenalin bei septischem Schock, Isoprenalin wird verwendet als Bronchospasmolytikum und Dopamin ist eine Option bei Schockzuständen (Karow und Lang-Roth 2016).

### **1.2.2.3 Phosphodiesterase-Hemmer**

Die Wirkstoffe Enoximon und Milrinon sind Vertreter der Gruppe der PDE-III-Hemmstoffe. Bei der PDE-III handelt es sich um ein Isoenzym der Phosphodiesterase von der mindestens 5 (PDE I-V) Isoformen unterschieden werden. Die Funktion der Phosphodiesterase liegt, wie vorher beschrieben, im Abbau des second messengers cAMP. Durch die Enzym-Hemmung steigt cAMP an, die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt in weiterer Folge intrazellulär an und die Schlagkraft erhöht sich. Im glatten Gefäßmuskel bewirken die PDE-III-Hemmer einen Ca<sup>2+</sup>-Mangel und somit eine Relaxation. Somit erklären sich die beiden Grundwirkungen: Positive Inotropie und Vasodilatation (Karow und Lang-Roth 2016).

Wegen erhöhter Sterblichkeitsrate und schwerer Nebenwirkungen wie Arrhythmien, finden die PDE-III-Hemmer nur in der Kurzzeittherapie bei schweren Formen der Herzinsuffizienz (NYHA 4), die nicht auf die Standardtherapie ansprechen, Verwendung (Aktories et al. 2013).

Methylxanthine wie Theophyllin wirken unselektiv auf alle PDE-Isoformen als Hemmstoffe. Ihre Wirkung ist vor allem bronchodilatatorisch und vasokonstriktorisch, ihr Anwendungsbereich liegt daher in der Pulmologie (Karow und Lang-Roth 2016).

#### **1.2.2.4 Calciumsensitizer**

Levosimendan zeichnet sich sowohl durch eine Empfindlichkeitserhöhung der Myofilamente gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  als auch durch eine selektive PDE-III-Hemmung aus. Folge ist eine Steigerung der Inotropie ohne nennenswerte Beeinflussung der Kontraktionszeiten. Der derzeitige Einsatzbereich von Levosimendan liegt im Bereich der akuten Herzinsuffizienz als Alternative zu den Catecholaminen (Aktories et al. 2013). Die Studienlage ist dabei nicht eindeutig.

In der 2002 veröffentlichten LIDO-Studie wurde der Einsatz von Levosimendan mit Dobutamin bei schwerer Herzinsuffizienz mit Low-Output verglichen. Levosimendan wird darin ein Vorteil zugesprochen durch günstigeren Effekt auf die Hämodynamik sowie durch niedrigere Mortalitätsrate (Follath et al. 2002).

Die 2007 publizierte SURVIVE-Studie zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied bezüglich Mortalität beim Vergleich von Levosimendan und Dobutamin bei der Behandlung der schweren Herzinsuffizienz (Mebazaa et al. 2007).

#### **1.2.2.5 Klasse-III-Antiarrhythmika**

Durch ihre Hemmung der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Kanäle bewirken Stoffe wie z.B. Amiodaron einen verlängerten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und somit eine Erhöhung der Kontraktionskraft. Dieses inotrope Prinzip wird allerdings nicht therapeutisch genutzt, da das Risiko für Arrhythmien steigt (Aktories et al. 2013).

### **1.2.2.6 Veratrum-Alkaloide**

Vertreter der Veratrum-Alkaloide wie Aconitin wirken über eine verlängerte Öffnungszeit der  $\text{Na}^+$ -Kanäle positiv inotrop durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung. Allerdings kommt es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials. Es findet sich keine therapeutische Anwendung (Aktories et al. 2013).

### **1.2.2.3 Omecamtiv mecarbil**

Ein neu entwickelter inotroper Stoff, dessen Ergebnisse in Studien zur Behandlung der Herzinsuffizienz Hoffnungen wecken, ist Omecamtiv mecarbil. Es wirkt als herzspezifischer Myosin-Aktivator, was zu einem positiv inotropen Effekt ohne gesteigerten Energieverbrauch führt. In Phase-II-Studien wurde eine Steigerung der linksventrikulären Auswurfraction sowie des Schlagvolumens bei Herzinsuffizienz nachgewiesen (Tariq und Aronow 2015).

## 2 Zielsetzung

In dieser Diplomarbeit soll die Wirkung des neu synthetisierten Imidazols MGim1 auf isolierte Organe von Meerschweinchen getestet und beurteilt werden.

Die Testung von MGim1 an einem Organ erfolgt in Form einer Versuchsreihe. Dabei findet jeder einzelne Versuch unter genau definierten Anfangsbedingungen statt um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Bei den verwendeten Organen handelt es sich um rechten Vorhof, Papillarmuskel, Aorta, Truncus pulmonalis und terminales Ileum. Der Vorhof dient der Testung auf einen möglichen chronotropen Effekt, der Papillarmuskel der Beurteilung einer möglichen Inotropie und an der Präparaten von den terminalem Ileum, sowie den Gefäßen Aorta und Truncus pulmonalis untersucht man auf spasmolytische bzw. vasodilatatorische Wirkung von MGim1.

Der spasmolytische Effekt auf den Darm wird dabei genauer getestet, indem man prüft ob der Wirkmechanismus von MGim1 hier auf einer Freisetzung von NO beruht.

Anhand von Dosis-Wirkungskurven wird der Effekt der Testsubstanz auf das jeweilige Organ beurteilt. Zusätzlich lassen sich EC<sub>50</sub>-Werte bestimmen, die Aufschluss über die Wirkstärke geben.

Prinzipiell angestrebt wird ein pharmakologisches Wirkprofil, das eine möglichst spezifische Wirkung an einem bestimmten Gewebe aufweist und dies bereits in niedriger Konzentration. Grund dafür liegt darin, dass generell durch steigende Spezifität einer Substanz die Zahl und die Intensität der verursachten Nebenwirkungen abnimmt.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Physiologische Nährlösung

Bei der täglich frisch zubereiteten Nährlösung handelt es sich um eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, die zugleich als physiologischer Puffer dient (Bailey und Ong 1978). Es ist eine blutisotone Lösung, die synonym auch Tyrode-Lösung genannt wird (Ammon 2004).

Der Ansatz mit den erforderlichen Stocklösungen (siehe Tabelle 1 und 2) erfolgt in einem 2 l Messkolben, wobei anfangs nur circa zur Hälfte mit destilliertem Wasser aufgefüllt und so für 20 Minuten mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast wird. Anschließend fügt man tropfenweise die entsprechende CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu. Das langsame Hinzufügen dient dazu einer möglichen Ausfällung entgegenzuwirken. Nun füllt man mit destilliertem Wasser auf 2 Liter auf und lässt weitere 30 Minuten begasen um die Sauerstoffsättigung der Lösung zu gewährleisten.

Die Nährlösung dient zur Aufrechthaltung der physiologischen Aktivität der entnommenen Organe. Ihre korrekte Zusammensetzung ist somit sowohl für Aufbewahrung nach Entnahme, als auch für die Testung selbst von Truncus pulmonalis, Aorta, rechtem Vorhof, Papillarmuskel und terminalem Ileum von großer Bedeutung.

*Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung*

<b>Substanz</b>	<b>Molare Masse</b>	<b>Konzentration Stocklösung</b>	<b>Stocklösung (ml) pro 1 l Tyrode</b>	<b>mmol / l</b>
NaCl	58.44 g/mol	1000.25 g / 5 l	33.60	114.90
KCl	74.55 g/mol	50.33 g / 5 l	35.00	4.73
NaHCO <sub>3</sub>	84.01 g/mol	125.00 g / 5 l	83.70	24.90
CaCl <sub>2</sub>	110.98 g/mol	147.02 g / 5 l	3.20	3.20
MgSO <sub>4</sub>	120.37 g/mol	62.00 g / 250 ml	1.18	1.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09 g/mol	34.00 g / 250 ml	1.18	1.18
Glucose	180.16 g/mol	Reinsubstanz	1.98	10.00

*Tabelle 2: Entsprechende Zusammensetzung von 2 Liter Tyrode*

<b>Reagens</b>	<b>Menge</b>
NaCl-Stocklösung	67,2 ml
KCl-Stocklösung	70,0 ml
NaHCO <sub>3</sub> -Stocklösung	167,4 ml
MgSO <sub>4</sub> -Stocklösung	2,36 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Stocklösung	2,36 ml
CaCl <sub>2</sub> -Stocklösung	6,4 ml
Glucose	3,96 g
Aqua Dest.	Ad 2000 ml

### **3.2 Kaliumchloridlösung**

Neben Tyrode als Nährlösung ist bei den Versuchen die Kaliumchlorid-Lösung von Bedeutung. Diese dient zur Kontraktion der Organe. Die Konzentration ist dabei nach empirischen Werten so gewählt, dass man nach Zugabe an den Organen eine Kontraktion von nahezu 100% erhält. Anschließend beobachtet man, ob sich durch Zupipettieren von Testsubstanz eine Spasmolyse bzw. Dilatation der Gewebe einstellt.

KCl-Lösungen kommen bei Testung von terminalem Ileum und den Gefäßen Truncus pulmonalis und Aorta zum Einsatz. Sie sind täglich frisch herzustellen. Die Versuche an rechtem Vorhof und Papillarmuskel laufen komplett in Nährlösung ab.

*Tabelle 3: Zusammensetzung der KCl-Lösungen für terminales Ileum, Truncus pulmonalis und Aorta*

<b>Organ</b>	<b>KCl-Einwaage in 100ml</b>	<b>Molarität</b>
Terminales Ileum	0,45 mg	60 mM
Aorta und Truncus pulmonalis	0,67 mg	90 mM

Die Einwaage erfolgt in einen 100 ml Messkolben. Anschließend wird mit Tyrode-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt und das Kaliumchlorid durch Schwenken vollständig gelöst.

### **3.3 Versuchstiere**

Die isolierten Organe, die bei den Versuchen verwendet werden, stammen von Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) aus der Ordnung der Nagetiere (Rodentia) (Herre und Röhrs 1990). Es handelt sich um männliche und weibliche Tiere des TRIK-Stammes im Alter von 8 bis 12 Wochen. Die Tötung erfolgt durch Genickbruch, da diese Methode schnell und somit verhältnismäßig wenig belastend für die Meerschweinchen ist. Direkt im Anschluss erfolgt die Entnahme der benötigten Organe, welche sofort in die vorbereitete Nährlösung gelegt werden.

### **3.4 Isolierung der Organe**

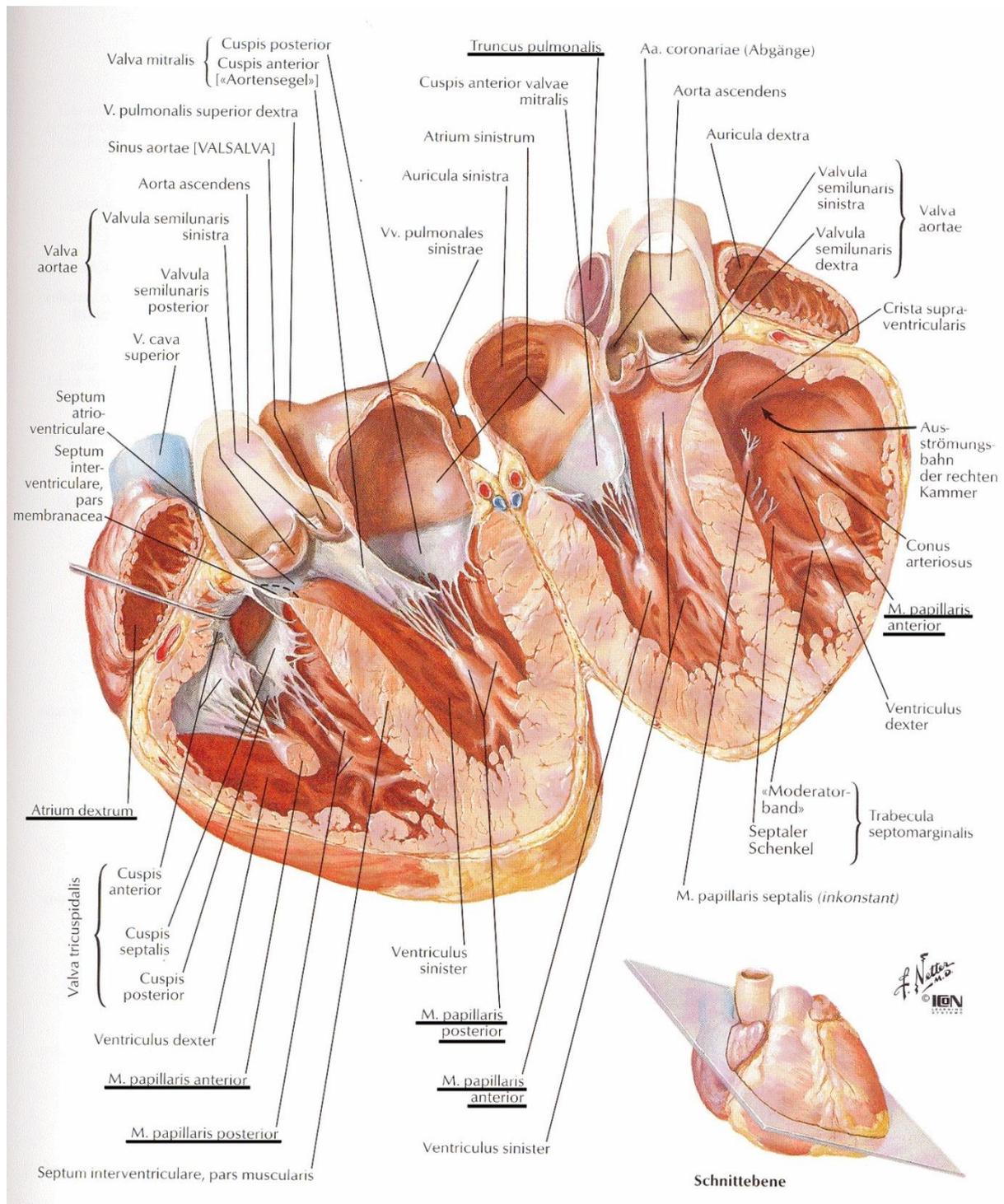
Gleich nach der Tötung öffnet man Bauchwand und Thorax des Meerschweinchens mit einer Schere. Als erstes erfolgt die Entnahme des Herzens inklusive des Truncus pulmonalis, dann die des Dünndarms und zuletzt die der Aorta. Der Reihe nach wird jedes der entnommenen Gewebe direkt in ein eigenes Becherglas, gefüllt mit an Carbogen gesättigter Tyrode, eingebracht. Beim verwendeten Teil des Dünndarms handelt es sich um das terminale Ende des Ileums. Bei der Aorta um den thorakalen Teil, welcher durch präzisen Schnitt mit einer feinen Schere entlang der Wirbelsäule isoliert wird. Dabei sollte möglichst wenig des umhüllenden Fettgewebes mitgenommen werden.

### **3.5 Präparation der Organe**

Im Anschluss an die Organentnahme erfolgt die Präparation des noch schlagenden Herzens bzw. seiner zur Testung benötigten Teile Vorhof und Papillarmuskel, sowie Isolierung des Truncus pulmonalis (siehe Abbildung 1). Die Bechergläser mit Aorta und Darm werden in der Zwischenzeit in der Tyrode-Lösung mit Carbogen begast.

Die Präparation dient dazu die Organe tauglich für die verwendeten Apparaturen zu machen.

Abbildung 1: Anatomische Zeichnung des Herzens (Netter 2003)



Quelle: Netter 2003

Präpariert wird in mit einem Korkring ausgelegten Petrischalen, welche circa zu einem Viertel mit der physiologischen Nährlösung befüllt werden. Um ein Aufschwimmen zu verhindern wird der Kork mit einem Kunststoffring befestigt. Die Organe werden darin mit

Präpariernadeln fixiert. Zudem benötigt man bei den weiteren Arbeitsschritten Federscheren, Pasteurpipetten, Pinzetten, S-förmige Haken aus Silberdraht, sowie dünnen Faden. Bei den besonders feinen Arbeiten wird ein Stereomikroskop verwendet.

Abbildung 2: Präparationsutensilien

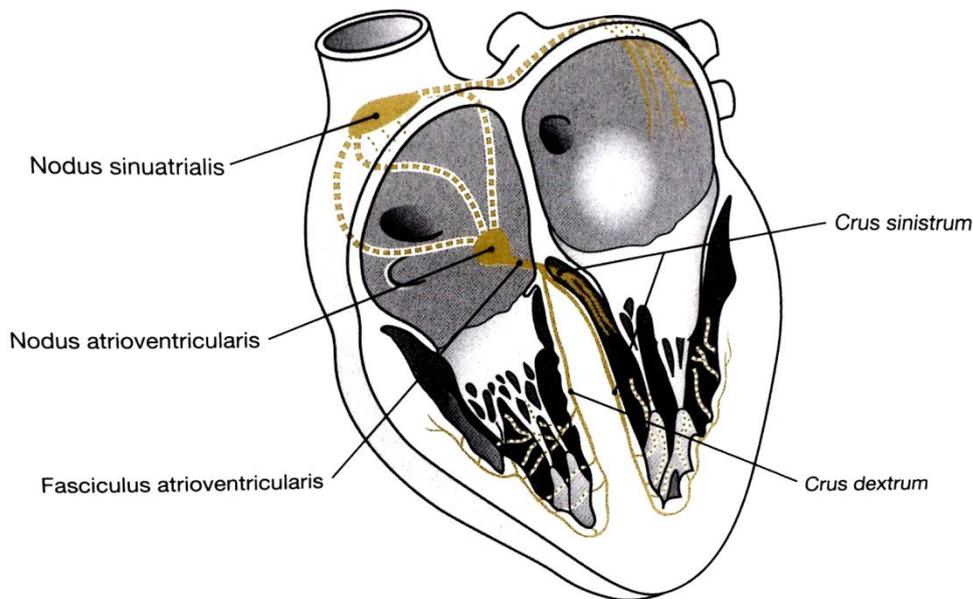


### 3.5.1 Präparation des rechten Vorhofs

Der rechte Vorhof (*Atrium dextrum*) befindet sich im oberen Teil des Herzens und beinhaltet den Zufluss der großen Hohlvenen, der Vena cava superior und inferior. Er wird vom linken Vorhof durch eine Scheidewand (*Septum interatriale*) getrennt. Drei Atrioventrikularklappen, auch Segelklappen genannt, sorgen am Übergang zur rechten Herzkammer dafür, dass während der Kontraktionsphase kein Blut zurück in den Vorhof gelangt (Thews et al. 2007).

In der Wand des rechten Vorhofs befindet sich der Sinusknoten (*Nodus sinuatrialis*), der als Taktgeber der Herzschlagfrequenz fungiert. Er veranlasst durch spontane Depolarisation die Erregung der Muskelzellen des Vorhofs. In der Folge kommt es durch Weiterleitung zum AV-Knoten (*Nodus atrioventricularis*) zur Ausbreitung der Erregung (Paulsen und Waschke 2010). Die spontane Aktivität des Sinusknotens ist der Grund, dass der Vorhof – im Gegensatz zum Papillarmuskel – keine weitere Stimulation benötigt um in der Nährlösung zu schlagen.

Abbildung 3: Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des Herzens (Paulsen und Waschke 2010)



Quelle: Paulsen und Waschke 2010

Das Herz wird in der Tyrode befüllten Petrischale mit Präpariernadeln fixiert. Zum Abtrennen von Blut kann die Nährlösung erneuert werden.

Begonnen wird mit der Öffnung des Herzens mittels Spitzschere, so dass rechte und linke Hälfte sichtbar werden. Der rechte Vorhof wird nun durch Schnitt entlang der Vena cava superior isoliert. Anschließend wird er am oberen Teil des Myokards und am unteren Teil eines verbliebenen Festrests mit je einer Präpariernadel fixiert. An den beiden Positionen der Nadeln wird mittels Präparierfaden jeweils ein S-förmiger Silberhaken durch Doppelknoten fest angebracht. Der fertig präparierte Vorhof wird nun zügig in die Apparatur eingespannt und in das mit Nährlösung befüllte und mit Carbogen begaste Organbad eingebracht.

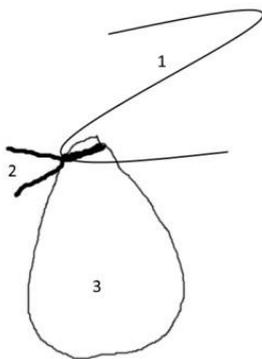
### 3.5.2 Präparation des Papillarmuskels

Die Papillarmuskeln (*Musculi papillares*) sind nach innen gerichtete Erhebungen der Herzkammermuskulatur. Über Sehnenfäden (*Chordae tendineae*) sind sie mit den Segelklappen verbunden und verhindert ein Zurückklappen dieser in den Vorhof während der

Systole (Benninghoff und Drenckhahn 2004). Sie sorgen somit dafür, dass das Blut im Herz nur in eine Richtung fließt.

Nach Entfernung des rechten Vorhofs folgt die Isolierung der Papillarmuskeln aus dem rechten Ventrikel. Am Ansatz der Sehnenfäden werden durch Fäden Silberhäkchen fixiert und die Papillarmuskeln herausgeschnitten. Die Purkinjefasern werden entfernt um bei den Versuchen Spontankontraktionen zu vermeiden. Analog ist das Vorgehen im linken Ventrikel. Bis zu ihrer Verwendung werden die isolierten Papillarmuskeln in Nährlösung mit Carbogen begast.

*Skizze 1: Präparierter Papillarmuskel*



*Legende zu Skizze 1: 1 = Silberdrahthaken; 2 = Präparierfaden um Ansatz der Sehnenfäden; 3 = Papillarmuskel*

### **3.5.3 Präparation des Truncus pulmonalis**

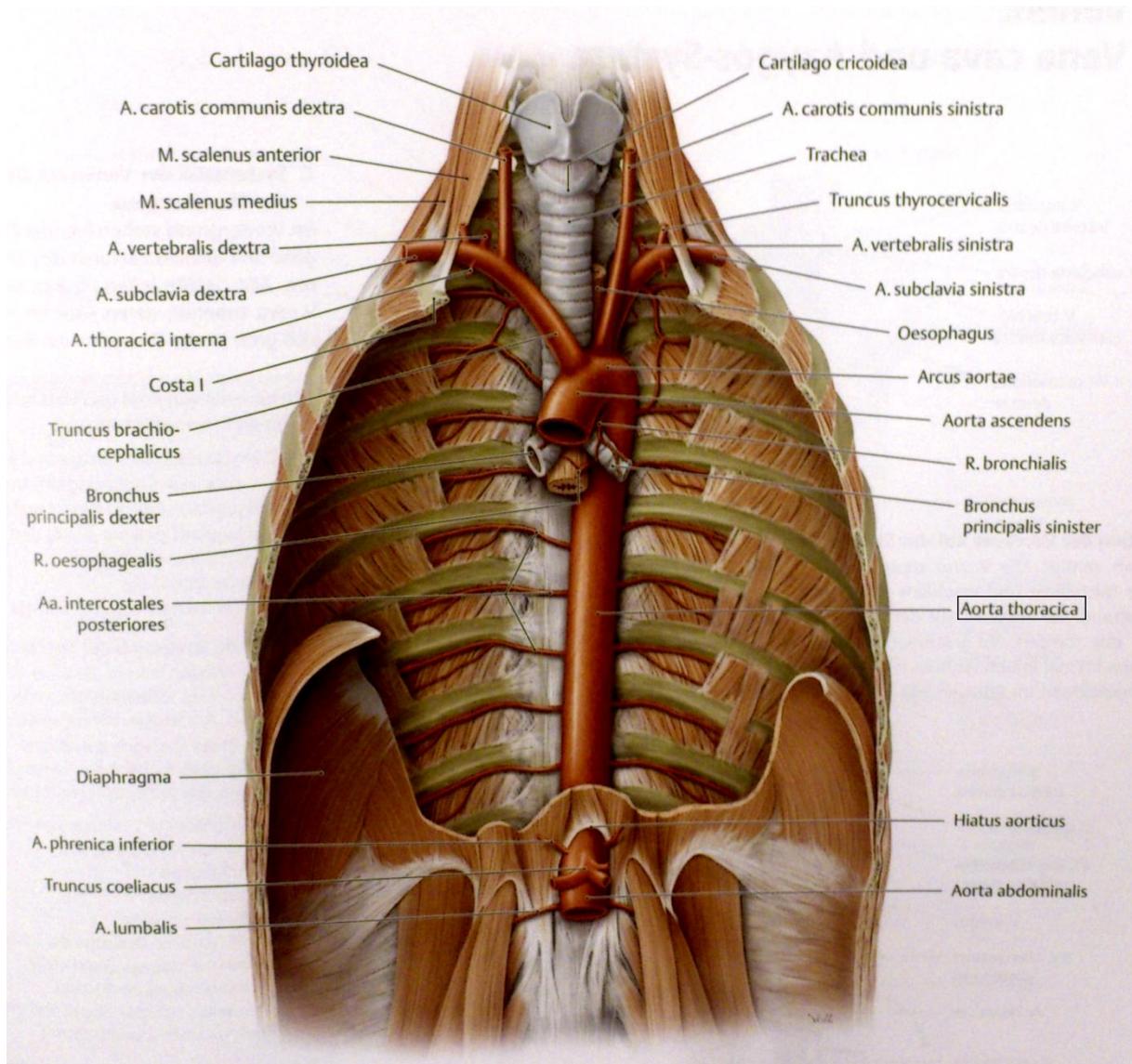
Der Truncus pulmonalis ist die herznahe Arterie, aus der die Pulmonalarterien entspringen (Lippert 2011). Er bildet somit deren gemeinsamen Stamm und transportiert sauerstoffarmes Blut aus dem rechten Ventrikel in Richtung Lunge (Thews et al. 2007).

Das Isolieren des Truncus pulmonalis erfolgt durch Entfernen von Herzgewebe, umliegenden Fettgewebes und der anliegenden Gefäße mit der Mirko-Federschere. Je nach Größe des Truncus pulmonalis können entweder ein- oder zwei Stücke von ca. 3 mm Länge gewonnen werden, die bis zu Versuchsbeginn in mit Carbogen begaster Tyrode-Lösung aufbewahrt werden.

### 3.5.4 Präparation der Aorta

Bei dem entnommenen Teil der Aorta handelt es sich um den thorakalen Teil (*Aorta thoracica*). Dieser ist Teil der Aorta descendens im Brustbereich, er verläuft von Aortenbogen bis Zwerchfell (Thews et al. 2007).

Abbildung 4: Anatomische Zeichnung der Aorta thoracica (Schünke et al. 2015)



Quelle: Schünke et al. 2015

Das entnommene Gefäß wird unter dem Stereomikroskop mit der Federschere sorgfältig von dem umliegenden Fettgewebe befreit. Dieser Arbeitsschritt ist von Bedeutung, da man so eine

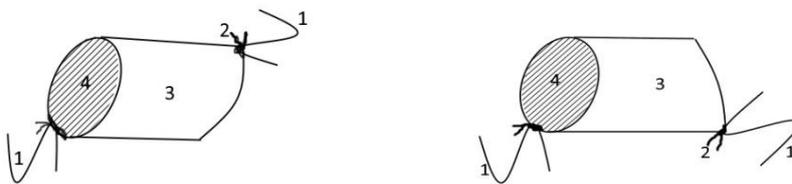
Einlagerung des Wirkstoffs im Fett und somit eine mögliche Ergebnisverfälschung vermeidet. Anschließend schneidet man die Aorta in 2-3 mm große Ringe für die Versuche.

### 3.5.5 Präparation des terminalen Ileums

Das Ileum stellt neben Jejunum und Duodenum einen Teil des Dünndarms dar. Zu den Funktionen des Dünndarms zählen Resorption, Verdauung, Weitertransport zu Dickdarm, Produktion von Hormonen und Immunabwehr (Anderhuber et al. 2012).

Von dem entnommenen Stück des terminalen Ileums werden für die einzelnen Versuche ca. 1cm große Stücke schräg abgeschnitten. Gereinigt wird das Lumen durch Spülen mit Nährlösung. An jeder geschnittenen Seite wird mittels Präparierfaden ein Silberhäkchen durch Doppelknoten befestigt. Besonders ist zu beachten dass dabei die Öffnung nicht zugebunden wird, da man bei den Versuchen eine Zirkulation des Wirkstoffs im Darmlumen benötigt.

*Skizze 2: Möglichkeiten der Darmpräparation*



*Legende zu Skizze 2: 1 = Silberdrahhaken; 2 = Präparierfaden; 3 = Stück des terminales Ileum; 4 = Lumen des terminalen Ileum*

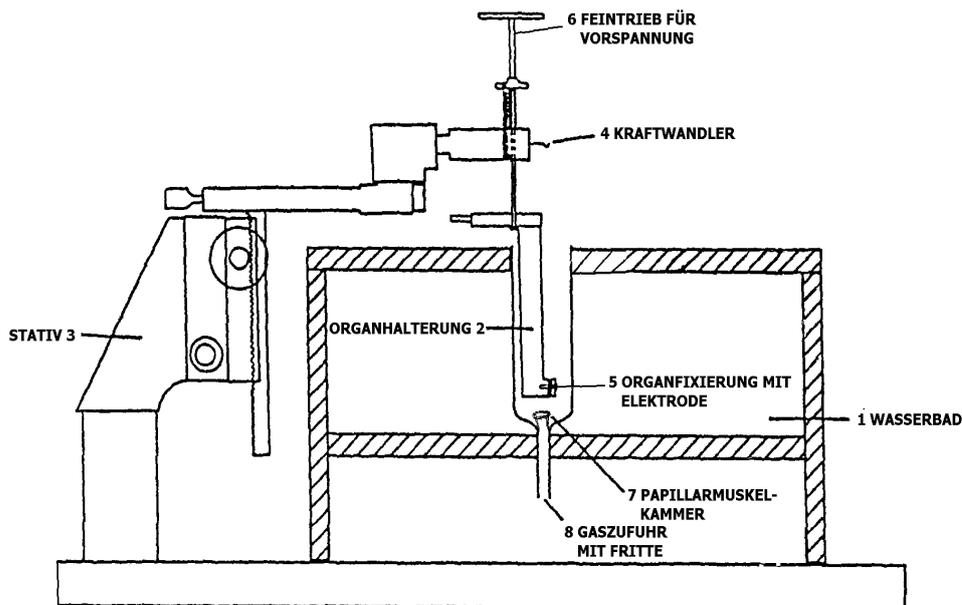
### 3.6 Versuchsapparaturen

Für die Versuche an den isolierten Organen ist es unerlässlich deren Vitalität aufrechtzuerhalten. Dazu wurden spezielle Apparaturen entwickelt, die durch Organbäder eine dauerhafte Versorgung mit den nötigen Nährstoffen durch die Tyrode-Lösung und dem richtigen Gasmisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid gewährleisten. Es erfolgen Messungen der isometrischen Kontraktion der Gewebe. Zur Reproduzierbarkeit der Versuche lässt sich eine genau definierte Vorspannung an den Organen einstellen.

### 3.6.1 Apparatur 1

Apparatur 1 dient der Untersuchung des Papillarmuskels mittels isometrischer Kraftmessung. Beurteilt wird hierbei die Änderung der Schlagkraft unter Einfluss der zu untersuchenden Substanz (Inotropie).

Skizze 3: Apparatur 1



Quelle: Department für Pharmakologie und Toxikologie Wien

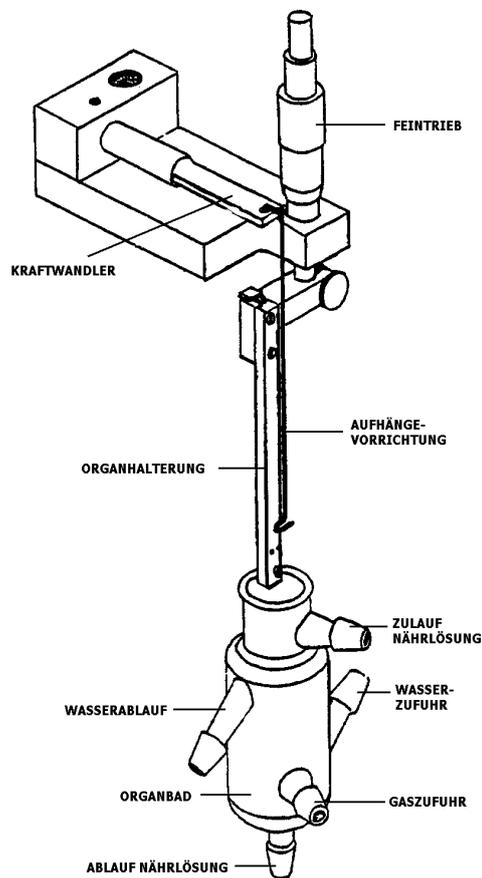
Das Organbad ist eingetaucht in einem auf  $35 \pm 1$  °C temperierten Wasserbad und enthält einen Carbogen-Zulauf. Es wird mit 25 ml Tyrode befüllt und mit Carbogen so begast, dass eine konstante Durchperlung der Lösung entsteht. Der präparierte Papillarmuskel enthält einen Silberhaken, der am Ansatz der Chordae tendineae mit Faden fixiert ist (siehe Skizze 1). Dieses Häkchen wird in der Aufhängevorrichtung eingehängt, wohingegen das untere Ende des Papillarmuskels direkt zwischen Elektrode und einer Plexiglasscheibe fixiert wird. Dies sollte zügig geschehen um den eingespannten Papillarmuskel möglichst schnell in das Organbad eintauchen zu können und so Organschäden zu vermeiden. Die Aufhängevorrichtung ist mit einem Kraftwandler verbunden. Zur Reproduzierbarkeit wird eine definierte Vorspannung mittels Feintrieb eingestellt.

Zur Stimulation des Papillarmuskels wird bei dieser Apparatur ein Reizgerät (Accupulser A310 und Stimulus Isolator A360, World Precision Instruments, USA) verwendet. Dies ist nötig, da der Papillarmuskel nicht autonom schlägt. Strom von bis zu 999 mA wird an den mit Plexiglas fixierten Papillarmuskel geleitet, der somit in einem definierten Intervall einen elektrischen Stimulus erhält und kontrahiert.

### 3.6.2 Apparatur 2

Apparatur 2 dient der Testung von Truncus pulmonalis, terminalem Ileum, rechtem Atrium und Aorta.

Skizze 4: Apparatur 2



Quelle: Department für Pharmakologie und Toxikologie Wien

Zur Schaffung einer möglichst physiologischen Umgebung für die Organe wird das doppelwandige Organbad durch ein auf  $37\pm 1$  °C temperiertes Wasserbad beheizt. Mittels Zu- und Ablauf erfolgt hierbei eine konstante Zirkulation im Zwischenraum der Doppelwand. Zudem enthält das Organbad einen Anschluss für Carbogen. Am unteren Ende dieses Gefäßes befindet sich ein Schlauch zum Ablassen von Nährlösung, nach oben hin ist es geöffnet.

Das zu testende Organ wird in einer Haltevorrichtung mittels Silberdraht von unten und oben fixiert. Das in dieser Apparatur eingehängte Organ kann nun in das mit Tyrode befüllte, temperierte und begaste Organbad eingebracht werden. Der obere Teil der Aufhängevorrichtung ist mit einem Kraftwandler verbunden, welcher nun sowohl ein gezieltes Einstellen der Vorspannung via Feintrieb, sowie die Messung des Tonus ermöglicht.

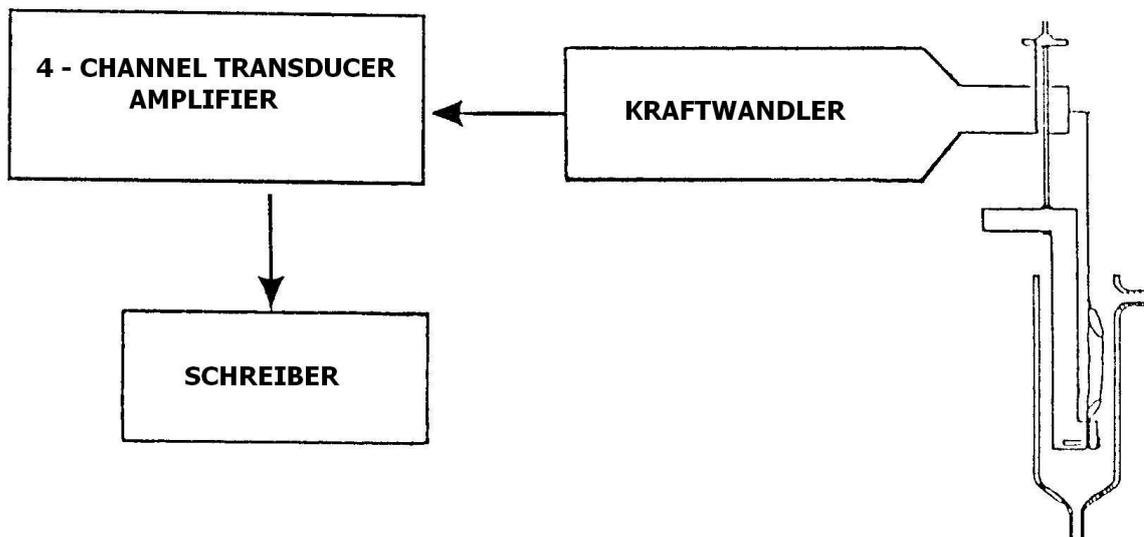
### **3.6.3 Kraftwandler, Amplifier und Schreiber**

Der Kraftwandler detektiert feinste mechanische Veränderungen an den Apparaturen. Hierbei handelt es sich um Änderungen des Tonus der eingespannten Organe. Diese Reize wandelt er in elektrische Signale um und leitet diese an den Amplifier weiter.

Bei dem Amplifier (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments, USA) handelt es sich um einen Verstärker, der die vom Kraftwandler erhaltenen elektrischen Impulse an den Schreiber weitergibt.

Das verstärkte Signal wandelt der Schreiber (Flatbed Recorder, BD-112; Kipp & Zonen, Niederlande) nun mit Tinte in einen Kurvenverlauf auf Papier um. Dabei sind Amplitudenhöhe (in mV), Laufgeschwindigkeit des Papiers und Nullpunkt einstellbar.

Skizze 5: Schematische Darstellung von Kraftwandler, Amplifier und Schreiber

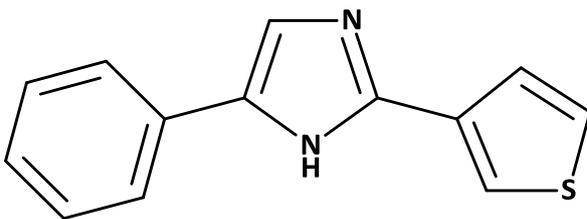


Quelle: Department für Pharmakologie und Toxikologie Wien

### 3.7 Testsubstanz und Stammlösung der Testsubstanz

Die zu testende Substanz MGim1 wurde von a.o. Univ.-Prof. Mag. pharm. Dr. Thomas Erker und seinem Team des Departments für Pharmazeutische Chemie zur Verfügung gestellt. Synthetisiert wurde sie von Dipl. Ing. (FH) Mario Gabriel.

Abbildung 5: Strukturformel MGim1

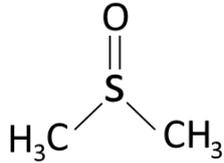


Die Nomenklatur von MGim1 lautet 5-Phenyl-2-(3-thienyl)-1H-imidazol, das Molekulargewicht beträgt 230.30 g/mol.

MGim1 wird in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dabei handelt es sich um eine mit Wasser mischbare farblose, hygroskopische Flüssigkeit, die in der

Lage ist für viele Verbindungen als Löslichkeitsvermittler in Wasser zu dienen (Beyer und Walter 2004).

Abbildung 6: Strukturformel DMSO



Vor Versuchsbeginn wird eine 0,025 molare Stammlösung von MGim1 hergestellt. Das bedeutet eine Menge von 2,5  $\mu\text{mol}$  (= 0,576 mg) MGim1 in 100 ml DMSO für Versuche am Organbad mit 25 ml Fassungsvermögen und 0,8  $\mu\text{mol}$  (= 0,184 mg) MGim1 in 100 ml DMSO für Versuche am Organbad mit 8ml Fassungsvermögen.

### 3.8 Durchführung der Versuche

Die Versuche werden an jedem der isolierten Organe einzeln durchgeführt. Dabei werden mehrere Versuche pro Organ benötigt um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die Organbäder und –Haltevorrichtungen werden nach jedem Versuch mit verdünnter HCl gereinigt und gründlich mit Aqua dest. nachgespült. Zusätzlich werden sie zu Beginn jeden Labortages mit Aqua dest. gespült.

#### 3.8.1 Allgemeines Pipettierschema

Zu allen an Apparaturen eingespannten Organen wird in die Nährlösung Testsubstanz in Form von Stammlösung in steigender Konzentration zugegeben. Dies erfolgt mit Eppendorf-Pipetten und immer nach demselben Muster (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Allgemeines Pipettierschema

Verstrichene Zeit (min)	Zugegebene Menge an MGim1-Stammlösung (µl)	Konzentration von MGim1 in Organbad nach Zupipettieren (µmol/l)
Start (Erreichen eines konstanten Kontrollwertes)	3	3
45	7	10
90	20	30
135	70	100

### 3.8.2 Versuchsablauf am Vorhof

Die Testung der Wirkung auf den Vorhof erfolgt an der vorher beschriebenen Apparatur 2. Vor Einbringen des Vorhofs wird das Organbad mit 25 ml Tyrode gefüllt und die Carbogenzufuhr so eingestellt, dass eine konstante Durchperlung der Lösung sichtbar ist. Fixiert wird der präparierte Vorhof durch Einhängen der angebrachten Silberhäkchen in die Haltevorrichtung. Der Teil mit sichtbarem Fettgewebe soll dabei nach oben schauen. Die Vorrichtung wird nun in die Tyrode eingebracht, wobei darauf zu achten ist, dass in der eingespannte Vorhof überall von Nährlösung umgeben ist. Kontakt des Organs mit Organbad oder Haltevorrichtung führen zu Ergebnisverfälschung. Nachdem man nun Schreiber und Amplifier eingeschaltet hat, wird der Schreiber auf 0 gestellt und der Vorhof mithilfe des Feintriebs auf 10,4 mN vorgespannt. Amplitudenhöhe wird auf 5 mV und Speed auf 5 mm/s gestellt. Da der Vorhof, wie zuvor bei der Präparation beschrieben, spontan schlägt ist meist spätestens hier am Schreibergerät ein Ausschlagen bemerkbar. Sollte die Amplitudenhöhe zu klein sein um ein Auszählen der Einzelschläge zu ermöglichen kann man auf 2 mV bzw. 1 mV umstellen. Man lässt nun den Vorhof 15-20 min in diesem Zustand bevor man die Kontrolle beginnt.

Eine Messung erfolgt alle 5 Minuten für einen Zeitraum von 12 Sekunden. Dabei zeichnet der Schreiber die Pulsationen über ein Feld von 6 cm. Diese Kontrolle führt man über mindestens 30 Minuten bzw. danach eben so lange durch, bis in dem aufgezeichneten Bereich eine

Variation von maximal einem Schlag auftritt. Nun kann nach dem oben angegebenen Schema die Substanz MGim1 in den Konzentrationen 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  jeweils 45 Minuten getestet werden. Die kumulierten Konzentrationen im Organbad werden durch Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  initial, 7  $\mu\text{l}$  nach 45 Minuten, 20  $\mu\text{l}$  nach 90 Minuten und 70  $\mu\text{l}$  nach 135 Minuten erreicht. Die Schläge in dem 12-Sekundenbereich alle 5 Minuten werden abgezählt um zu überprüfen welchen Einfluss die Testsubstanz auf die Chronotropie hat. Entscheidend bei allen Messungen ist vor allem der Wert 45 Minuten nach Einstellung der entsprechenden Konzentration, da hier der steady-state zu erwarten ist.

### **3.8.3 Versuchsablauf am Papillarmuskel**

Für Testung am Papillarmuskel wird die vorher beschriebene Apparatur 1 benötigt. Dabei wird das Organbad mit 25 ml Tyrode befüllt und das Gas auf den gewünschten durchgängig sichtbaren Perleffekt eingestellt. Das Organbad selbst befindet sich im temperierten Wasserbad. Der präparierte Papillarmuskel wird am Silberhaken in die Aufhängevorrichtung eingehängt und am unteren Ende mit einer Plexiglasscheibe an der Elektrode fixiert. Nun wird diese Halterungsapparatur soweit in die Nährlösung gesenkt, dass der Papillarmuskel gerade noch vollständig eingetaucht ist. Bei 5 mV und 5 mm/s Speed am Schreiber wird eine Vorspannung von 3,9 mN eingestellt. Da der Papillarmuskel im Gegensatz zum Vorhof nicht spontan schlägt benötigt man eine Stimulation mittels Reizgerät mit einem Hertz. Gestartet wird mit bei 999 mA wobei man wartet bis der Papillarmuskel zu schlagen beginnt. Anschließend dreht man die Stromstärke zurück bis die Kontraktionen aufhören. An diesem Punkt der Schwellstromstärke addiert man 10% der beobachteten Ampere und bringt den Muskel so wieder zum schlagen. Grund für dieses Vorgehen ist, dass man die Stromstärke nicht zu hoch wählen soll um eine Entleerung der Catecholaminspeicher zu vermeiden, da dies ein rasches Ermüden des Papillarmuskels und so eine Ergebnisverfälschung zur Folge hätte. Nun kann mit der Kontrollmessung begonnen werden. Aufgezeichnet wird über ein Feld von 6 cm entsprechend 12 Sekunden. Dieser Vorgang wiederholt sich wie vorher schon beim Vorhof alle 5 Minuten. Die Amplituden der Kontraktionen werden dabei mit Lineal abgemessen und notiert. Bei zu geringer Amplitudenhöhe kann diese durch Umschalten auf 1 bzw. 2 mV vergrößert werden. Beträgt die Höhe trotzdem weniger als 2 cm, so wird der Papillarmuskel als nicht geeignet verworfen. Die Kontrollwertmessung läuft nun über einen

Zeitraum von mindestens 40 Minuten. Sobald dann konstante Kontrollwerte, d.h. zwei aufeinanderfolgende Messungen mit mindestens einem Millimeter Unterschied in Höhe der Amplituden, erhalten werden, kann man mit dem Zupipettieren der Testsubstanz starten. Die Testsubstanz wird dabei in gewohnter Weise in Form von Stammlösung in den Konzentrationen 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  nacheinander am Organ getestet. Nach der jeweiligen Zugabe erfolgt wieder eine Messung alle 5 Minuten bis nach 45 Minuten auf die nächsthöhere Konzentration zugegeben wird.

### **3.8.4 Versuchsablauf an den Gefäßen Aorta und Truncus pulmonalis**

Durchführung der Tests an Aorta und Truncus pulmonalis erfolgt an Apparatur 2. Das Organbad wird mit 25 ml Tyrode-Lösung befüllt und die Carbogen-Zufuhr auf kontinuierlichen Fluss eingestellt. Die für den Versuch präparierten Stücke der Aorta und des Truncus pulmonalis bestehen aus von Fettgewebe befreiten, ca. 2 mm dicken, ringförmigen Schnitten dieser Gefäße. Sie werden direkt in die Apparatur eingehängt. Es ist darauf zu achten, dass dabei möglichst wenig Zug auf die Gefäße ausgeübt wird um eine Überdehnung der quergestreiften Muskulatur zu verhindern. Die eingespannten Organe werden nun in die Nährlösung gesenkt. Dabei ist wie immer darauf zu achten, dass außer zu Silberdrähten der Aufhängevorrichtungen kein Kontakt zu weiteren Teilen der Apparatur besteht. Nun wird zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit eine definierte Vorspannung mittels Feintrieb eingestellt. Bei der Aorta beträgt diese Vorspannung von 19,6 mN bei 10 mV, beim Truncus pulmonalis 9,81 mN bei 5 mV. Speed-Einstellung am Schreiber ist dabei 1 mm/min. In diesem Zustand lässt man die Organe nun 20 Minuten in der Tyrode-Lösung. Nach Ablauf der 20 Minuten wird bei Versuchen an der Aorta die Empfindlichkeit am Schreiber auf 5 mV, entsprechend 9,81 mV umgestellt. Im Weiteren sind Versuchsdurchführung an Aorta und Truncus pulmonalis ident. Nachdem der Schreiber jetzt auf null gestellt wurde startet mit der Aufzeichnung des Versuchs. Dabei lässt man die Tyrode aus dem Organbad ab und füllt die gleiche Menge an frisch hergestellter 90 mM KCl-Lösung nach. Diese bereits vorher beschriebene KCl-Lösung dient dazu, möglichst maximale Kontraktion der glatten Muskulatur herbeizuführen und so im weiteren Ablauf den spasmolytischen Effekt der Testsubstanz zu überprüfen. Nun wird mindestens 45 Minuten der Verlauf aufgezeichnet. Ist nach dieser Zeit in dem Kontraktionsverlauf ein konstanter Wert mit einer Amplitudenhöhe

von über 5 cm am Schreiber zu beobachten, kann begonnen werden die frisch zubereitete Stammlösung der Testsubstanz, bestehend aus MGim1 und DMSO, zuzupipettieren. Dabei wird vor der ersten Zugabe der aktuelle Wert im Kurvenverlauf markiert. Dieser Wert ist der Kontrollwert, entsprechend dem steady-state in KCl-Lösung. Die erste Zugabe an Stammlösung zum Organbad mit KCl-Lösung besteht aus 3 µl, entsprechend 3 µM Konzentration im Organbad. Der Verlauf wird dabei durchgehend aufgezeichnet. Nun wird nach dem üblichen Schema alle 45 Minuten die nächste definierte Menge an Stammlösung zugegeben. Erhalten werden so die Werte bei den MGim1-Konzentrationen 3, 10, 30 und 100 µmol/l.

### **3.8.5 Versuchsablauf am terminalen Ileum**

Das präparierte Darmstück wird an seinen angebundenen Silberhäkchen in die Apparatur 2 eingehängt. Die Vorspannung wird auf 4,9 mN bei 5mV eingestellt. Der Ablauf erfolgt analog zu dem an Aorta und Truncus pulmonalis: Einbringen in Tyrode-Lösung, 20 Minuten warten, dann Aufzeichnung starten und Tyrode durch KCl-Lösung ersetzen. Die verwendete KCl-Lösung besitzt beim terminalen Ileum eine Konzentration von 60 mmol/l. Nun beobachtet man, wie bei den Gefäßen, ob nach mindestens 45 Minuten ein konstanter Wert der gemessenen Kontraktion zustande kommt. Ist Konstanz erreicht, wird Testsubstanz in den gewohnten Mengen alle 45 Minuten zugegeben.

### **3.8.6 Versuchsablauf Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin am terminalen Ileum**

MGim1 zeigt eine signifikante spasmolytische Wirkung am Dünndarm (siehe 4.5 Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum), daher werden weitere Versuchsreihen durchgeführt um Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus ziehen zu können.

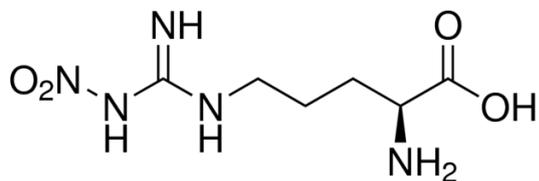
Zu diesem Zweck wird Nitro-L-Arginin herangezogen.

L-Arginin ist eine basisch reagierende Aminosäure aus der Gruppe der Diaminomonocarbonsäuren (Beyer und Walter 2004). Sie wird durch das Enzym NO-Synthase desaminiert, dabei entsteht Stickstoffmonoxid. Die im Endothel vorkommende NO-Synthase

wird als eNOS bezeichnet und setzt das entstehende Gas Stickstoffmonoxid frei. Es kommt zur Diffusion in das angrenzende Gewebe, der glatten Muskulatur. Hier führt NO durch intrazelluläre Bindung an die Guanylat-Cyclase zur schnellen Entspannung (Alberts et al. 2011). Im Darm deutet einiges darauf hin, dass NO hier als nicht adrenerger nicht cholinерger (NANC) Hemmer der glatten Muskulatur auftritt (Sanders und Ward 1992).

Nitro-L-Arginin hingegen weist eine Hemmung der NO-Synthase auf (Traystman et al. 1995) und eignet sich somit zur Überprüfung, ob MGim1 seine spasmolytische Wirkung über diesen Mechanismus freisetzt.

Abbildung 7: Nitro-L-Arginin



In der ersten Versuchsreihe wird, wie bei den Versuchen zuvor, gewartet bis sich ein konstanter Kontrollwert in KCl-Lösung einstellt. Anschließend erfolgt die Zugabe von in Tyrode gelöstem Nitro-L-Arginin zum Erreichen einer Konzentration von 30 µmol/l im Organbad. Nach 45 Minuten Wirkdauer wird MGim1 hinzugegeben. Analog findet eine weitere Versuchsreihe bei 100 µmol/l Nitro-L-Arginin statt.

Bei der einzustellenden Konzentration von MGim1 orientiert man sich dabei an der vorher in den Versuchen an terminalen Ilea erhaltenen Werten. Es wird eine Konzentration etwas über der ermittelten EC<sub>50</sub> (=14,11 µmol/l; siehe 4.5 Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum) gewählt um eine ausreichende Wirkung zu gewährleisten. In diesem Fall wählt man eine Konzentration von 20 µmol/l MGim1 für beide Versuchsreihen.

## **3.9 Auswertung**

Bei der Auswertung der Versuche werden die Werte unter den jeweiligen Konzentrationen an Testsubstanz MGim1 im steady-state, d.h. nach 45 Minuten Einwirkzeit, mit dem Kontrollwert verglichen. Dabei muss die Eigenwirkung des Lösungsmittels DMSO berücksichtigt werden.

### **3.9.1 Auswertung rechter Vorhof**

Durch die Versuchsreihen am rechten Vorhof lässt sich eine Aussage über die Änderung der Schlagfrequenz, der Chronotropie, treffen.

Ausgehend von dem konstanten Kontrollwert im Tyrodebad wird die Änderung der Schlagzahl während des jeweils 45 minütigen Einwirkens der Konzentrationen 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 beobachtet. Dabei werden die Schläge des Vorhofs während der 12 Sekunden Aufzeichnung alle 5 Minuten gezählt und mit 5 multipliziert. Man erhält die Schlagzahl pro Minute. Der Kontrollwert wird gleich 0 % gesetzt, eine Steigerung der Schlagzahl unter MGim1 signalisiert einen positiv chronotropen Effekt der Testsubstanz, eine Senkung signalisiert einen negativ chronotropen Effekt.

### **3.9.2 Auswertung Papillarmuskel**

Die Testung am Papillarmuskel gibt Aufschluss über die Änderung der Schlagamplituden und somit der Schlagkraft (Inotropie) unter Einfluss von MGim1.

Die Messung erfolgt mit dem Lineal auf dem Millimeterpapier. Ein Zentimeter entspricht dabei bei 5 mV einem Wert von 0,98 mN. Zur Umrechnung der Zentimeter in mN muss man also die erhaltenen Werte bei Einstellung auf 5 mV mit 0,98 multiplizieren, bei Einstellung auf 1 oder 2 mV mit Faktor 0,39. Die Amplitudenhöhe des Kontrollwerts wird dabei 0 % gleichgesetzt und mit der Änderung unter den verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanz nach 45 Minuten verglichen. Ein positiv inotroper Effekt der Testsubstanz führt zur Zunahme der Amplitudenhöhe, ein negativ inotroper Effekt zu deren Abnahme.

### **3.9.3 Auswertung terminales Ileum, Aorta und Truncus pulmonalis**

Durch Zugabe von KCl-Lösung wird eine möglichst große Kontraktion der glatten Muskulatur ausgelöst. Nachdem ein konstanter Kontrollwert erreicht ist kann man nun den spasmolytischen bzw. vasodilatatorischen Effekt von MGim1 zu den definierten Konzentrationen im steady-state messen. Die Umrechnung der dabei jeweils nach 45 Minuten in Zentimeter gemessenen Werte in mN erfolgt wie vorher über den Faktor 0,98 bei 5 mV.

### **3.9.4 Auswertung Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin an terminalem Ileum**

Nach Einstellung eines konstanten Kontrollwerts an Kontraktion in KCl-Lösung misst man die Änderung des Muskeltonus unter Einfluss von Nitro-L-Arginin nach 45 Minuten. Anschließend erfolgt die Zugabe von MGim1 mit Messung der spasmolytischen Wirkung nach weiteren 45 Minuten. Wie vorher erfolgt die Umrechnung der gemessenen Zentimeter in mN über den Faktor 0,98 bei 5 mV.

Aus der ersten Versuchsreihe erhält man die Werte für die Konzentrationen von 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin und 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin + 20  $\mu\text{mol/l}$  MGim1. Aus der Zweiten die Werte bei 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin und 100 $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin + 20  $\mu\text{mol/l}$  MGim1.

## 4 Ergebnisse

Im Folgenden wird pro Versuchsreihe an einem Organ eine tabellarische und graphische Zusammenfassung abgebildet, sowie die Aufzeichnung eines Originalversuchs.

Die Tabellen geben bei den jeweiligen Konzentrationen von MGim1 die Durchschnittswerte der Kontraktionskraft ( $f_c$ ) in mN bzw. Prozent und deren zugehörige Standardfehler (SEM) an. Beim Vorhof ist statt der Kontraktionskraft die Schlagzahl pro Minute ( $f$ ) angegeben. Zusätzlich sind Versuchsanzahl und Irrtumswahrscheinlichkeit enthalten.

Die Graphen beinhalten die erhaltenen Mittelwerte der Versuche (Punkte), deren ermittelte Standardfehler (Balken bei Punkten) und die Verbindung dieser Werte durch eine Linie. Auf der y-Achse ist die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft verzeichnet, auf der x-Achse logarithmisch die Konzentration von MGim1. Die gestrichelte Linie markiert die  $EC_{50}$ . Dies ist ein pharmakologisch und toxikologisch bedeutender Wert, der die Konzentration angibt bei der ein halbmaximaler Effekt zu verzeichnen ist (Jiang und Kopp-Schneider 2015). In unserem Fall bedeutet das diejenige Konzentration, bei der sich Schlagkraft, Schlagzahl oder Kontraktionskraft halbiert bzw. um 50% gesteigert haben.

## 4.1 Wirkung von MGim1 auf den Vorhof

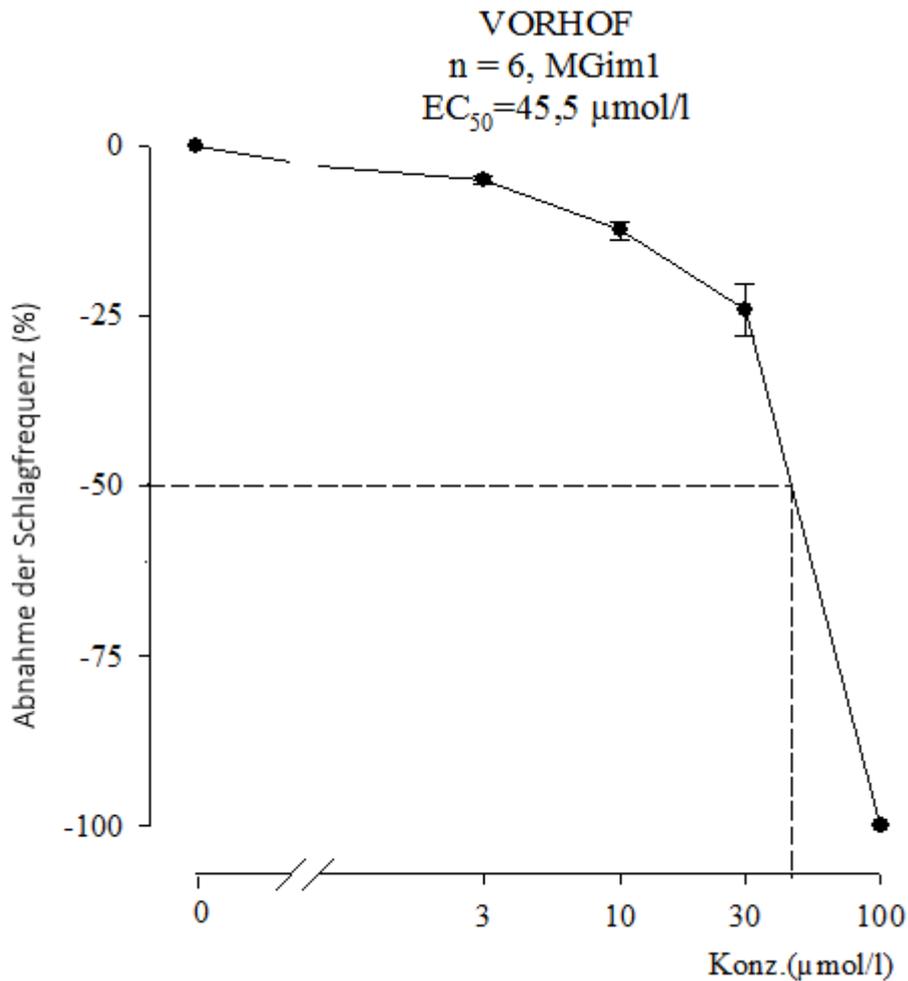
Am rechten Vorhof testet man welche Wirkung MGim1 auf die Schlagfrequenz am Herzen hat. MGim1 zeigt dabei einen negativ chronotropen Effekt.

Tabelle 5: Wirkung MGim1 auf Vorhof

<b>MGim1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>f <math>\pm</math> SEM (x/min)</b>	<b>f <math>\pm</math> SEM (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtums – wahrscheinlichkeit P</b>
Kontrolle	213,33 $\pm$ 13,82	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	202,50 $\pm$ 12,83	-5,04 $\pm$ 0,58	6	n.s.
10	186,67 $\pm$ 12,02	-12,47 $\pm$ 1,31	6	0,05
30	159,17 $\pm$ 4,17	-24,22 $\pm$ 3,86	6	0,01
100	0,00 $\pm$ 0,00	-100,00 $\pm$ 0,00	6	0,001

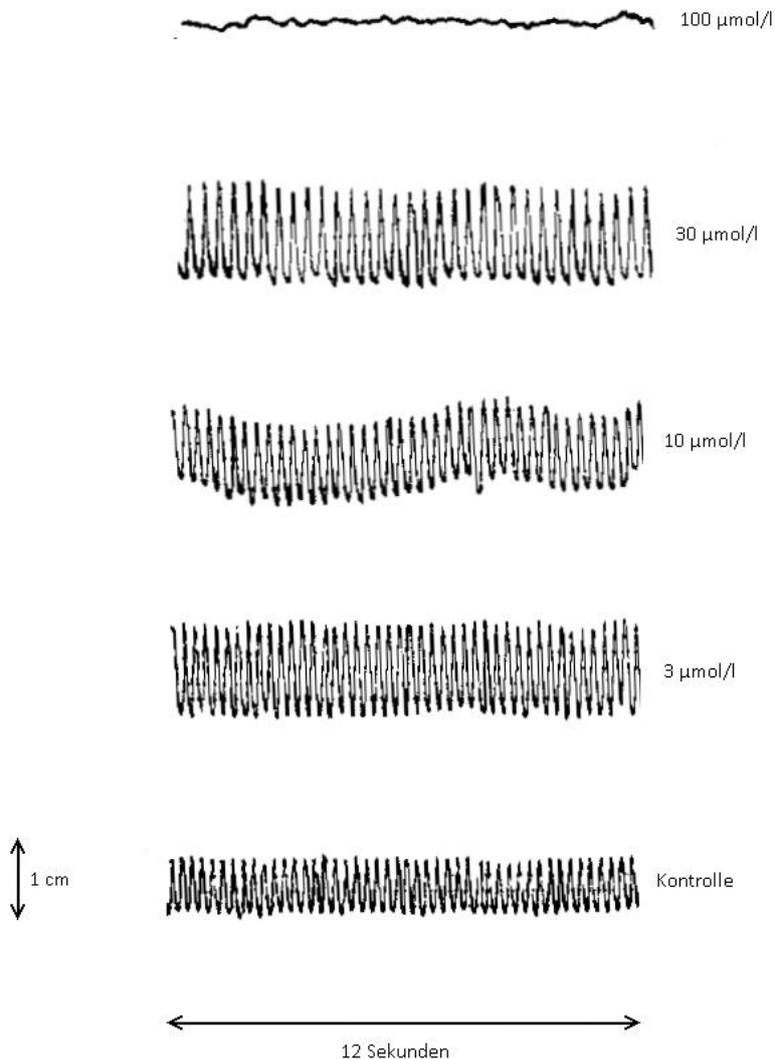
Anfänglich kommt es zu einer moderaten und weitgehend proportionalen Abnahme der Schlagzahl unter den Konzentrationen von 3, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$ . Anschließend kam es bei jedem Versuch der Reihe bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  zum Stillstand.

Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungskurve am rechten Vorhof



Durch die Konzentration-Wirkungskurve wird das Beschriebene nochmal graphisch verdeutlicht. Der erste Effekt auf die Schlagzahl wird bereits bei der Konzentration von 3 µmol/l. Bis 30 µmol/l kommt es zu einem relativ moderaten, negativ chronotropen Effekt von durchschnittlich ca. 24 %. Bei Dosiserhöhung auf 100 µmol/l kommt es zur Abnahme der Frequenz um 100 %. Die EC<sub>50</sub> ist bei 45,5 µmol/l MGim1 ermittelt.

Abbildung 8: Originalversuch Vorhof



Der abgebildete Originalversuch mit MGim1 am Vorhof stellt die Schlagfrequenz nach 45 min unter der jeweiligen Konzentration dar. Aufgezeichnet wird 12 Sekunden lang. Die Kontrolle zeigt die Frequenz des Vorhofs in Tyrode-Lösung. Die einzelnen Ausschläge im 12-Sekunden-Intervall werden gezählt und miteinander verglichen. Bereits mit dem bloßen Auge ist eine Abnahme der Schlagzahl mit steigender Konzentration bis 30  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 sichtbar. Die Linie bei 100  $\mu\text{mol/l}$  signalisiert, dass der Vorhof die Schlagtätigkeit komplett eingestellt hat.

Obwohl der Versuch rein der Beurteilung der Chronotropie dient, lässt sich bei Betrachtung des Originalversuchs bereits eine Vermutung aufstellen, die durch die Testung am Papillar bestätigt wird: Die Amplitudenhöhe ist bis zur Einstellung der Schlagfunktion unter MGim1 steigend.

## 4.2 Wirkung vom MGim1 auf den Papillarmuskel

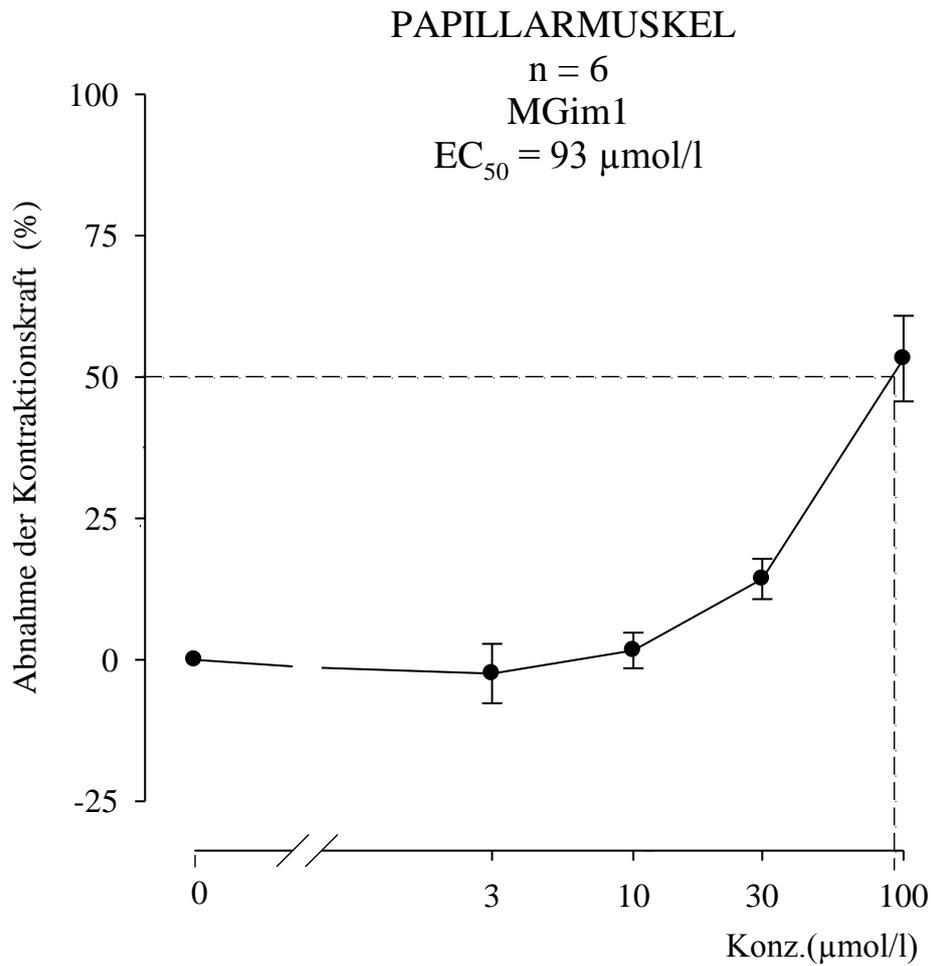
Am Papillarmuskel wird die Auswirkung von Mgin1 auf die Schlagkraft, die Inotropie, ermittelt. Erst in höheren Konzentrationen lässt sich dabei ein positiv inotroper Effekt beobachten.

*Tabelle 6: Wirkung am Papillarmuskel*

<b>MGim1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche <b>n</b></b>	<b>Irrtums – wahrscheinlichkeit <b>P</b></b>
Kontrolle	1,21 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	1,19 $\pm$ 0,19	-2,44 $\pm$ 5,26	6	n.s.
10	1,23 $\pm$ 0,19	1,65 $\pm$ 3,14	6	n.s.
30	1,38 $\pm$ 0,18	14,28 $\pm$ 3,58	6	0,05
100	1,83 $\pm$ 0,20	53,25 $\pm$ 7,58	6	0,01

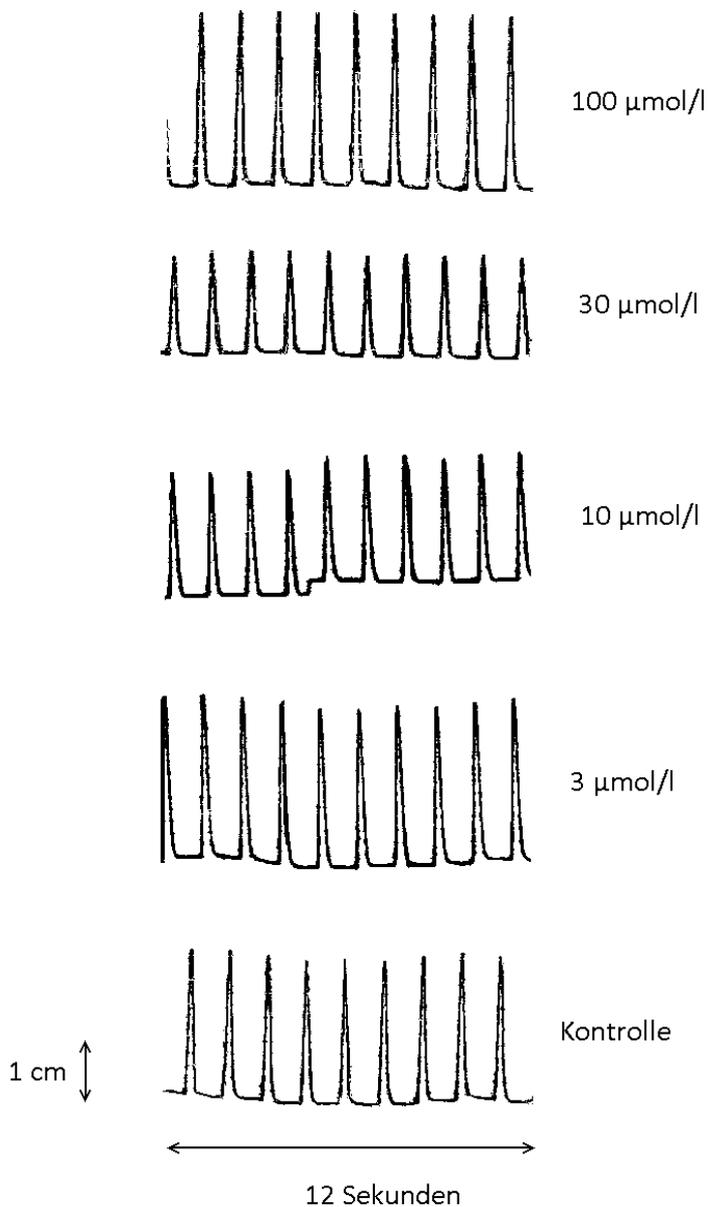
Aus Tabelle 6 entnimmt man bei der Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  im arithmetischen Mittel eine leichte Senkung der Schlagkraft, bei 10  $\mu\text{mol/l}$  hingegen eine leichte Steigerung. Die beiden Werte haben allerdings eine relativ hohe Schwankungsbreite, so dass man die Änderungen nicht als signifikant bezeichnen kann. Ein signifikanter Effekt tritt ab der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  auf. Es kommt zu einer Steigerung der Schlagkraft um ca. 14%, einem mäßigen positiv inotropen Effekt. Dieser Effekt verstärkt sich bei den Versuchen unter 100  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 auf etwas über 53% im Durchschnitt.

Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve am Papillarmuskel



In der graphischen Darstellung sieht man den anfänglich geringen Effekt bei 3 und 10 µmol/l. Besonders bei der Konzentration von 3 µmol/l fällt die relativ hohe Spanne des Standardfehlers auf. Bei 30 und 100 µmol/l ist ein proportionaler Anstieg der Schlagkraft zur Konzentration zu verzeichnen. Die EC<sub>50</sub> liegt bei 93 µmol/l.

Abbildung 10: Originalversuch Papillarmuskel



In der Originalabbildung einer Versuchsaufzeichnung am Papillarmuskel sind die 12-Sekunden-Intervalle in der jeweiligen Konzentration MGim1 nach jeweils 45 min abgebildet. Als Kenngröße ist außerdem 1 cm angegeben. Die durchschnittliche Amplitude wird gemessen und mit dem Kontrollwert verglichen. Kontrollwert ist die konstante Schlagkraft des Papillarmuskels in Tyrode-Lösung. Es lässt sich mit dem Auge eine leichte Zunahme der Amplitude nach 100  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 beobachten, bei der allerdings zur Wertermittlung der negativ inotrope Effekt des Lösungsmittels DMSO berücksichtigt werden muss.

### 4.3 Wirkung von MGim1 an Truncus pulmonalis

Am Truncus pulmonalis testet man auf den Effekt der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur der Gefäße. MGim1 zeigt dabei eine vasodilatierende Wirkung.

*Tabelle 7: Wirkung an Truncus pulmonalis*

<b>MGim1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtums - wahrscheinlichkeit P</b>
Kontrolle	$10,78 \pm 0,78$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$10,26 \pm 0,79$	$-4,96 \pm 0,84$	5	n.s.
10	$9,41 \pm 0,86$	$-12,99 \pm 3,01$	5	0,05
30	$7,39 \pm 0,94$	$-31,93 \pm 5,86$	5	0,01
100	$3,13 \pm 0,93$	$-71,07 \pm 8,86$	5	0,001

In Tabelle 7 entspricht nun eine Abnahme an mN einer Herabsetzung des Muskeltonus. Somit lässt sich bereits bei der geringen Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 eine leichte Vasodilatation, verglichen mit dem Kontrollwert, beobachten. Mit steigender Konzentration der Testsubstanz verstärkt sich dieser Effekt.

Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve an Truncus pulmonalis (hier als Arteria pulmonalis bezeichnet)

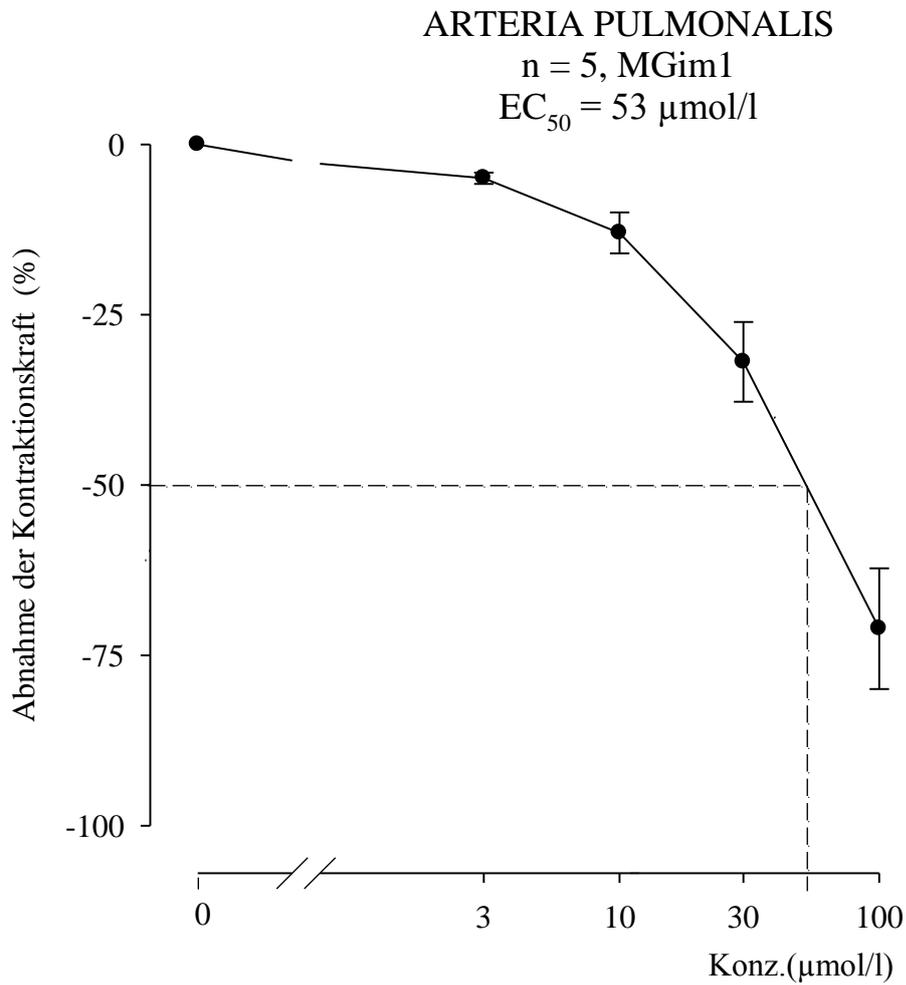


Abbildung 11 veranschaulicht die kontinuierliche Abnahme des Muskeltonus im Truncus pulmonalis unter Einfluss der steigenden MGim1-Konzentration. Die EC<sub>50</sub> kann bei 53 µmol/l ermittelt werden.

Abbildung 12: Originalversuch an *Truncus pulmonalis*

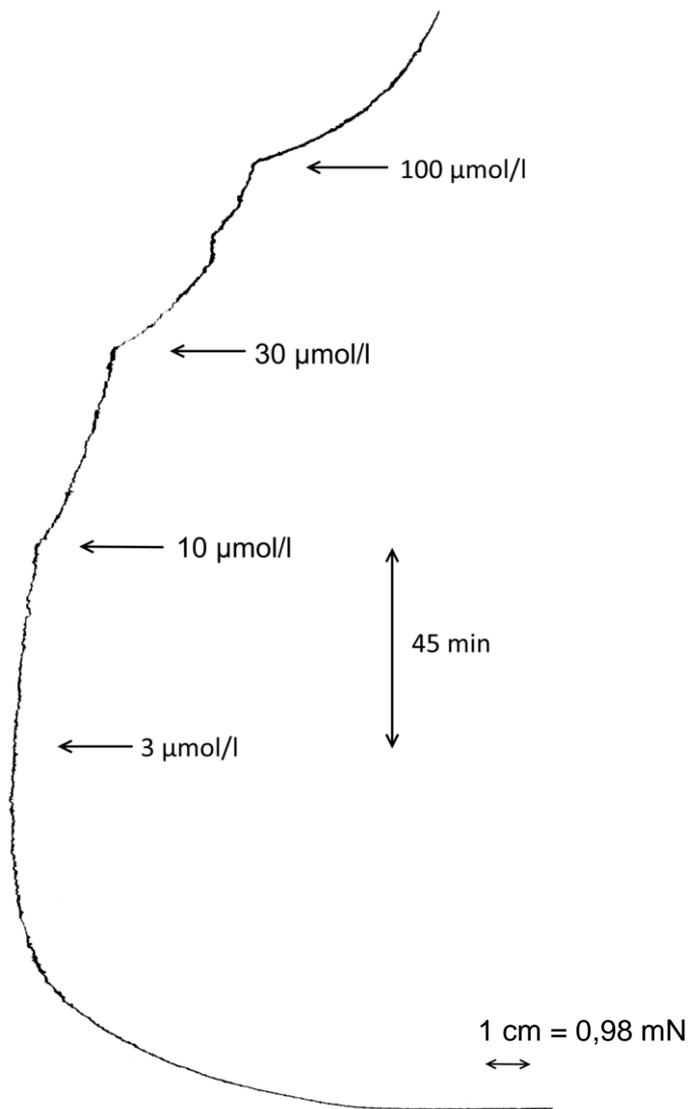


Abbildung 12 zeigt die Originalaufzeichnung eines Versuchs am *Truncus pulmonalis*. Als Kenngrößen sind 1 cm (= 0,98 mN) und 45 min angegeben. Der Kurvenverlauf bezeichnet somit die Kontraktionskraft des Gefäßes bei fortlaufender Zeit. Die Zeit ist von unten nach oben fortschreitend. Die einzelnen Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe an MGim1 zum Erreichen der jeweils verzeichneten Konzentration. Bis zum ersten Pfeil bei 3 µmol/l zeigt der Kurvenverlauf die Kontraktion des Darms in KCl-Lösung. Eine Verschiebung nach links bedeutet Vasokonstriktion, eine Verschiebung nach rechts bedeutet eine Abnahme der Kontraktionskraft, also Vasodilatation.

Zu beobachten ist die anfangs leichte, ab 30 µmol/l stärkere Vasodilatation durch MGim1.

#### 4.4 Wirkung von MGim1 an der Aorta

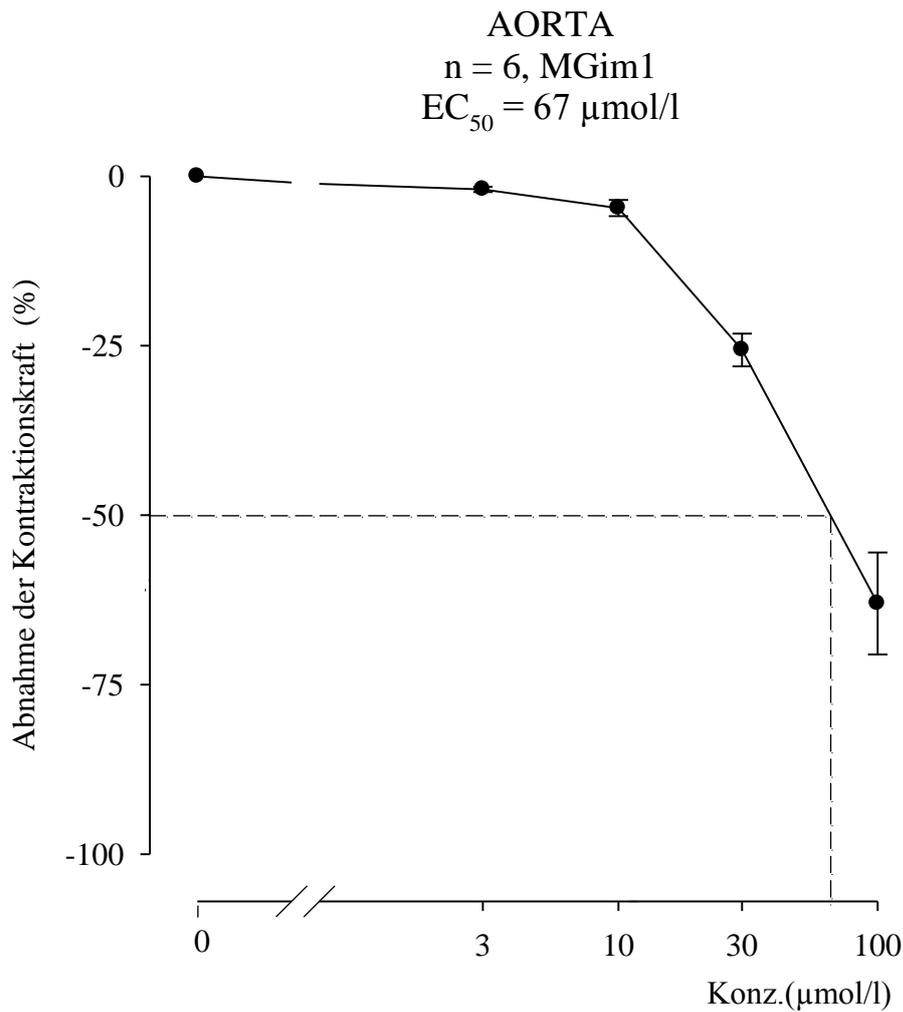
Mit der Aorta hat man ein weiteres Gefäß zur Verfügung an dem der Effekt von MGim1 auf die glatte Muskulatur getestet werden kann. Die Versuche zeigen eine Abnahme der Kontraktionskraft und somit einen vasodilatatorischen Effekt von MGim1.

*Tabelle 8: Wirkung an der Aorta*

<b>MGim1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtums – wahrscheinlichkeit P</b>
Kontrolle	11,82 $\pm$ 1,28	0,00 $\pm$ 0,00	6	-
3	11,58 $\pm$ 1,23	-1,93 $\pm$ 0,39	6	n.s.
10	11,20 $\pm$ 1,10	-4,69 $\pm$ 1,20	6	n.s.
30	8,73 $\pm$ 0,84	-25,63 $\pm$ 2,42	6	0,05
100	4,34 $\pm$ 0,80	-63,03 $\pm$ 7,52	6	0,01

Den Werten aus Tabelle 8 kann man entnehmen, dass bereits ab der niedrigsten Konzentration (3  $\mu\text{mol/l}$ ) ein leichter vasodilatatorischer Effekt entsteht, der durch steigende Konzentration verstärkt wird.

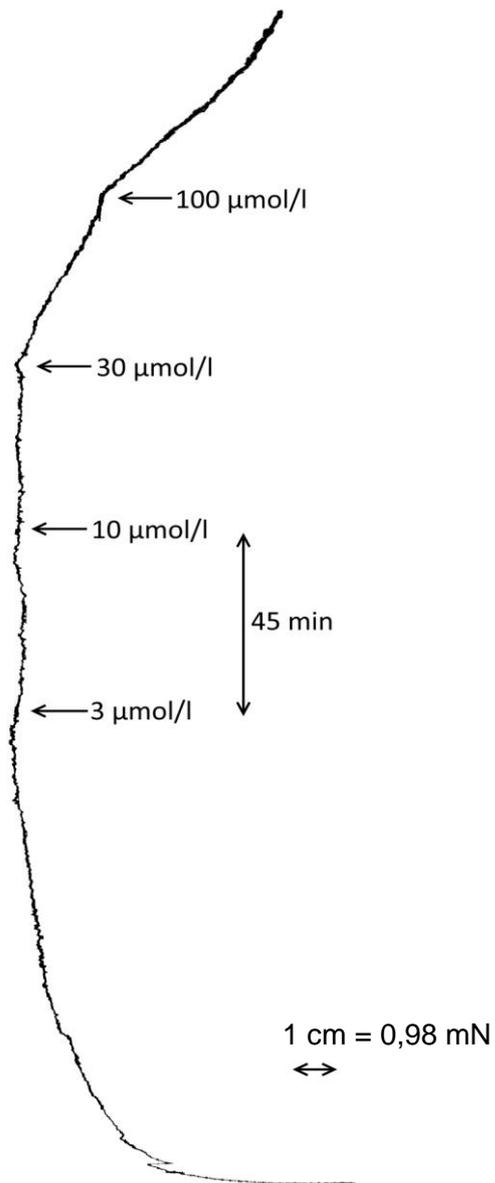
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve an der Aorta



An Abbildung 13 ist die anfangs leichte, in höheren Konzentrationen jedoch deutliche Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta unter Einfluss von MGim1 sichtbar. Die EC<sub>50</sub> liegt bei 67 µmol/l.

Auch wenn die Vasodilatation nicht ganz so stark ausgeprägt und die EC<sub>50</sub> später erreicht wird, so ähnelt der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve an der Aorta doch dem des Truncus pulmonalis (siehe vorher).

Abbildung 14: Originalversuch an der Aorta



Die Originalaufzeichnung des Kurvenverlaufs zeigt die Kontraktionskraft (1 cm = 0.98 mN) der Aorta pro Zeiteinheit (min). Die Zeit ist dabei von unten nach oben fortschreitend. Bis zum ersten Pfeil bei 3  $\mu\text{mol/l}$  beschreibt die Kurve die Kontraktionskraft der Aorta in der KCl-Lösung. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe an MGim1 zum Erreichen der angezeichneten Konzentration. Eine Kurvenverschiebung nach links bedeutet eine Zunahme der Kontraktionskraft, Rechtsverschiebungen zeigen Abnahme der Kontraktionskraft, also Vasodilatation, an.

Der abgebildete Versuch zeigt ab 30  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 eine leichte Vasodilatation.

## 4.5 Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum

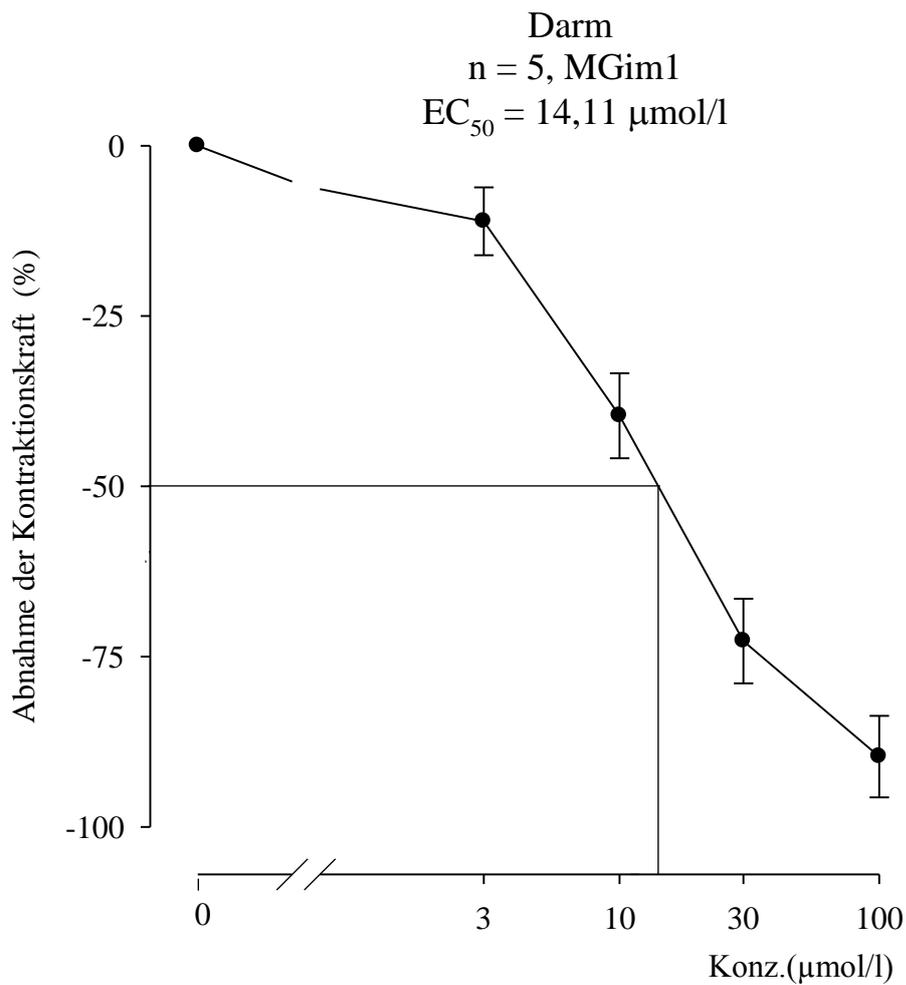
Es wird auf Wirkung an der glatten Muskulatur des Dünndarms getestet. Dabei lässt sich ein spasmolytischer Effekt von MGim1 beobachten.

*Tabelle 9: Wirkung am terminalen Ileum*

<b>MGim1 (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</b>	<b>Anzahl der Versuche n</b>	<b>Irrtums – wahrscheinlichkeit P</b>
Kontrolle	$8,58 \pm 1,57$	$0,00 \pm 0,00$	6	-
3	$7,56 \pm 1,37$	$-11,10 \pm 4,98$	6	0,05
10	$5,21 \pm 1,20$	$-39,64 \pm 6,25$	6	0,01
30	$2,51 \pm 0,98$	$-72,71 \pm 6,21$	6	0,01
100	$1,05 \pm 0,73$	$-89,68 \pm 5,99$	6	0,01

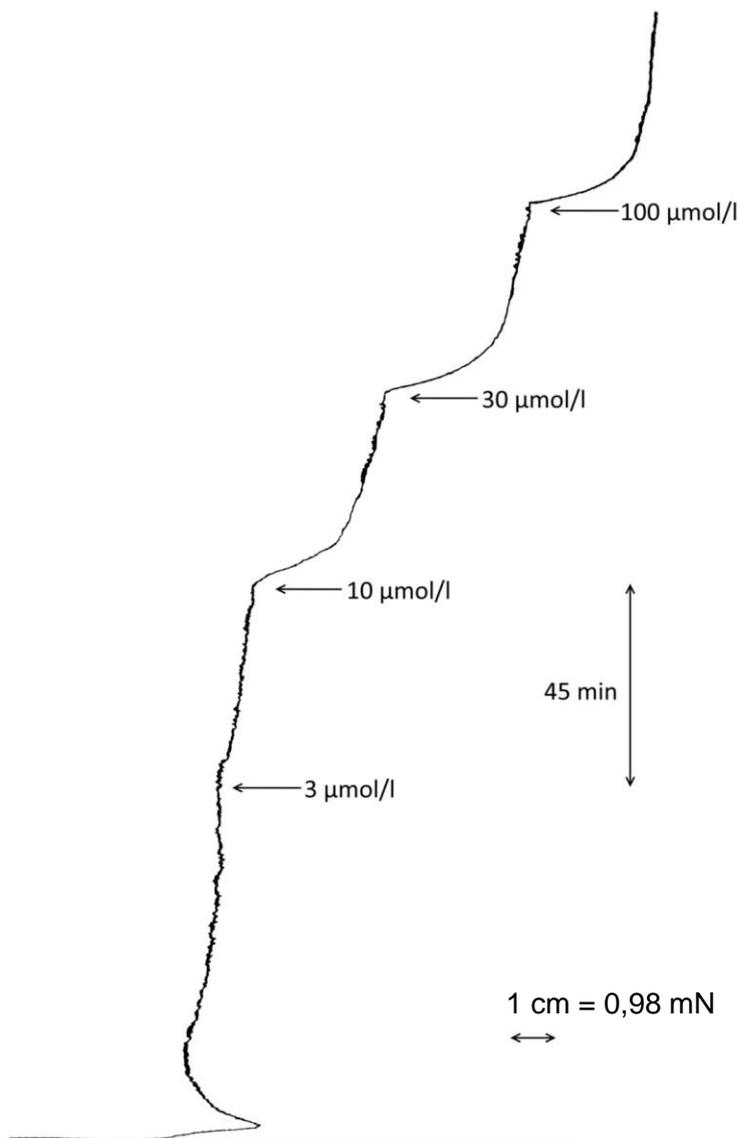
Die Versuchsreihe am terminalen Ileum liefert für MGim1 Werte, die ab der niedrigsten Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  bereits eine relativ deutliche Verminderung der Kontraktionskraft zeigen. Der spasmolytische Effekt steigt durch Konzentrationserhöhung an, bis hin zu einer Tonussenkung von nahezu 90% unter 100  $\mu\text{mol/l}$  MGim1.

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve am terminalen Ileum



In Abbildung 15 ist anhand der Konzentrations-Wirkungskurve die spasmolytische Wirkung veranschaulicht. Die Kontraktionskraft sinkt dabei vor allem von den Konzentrationen 3 – 30 µmol/l stark ab. Die EC<sub>50</sub> liegt vergleichsweise niedrig bei 14,11 µmol/l.

Abbildung 16: Originalversuch am terminalen Ileum



Die Abbildung des Originalversuchs zeigt die Kontraktionskraft des Dünndarms in Abhängigkeit von der Zeit. Die Kontraktionskraft nimmt dabei von rechts nach links zu, die Zeit von unten nach oben. Als Kenngrößen sind 1 cm (= 0,98 mN) und 45 min gegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe an MGim1 auf die einzustellende Konzentration. Zuvor wird die Kontraktion in KCl-Lösung beschrieben.

Durch Zugabe von MGim1 wird eine kontinuierliche Kontraktionsabnahme, also ein vasodilatatorischer Effekt, sichtbar.

## 4.6 Wirkmechanismus am terminalem Ileum

Nitro-L-Arginin lässt man dabei in der ersten Versuchsreihe in der Konzentration 30  $\mu\text{mol/l}$  im Organbad für 45 Minuten auf den Dünndarm einwirken. In der zweiten Versuchsreihe in der Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  für 45 Minuten. Anschließend wird MGim1 zugegeben und der entstehende Effekt in der Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  für weitere 45 Minuten gemessen.

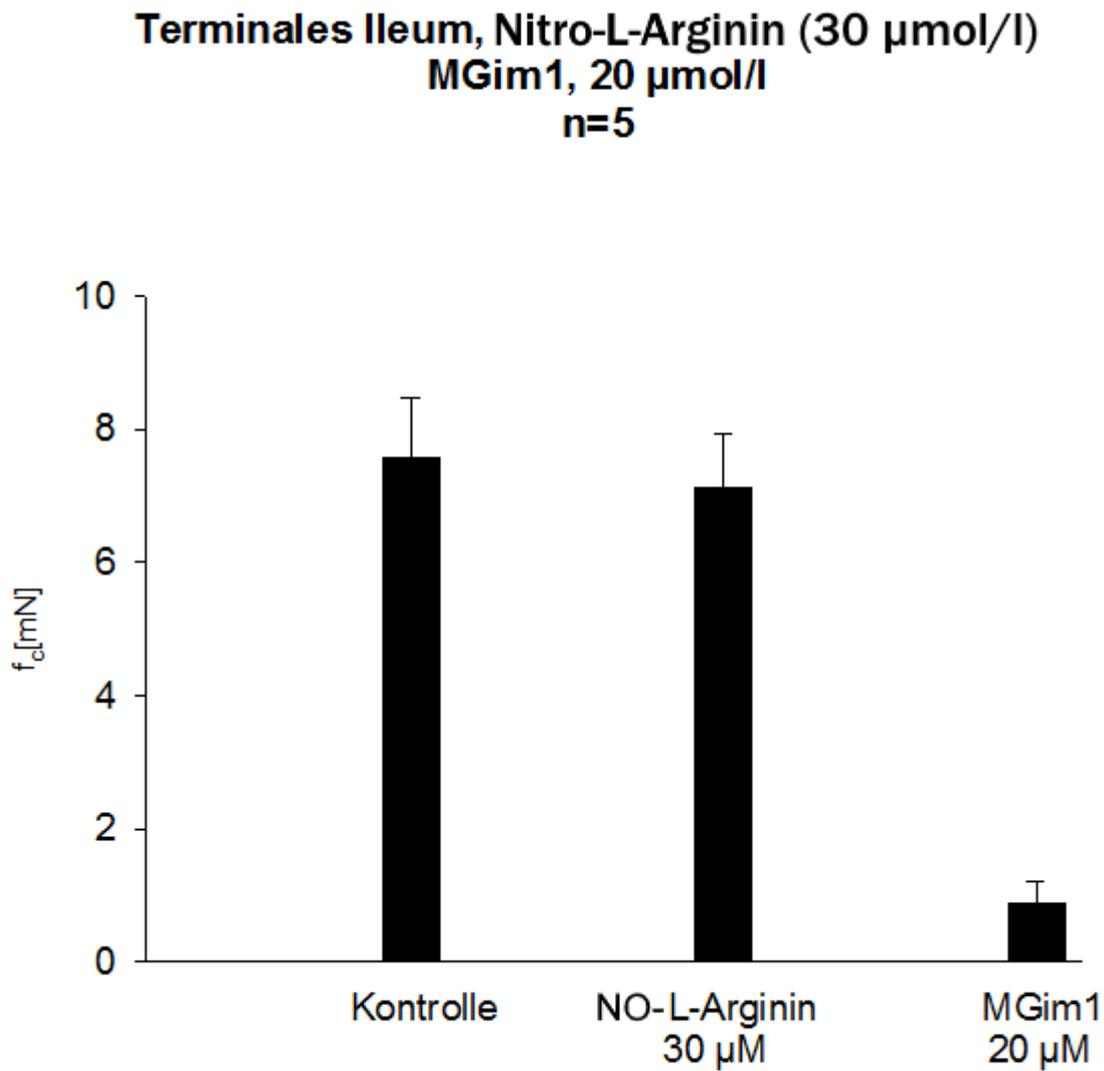
### 4.6.1 Wirkung von 20 $\mu\text{mol/l}$ MGim1 nach 30 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

Tabelle 10: Wirkmechanismus am Darm mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin

<b>Konzentration (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche <b>n</b></b>	<b>Irrtums- wahrscheinlichkeit <b>P</b></b>
Kontrolle	$7,59 \pm 0,89$	5	-
Nitro-L-Arginin 30 $\mu\text{mol/l}$	$7,12 \pm 0,81$	5	-
MGim1 20 $\mu\text{mol/l}$	$0,87 \pm 0,35$	5	0,01

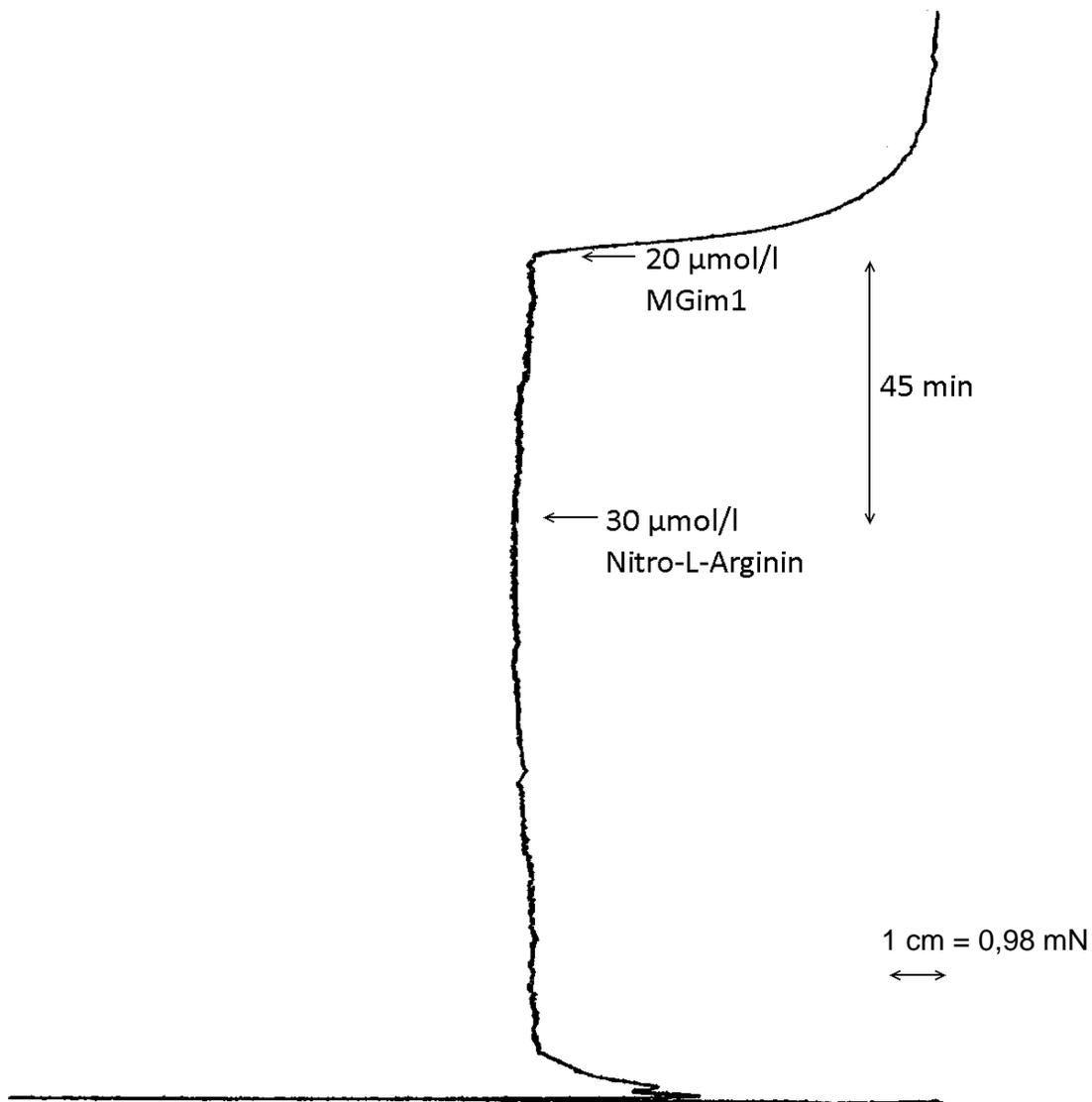
An den Werten aus Tabelle 10 ist abzulesen, dass Nitro-L-Arginin in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  kaum eine spasmolytische Wirkung zeigt. Die Wirkung der eingestellten Konzentration von MGim1 hingegen ist stark tonussenkend.

Abbildung 17: Wirkmechanismus am Darm mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin



In Abbildung 17 sind die ermittelten Werte durch ein Balkendiagramm dargestellt. Dabei ist auf der x-Achse die jeweilige Substanz angegeben, auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Auch hier ist klar zu sehen, dass durch Nitro-L-Arginin kaum Senkung der Kontraktionskraft erreicht wird, durch MGim1 hingegen schon.

Abbildung 18: Originalversuch Wirkmechanismus mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin



In der Originalabbildung des Versuches am terminalen Ileum lässt sich eine durch Verschiebung der Kurve von links nach rechts eine Kontraktionsabnahme beobachten. Die Zeit ist von unten nach oben zunehmend. Als Kenngrößen sind 1 cm (= 0.98 mN) und 45 min angeführt. Bis sich ein konstanter Kontrollwert eingestellt hat zeichnet der Schreiber den Kontraktionsverlauf des Dünndarms in KCl-Lösung auf. Der erste Pfeil markiert die Zugabe von Nitro-L-Arginin, der 2. Pfeil die Zugabe von MGim1 nach 45 min.

Die 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin bleiben ohne Auswirkung auf die Kontraktionskraft, die folgenden 20  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 wirken deutlich spasmolytisch.

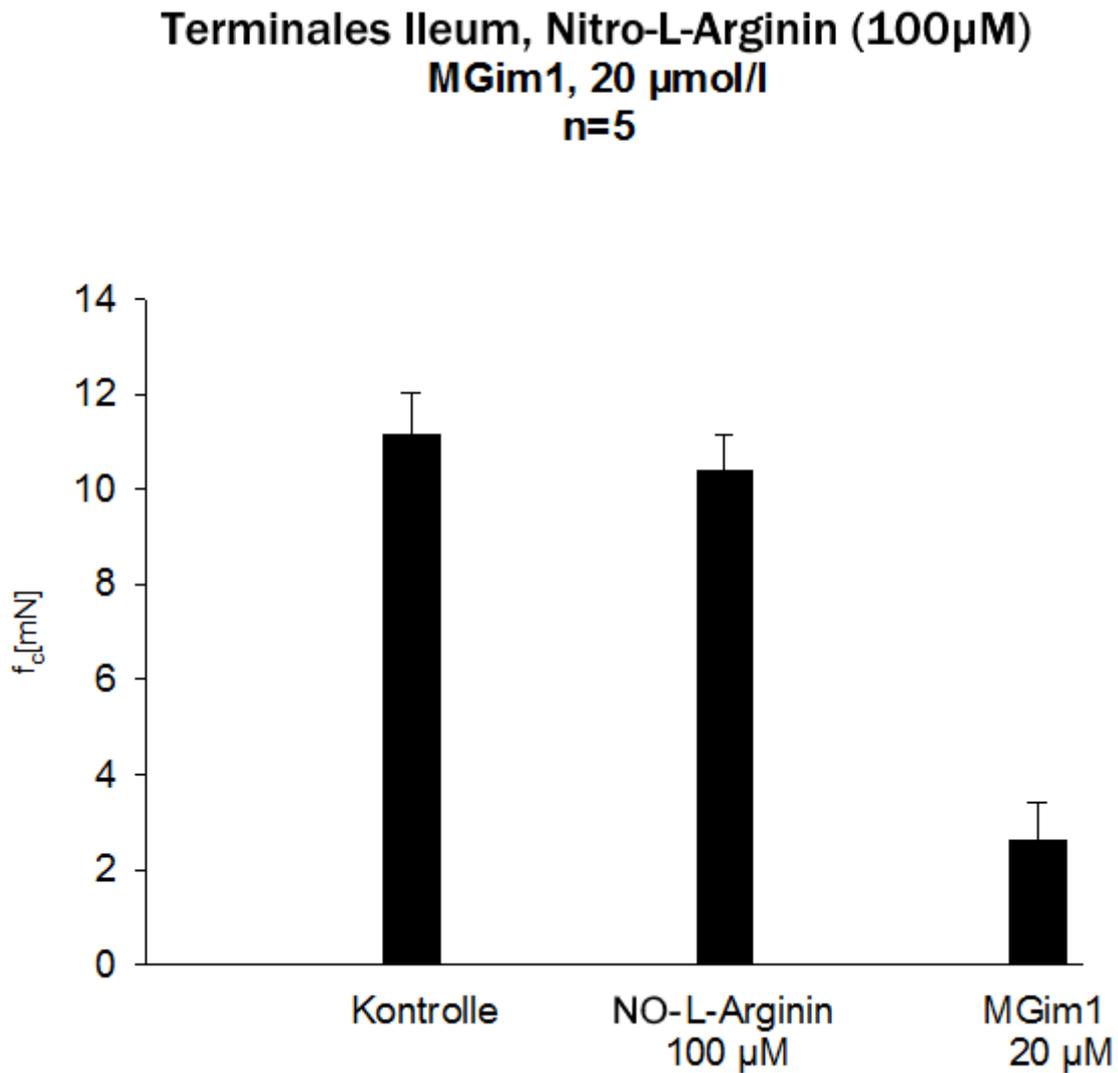
#### 4.6.2 Wirkung von 20 $\mu\text{mol/l}$ MGim1 nach 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin

Tabelle 11: Wirkmechanismus am Darm mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin

<b>Konzentration (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</b>	<b>Anzahl der Versuche <b>n</b></b>	<b>Irrtums- wahrscheinlichkeit <b>P</b></b>
Kontrolle	$11,15 \pm 0,86$	5	-
Nitro-L-Arginin 100 $\mu\text{mol/l}$	$10,38 \pm 0,77$	5	-
MGim1 20 $\mu\text{mol/l}$	$2,60 \pm 0,84$	5	0,01

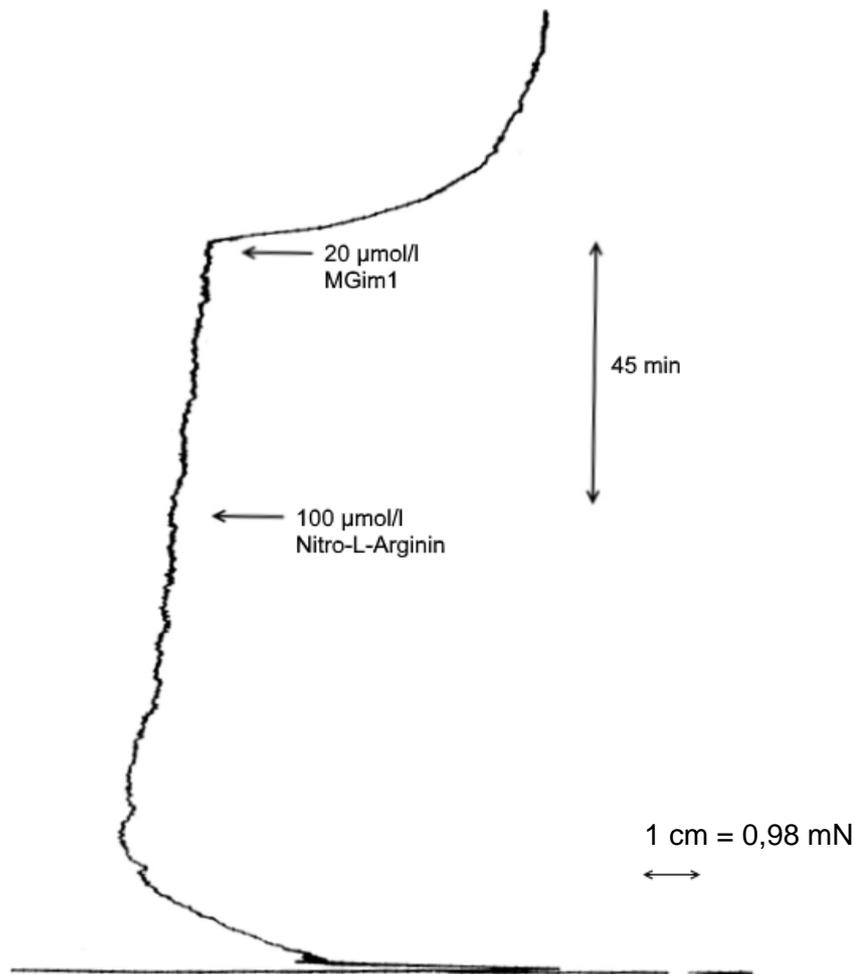
In Tabelle 11 ist ein ähnlicher Effekt wie bei der Wirkmechanismus-Versuchsreihe zuvor zu beobachten. Nitro-L-Arginin zeigt keine bzw. nur minimale Wirkung, MGim1 setzt die Kontraktionskraft des Darms stark herab.

Abbildung 19: Wirkmechanismus am Darm mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin



Wie bei der Versuchsreihe mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin erfolgt die Darstellung auch hier mittels Balkendiagramm. Es wird deutlich, dass sich die Erhöhung der Konzentration an Nitro-L-Arginin von 30 auf 100  $\mu\text{mol/l}$  sich zunächst nicht auf die Kontraktionskraft auswirkt. Die Konzentration von MGim1 ist mit 20  $\mu\text{mol/l}$  gleich geblieben und zeigt wie vorher auch in Gegenwart von 100 $\mu\text{mol/l}$  einen starken spasmolytischen Effekt.

Abbildung 20: Originalversuch Wirkmechanismus am Darm mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin



Die Abbildung des Originalversuches zeigt den Verlauf der Kontraktionskraft des terminalen Ileums. Die Zeit ist dabei von unten nach oben zunehmend, die Kontraktion von links nach rechts abnehmend. Anfangs zeichnet der Schreiber die Kontraktionskraft in KCl-Lösung auf. Der erste Pfeil signalisiert die Zugabe von Nitro-L-Arginin zur Einstellung der Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . Der zweite Pfeil verzeichnet die Zugabe von MGim1.

Es zeigt sich kein Effekt durch 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin und eine deutliche Vasodilatation bei 20  $\mu\text{mol/l}$  MGim1.

## 5 Diskussion

Die Testung von MGim1 an isolierten Meerschweinchenorganen dient der Ermittlung eines pharmakologischen Wirkprofils. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert und miteinander verglichen.

Anhand der Versuche am Vorhof erfolgt ein Rückschluss auf den chronotropen Effekt von MGim1 durch Ermittlung der Änderung der Schlagfrequenz. An Papillarmuskel wird mittels Amplitudenhöhe unter verschiedenen Konzentrationen die inotrope Wirkung von MGim1 beurteilt.

Die Versuche an den Gefäßpräparaten von Aorta und Truncus pulmonalis dienen der Ermittlung einer potentiell vasodilatatorischen Wirkung von MGim1. Am terminalen Ileum testet man auf eine Spasmolyse unter Einfluss von MGim1, wobei hier weiterführend mit Nitro-L-Arginin eine Enzymblockade herangezogen wird, um genauere Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu ziehen.

### 5.1 Effekt von MGim1 auf die Herzmuskulatur

Bei der Muskulatur des Herzens handelt es sich um quergestreiftes Muskelgewebe. Es ist generell ähnlich der Skelettmuskulatur aufgebaut, verfügt allerdings über spontane Selbsterregung (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Am rechten Vorhof zeigt sich eine konstante Abnahme der Schlagfrequenz unter steigenden Konzentrationen von MGim1. Unter 3  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 beträgt die Abnahme im Durchschnitt 5,04 %, unter 10  $\mu\text{mol/l}$  12,47 % und bei 30  $\mu\text{mol/l}$  ist eine Abnahme von 24,22 % im Mittel zu verzeichnen. Bei der Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  stellte der Vorhof bei allen Versuchen das Schlagen ein, was der Abnahme von 100 % entspricht. Die  $\text{EC}_{50}$  liegt bei 45,5  $\mu\text{mol/l}$ .

MGim1 zeigt einen negativ chronotropen Effekt am Vorhof.

Am Papillarmuskel sind die erhaltenen Mittelwerte bei den niedrigen Konzentrationen mit einer anfänglichen Senkung der Kontraktionskraft um 2,44% bei 3  $\mu\text{mol/l}$  und einer Steigerung um 1,65 % bei 10  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 als nicht signifikant einzustufen. Bei 30  $\mu\text{mol/l}$

MGim1 kommt es zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft um 14,28 % und bei 100 µmol/l MGim1 zu einer Steigerung von 53,25 %. Die EC<sub>50</sub> liegt bei 93 µmol/l.

Auch wenn die ersten beiden Konzentrationen keinen nennenswerten Effekt zeigen, so wirkt MGim1 ab den höheren Konzentrationen von 30 und 100 µmol/l positiv inotrop.

*Tabelle 12: Vergleich der Werte an rechtem Vorhof und Papillarmuskel*

<b>Organpräparat</b>	<b>Schlagfrequenz- bzw. Kontraktionskraftänderung bei 100 µmol/l MGim1</b>	<b>EC<sub>50</sub>-Werte für MGim1</b>
Vorhof	-100 %	45,5 µmol/l
Papillarmuskel	+53,25 %	93 µmol/l

In Tabelle 12 sind noch einmal die Wirkung auf rechten Vorhof und Papillarmuskel veranschaulicht. Die Wirkung von MGim1 ist dabei jeweils entgegengesetzt: Man erhält einen negativ chronotropen Effekt am Vorhof, aber einen positiv inotropen Effekt am Papillarmuskel. Dabei ist bei Vergleich der Werte die beschriebene Wirkung auf den Vorhof stärker ausgeprägt als die auf den Papillarmuskel. Obwohl man sich am selben Organ befindet und beide Ansatzpunkte Muskelzellen des Herzens sind, muss man den Grund für diese Wirkung vermutlich in den feinen Unterschieden der Gewebe suchen. Die Schlagfrequenz des Vorhofs wird, wie vorher beschrieben, durch den Sinusknoten als primären Taktgeber gesteuert. Der Sinusknoten besteht aus spezialisierten quergestreiften Muskelzellen, die die Fähigkeit besitzen selbstständig zu depolarisieren und so Erregung zu initiieren (Paulsen und Waschke 2010). Bei den Papillarmuskeln handelt es sich um gewöhnliche Herzmuskelzellen der Kammermuskulatur (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Verglichen mit den in der Einleitung beschriebenen positiven inotropen Substanzen erkennt man im Wirkprofil am Herzen eine Ähnlichkeit zu den Herzglykosiden, die ebenfalls ebenfalls einen positiv inotropen und negativ chronotropen Effekt besitzen. Genauere Aussagen lassen sich allerdings nicht treffen, da hierzu weiter Untersuchungen inklusive Aufklärung des Wirkmechanismus von MGim1 sind.

## **5.2 Effekt vom MGim1 auf die glatte Muskulatur**

Glatte Muskulatur ist v.a. in Hohlorganen und Blutgefäßen zu finden. Ihre Funktion besteht in der Kontrolle der Volumina. Glatte Muskelzellen sind in der Lage bei vergleichsweise geringem ATP-Verbrauch dauerhaft zu kontrahieren und somit einen speziellen Tonus aufrecht zu erhalten. Funktionell lässt sich daher eine größere Vielfalt als bei der quergestreiften Muskulatur beobachten (Klinke et al. 2010).

### **5.2.1 MGim1 an Gefäßen**

An den Präparaten von Aorta und Truncus pulmonalis testet man die Wirkung von MGim1 auf die glatte Muskulatur der Gefäße. Es handelt sich um Arterien vom elastischen Typ, die durch ihre Windkesselfunktion das stoßweise ausgeworfene Blut in einen konstanteren Fluss umwandeln (Welsch 2010).

An der Aorta erhält man entsprechend dem Pipettierschema mit den steigenden Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 µmol/l MGim1 Abnahmen der durchschnittlichen Kontraktionskraft um 1,93 %, 4,69 %, 25,63% und letztendlich 63,03 %. Es zeigt sich somit ein sehr geringer Effekt unter den niedrigen Konzentrationen von 3 und 10 µmol/l MGim1. Erst bei den Konzentrationen von 30 und 100 µmol/l wird die Wirkung deutlich. Es zeigt sich ein vasodilatierender Effekt durch MGim1, bei dem die  $EC_{50}$  67 µmol/l MGim1 beträgt.

Am Truncus pulmonalis zeigt sich ein ähnliches Bild: Mit Abnahme der Kontraktionsabnahmen von 4,96 %, 12,99 %, 31,93 % und 71,07 % bei den jeweiligen Konzentration von MGim1 zeigt sich hier auch ein anfangs leichter, mit steigender Konzentration stetig verstärkter Effekt von MGim1 auf den Gefäßtonus. Es kommt zu Vasodilatation, die  $EC_{50}$  liegt bei 53 µmol/l MGim1.

*Tabelle 13: Vergleich der Werte an Aorta und Truncus pulmonalis*

<b>Organpräparat</b>	<b>Kontraktionskraftänderung bei 100 µmol/l MGim1</b>	<b>EC<sub>50</sub>-Werte für MGim1</b>
Aorta	-63,03 %	67 µmol/l
Truncus pulmonalis	-71,07 %	53 µmol/l

Die Tabelle 13 zeigt den ähnlichen Effekt von MGim1 auf die beiden Gefäßpräparate. Die Wirkung auf den Truncus pulmonalis ist dabei im Durchschnitt etwas ausgeprägter, die EC<sub>50</sub> wird früher erreicht.

### **5.2.2 MGim1 am Darm**

An den Präparaten des Dünndarms testet man auf eine mögliche spasmolytische Wirkung von MGim1 auf die glatte Muskulatur.

Bei den Versuchsreihen am terminalen Ileum zeigt MGim1 dabei eine stärkste Wirkung. Bereits bei der Konzentration von 3 µmol/l kommt es zu einer durchschnittlichen Abnahme der Kontraktion von 11,10 %. Im Weiteren verstärkt sich dieser Effekt durch Kontraktionsabnahmen von 39,64 % bei 10 µmol/l, 72,71 % bei 30 µmol/l und 89,68 % bei 100 µmol/l MGim1. Die Testsubstanz MGim1 zeigt eine vergleichsweise starke spasmolytische Wirkung, die EC<sub>50</sub> liegt bei 14,11 µmol/l.

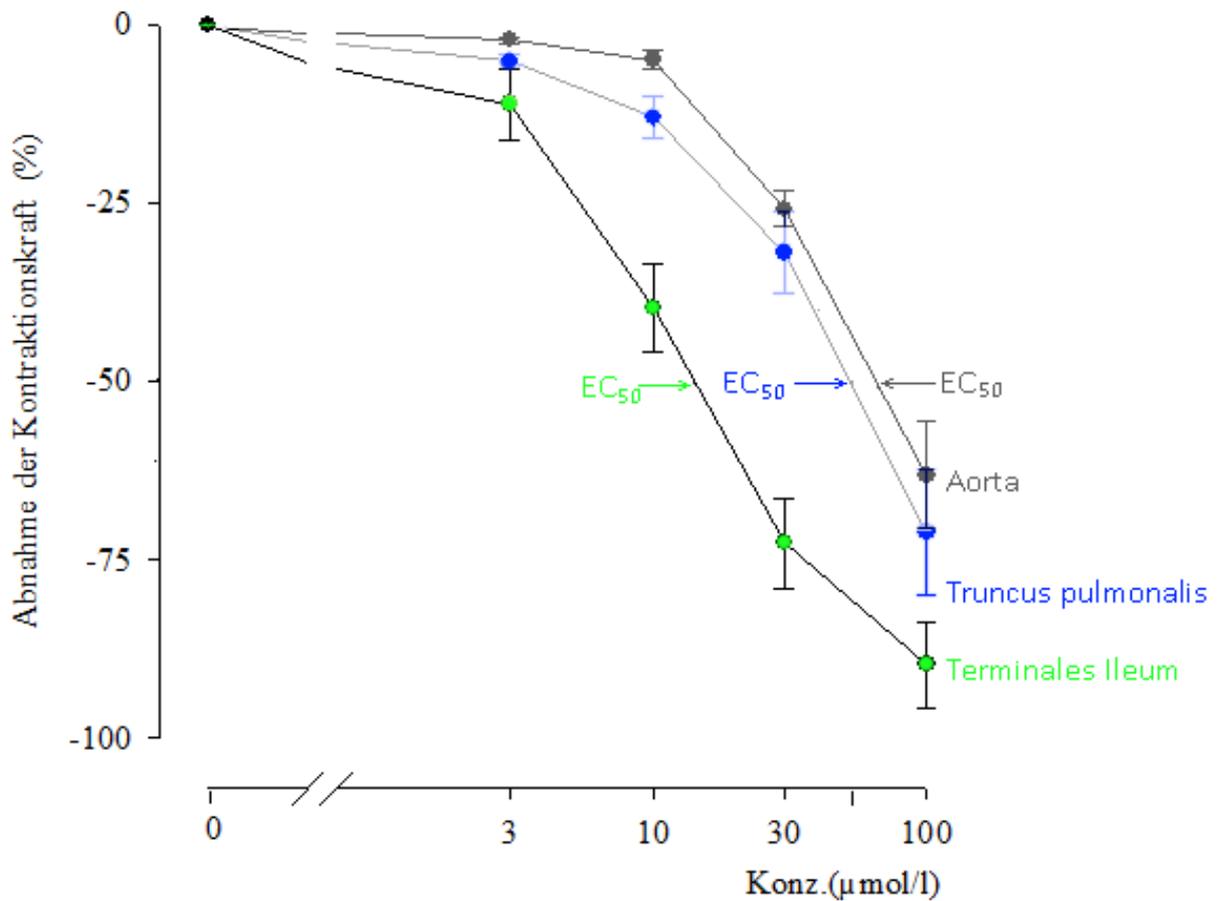
### 5.2.3 Vergleich des Effekts von MGim1 an Darm und Gefäßen

Tabelle 14: Vergleich der Werte der Gefäßpräparate mit denen des Darms

<b>Organpräparat</b>	<b>Kontraktionskraftänderung bei 100 µmol/l MGim1</b>	<b>EC<sub>50</sub>-Werte für MGim1</b>
Aorta	-63,03 %	67 µmol/l
Truncus pulmonalis	-71,07 %	53 µmol/l
Terminales Ileum	-89,68 %	14,11 µmol/l

Die Abnahme der Kontraktionskraft durch MGim1 verglichen mit dem Kontrollwert erfolgt am Darm deutlicher als an den Gefäßpräparaten. Am Darm ist der Effekt von 100 µmol/l stärker, die EC<sub>50</sub> wird früher erreicht.

Abbildung 21: Graphischer Vergleich von Aorta, Truncus pulmonalis und terminalem Ileum



Der graphische Vergleich veranschaulicht den sehr ähnlichen Effekt von MGim1 auf Aorta und Truncus pulmonalis. Am terminalen Ileum zeigt sich eine leicht abweichende und stärkere Wirkung. Erklärbar ist dies dadurch, dass Aorta und Truncus pulmonalis sich in ihrem Aufbau und der Anordnung der glatten Muskulatur sehr ähnlich sind, da es sich um zwei Gefäßpräparate handelt. Der Dünndarm enthält als motorische Einheit zwar auch glatte Muskulatur, unterscheidet sich allerdings in Funktion und Aufbau von den Gefäßen.

### 5.3 EC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich

Die Wirkung von MGim1 ist an allen Organpräparaten stark genug vorhanden um überall eine EC<sub>50</sub> zu bestimmen.

*Tabelle 15: Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte von MGim1*

	<b>Atrium dextrum</b>	<b>Musculus papillaris</b>	<b>Aorta</b>	<b>Truncus pulmonalis</b>	<b>Ileum terminale</b>
<b>EC<sub>50</sub></b>	45,5 µmol/l	93 µmol/l	67 µmol/l	53 µmol/l	14,11 µmol/l

Tabelle 15 veranschaulicht, dass MGim1 seine stärkste Wirkung am Darm zeigt. Es wird die geringste Konzentration benötigt, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen. Anschließend folgen Vorhof, Lungenstamm und Aorta mit relativ nah beieinander liegenden EC<sub>50</sub>. Die höchste EC<sub>50</sub> ist beim Papillarmuskel zu beobachten. Eine gewebsspezifische Wirkung von MGim1 liegt nicht vor.

### 5.4 Wirkung von MGim1 in Kombination mit Nitro-L-Arginin

Wie vorher beschrieben wird dem Gas NO ein relaxierender Effekt auf die Darmmuskulatur zugeschrieben (Sanders und Ward 1992). In Studien wurde nachgewiesen, dass Nitro-L-Arginin eine Blockade der NO-Synthase bewirkt und somit Einfluss auf die Relaxation der glatten Muskulatur des Ileums nehmen kann (Osthaus und Galligan 1992). Im Folgenden wird anhand der Versuchsreihen untersucht, ob die beobachtete spasmolytische Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum möglicherweise auf den Mechanismus der NO-Freisetzung zurückzuführen ist. Dazu wird die Wirkung von MGim1 nach Zugabe von Nitro-L-Arginin beurteilt.

In der ersten Versuchsreihe bleibt die Kontraktionskraft unter 30 µmol/l Nitro-L-Arginin nach 45 min gegenüber dem Kontrollwert kaum verändert. Durch die anschließende Zugabe von 20 µmol/l MGim1 kommt es zu starker Abnahme der Kontraktionskraft.

Die zweite Versuchsreihe ist analog der Ersten, nur mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Nitro-L-Arginin statt 30  $\mu\text{mol/l}$ . Auch hier zeigt sich unter Nitro-L-Arginin 45 min kaum Veränderung. Der Zusatz von 20  $\mu\text{mol/l}$  MGim1 führt ebenfalls zu einer starken Spasmolyse.

*Tabelle 16: Vergleich der Versuchsreihen zum Wirkmechanismus*

Versuchsreihe	Kontraktionskraft in mN $\pm$ Standardfehler		
	Kontrolle	Nitro-L-Arginin	MGim1
<b>30 <math>\mu\text{mol/l}</math> Nitro-L-Arginin + 20 <math>\mu\text{mol/l}</math> MGim1</b>	7,59 $\pm$ 0,89	7,12 $\pm$ 0,81	0,87 $\pm$ 0,35
<b>100 <math>\mu\text{mol/l}</math> Nitro-L-Arginin + 20 <math>\mu\text{mol/l}</math> MGim1</b>	11,15 $\pm$ 0,86	10,38 $\pm$ 0,77	2,60 $\pm$ 0,84

Durch den Zusatz von Nitro-L-Arginin, einem NO-Antagonisten, ist keine Abnahme des Effekts von MGim1 zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass NO keine bzw. wenn überhaupt eine untergeordnete Rolle bei der spasmolytischen Wirkung von MGim1 am terminalen Ileum spielt.

Zur Klärung des Wirkmechanismus sind weitere pharmakologische Untersuchungen notwendig.

## 6 Zusammenfassung

In der Diplomarbeit wird die neu synthetisierte Substanz MGim1 an isolierten Meerschweinchenorganen hinsichtlich ihrer Wirkung und Wirkstärke untersucht und ein ausgewählter Wirkmechanismus genauer überprüft.

Bei den zur Testung herangezogenen Organen handelt es sich um Atrium dextrum, Musculus papillaris, Aorta thoracica, Truncus pulmonalis und Ileum terminale. Diese werden präpariert und mit verschiedenen Konzentrationen (3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$ ) von MGim1 getestet. Die Präparate befinden sich dabei in mit Carbogen begaster physiologischer Nährlösung.

Am Herzen zeigt MGim1 eine positiv inotrope und negativ chronotrope Wirkung: Die Schlagzahl des Vorhofs wird gesenkt, die Kontraktionskraft des Papillarmuskels gesteigert. An den Gefäßpräparaten von Aorta und Truncus pulmonalis bewirkt MGim1 eine Relaxation der glatten Muskulatur und somit eine Vasodilatation. Die Präparate des terminalen Ileums weisen unter MGim1 einen spasmolytischen Effekt auf.

Die Wirkung ist an allen Präparaten stark genug um eine  $EC_{50}$  für MGim1 zu bestimmen. Die  $EC_{50}$  ist am terminalen Ileum am geringsten (14,11  $\mu\text{mol/l}$ ), gefolgt vom rechten Vorhof (45,5  $\mu\text{mol/l}$ ), Truncus pulmonalis (53  $\mu\text{mol/l}$ ), Aorta (67  $\mu\text{mol/l}$ ) und Papillarmuskel (93  $\mu\text{mol/l}$ ). Der spasmolytische Effekt auf den Darm ist somit am stärksten. Eine Gewebsspezifität ist nicht zu beobachten.

Die Spasmolyse am Darm unter MGim1 kann durch Einsatz von Nitro-L-Arginin auf den genaueren Wirkmechanismus untersucht werden. Bei Nitro-L-Arginin handelt es sich um einen NO-Synthasen-Blocker, der in zwei Versuchsreihen angewendet wird. Einmal in der Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  und einmal in der Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . MGim1 wird beide Male in der Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt. MGim1 zeigt in beiden Versuchsreihen trotz vorheriger Zugabe von Nitro-L-Arginin eine starke Kontraktionsabnahme. Dies lässt darauf schließen, dass der spasmolytische Effekt nicht auf der Freisetzung von NO beruht.

## 7 Literaturverzeichnis

Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage*. München: Urban & Fischer Verlag

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011). *Molekularbiologie der Zelle, 5. Auflage*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co.

Ammon HPT (2004). *Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch; 9. Auflage*. Berlin: Walter de Gruyter

Anderhuber F, Pera F, Streicher J (2012). *Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band, 19. Auflage*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co.

Bailey L, Ong S (August 1978). *Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations*. J Pharmacol Meth; 171-175

Benninghoff, Drenckhahn (2004). *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie; Band 2, 16. Auflage*. München: Urban & Fischer Verlag

Beyer H, Walter W (2004). *Lehrbuch der organischen Chemie, 24. Auflage*. Stuttgart: Hirzel Verlag

Follath F, Cleland J, Just H, Papp J, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L (2002). *Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial*. Zürich: Lancet 360:196-202.

Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012). *Pharmakologie & Toxikologie - Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag

Herre W, Röhrs M (1990). *Haustiere - zoologisch gesehen; 2. Auflage, Unveränderter Nachdruck 2013*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum

Jiang X, Kopp-Schneider A (2015). *Statistical strategies for averaging EC50 from multiple dose-response experiments*. Arch Toxicol 89: 2119

Karow T, Lang-Roth R (2016). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*, 24. Auflage. Pulheim: Selbstverlag des Verfassers.

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (2010). *Physiologie*, 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG

Lippert (2011). *Lehrbuch Anatomie*, 8. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag

Lüllmann H, Mohr K (1999). *Pharmakologie und Toxikologie - Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 14. komplett überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Mebazaa A, Nieminen M, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber F, Pocock S, Thakkar R, Padley RJ, Poder P, Kivikko M (2007). *Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial*. *JAMA*; 297:1883-1891

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

Osthaus L, Galligan J (1992). *Antagonists of nitric oxide synthesis inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum*. *J Pharmacol Exp Ther.*; 260:140-5

Pape H, Kurtz A, Silbernagl S (2014). *Physiologie*, 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Paulsen F, Waschke J (2010). *Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen: Innere Organe*, 23. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag

Pschyrembel W (2007). *Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch*, 261. Auflag, Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG

Sanders K, Ward S (1992). *Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission*. *Am J Physiol*, 262:G379-G392

Scholz H, Schwabe U (2005). *Taschenbuch der Arzneibehandlung - Angewandte Pharmakologie*; 13. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2015). *PROMETHEUS - LernAtlas der Anatomie*, 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Tariq S, Aronow W (2015). *Use of Inotropic Agents in Treatment of Systolic Heart Failure*. I J Mol Sci 16(12): 29060–29068.

Thews, Mutschler, Vaupel. (2007). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, 6. Auflage*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Traystman R, Moore L, Helfaer M, Davis S, Banasiak K, Williams M, Hurn PD (1995). *Nitro-L-arginine analogues. Dose- and time-related nitric oxide synthase inhibition in brain*. Stroke; 26: 864-869.

Vamos M, Erath J, Hohnloser S (2015). *Digoxin-associated mortality: a systematic review and meta-analysis of the literature*. Eur Heart J 36: 1831-1838.

Welsch (2010). *Lehrbuch Histologie, 3. Auflage*. München: Urban & Fischer Verlag