



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten
Kohlesäureamids (STM10.HCl) an isolierten Organen
von Meerschweinchen“

verfasst von / submitted by

Marianne Eder

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra 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:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Hinter jedem erfolgreichen Mann steht eine starke Frau, oder war es umgekehrt?

Mein Erfolg fußt auch in der Unterstützung durch meinen geliebten Partner Christian, dem ich meine Diplomarbeit widme.

Mit deiner Güte und Liebe, deinen aufmunternden Worten und deinem Verständnis konnte ich mein Ziel erreichen. Jeder Moment den ich mit dir teilen kann, wird zu einem Einmaligen und Wunderschönen!

In tiefer Dankbarkeit und Liebe!

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken.

Ihr habt meinen Erfolg auch auf euren Schultern mitgetragen. Für die lustigen und schönen Stunden, die ich mit euch verbringen kann, für die offenen Ohren und eure Hilfsbereitschaft möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken!

Ein großes Dankeschön an alle meine lieben Freunde, die stets an meiner Seite waren. Herzlichen Dank für die vielen wunderbaren Erlebnisse und Stunden!

Ein großes Dankeschön ergeht an meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik, der stets bemüht, fröhlich und großzügig für das Wohlergehen seiner Diplomanden sorgt. Für die nette und lehrreiche Zeit danke ich Ihnen sehr!

Lange Jahre konnte ich mich freuen, bei Herrn Prof. Dr. Thomas Erker als Tutorin tätig zu sein. Es war eine tolle Erfahrung in Ihrem Team zu arbeiten! Vielen lieben Dank für die freundliche und angenehme Zusammenarbeit!

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem geschätzten Kollegen und Freund Herrn Mag. pharm. Michael Hintersteiniger für die zur Verfügung gestellte Testsubstanz bedanken!

Wenn du einmal Erfolg hast, kann es Zufall sein.

Wenn du zweimal Erfolg hast, kann es Glück sein.

Wenn du dreimal Erfolg hast, so ist es Fleiß und Tüchtigkeit.

(Sprichwort aus der Normandie)

Inhaltsverzeichnis

1.	Zielsetzung	1
2.	Einleitung.....	2
2.1.	Erregungsbildung und Erregungsleitung des Herzens.....	2
2.2.	Aktionspotential	2
2.3.	Hypertonie	2
2.4.	Antihypertensive Therapiegrundlagen (Karow 2015).....	3
2.5.	Antihypertensiva der ersten Wahl.....	4
2.5.1.	Angiotensin Converting Enzym-Hemmer	4
2.5.2.	Angiotensin-II-Hemmer	4
2.5.3.	Betablocker	4
2.5.4.	Kalziumantagonisten	5
2.5.5.	Diuretika	5
2.6.	Antihypertensiva der zweiten Wahl	5
3.	Material und Methoden.....	7
3.1.	Präklinische Phase der Wirkstoffprüfung.....	7
3.2.	Versuchstiere	7
3.3.	Herstellen der Präparate	7
3.3.1.	Tötung des Versuchstiers	7
3.3.2.	Isolierung der Organe.....	7
3.3.3.	Präparationsbesteck.....	8
3.3.4.	Isolierung und Präparation der Aorta descendens	8
3.3.5.	Isolierung und Präparation der Ateria pulmonalis	9
3.3.6.	Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs.....	9
3.3.6.1.	Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln.....	9
3.3.7.	Isolierung und Präparation des terminalen Ileums	10
3.4.	Verwendete Lösungen, Gase	10
3.4.1.	Physiologische Nährlösung: Tyrode	10
3.4.2.	Kontraktionslösung mit Kaliumchlorid.....	12
3.4.3.	Oxymix	12
3.5.	Apparaturen	12
3.5.1.	Aufbau.....	13

3.5.2.	Das Organbad.....	13
3.5.3.	Die Gaszufuhr.....	13
3.5.4.	Das Wasserbad	14
3.5.5.	Die Organhalterung und die Aufhängevorrichtung	14
3.5.6.	Der Kraftwandler.....	15
3.5.7.	Der Verstärker	15
3.5.8.	Der Schreiber.....	15
3.5.9.	Apparatur 1a	15
3.5.10.	Apparatur 1b	16
3.5.11.	Die Apparatur 2	17
3.6.	Durchführung der Versuche	18
3.7.	Testsubstanz STM10.HCl.....	18
3.7.1.	Stammlösung	18
3.7.2.	Vor der Zugabe von STM10.HCl	19
3.7.3.	Substanzzugabe	19
3.8.	Arbeitsvorschrift und Durchführung der Versuche mit STM10.HCl	20
3.8.1.	Versuchsablauf bei Aorta descendens, Aorta pulmonalis, terminales Ileum	20
3.8.2.	Versuchsablauf beim Papillarmuskel.....	21
3.8.3.	Versuchsablauf beim rechten Vorhof	23
3.9.	Arbeitsvorschrift und Durchführung der Versuche zur Identifizierung des Wirkmechanismus	24
3.10.	Stickstoffmonoxid-Synthase und Stickstoffmonoxid	25
3.11.	L-Nitro-Arginin	26
3.11.1.	Chemische und physikalische Eigenschaften L-Nitro-Arginin.....	26
3.11.2.	Nitro-L-Arginin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 µmol/l.....	26
3.11.3.	Durchführung der Wirkmechanismusbestimmung mit Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 30 µmol/l.....	26
3.11.4.	Durchführung der Wirkmechanismusbestimmung mit Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100 µmol/l.....	27
3.11.5.	Eichfaktor	27
3.12.	Welche Informationen können durch die Versuche gewonnen werden?	27
3.13.	Aorta descendens, Ateria pulmonalis	27
3.14.	Terminales Ileum	28
3.15.	Atrium dextrum	28

3.16.	Musculus papillaris	28
3.17.	Prüfung des Wirkmechanismus.....	28
3.18.	Zielsetzung der neu synthetisierten Substanz STM10.HCl.....	29
3.19.	Statistik	29
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Wirkung von STM10.HCl auf die Aorta descendens	30
4.2.	Wirkung von STM10.HCl auf die Ateria pulmonalis.....	33
4.3.	Wirkung von STM10.HCl auf das terminale Ileum	36
4.4.	Wirkung von STM10.HCl auf das Atrium dextrum.....	39
4.5.	Wirkung von STM10.HCl auf den Musculus papillaris.....	42
4.6.	Wirkung von STM10.HCl nach Blockade mit Nitro-L-Arginin 30 µmol/l.....	45
4.7.	Wirkung von STM10.HCl nach Blockade mit Nitro-L-Arginin 100 µmol/l.....	48
5.	Diskussion	51
5.1.	Effekte von STM10.HCl auf die glatte Muskulatur	51
5.1.1.	Effekte auf die Aorta descendens.....	51
5.1.2.	Effekte auf die Ateria pulmonalis.....	52
5.1.3.	Effekte auf das terminale Ileum.....	52
5.1.4.	Effekte auf das terminale Ileum in Gegenwart von Nitro-L-Arginin	53
5.2.	Effekte von STM10.HCl auf das Herz.....	54
5.2.1.	Effekte auf den rechten Vorhof	54
5.2.2.	Effekte auf den Papillarmuskel	55
6.	Zusammenfassung.....	56
7.	Literaturverzeichnis.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stereolupe und Präparationsbesteck	8
Abbildung 2: Schema der Versuchsanordnung	13
Abbildung 3: Aufbau Apparatur 1a	16
Abbildung 4: Struktur von STM10.HCl	18
Abbildung 5: Papillarmuskel in Apparat 2	23
Abbildung 6: Struktur Nitro-L-Arginin	26
Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl an der Aorta descendens	31
Abbildung 8: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve an der Aorta descendens	32
Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl an der Ateria pulmonalis	34
Abbildung 10: Originalaufzeichnung Kontraktionskurve der Ateria pulmonalis	35
Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl am terminalen Ileum	37
Abbildung 12: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve am terminalen Ileum	38
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl am Atrium dextrum	40
Abbildung 14: Originalaufzeichnung des Sinusrhythmus	41
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Musculus papillaris	43
Abbildung 16: Originalaufzeichnung Musculus papillaris	44
Abbildung 17: Balkendiagramm Wirkmechanismus 30 μ M Nitro-L-Arginin	46
Abbildung 18: Originalaufzeichnung Wirkmechanismus 30 μ M Nitro-L-Arginin	47
Abbildung 19: Balkendiagramm Wirkmechanismus 100 M Nitro-L-Arginin	49
Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve von 10 μ M STM10.HCl nach Blockade mit 100 μ M Nitro-L-Arginin	50
Abbildung 21: Wirkung von STM10.HCl auf die glatte Muskulatur	51
Abbildung 22: Wirkung von STM10.HCl auf das Herz	54
Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode	11
Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 l Tyrode	11
Tabelle 3: Einwaagen STM10.HCl in mg auf das Volumen des Organbades geeicht	19
Tabelle 4: Vorspannungen für Apparaturen und Präparate	20
Tabelle 5: Organe und dazugehörige EC ₅₀ in μ mol/l	25
Tabelle 6: Vorspannung in mV und dazugehörige Eichfaktoren	27

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von STM10.HCl an der Aorta descendens	30
Tabelle 8: Versuchsergebnisse von STM10.HCl an der Ateria pulmonalis	33
Tabelle 9: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am terminalen Ileum	36
Tabelle 10: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am Atrium dextrum	39
Tabelle 11: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am Musculus papillaris	42
Tabelle 12: Versuchsergebnisse von 10µM STM10.HCl am terminalen Ileum nach Blockade mit 30 µM Nitro-L-Arginin	45
Tabelle 13: Versuchsergebnisse mit 10 µM STM10.HCl am terminalen Ileum nach Blockade mit 100 µM Nitro-L-Arginin	48

1. Zielsetzung

Diese Diplomarbeit befasst sich mit den Effekten des neu synthetisierten Wirkstoffes STM10.HCl auf isolierte Meerschweinchenorgane.

Dazu werden bestimmte Organe bzw. Organteile mit einer definierten Konzentration der in Wasser gelösten Substanz in Kontakt gebracht. Die Originalregistrierung einer Wirkungskurve des Organs wird mittels Schreiber aufgezeichnet.

Für die Prüfung an der glatten Muskulatur werden Präparate von Aorta descendens, Truncus pulmonalis und terminalem Ileum herangezogen. Um weitere Aussagen über das Wirkprofil treffen zu können, testet man STM10.HCl am Atrium dextrum und am Musculus papillaris. Der Versuch am rechten Vorhof gibt Aufschluss über die Wirkungen auf die Chronotropie von STM10.HCl, währenddessen die Prüfung am Papillarmuskel eine Aussage über den Einfluss der Substanz auf die Inotropie ermöglicht.

Am Anfang der praktischen Arbeit steht das Erlernen der Gerätetechnik, sowie der Herstellung der Präparate aus Meerschweinchenorganen. Hernach werden an jedem zu untersuchendem Organteil Versuche durchgeführt, die reproduzierbar sein müssen. Dies wird durch 5 reproduzierbare Wirkungskurven verifiziert. Hieraus wird die EC_{50} bestimmt. Danach wird an dem Organ mit der kleinsten EC_{50} indirekt bestimmt, ob STM10.HCl seine Wirkung über die Stickstoffmonoxid-Synthase vermittelt.

Durch die Aufzeichnung des Wirkprofils erhält man Informationen über neue Drug Targets und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die gewonnenen Daten liefern wertvolle Ergebnisse zur Wirkstoffentwicklung.

2. Einleitung

2.1. Erregungsbildung und Erregungsleitung des Herzens

Die rhythmischen Aktionen des Herzens werden von Erregungen ausgelöst, die normalerweise im Sinusknoten entstehen. Die Erregungsausbreitung ist hierarchisch gegliedert: der Sinusknoten fungiert als primärer Schrittmacher, der Atrioventrikularknoten verzögert die Überleitung auf die Kammern und sichert somit, dass die Vorhofsystole beendet ist, bevor die Kammerkontraktion beginnt. Die Erregung trifft danach auf das His-Bündel, welches sich in die Tawara-Schenkel teilt. Die Tawara-Schenkel werden auch Kammerschenkel genannt und leiten die Erregung auf die rechte und linke Herzkammer weiter, worauf sie sich in die Purkinje-Fasern aufteilen (Thews 1999).

2.2. Aktionspotential

Während der Herzaktion (Systole) durchläuft jede Herzmuskelzelle ein Aktionspotential, das sich aus den Phasen 0 bis 3 zusammensetzt. Es beginnt mit einer raschen Depolarisation (Phase 0), die die Schnelligkeit der Erregungsfortleitung bestimmt. Nach einer transienten, unvollständigen Repolarisation (Phase 1) schließt sich die lang anhaltende Phase 2 (Plateauphase) an, während der das für die elektromechanische Koppelung notwendige Ca^{2+} in die Zelle strömt. Die Phase 3 repräsentiert die Repolarisation und ist damit für die Wiederherstellung des Ruhezustandes verantwortlich. Während des gesamten Aktionspotentials ist die Membran depolarisiert und damit vor einem weiteren depolarisierenden Reiz geschützt – sie ist refraktär. Während der Phase 4 herrscht ein Ruhemembranpotential von -80 bis -90 mV, und an Zellen, die zu spontaner Impulsbildung (Automatie) fähig sind, eine leichte spontane Depolarisation (Aktories 2004).

2.3. Hypertonie

Arterielle Hypertonie ist definiert als Blutdruck von systolisch > 140 und/oder diastolisch > 90 mm Hg bei mindestens 3 Messungen in Ruhe an 2 verschiedenen Tagen. Fallen systolischer und diastolischer Blutdruck in verschiedene Kategorien, ist der höhere Wert maßgebend (Karow 2015).

Generell unterscheidet man die primäre, essentielle Hypertonie (90%) aufgrund genetischer Disposition und die sekundäre Hypertonie (5-10%), die durch andere Erkrankungen ausgelöst

wird. Die Klassifizierung erfolgt in Stufen, wobei ein optimaler Blutdruck von systolisch < 120 und diastolisch < 80 mm Hg als optimal, und Werte von systolisch bis 139 und diastolisch bis 89 mm Hg als noch normal gelten. Danach unterscheidet man 3 Stufen, wobei die schwere Hypertonie durch einen systolischen Blutdruck von ≥ 180 und diastolischen Blutdruck ≥ 140 gekennzeichnet ist. Bei der isolierten systolischen Hypertonie ist nur der systolische Wert erhöht.

Eine Behandlung des Bluthochdrucks ist unerlässlich um das kardiovaskuläre Risiko zu senken.

Die Hypothese, dass neue Antihypertonika wie Kalziumantagonisten, alpha-Blocker, ACE-Hemmer oder AT1-Blocker kardiovaskuläre Prognose mehr als nur durch ihre antihypertensiven Eigenschaften begünstigen, bleibt ungeprüft. Das Ergebnis, dass Blutdruckunregelmäßigkeiten die kardiovaskuläre Prognose negativ beeinflussen, untermauert die Wichtigkeit einer engen Blutdruckkontrolle. Allerdings bleibt offen, auf welche Werte der Blutdruck gesenkt werden soll, um maximalen kardiovaskulären Vorteil zu erreichen (Staessen JA1 2003).

2.4. Antihypertensive Therapiegrundlagen (Karow 2015)

Das Hauptziel ist die Reduktion des gesamten kardiovaskulären Risikos, was neben der Blutdrucksenkung auch die Therapie zusätzlicher Risikofaktoren beinhaltet. Dazu soll der Blutdruck bei allen Hypertonikern < 140/90 mm Hg gesenkt werden. Bei Gesunden gilt „the lower, the better“. Bei Hypertonikern mit kardiovaskulären Erkrankungen und sehr niedrigen Blutdruckwerten besteht eine J-Kurve mit wiederum erhöhten kardiovaskulären Ereignissraten, Niereninsuffizienz und Proteinurie.

Eine Lebensstiländerung senkt den Blutdruck und ist die erste Maßnahme der antihypertensiven Therapie. Dazu gehören verschiedene Maßnahmen wie Sport, Gewichtsreduktion, Rauchen einstellen, Natrium- und Alkoholrestriktion, Diät, Stressabbau und die Überprüfung ob eine Therapie mit Medikamenten vorliegt, die den Blutdruck erhöhen können (NSAID, Glukokortikoide, orale Kontrazeptiva,...).

Sollten diese Maßnahmen den Blutdruck nicht ausreichend senken, so werden zusätzlich blutdrucksenkende Pharmaka eingesetzt. Je nach den individuellen Begleiterkrankungen wird in der Monotherapie das passende blutdrucksenkende Medikament verordnet. Bei unzureichender Blutdrucksenkung kann eine Kombinationstherapie angestrebt werden.

2.5. Antihypertensiva der ersten Wahl

Dazu zählen ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, Betablocker, Calciumantagonisten und Thiaziddiuretika. Sie senken nachweislich die Morbidität und Mortalität und können durch weitere blutdrucksenkende Medikamente ergänzt werden.

2.5.1. Angiotensin Converting Enzym-Hemmer

Diese senken den Blutdruck indem sie die zinkhaltige Peptidase Kininase II (=ACE) hemmen und somit die Metabolisierung von Angiotension I in Angiotensin II und den Bradykininabbau inhibieren. Angiotensin II ist ein potenter Vasokonstriktor und steigert den Blutdruck über direkte Vasokonstriktion, erhöhte Noradrenalinfreisetzung, erhöhte Natriumrückresorption im proximalen Tubulus und erhöhte Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde. Aldosteron bewirkt wiederum eine erhöhte Natriumresorption und erhöhte Kaliumexkretion.

Weitere Arzneimittelgruppen die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen sind Renin-Inhibitoren, Angiotensin-II-Hemmer und Aldosteronantagonisten. Auch diese können zur Blutdrucktherapie herangezogen werden.

2.5.2. Angiotensin-II-Hemmer

Durch einen selektiven Antagonismus am AT1-Rezeptor wird der Angriff von Angiotensin-II blockiert. Dies führt zur Vasodilatation, verminderter Natriumrückresorption und somit sinkt die Wasserretention, der Blutdruck sinkt. Die Wirkung ist weniger stark ausgeprägt, da Bradykinin selbst vasodilatierend und somit Blutdrucksenkend wirkt.

2.5.3. Betablocker

Die Wirkung von Betablocker wird durch eine kompetitive Hemmung endogener und exogener adrenerger Substanzen an β -Rezeptoren erreicht. Man kann 2 Subtypen unterscheiden:

β_1 -Adrenozeptoren kommen am Herz, Fettgewebe und Niere vor. Die Blockade wirkt daher negativ chrono-, ino- und dromotrop und vermindert die Automatie. Weiters wird der Fettabbau gehemmt und in der Niere wird die Reninausschüttung blockiert.

Zur Blutdrucktherapie werden die β_1 -Rezeptor selektiven Blocker verwendet. Ihre Selektivität ist dosisabhängig. Werden auch β_2 -Adrenozeptoren blockiert, führt dies zur Bronchokonstriktion, gehemmter Insulinsekretion und blockierter Glykogenolyse im Skelettmuskel.

2.5.4. Kalziumantagonisten

Kalziumantagonisten üben eine Blockade auf den Kalziumeinstrom in die Zellen der glatten Muskulatur, das Arbeitsmyokard und in den Zellen der Erregungsbildung und -leitung aus. Mittellang bis langwirksame Dihydropyridine werden zur antihypertensiven Therapie herangezogen, da sie eine ausgeprägte Wirkung auf die glatte Muskulatur aufweisen, jedoch die Effekte auf die Reizleitung und das Myocard vernachlässigbar sind. Benzothiazepine und Phenylalkylamine inhibieren den Kalziumeinstrom an allen genannten Geweben und werden daher als Antiarrhythmika eingesetzt.

2.5.5. Diuretika

Sie hemmen reversibel den Transport von Anionen oder Kationen über Carrier im Tubulussystem der Niere und somit steigt sekundär die Wasserausscheidung. Zu den Diuretika zählen Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen: Osmodiuretika, Carboanhydrasehemmer, Thiazide, Schleifendiuretika, kaliumsparende Diuretika und Aldosteronantagonisten. Als Antihypertensiva eignen sich Thiazidiuretika. Thiazide wie Chlorothiazid, Chlorthalidon oder Hydrochlorothiazid hemmen reversibel den Na^+Cl^- -Carrier im proximalen Teil des distalen Tubulus. Um eine Hypokaliämie zu verhindern werden sie mit kaliumsparenden Diuretika eingesetzt.

2.6. Antihypertensiva der zweiten Wahl

Diese können bei unzureichender Wirkung der 1. Wahl Antihypertensiva oder bei Unverträglichkeiten eingesetzt werden. Dazu zählen α_1 -Adrenozeptorblocker, zentrale Antihypertonika und wie in 3.2.1 erwähnt der direkte Renin-Inhibitor Aliskiren.

Keine generelle Anwendungsempfehlung zur Dauertherapie gibt es für organische Nitrate und zentrale Antisymphotonika Clonidin, Urapidil, Reserpin und Methyldopa.

Die Behandlung einer hypertensiven Krise kann die Anwendung von organischen Nitraten, Dihydralazin oder Minoxidil erfordern.

3. Material und Methoden

3.1. Präklinische Phase der Wirkstoffprüfung

Nach Identifizierung eines potentiellen neuen Wirkstoffes und Aufklärung der zu Grunde liegenden Wirkmechanismen erfolgt die Wirksamkeitsprüfung am Tier. Dies bezieht sich sowohl auf die erwünschte, pharmakologische Wirkung als auch auf unerwünschte Nebenwirkungen und Toxizität. Der größte Teil der Kandidatensubstanzen wird bereits in der präklinischen Phase auf Grund ungünstiger Wirkprofile von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen (Efferth 2006).

Meine Diplomarbeit dient der Datensammlung über STM10.HCl in der präklinischen Phase.

3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen weibliche und männliche Meerschweinchen des "TRIK" - Stammes. Die wenige Wochen alten Tiere weisen ein durchschnittliches Gewicht von 400 g auf. Die Ionenkanäle von Meerschweinchen sind den des Menschen sehr ähnlich.

3.3. Herstellen der Präparate

3.3.1. Tötung des Versuchstiers

Ein Versuchstier wird am Morgen des Versuchstages durch Genickschlag getötet. Danach werden Organe zu Versuchszwecken isoliert. Dieses Verfahren stellt eine Alternative zum Tierversuch dar, denn es gewährleistet einen schnellen und möglichst schmerzlosen Tod.

3.3.2. Isolierung der Organe

Die Bauchdecke wird mit einer Schere geöffnet und die Organe entnommen. Das noch schlagende Herz, der Darm und die Aorta werden herausgeschnitten. Aus dem Herz werden der rechte Vorhof und die Papillarmuskeln entnommen. Sodann wird die Pulmonalarterie präpariert. Alle Präparate werden sogleich in Bechergläser mit physiologischer Nährlösung eingelegt und mit Sauerstoff und CO₂ begast, um sie am Leben zu halten.

3.3.3. Präparationsbesteck

Man legt eine Petrischale mit Kork aus und füllt sie mit Nährlösung. Ein Gummiring beschwert den Kork und verhindert das Aufschwimmen. Diese Petrischale dient während der Präparation als Behältnis der Organe. Durch das Feststecken der Organe mit Insektennadeln am Kork wird das zu bearbeitende Material fixiert. Mit Hilfe von Spitzscheren, Federschere, Pinzetten, Pasteurpipetten, Insektennadeln, Bindfaden und Silberdraht werden Präparate hergestellt. Unter Verwendung einer Stereolupe können sehr kleine und präzise Schnitte durchgeführt werden. Die angefertigten Präparate werden sofort wieder in Nährlösung eingelegt und weiter mit Oxymix versorgt. Während der Präparation soll zügig gearbeitet werden, da die Gefahr besteht, dass die Organe absterben.

Abbildung 1: Stereolupe und Präparationsbesteck



3.3.4. Isolierung und Präparation der Aorta descendens

Nach der Entnahme des Herzens am Versuchstier, schneidet man am Rückgrat entlang die Aorta descendens heraus und legt diese sofort in ein dafür vorgesehenes Becherglas mit Tyrode. Die Wirbelsäule wird stark nach vorne gedrückt, die Aorta mit einer Pinzette fixiert und eine Spitzschere trennt sie ab. Unter der Stereolupe in der Petrischale muss im Anschluss Fett- und Muskelgewebe fein säuberlich abgeschnitten werden, ohne die Aorta dabei zu verletzen. Am besten geeignet ist hierfür eine scharfe Federschere. Geübte können dazu auch die größere Spitzschere anwenden. Danach werden Ringe geschnitten, die wenige Millimeter

stark sind und wieder in Nährlösung aufbewahrt oder aber gleich in die Apparatur 1 eingespannt.

3.3.5. Isolierung und Präparation der Ateria pulmonalis

Die Überreste von Perikard, Fett- und Lungengewebe werden mit der Federschere entfernt. Ein am Herzen sehr nahe gelegener Schnitt trennt die Pulmonalarterie ab. Daraus werden wenige Millimeter starke Stücke angefertigt. Verwendet wird nur jener Teil der Ateria pulmonalis, der sich vor der Gabelung in linke und rechte Aterie befindet. Die Präparate werden in Tyrode gelegt und begast oder gleich in die Apparatur 1a oder 1b eingehängt.

3.3.6. Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs

Der Sinusknoten besteht aus undifferenzierten Zellen, deshalb muss für die Durchführung der Versuche jeweils der gesamte rechte Vorhof vorbereitet werden. Dem Thorax des Meerschweinchens entnimmt man das gesamte Herz. Sodann wird es in einer Petrischale mit Insektennadeln fixiert. Eine Nadel wird an der Herzspitze und eine Nadel an der Herzbasis eingebracht. Durch häufiges Spülen des Gewebes mit Tyrode kann überschüssiges Blut entfernt werden. Nun werden Lungen-, Fettgewebe und Perikard abgeschnitten. Mit präzisen Schnitten wird der rechte Vorhof vom rechten Ventrikel und dem linken Vorhof getrennt. Dieser Schritt verlangt vom Präparator eine ruhige Hand, da der Sinusknoten weiterschlägt. Nun liegt der rechte Vorhof frei und kann in eine weitere Petrischale übergeführt und mit Nadeln fixiert werden. Um den Vorhof in eine Apparatur einspannen zu können muss man an der Spitze und am Herzohr mit Hilfe eines Bindfadens jeweils ein Silberdrahthäkchen befestigen. Sofort im Anschluss wird der Vorhof in die Apparatur 1 eingespannt und mit Tyrode und Sauerstoff versorgt.

3.3.6.1. Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln

Aus dem rechten Ventrikel werden die Papillarmuskeln isoliert und in einem Tyrodebad suspendiert (Reiter 1967). Zuerst entfernt man den rechten Vorhof. Danach schneidet man den rechten Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze auf. Jetzt kann man den Ventrikel aufklappen und mit Nadeln fixieren. Es werden anhaftende Purkinje-Fasern

abgetrennt, da diese spontan depolarisieren können und somit die Untersuchungsergebnisse verfälschen. Am Ansatz des Musculus papillaris wird nun mit einem Bindfaden ein Silberdrahthäkchen festgebunden. Beim Papillarmuskel handelt es sich um Vorstülpungen der Herzmuskulatur in die Ventrikel, die über Sehnen mit den Segelklappen verbunden sind. An diesen zwei Ansatzpunkten wird geschnitten und der Muskel vorsichtig herausgetrennt. Man sollte darauf achten, den Muskel dabei nicht zu dehnen. Die Präparate werden unverzüglich in Nährlösung eingelegt und mit Oxymix begast. Der linke Ventrikel enthält ebenso Papillarmuskeln, bei denen man in gleicher Weise vorgeht. Nach der Vorbereitung wird der Papillarmuskel in die Apparatur 2 eingespannt.

3.3.7. Isolierung und Präparation des terminalen Ileums

Zwischen Jejunum und dem Caecum befindet sich das terminale Ileum. Nach dem Bauchschnitt am Versuchstier wird der Dünndarm angehoben und durch Schnitte vom Gekröse getrennt. Man zieht ein ca. 15 bis 20 Zentimeter langes Stück des Dünndarms heraus und bindet das jejunal gelegene Stück mit einem Bindfaden ab. Der Faden dient der Markierung. Sogleich schneidet man vorm Caecum ab, legt den Krummdarm in Tyrode und sorgt für die Sauerstoffzufuhr. Aus dem so gewonnenen Organ können nun mehrere Präparate von ca. 1 cm Länge hergestellt werden. Dazu schneidet man ein Stück des terminalen Ileums ab, bringt es in die Petrischale ein und fixiert die Enden mit Nadeln. Nun müssen Chymusreste entfernt werden. Mit einer Pasteurpipette durchspült man das Organ mit Tyrode. Nun bindet man an beide Enden jeweils ein Silberdrahthäkchen mit einem Bindfaden an. Dabei ist Sorge zu tragen, dass das Darmstück nicht gedehnt wird und man den Darm nicht abbindet, sondern das Darmlumen offen bleibt. Die Öffnung ist essentiell, damit die Nährlösung in das Präparat eindringen kann und es durchfließt. Sofern man das gefertigte Darmstück nicht sofort in die Apparatur 1 einspannt, überführt man es wieder in Tyrode und versorgt es mit Sauerstoff.

3.4. Verwendete Lösungen, Gase

3.4.1. Physiologische Nährlösung: Tyrode

Eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Reiter 1967) dient als Nährlösung für die entnommenen Organe und ist, wie folgt, jeden Tag frisch herzustellen:

- Bestandteile aus Tabelle 1, ohne CaCl₂, in entsprechenden Mengen in 2 l-Messkolben geben und mischen
- Mit Aqua bidestillata auf $\frac{3}{4}$ des Messkolbens auffüllen
- Messkolben schütteln
- 20 min mit Oxymix begasen, damit man eine mit Sauerstoff gesättigte Lösung erhält
- CaCl₂ langsam dazu tropfen, um das Ausfallen des CaCl₂ - Salzes zu verhindern
- Mit Aqua bidestillata bis zur Eichmarke auffüllen und erneut gut durchmischen

Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode

Substanz	Molare Masse in g/Mol	Stocklösung	Stocklösung in ml pro 1 l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,44	1000,25 g/5 l	33,60	114,90
KCl	74,55	50,33 g/5 l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01	125,00 g/5 l	83,70	24,90
CaCl ₂	110,98	147,02 g/5 l	3,20	3,20
MgSO ₄	120,37	62,00 g/250 ml	1,18	1,18
KH ₂ PO ₄	136,09	34,00 g/250 ml	1,18	1,18
(+)-D-Glucose	180,16	Reinsubstanz	1,98	10

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 l Tyrode

Substanz	Menge
NaCl	67,20 ml
KCl	70,00 ml
NaHCO ₃	167,40 ml
CaCl ₂	6,40 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ PO ₄	2,36 ml
(+)-D-Glucose	3,96 g

Die Tyrode wird verwendet um die entnommenen Organe zu lagern und den Darminhalt, falls nötig, vorsichtig heraus zu Spülen. Weiters wird überschüssiges Blut am Herzen ausgewaschen, die Organbäder vor dem Versuch mit Nährlösung gewaschen, gespült und

befüllt.

Außerdem stellt man mit Tyrode die Kontraktionslösung mit Kaliumchlorid her.

3.4.2. Kontraktionslösung mit Kaliumchlorid

Die Tyrode wird bei den Präparaten von Aorta, Pulmonalarterie und dem Darm nach 20 min Eingewöhnungszeit bei 37°C und definierter Vorspannung durch die gleiche Menge Kontraktionslösung ersetzt. Dies dient der chemischen Reizung der glatten Muskulatur, da der Kaliumüberschuss der Nährlösung eine Maximalkontraktion der Präparate auslöst.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurden die KCl Einwaagen experimentell ermittelt, die nötig sind, damit die verschiedenen Organe maximal kontrahieren. Die Maximalkontraktion der Organe wird durch folgende Lösungen erreicht:

- Die Konzentration der Darm-Kontraktionslösung beträgt 60 mmol/l. Dazu werden 0,45g KCl eingewogen und anschließend in einen 100 ml Messkolben mit Tyrode aufgefüllt.
- Für Aorta und Pulmonalarterie wiegt man 0,67 g KCl ein und füllt auf einen 100 ml Messkolben mit Tyrode auf. Dies entspricht einer Konzentration von 90 mmol/l.

3.4.3. Oxymix

Oxymix oder Carbogen ist ein Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % CO₂. Dieses wird als Gas in die Nährlösung eingebracht. Jedes Organbad besitzt eine Zuleitung für das Gas bestehend aus einer Fritte, einem Zuleitungsschlauch und einer Klemme. Die Klemme dient zur Regulierung des Gasflusses. In die Tyrode und die Bechergläser mit Organen werden ebenfalls Schläuche mit Fritten zur Gaszerstäubung eingehängt. Durch die konstante Zufuhr von Oxymix wird ein physiologischer pH-Wert von 7,2 bis 7,4 erreicht, die Sauerstoffversorgung der Organe gewährleistet und das Organbad durchmischt.

3.5. Apparaturen

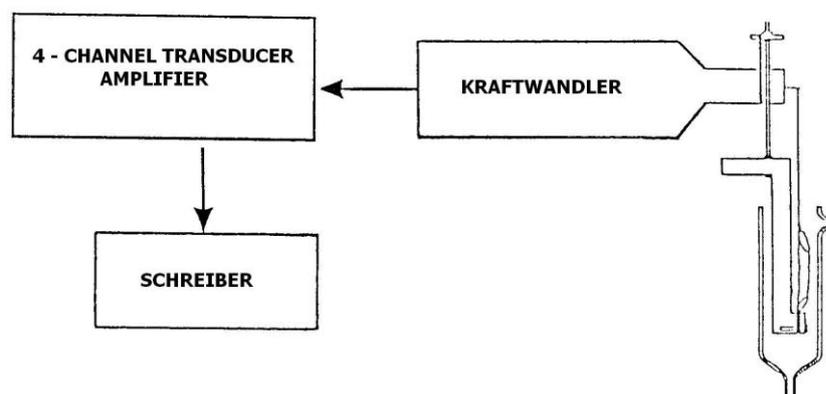
Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, benötigt man Apparaturen, die physiologische Bedingungen herstellen können. Die Temperatur, der pH-Wert und die Sauerstoffversorgung müssen während des Einzelversuchs und in Versuchsreihen konstant gehalten werden und reproduzierbar sein.

3.5.1. Aufbau

Die Apparaturen 1a, 1b und 2 stimmen in folgenden Elementen im Aufbau überein:

- 1 Organbad für das Präparat
- Gaszufuhr mit Fritte
- 1 Wasserbad
- 1 Organhalterung, 1 Aufhängevorrichtung
- 1 Kraftwandler
- 1 Verstärker
- 1 Schreiber

Abbildung 2: Schema der Versuchsanordnung



3.5.2. Das Organbad

Es besteht aus doppelwandigem Glas. An seiner Oberseite ist das Organbad geöffnet und ermöglicht somit das Eintauchen der Organhalterung und der Aufhängevorrichtung. Seitlich am des Organbads mündet ein Schlauch ein, über die die Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. An der Unterseite des Organbads befindet sich ein Kunststoffschlauch, durch welchen der Inhalt des Organbades abgelassen werden kann. Dies ist durch eine Klemme regulierbar.

3.5.3. Die Gaszufuhr

Das Sauerstoff/CO₂-Gemisch gelangt über die Hauptgaszufuhr zum Sauerstoffschlauch am Organbad. Am Sauerstoffschlauch befindet sich eine Klemme, an der man die Stärke der Gaszufuhr regulieren kann. Eine Fritte trennt den Sauerstoffschlauch vom Lumen des

Organbades und sorgt für feine Gasbläschen. Die Bläschen durchmischen das Bad. Somit kann sich der Wirkstoff homogen verteilen und die Lösung wird mit Sauerstoff gesättigt. Gleichzeitig wird der physiologische pH-Wert konstant gehalten.

3.5.4. Das Wasserbad

Die Temperatur des Wasserbades kann frei gewählt werden. Die Versuche werden bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Der Vorhof, der Krummdarm, die Aorta descendens und Aorta pulmonalis werden bei einer Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ vermessen. Der Versuch am Papillarmuskel dagegen wird bei geringerer Temperatur von $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Das Wasserbad ist eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn einzuschalten. Eine Wasserzuleitung transportiert das temperierte Wasser zum Organbad. Das Wasser durchspült den doppelwandigen Mantel des Organbades und wird danach dem Wasserbad erneut zugeführt.

3.5.5. Die Organhalterung und die Aufhängevorrichtung

An der Organhalterung befindet sich am unteren Ende ein Silberdraht, an dem man das Präparat befestigen kann. Somit stellt sie die untere Einhängvorrichtung für die Silberdrahthäkchen des Präparates dar. Des Weiteren ist die Organhalterung mit einer Schraube gekoppelt, die eine Manipulation der Höhe erlaubt. Das Verstellen der Höhe der Organhalterung dient der Vorspannung für das jeweilige Präparat. Je nach Arbeitsvorschrift muss eine definierte Vorspannung in cm oder mN eingestellt werden. Die Organhalterung stellt man durch Drehen der Schraube nach unten, damit das Präparat leicht auf Zug gehalten wird. Dieser Schritt ist wichtig, damit das Organ beim Einbringen in die Nährlösung, nicht wieder aus den Halterungen rutschen kann. Die Aufhängevorrichtung dient zum Einhängen des Präparates für das zweite Silberdrahthäkchen. Die Aufhängevorrichtung ist am Kraftwandler befestigt und ermöglicht die Aufzeichnung der Kontraktionskraft des Organs während der gesamten Untersuchungszeit. Die Aufhängevorrichtung kann aber auch aus einem Silberdraht bestehen, der am Kraftwandler befestigt ist. Dann muss man sich eine Öse zum Einhängen biegen. Präparate vom Darm und Vorhof werden so vorbereitet, dass an ihren Enden mit Bindfaden zwei Häkchen angebunden werden, die in die Halterungen eingehakelt werden können. Man hängt nun beide Silberdrahthäkchen ein, und fixiert somit das Präparat zwischen Organhalterung und Aufhängevorrichtung. Der Papillarmuskel wird zur unteren

Fixierung zwischen eine Platinplatte und eine Plexiglasscheibe eingequetscht. Die Teile der Aorta und Pulmonalis können zwischen kleinen Metalldreiecken fixiert und danach eingehängt werden, oder man hängt sie zwischen Silberdrähte.

3.5.6. Der Kraftwandler

Die mechanischen Signale der Organe werden gemessen. Ein Dehnungsmessstreifen reagiert auf die Kontraktion der Präparate und wandelt diese mechanische Information in ein elektrisches Signal um. Der Widerstandswandler Typ AE875, Firma Aksjeselskapet, Horton, Norwegen wird in den Apparaturen 1 und 2 eingesetzt.

3.5.7. Der Verstärker

Der Amplifier verstärkt die aufgenommenen Signale und leitet sie an den Schreiber weiter. Die Firma World Precision Instruments hat diesen Verstärker gebaut.

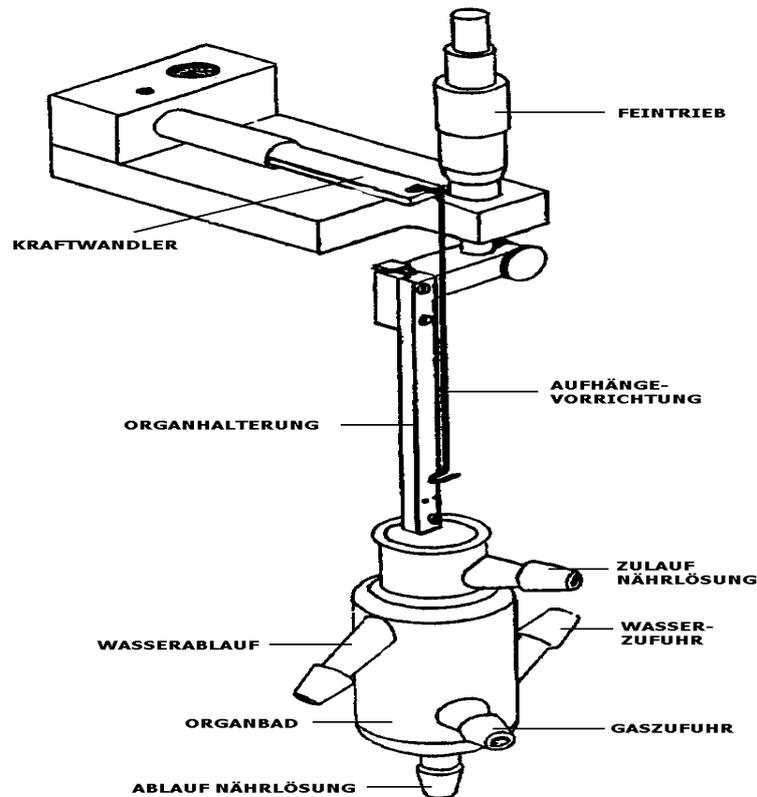
3.5.8. Der Schreiber

Der Flatbed Recorder hält die Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve auf Millimeterpapier fest. Der Schreiber ist ein Produkt der Firma Kipp & Zonen und misst in cm.

3.5.9. Apparatur 1a

Apparatur 1a wird benutzt, um Versuchsreihen an Aorta descendens, Aorta pulmonalis, terminalem Ileum und Atrium dextrum durchzuführen. Die Versuchsanordnung ist wie in 4.5.1. bis 4.5.8. beschrieben, aufgebaut. Vermessen werden diese Präparate in 25 ml der vorgeschriebenen Nährlösung, bzw. Kaliumchloridlösung.

Abbildung 3: Aufbau Apparatur 1a



3.5.10. Apparatur 1b

Bei Apparatur 1b handelt es sich um ein Produkt der Firma World Precision Instruments. Der Aufbau ist in seinen Grundzügen ähnlich wie in 4.5.1 bis 4.1.8. beschrieben, jedoch wird nicht mehr analog, sondern digital aufgezeichnet. Das Labscribe-Programm dient der Aufzeichnung und Bearbeitung der Kontraktionskurven. Die Aufzeichnung erfasst gleichzeitig alle 4 Organbäder. Die Kurven können nicht isoliert aufgenommen werden, sodass man alle laufenden Messungen bis zum Ende abwarten muss, bevor ein neuer Messdurchgang gestartet werden kann. Das Programm zeichnet in mN auf. Diese Werte müssen danach in Zentimeter umgerechnet werden, um sie an die Ergebnisse der analogen Geräte anzugleichen. Um die digitalen Werte in cm umzurechnen, werden sie mit dem Faktor 1,02 multipliziert.

Die Gerätschaft besitzt 4 Organbäder: zwei davon fassen jeweils 5 ml und zwei weitere fassen 25 ml der Nährlösung. Der Einfachheit halber misst man in den 5 ml Organbädern Aorta descendens und Aorta pulmonalis, da diese kleiner sind. Die Menge des Arzneistoffes ist auf das Volumen des Organbades umzurechnen. In den größeren 25 ml Organbädern können

problemlos auch größere Präparate wie terminales Ileum oder Atrium dextrum vermessen werden. Die Zugabe der entsprechenden Menge Nährlösung bzw. Kontraktionslösung kann durch das Öffnen einer Klemme erfolgen. Vorteilhaft ist, dass der Apparat 1b das Volumen des Nährmediums selbsttätig und präzise in das Organbad füllt. So vermeidet man Messfehler, die durch Abmessen in einem Messzylinder entstehen. Des Weiteren werden die Präparate nicht an Silberdrahhäkchen befestigt (außer dies erweist sich als vorteilhaft), sondern mit Metalldreiecken eingespannt. Dies ist besonders günstig für Präparate von Aorta descendens und Ateria pulmonalis, weil sie so nicht verletzt werden, und auch nicht mehr verrutschen können. Man bindet zwei Metalldreiecke an einen Bindfaden. Das Obere wird am Kraftwandler eingehängt, am unteren wird das Präparat befestigt. Ein weiteres Metalldreieck dient zum Festmachen des Präparates an dessen Unterseite. Dieses Metalldreieck wird an der Organaufhängung festgemacht.

3.5.11. Die Apparatur 2

Sie dient der Aufzeichnung der Kontraktionskraft des Papillarmuskelpräparates.

Unterschiede zum Aufbau laut 4.5.1. bis 4.1.8:

- Das Organbad sitzt im abnehmbaren Deckel des beheizbaren Wasserbades. Somit taucht das Organbad direkt in das Wasserbad ein.
- Das Sauerstoff/CO-Gemisch wird über einen Schlauch mit Klemme durch eine Fritte im Boden des Organbades eingeleitet.
- Die Organhalterung ist aus Kunststoff gefertigt und über einen Stativschlitten an einem Stativ befestigt.
- Als Aufhängevorrichtung dient ein Silberdraht, der am Kraftwandler befestigt ist. Am Draht wird das Häkchen des Papillarmuskelpräparates eingequetscht.
- Das untere Ende des Muskels, wird zwischen einer Plexiglasplatte und einer Platinkathode fest eingequetscht. Dazu wird eine Schraube angezogen. Dieser Schritt erfordert Präzision und Fingerfertigkeit, da der Muskel sehr sensibel ist. Durch ungeübte Handhabung wird das Präparat leicht überdehnt, zerquetscht oder durch Kontakt mit der Umgebungsluft zerstört.
- Ein Reizgerät gibt elektrische Impulse über die Kathode an den Muskel ab, sodass dieser zu kontrahieren beginnt. Dies ersetzt die chemische Reizung durch KCl, wie es bei Aorta- und Darmpräparaten zur Anwendung kommt.

- Auch bei Apparatur 2 wird über den Feintrieb vorgespannt, damit man reproduzierbare Messungen durchführen kann.
- Die Dokumentation erfolgt analog, wie in 4.1.8. beschrieben.

3.6. Durchführung der Versuche

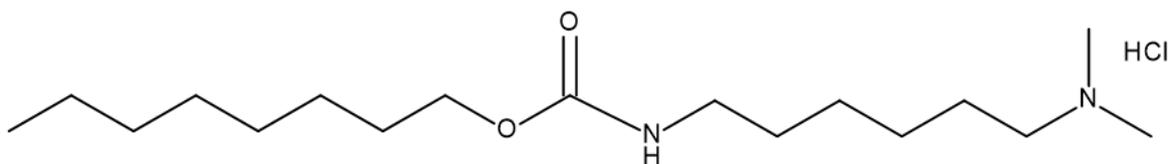
3.7. Testsubstanz STM10.HCl

Unter der Leitung von Herrn Ao. Prof. Dr. Thomas Erker am Departement Pharmazeutische Chemie wurde von Herrn Mag. pharm. Michael Hintersteiniger die Substanz STM10.HCl neusynthetisiert.

Chemische und physikalische Eigenschaften von STM10.HCl:

Bezeichnung:	STM10.HCl
Molare Masse:	336,90 g/mol
Nomenklatur:	N-[6-(Dimethylamino)hexylamino]-octyloxy-carbante Hydrochlorid
Summenformel:	$C_{17}H_{36}N_2O_2 \cdot HCl$
Farbe:	weiß
Löslichkeit:	gut löslich in Wasser

Abbildung 4: Struktur von STM10.HCl



3.7.1. Stammlösung

Um die Substanz mit den Organen in Kontakt bringen zu können, wird zunächst eine Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung enthält 100 $\mu\text{mol/l}$ von STM10.HCl.

An jedem Versuchstag wird die Stammlösung frisch zubereitet. Die Einwaage ist auf das Volumen des Organbades bezogen:

Tabelle 3: Einwaagen STM10.HCl in mg auf das Volumen des Organbades geeicht

Volumen Organbad	Einwaage STM10.HCl in mg
25 ml	0,842 mg
5 ml	0,168 mg

3.7.2. Vor der Zugabe von STM10.HCl

Eine konstante Kontraktion, Schlagfrequenz bzw. Amplitudenhöhe des Präparates ist die Bedingung für den Versuchsstart. Außerdem kann sich das Organ somit akklimatisieren. Die Bestimmung der Gleichmäßigkeit unterscheidet sich je nach Organ:

Aorta descendens, Aorta pulmonalis, terminales Ileum:

Nach dem Tausch der Tyrode gegen die Kaliumchloridlösung steigt der Messwert von verwertbaren Präparaten über 5 cm (Apparatur 1a) oder 4,8 mN (Apparatur 1b). Man wartet ab, bis die Kontraktionskurve nicht mehr steigt oder fällt und sich eine Gerade einstellt. Dies dauert meistens zwischen 2 bis 3 h, jedoch mindestens 45 min.

Papillarmuskel:

Nach 45 min beginnt man damit jede 5 min die Kontraktionsamplitude des Muskels für wenige Schläge aufzuzeichnen. Schlägt die Amplitude höher aus als 2 cm, so kann der Papillarmuskel für den Versuch verwendet werden. Das Präparat ist konstant, wenn sich die Amplitude über 3 Messungen in 5 minütigen Abstand nicht mehr größer +/- 1 mm ändert. Dies stellt man fest, indem man die Amplitudenhöhe mit einem Lineal bestimmt.

Rechter Vorhof:

Nach 45 min wird die Frequenz des rechten Vorhofs für 12 sec lang bestimmt. Die Schläge werden ausgezählt. Als konstant bezeichnet man ein Präparat, wenn sich die Frequenz nicht mehr größer +/- 1 Schlag ändert.

3.7.3. Substanzzugabe

Es wird eine kumulative Messung durchgeführt. Dazu werden im Abstand von je 45 min 3 µl, 7 µl, 20 µl und zuletzt 70 µl der frisch bereiteten Stammlösung mit einer Mikroliterpipette in die Nährlösung (Papillarmuskel, Vorhof) bzw. Kontraktionslösung (Aorta, Pulmonalis, Darm) pipettiert. Man kennzeichnet das Einspritzen am Millimeterpapier oder setzt einen Marker (Apparatur 1b). Um die Einstellung eines Fließgleichgewichtes zu ermöglichen, ist es wichtig, die 45 minütigen Abstände einzuhalten. Man beachte, dass das Zusetzen der Substanz sehr

sorgsam erfolgen muss, da schon kleine Erschütterungen durch den Kraftwandler registriert werden.

3.8. Arbeitsvorschrift und Durchführung der Versuche mit STM10.HCl

An den isolierten Organen wird durch Zusatz von STM10.HCl getestet, ob eine Wirkung ausgelöst werden kann:

3.8.1. Versuchsablauf bei Aorta descendens, Aorta pulmonalis, terminales Ileum

Als erster Schritt werden das Wasserbad, der Verstärker und der Schreiber eingeschaltet. Das Organbad wird mit destilliertem Wasser und danach zweimal mit Tyrode gespült. Nun 25 ml Tyrode mit einem Messzylinder abmessen, in das Organbad einbringen und mit Oxymix versorgen. Sodann kann man das Präparat des jeweiligen Organs herstellen. Im Anschluss wird das gefertigte Präparat zwischen Organhalterung und Aufhängevorrichtung eingehängt. Am Verstärker wird nun von „Gnd“ auf „Diff“ umgeschaltet, um das Signal zu empfangen und der Schreiber wird zum Nullpunkt gestellt. Der Schreiber zeichnet mit 5 mV und mit einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 1 mm/min auf. Nun wird das Präparat vorgespannt. Dazu wird der Feintrieb so gedreht, dass sich die Organhalterung nach unten bewegt. Das Präparat wird so einer reproduzierbaren Zugspannung ausgesetzt.

Tabelle 4: Vorspannungen für Apparaturen und Präparate

Präparat	Vorspannung in cm für Apparatur 1a	Vorspannung in mN für Apparatur 1b
Aorta descendens	10	9,8
Aorta pulmonalis		
Terminales Ileum	5	4,8

Es wird sofort die Stoppuhr gestellt. Nun hat das Organ Zeit sich für 20 min an die Versuchsumgebung anzupassen. Nach 20 min wird das Organ noch einmal auf die entsprechenden Werte nachgespannt. Dadurch kann man eventuelle Verfälschungen durch zu starke Kontraktion ausgleichen. Jetzt wird der Schreiber erneut auf den Nullpunkt gestellt und die Aufzeichnung gestartet. Dazu wird der Schreiber auf das Papier gesetzt und der „Rekord“-Knopf gedrückt. Sogleich öffnet man am Auslass des Organbades die Klemme. Die Tyrode fließt ab. Die Klemme wird wieder geschlossen. Nun werden 25 ml der entsprechenden

Kontraktionslösung (siehe 4.4.2.) in das Organbad überführt. Dabei soll darauf geachtet werden, weder Teile der Apparatur zu berühren, noch das Präparat zu übergießen. Bei Apparatur 1b wird die Kontraktionslösung über eine Klemme aus einem Vorratsbehältnis zugeführt. Automatisch wird die richtige Menge des Nährmediums gewählt. Die Stoppuhr wird erneut gestellt. Der Schreiber registriert bei für den Versuchsablauf tauglichen Präparaten einen starken und raschen Anstieg der Kontraktionskurve. Dieses typische Muster zeigt die Maximalkontraktion des Organes an. Anschließend kommt es zum Abfall der Kurve, wobei das Präparat nicht unter 5 cm bei Apparatur 1a oder 4,8 mN bei Apparatur 1b abfallen darf. Nun wartet man bis das Organ einen konstanten Tonus aufweist. Die Prüfung der Gleichmäßigkeit wird wie in 5.1.2. durchgeführt. Wie in 5.1.3. beschrieben setzt man nach dem Erreichen einer regelmäßigen Kontraktion die Substanz in den angegebenen Konzentrationen im Abstand von 45 zu. Dies ist der Startpunkt der eigentlichen Messung: Als erstes 3 μ l der 100 μ molaren Stammlösung von STM10.HCl dazu pipettieren, auf dem Millimeterpapier eine Markierung setzen und 45 min warten. Die Zeitmessung erfolgt durch eine Stoppuhr. Nach Ablauf der 45 min werden die 7 μ l der Stammlösung zugesetzt und wieder eine Kennzeichnung am Papier angebracht. Nach dem Ablauf von 45 min können nun 20 μ l der Substanzlösung zugegeben werden. Wieder markiert man den Zeitpunkt am Papier und stellt erneut die Uhr für 45 min. Der letzte Durchgang erfolgt mit dem Zugeben von 70 μ l STM10.HCl Stammlösung, dem Markieren und nochmaligem Abwarten von 45 min. Der Schreiber registriert während des gesamten Ablaufs den Tonus des Organes und zeichnet diesen auf. Nachdem man 70 μ l zugesetzt hat, und die vorgeschriebene Zeitspanne abgewartet hat, ist der Versuch beendet.

3.8.2. Versuchsablauf beim Papillarmuskel

Als erstes wird das Wasserbad, der Verstärker und Schreiber eingeschaltet. Danach spült man das Organbad mit destilliertem Wasser und im Anschluss zweimal mit Tyrode. Es werden 25 ml Tyrode mit dem Messzylinder abgemessen, in das Organbad überführt und mit Sauerstoff und CO₂ begast. Am Papillarmuskel wird mit einem Bindfaden ein Silberhäkchen angeknötet. Danach wird er aus dem Ventrikel getrennt und in Nährlösung überführt. Damit das Präparat am Leben erhalten werden kann, muss schnellstmöglich Oxymix zugeführt werden.

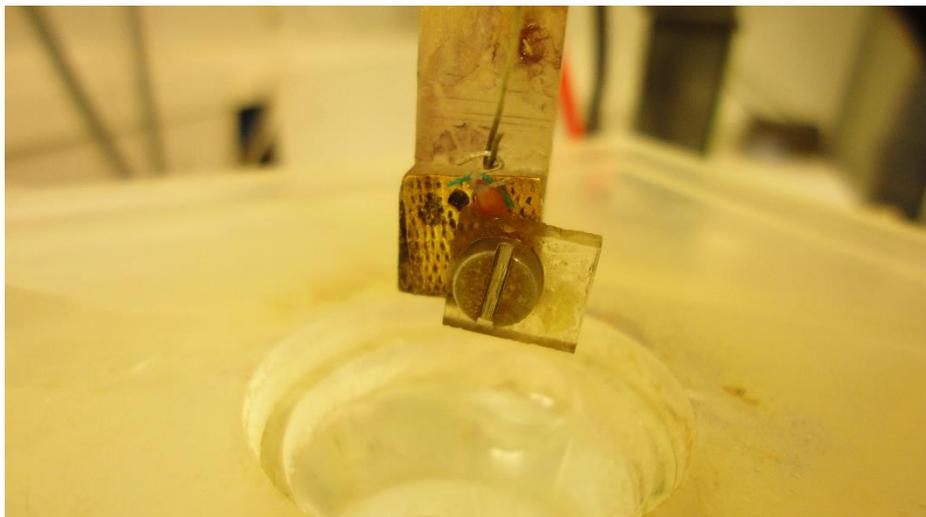
Nun muss der Musculus papillaris zwischen Organhalterung und Aufhängevorrichtung eingebracht werden. Die Aufhängevorrichtung besteht aus Silberdraht. Dieser ist am Kraftwandler befestigt. Zum Anbringen des Häkchens wird ein Ohr gebogen. Als nächster

Schritt wird der Muskel an der Organhalterung befestigt. Dazu bringt man das Präparat zwischen die Platinkathode und die Plexiglasscheibe. Durch Feststellen der Schraube mit einem Schraubenzieher quetscht man den unteren Teil des Muskels zwischen den Platten ein (siehe Abbildung 6). Dieser Schritt ist sehr diffizil und gelingt erst nach längerer Praxis. Nun setzt man den Muskel ein wenig unter Zug, damit er nicht mehr aus der Halterung rutschen kann. Das Stativ über das Organbad bringen und nun das Stativ nach unten drehen, bis der Papillarmuskel leicht in die Nährlösung eintaucht. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass sich der Muskel an der knapp an der Oberfläche des Mediums befindet. Der Muskel weist selbst nach elektrischer Reizung keinen Tonus auf, wenn er zu tief in die Lösung eingetaucht wird. Sodann kann man den Verstärker von „Gnd“ auf „Diff“ umschalten, um das Signal zu empfangen und den Schreiber zum Nullpunkt stellen. Der Schreiber misst auf einer Spannung von 5 mV, welche bei Bedarf auf 2 mV oder 1 mV erniedrigt werden kann, damit das Signal seine entsprechende Aussagekraft behält. Die Aufzeichnungsgeschwindigkeit beträgt 5 mm/sec. Nun wird das Präparat vorgespannt. Dazu wird der Feintrieb so gedreht, dass sich die Organhalterung nach unten bewegt. Das Präparat wird so einer reproduzierbaren Zugspannung ausgesetzt. Beim Papillarmuskel wird auf 4 cm vorgespannt. (Apparatur 2)

Als nächstes muss der Muskel durch einen elektrischen Impuls gereizt werden. Bei zum Versuch geeigneten Präparaten kommt es zur Kontraktion des Muskels. Der Schreiber zeichnet die Kontraktion als Amplitude auf. Als Reizgerät dient eine Kombination von A360 Stimulus Isolator und A310 Accupulser. Beide Gerätschaften sind von der Marke World Precision Instruments. Der Stimulus Isolator und der Accupulser werden eingeschaltet. Daraufhin erhöht man am Stimulus Isolator die Stromstärke solange, bis man am Schreiber eine Amplitude erkennen kann. Nun setzt man den Muskel ca. 20 min dieser Stromstärke aus. Dies dient der Eingewöhnung des Präparates. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wird nun die Stromstärke solange erniedrigt, bis der Papillarmuskel keinen Tonus mehr aufweist. Dies erkennt man daran, dass der Schreiber keinen Ausschlag mehr aufzeichnet. Diejenige Stromstärke bei der der Muskel zu schlagen aufhört, nennt man Schwellenstromstärke. Um die Stromstärke ideal einzustellen, wird am Stimulus Isolator sodann die Schwellenstromstärke um 10% erhöht. Dies ist jener Wert, bei dem der Papillarmuskel nun einen gleichmäßigen Rhythmus entwickeln muss. Die richtige Einstellung der Stromstärke ist essentiell. Würde man den Muskel kontinuierlich mit voller Spannung elektrisch reizen, so entleeren sich die muskulären, endogenen Katecholaminspeicher von Noradrenalin und Adrenalin. Die Folge ist, dass der Muskel keinen Tonus mehr aufweist und man somit ein falsches Untersuchungsergebnis generiert. Nach 45 min kann man mit der ersten

Aufzeichnung der Amplitudenhöhe, über mehrere Schläge hintereinander, beginnen. Dazu wird der Schreiber auf das Papier gebracht und der „Rekord“-Knopf gedrückt. Nun zeichnet man alle 5 min einige Schläge der Kontraktion und misst die Amplitudenhöhe in cm mit Hilfe eines Lineals ab. Eine Mindesthöhe von 2 cm gilt als Voraussetzung, um den Papillarmuskel vermessen zu können. Das Organ ist konstant, wenn sich die Amplitudenhöhe nicht mehr größer ± 1 mm über 3 Schläge ändert. Diese Abweichung darf sich bei mindestens 3 aufeinanderfolgenden Messungen im Abstand von 5 min nicht ändern. Meistens muss eine Zeitspanne von zwei bis 3 Stunden abgewartet werden, damit sich diese Regelmäßigkeit einstellen kann. Hat der Muskel nun eine gleichmäßige Amplitudenhöhe erreicht, kann mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden. Dazu werden zuerst 3 μ l der 100 μ molaren Stammlösung von STM10.HCl mit einer Mikroliterpipette zur Tyrode gegeben. Sofort wird die Stoppuhr gestellt und 45 min abgewartet. Während diesen 45 min werden alle 5 min Aufzeichnungen der Kontraktionen durchgeführt. Nach den 45 min, gibt man die nächsten 7 μ l der zu prüfenden Lösung zu, stellt die Uhr und zeichnet erneut jede 5 min einige Schläge des Muskels auf. Diese Vorgehensweise wird nun auch noch mit 20 μ l und im Anschluss mit 70 μ l der Stammlösung wiederholt. Sind die 45 min nach dem Einspritzen von 70 μ l verstrichen, ist der Versuch beendet.

Abbildung 5: Papillarmuskel in Apparat 2



3.8.3. Versuchsablauf beim rechten Vorhof

Erneut bereitet man das Wasserbad, den Verstärker und Schreiber vor. Der Schreiber zeichnet mit 5 mV auf, diese Spannung kann bei Bedarf auf 2 mV oder 1 mV gesenkt werden. Die

Geschwindigkeit der Aufnahme beträgt 5 mm/sec. Das Organbad mit destilliertem Wasser und danach zweimal mit Tyrode gut spülen und nun mit 25 ml Nährlösung befüllen und mit Oxymix sättigen. Den Vorhof, wie in Absatz 4.3.6. angeführt, präparieren und in die Apparatur 1a einspannen. Vorsichtig zwischen Organhalterung und Aufhängevorrichtung straffen, damit sich die Häkchen beim Einsenken in das Nährmedium nicht mehr von der Aufhängung lösen können. Es muss zügig gearbeitet werden, damit das Organ durch den Luftsauerstoff keinen Schaden nimmt. Den Verstärker von „Gnd“ auf „Diff“ umlegen, um das Signal zu empfangen und den Schreiber zum Nullpunkt bringen. Nun wird der Vorhof unter definierte Vorspannung gesetzt. Dazu wird bewegt man über den Feintrieb die Organhalterung soweit nach unten, dass am Schreiber eine Vorspannung von 10,4 cm ablesbar wird. Für die nächsten 20 min hat das Präparat nun Zeit sich in der Nährlösung zu akklimatisieren. Hierbei kann sich das Problem ergeben, dass der Vorhof keinen Sinusrhythmus aufweist. Durch häufiges Wechseln der Tyrode kann der Sinusrhythmus angeregt werden und der Vorhof beginnt wieder zu kontrahieren. Nach weiteren 45 min kann man das erste Mal die Regelmäßigkeit der Schläge überprüfen. Dazu werden im Abstand von 5 min jeweils über 12 sec die Schläge des Atriums aufgezeichnet. Um diese Aufzeichnung vorzunehmen setzt man den Schreiber auf das Millimeterpapier und drückt den „Rekord“-Knopf. Hat sich das Präparat konstant eingependelt, so weicht die Anzahl der Schläge über 12 sec nicht mehr größer +/- 1 Schlag ab. Diese Gleichmäßigkeit muss für mindestens 3 Messungen im Abstand von je 5 min gegeben sein. Dies ist der Zeitpunkt um wieder mit dem eigentlichen Versuch zu beginnen. Erneut kommt das Pipettierschema zum Tragen, wobei man im Abstand von je 45 min zuerst 3 µl, dann 7 µl, danach 20 µl und zuletzt 70 µl dazusetzt. Nach der letzten Zugabe der Substanz wartet man für 45 min und beendet den Versuch.

3.9. Arbeitsvorschrift und Durchführung der Versuche zur Identifizierung des Wirkmechanismus

Die Prüfung des Wirkmechanismus wird an jenem Organ mit der kleinsten effektiven Konzentration durchgeführt. Dazu bestimmt man anhand der Ergebnisse der Versuche von Absatz 8 die EC₅₀ für jedes Organ aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die kleinste EC₅₀ gibt Aussage darüber, an welchem Organ STM10.HCl die größte Wirkung hervorruft.

Tabelle 5: Organe und dazugehörige EC₅₀ in µmol/l

Organ	EC ₅₀ in µmol/l
Aorta descendens	keine
Ateria pulmonalis	23,5
Atrium dextrum	5,5
Musculus Papillaris	4,96
Terminales Ileum	8,7

Zur Bestimmung des Wirkmechanismus werden nur Präparate des Krummdarms, der absteigenden Aorta oder der Pulmonalarterie herangezogen. Die Prüfung am Atrium und am Papillarmuskel ermöglicht eine Vorhersage des Nebenwirkungspotentials am Herzen. Die kleinste EC₅₀ an der glatten Muskulatur wird am Krummdarm erreicht. Deshalb wird STM10.HCl am terminalen Ileum geprüft. Nitro-L-Arginin blockiert selektiv die NOS. Daher wird Nitro-L-Arginin-Lösung in definierter Konzentration zugesetzt, und im Anschluss eine 10 µmolare Lösung von STM10.HCl. Anhand der aufgezeichneten Kontraktionskurven des terminalen Ileums, kann man feststellen ob STM10.HCl die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch die Stickstoffmonoxid-Synthase stimuliert.

3.10. Stickstoffmonoxid-Synthase und Stickstoffmonoxid

Katalysatoren der zellulären NO-Produktion sind die NO-Synthasen (NOS). Die Stickstoffmonoxid-Synthase kommt in verschiedenen Isoformen und unterschiedlichen Geweben und Organen vor. Beschrieben sind die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS), die induzierbare (iNOS) und die mitochondriale (mtNOS) NO-Synthase. NO-Synthasen katalysieren die Synthese von L-Citrullin und dem Stickstoffmonoxidradikal aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff (Ganten 2006).

NO ist der Ligand der löslichen, zytosolischen Guanylatzyklase, bindet an deren Häm-Gruppe und aktiviert sie (Geckle 2010). Die Bildung von GTP zu cGMP wird katalysiert.

Die erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentration führt über eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation (Karow 2015).

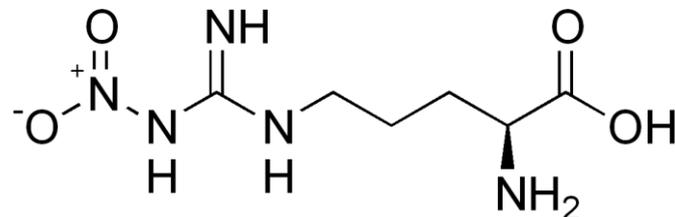
3.11. L-Nitro-Arginin

Die Freisetzung des NO lässt sich stereospezifisch durch eine Reihe von Argininanaloga blockieren, die teilweise das Präkursorsubstrat Arginin verdrängen (NG-Monomethyl-L-Arginin), das Enzym irreversibel inaktivieren (z.B. L-Nitro-Arginin) oder den endothelständigen Arginincarrier blockieren (L-Nitro-Arginin-Methylester) (Greiling 1992).

3.11.1. Chemische und physikalische Eigenschaften L-Nitro-Arginin

Bezeichnung:	L-Nitro-Arginin
Molare Masse:	219.20 g/mol
Nomenklatur:	(2 <i>S</i>)-2-Amino-5-[[Amino-(nitramido)-methyliden]amino]-pentansäure
Summenformel:	C ₆ H ₁₃ N ₅ O ₄
Farbe:	rosa
Löslichkeit:	schlecht löslich in Wasser

Abbildung 6: Struktur Nitro-L-Arginin



3.11.2. Nitro-L-Arginin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 µmol/l

0,548 mg Nitro-L-Arginin werden in 100 µl Kaliumchloridlösung am Ultraschallbad aufgelöst.

3.11.3. Durchführung der Wirkmechanismusbestimmung mit Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 30 µmol/l

Es wird der Darm wie in der Arbeitsvorschrift 4.3.7. beschrieben vorbereitet und bis zum konstanten Tonus des Organs. gewartet. Im Anschluss spritzt man ins Organbad 30 µl der Nitro-L-Argininlösung, die wie oben angeführt, hergestellt wurde. Man wartet 45 min, damit sich das Gleichgewicht in der Lösung einstellen kann. Hierauf gibt man 10 µl der STM10.HCl

Stammlösung dazu und wartet erneut 45 Minuten. Hierauf ist der Versuch beendet und man kann die Ergebnisse auswerten.

3.11.4. Durchführung der Wirkmechanismusbestimmung mit Nitro-L-Arginin in einer Konzentration von 100 µmol/l

Der Versuchsablauf wird wie in 5.5.3 durchgeführt, jedoch werden anstatt 30 µl, 100 µl der Nitro-L-Argininlösung eingespritzt.

3.11.5. Eichfaktor

Werden die Messwerte analog in cm bestimmt (Apparatur 1a, 2), so muss mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert werden. Man erhält die Messwerte in mN.

Wie schon erwähnt, müssen die Messwerte der Apparatur 1b mit dem Faktor 1,02 multipliziert, damit man die Werte in cm erhält.

Tabelle 6: Vorspannung in mV und dazugehörige Eichfaktoren

Spannung in mV	Eichfaktor
2	0,39
5	0,98
10	1,96

3.12. Welche Informationen können durch die Versuche gewonnen werden?

3.13. Aorta descendens, Ateria pulmonalis

Diese Gefäße bestehen aus glatter Muskulatur. Eine Veränderung der Kontraktilität führt zur Beeinflussung des Blutdrucks. Da man zum Präparat Kaliumchloridlösung gibt, stellt sich ein gleichmäßiger, maximaler Gefäßtonus ein. Nimmt die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur nach Zusatz von STM10.HCl ab, so wirkt STM10.HCl vasodilatierend, der Blutdruck sinkt und es kommt in Folge zur Senkung des Herz-Zeit-Volumens. Es besteht auch die Möglichkeit, dass der Tonus nicht beeinträchtigt ist, somit kann postuliert werden,

dass STM10.HCl keinen Einfluss auf diese Organe und in weiterer Folge auf den Blutdruck nimmt.

3.14. Terminales Ileum

STM10.HCl kann nach Zusatz zum Organbad eine Spasmolyse hervorrufen. Diese Information erhält man, wenn der Schreiber nach Zusatz von STM10.HCl einen Abfall der Kontraktionskurve misst. Die spasmolytische Wirkung kann ein Ansatz zur Therapie von akuten oder chronischen Darmerkrankungen sein.

3.15. Atrium dextrum

Die Wirkung von STM10.HCl auf den Schrittmacher des Herzens, den Sinusknoten kann festgestellt werden. Nimmt die Herzfrequenz nach Zusatz von STM10.HCl ab, so wirkt es negativ chronotrop. Bei tachykarden Herzrhythmusstörungen ist eine Abnahme der Chronotropie erwünscht, somit könnte dies ein Target sein. Es kann auch beurteilt werden, ob STM10.HCl eine Steigerung der Herzfrequenz hervorruft – als ein mögliches Ziel für bradykarde Herzrhythmusstörungen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass keine Wirkung auftritt.

3.16. Musculus papillaris

Die Wirkung von STM10.HCl kann positiv oder negativ inotrop oder indifferent sein. Als ein mögliches therapeutisches Einsatzgebiet ist hier die Herzinsuffizienz zu nennen.

3.17. Prüfung des Wirkmechanismus

Es wird der Nachweis erbracht, ob STM10.HCl Stickstoffmonoxid über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase freisetzt. STM10.HCl wurde als eine Folgesubstanz von Schwefelhaltigen Verbindungen synthetisiert. Diese Schwefelhaltigen Verbindungen setzen nach hydrolytischer oder enzymatischer Spaltung H₂S frei, welches jedoch zytotoxisch ist. In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob STM10.HCl ein besseres Wirkung-Risiko-Profil aufweist.

3.18. Zielsetzung der neu synthetisierten Substanz STM10.HCl

Eine möglichst gewebsselektive und potente Wirkung soll durch die Substanz hervorgerufen werden. Die Gewebeselektivität ist ein wichtiges Kriterium in der Wirkstoffentwicklung, da gewährleistet sein soll, dass Nebenwirkungen vermieden werden können. Wirkstoffe, deren Hauptwirkung nicht am Herzen zu Stande kommt, die jedoch einen Einfluss auf die Reizleitung und Kontraktionskraft ausüben, sind in der Wirkstoffentwicklung zu vernachlässigen, da das Risiko von potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein weiteres wichtiges Ziel ist es, dass die Substanz die EC_{50} bei einer möglichst kleinen Konzentration erreicht. Je kleiner die Dosis, bei der die EC_{50} erreicht wird, umso potenter ist die Substanz. Dies ist wichtig, da zum einen kleinere Mengen an Arzneistoff besser für die Produktion geeignet sind. So können beispielsweise kleine Einwaagen mit einem Füllstoff vermischt werden, um die volumetrische Dosierung für Tablettenpressen oder Kapselmaschinen vornehmen zu können. Zum anderen hängt die Compliance der Patienten in großem Maß von der einfachen, handlichen und unkomplizierten Einnahme der Arzneistoffe ab.

3.19. Statistik

Da STM10.HCl gut wasserlöslich ist, kann man Wirkungen des Lösungsmittels vernachlässigen. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen werden in mN angegeben und danach in Prozent umgerechnet. Der Standardfehler und der arithmetische Mittelwert wurden berechnet. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wird anhand der erhaltenen Werte gezeichnet. Die y-Achse gibt die Änderung der Kontraktionskraft bzw. die Frequenz der Schläge an. Die x-Achse erfasst die eingespritzten semilogarithmischen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$. Die graphische Darstellung erfolgt über das „Sigma Plot 9.0“. Mit Hilfe der Grafik wurde die EC_{50} bestimmt.

Der Student-t-Test wird herangezogen um die Signifikanz der Ergebnisse zu beurteilen. Als signifikant werden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($P < 0,05$) angesehen. Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1% ($P < 0,01$), so sind die Ergebnisse hochsignifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Wirkung von STM10.HCl auf die Aorta descendens

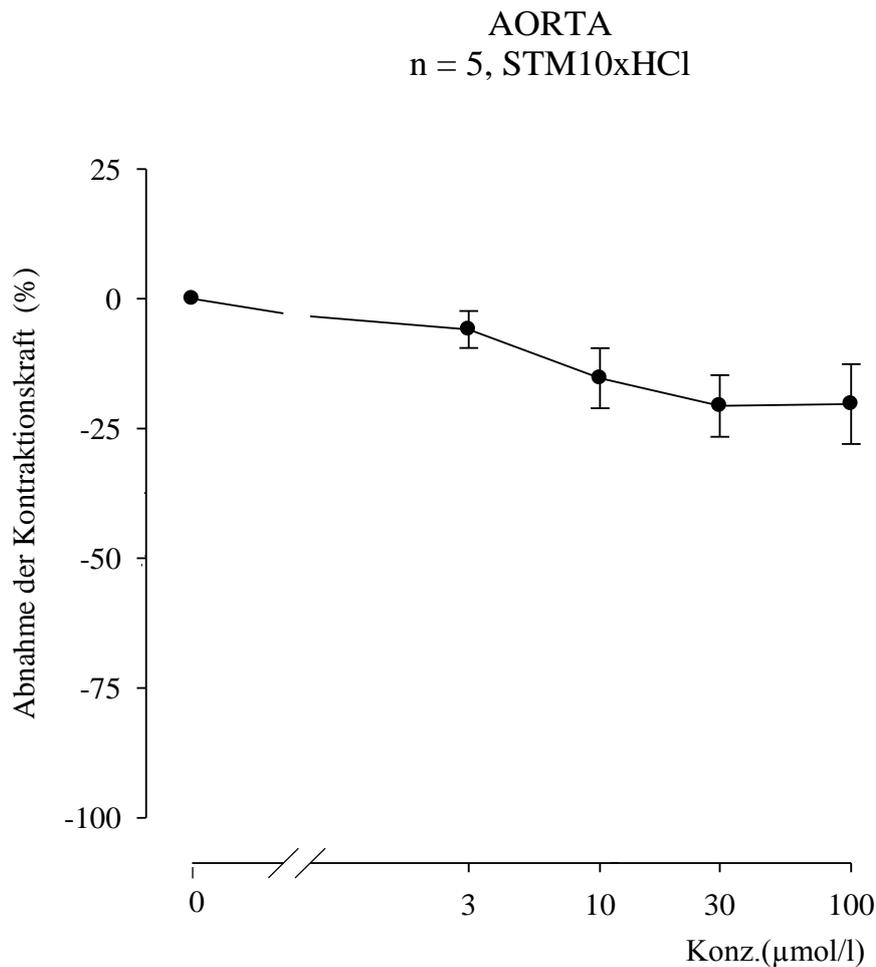
Der Versuchsablauf wird wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, zur Ermittlung der Wirkung von STM10.HCl auf die glatte Muskulatur der Aorta, durchgeführt. Durch 5 reproduzierbare Versuche wird festgestellt, ob STM10.HCl einen vasodilatierenden Effekt aufweist. Das arithmetische Mittel beträgt $16,60 \pm 6,72$ mN für den Kontrollwert. Beim Zusetzen der entsprechenden Konzentrationen fällt auf, dass es zu keinem signifikanten Abfall der Kontraktionskurve kommt. An den vermessenen Aortenpräparaten konnte somit keine EC_{50} bestimmt werden. Als Konsequenz ergibt sich daher, dass STM10.HCl kaum eine Vasodilatation an glatter, arterieller Muskulatur bewirkt.

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von STM10.HCl an der Aorta descendens

STM10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$16,60 \pm 6,72$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$15,58 \pm 6,15$	$-5,93 \pm 3,55$	5	n.s.
10	$13,85 \pm 4,94$	$-15,31 \pm 5,78$	5	0,05
30	$12,52 \pm 3,00$	$-20,65 \pm 5,95$	5	0,05
100	$12,47 \pm 2,93$	$-20,28 \pm 7,68$	5	0,05

Tabelle 7 zeigt die Anzahl der durchgeführten Versuche n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung in mN und Prozent.

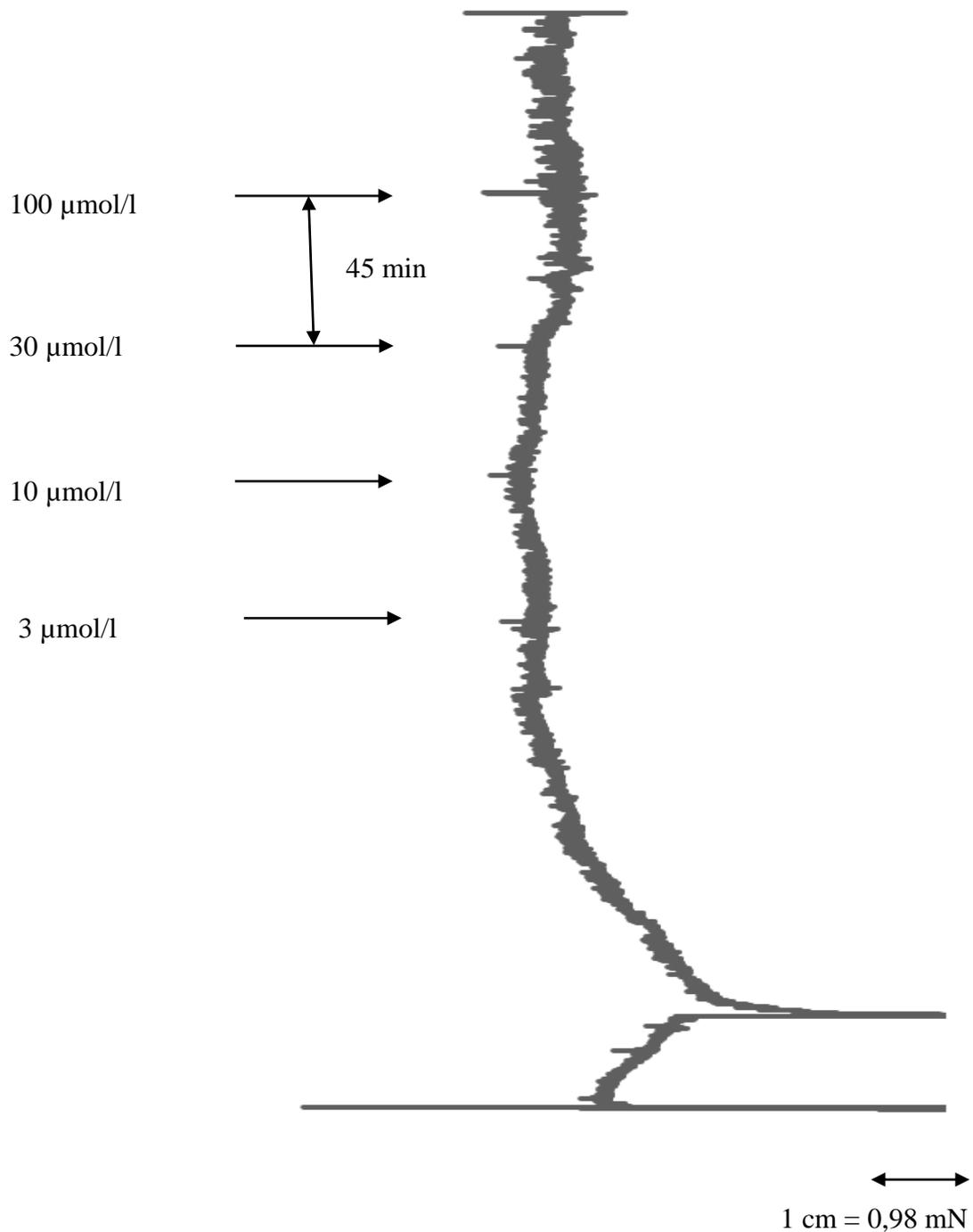
Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl an der Aorta descendens



Auf der x-Achse ist die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % aufgetragen.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt, dass keine halbmaximale Wirkung bestimmt werden kann, da der Verlauf der Kurve annähernd linear ist. Daraus kann man schließen, dass die zu testende Substanz nur marginal an der glatten Muskulatur der Aorta descendens angreift. Die Kontraktionskraft der Aortenpräparate ist auch bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ fast ident mit dem Kontrollwert. Selbst bei dieser letzten, hohen Konzentration gibt es kein Anzeichen für toxische Effekte von STM10.HCl.

Abbildung 8: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve an der Aorta descendens



Zu sehen ist die Aufzeichnung des Versuchs an der Aorta, wie es das Messgerät aufzeichnet. Wie deutlich zu erkennen ist, kommt es zu keinem signifikanten Abfall der Kontraktionskurve, welche auf einen vasodilatierenden Effekt hinweisen würde.

4.2. Wirkung von STM10.HCl auf die Ateria pulmonalis

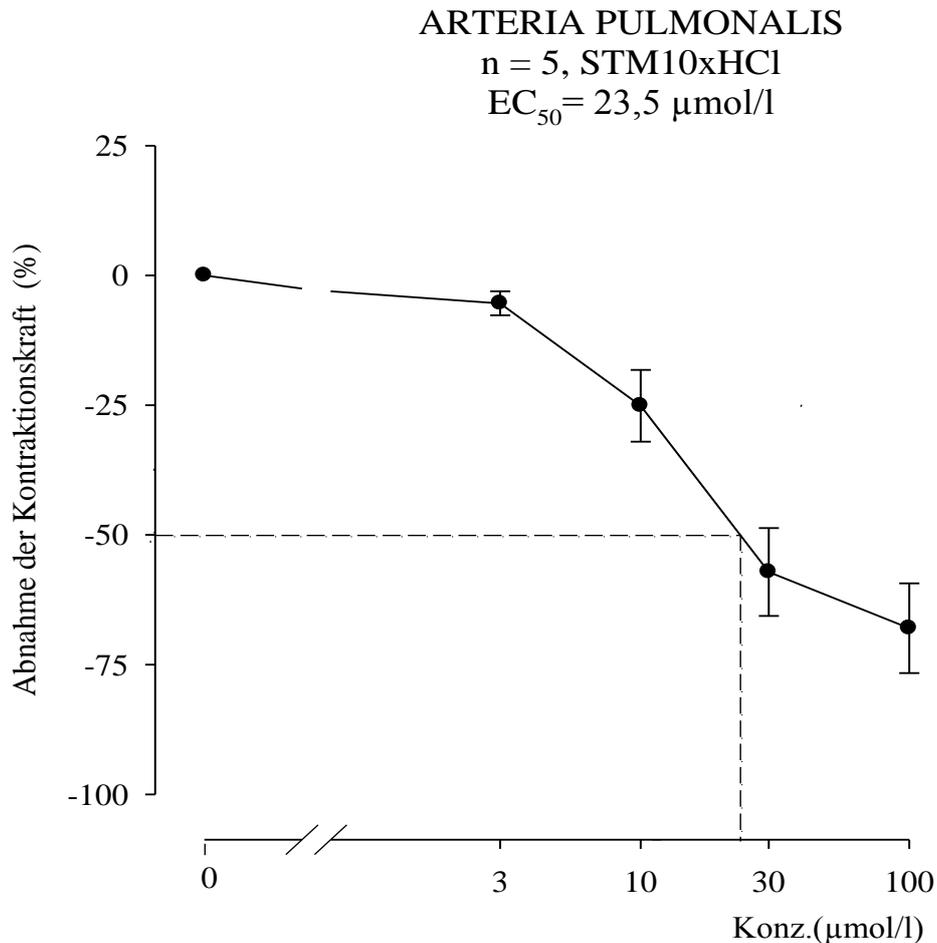
An der Pulmonialaterie wurden 5 Versuche wie in Kapitel 5 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurde eine deutliche Wirkung auf den Gefäßtonus der Ateria pulmonalis festgestellt. Der errechnete Kontrollwert beträgt $18,93 \pm 6,89$ mN. Schon nach der Zugabe von 3 μ l der 100 μ molaren Stammlösung von STM10.HCl sinkt der Wert auf $17,80 \pm 6,40$ mN. Das Organ kann dies durch weiteres kontrahieren kompensieren. Bei der Fortführung des Versuches jedoch werden Konzentrationen erreicht, bei denen die Kontraktionskraft deutlich abnimmt. Die Abnahme des Gefäßtonus kann man aus der Tabelle 8 entnehmen. Durch Zusatz der finalen Konzentration von 100 μ mol/l erreicht man einen mittleren Wert von $6,40 \pm 4,88$ mN, was einer Abnahme der Kontraktionskraft von $-68,00 \pm 8,65$ % entspricht. Es lässt sich eine signifikante Wirkung von STM10.HCl auf die Pulmonialaterie aufzeigen.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von STM10.HCl an der Ateria pulmonalis

STM10.HCl (μ mol/l)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$18,93 \pm 6,89$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$17,80 \pm 6,40$	$-5,38 \pm 2,30$	5	n. s.
10	$13,66 \pm 4,73$	$-25,11 \pm 6,90$	5	0,05
30	$8,06 \pm 4,84$	$-57,16 \pm 8,48$	5	0,05
100	$6,40 \pm 4,88$	$-68,00 \pm 8,65$	5	0,05

Tabelle 8 zeigt die Anzahl der durchgeführten Versuche n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung in mN und Prozent.

Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl an der Ateria pulmonalis



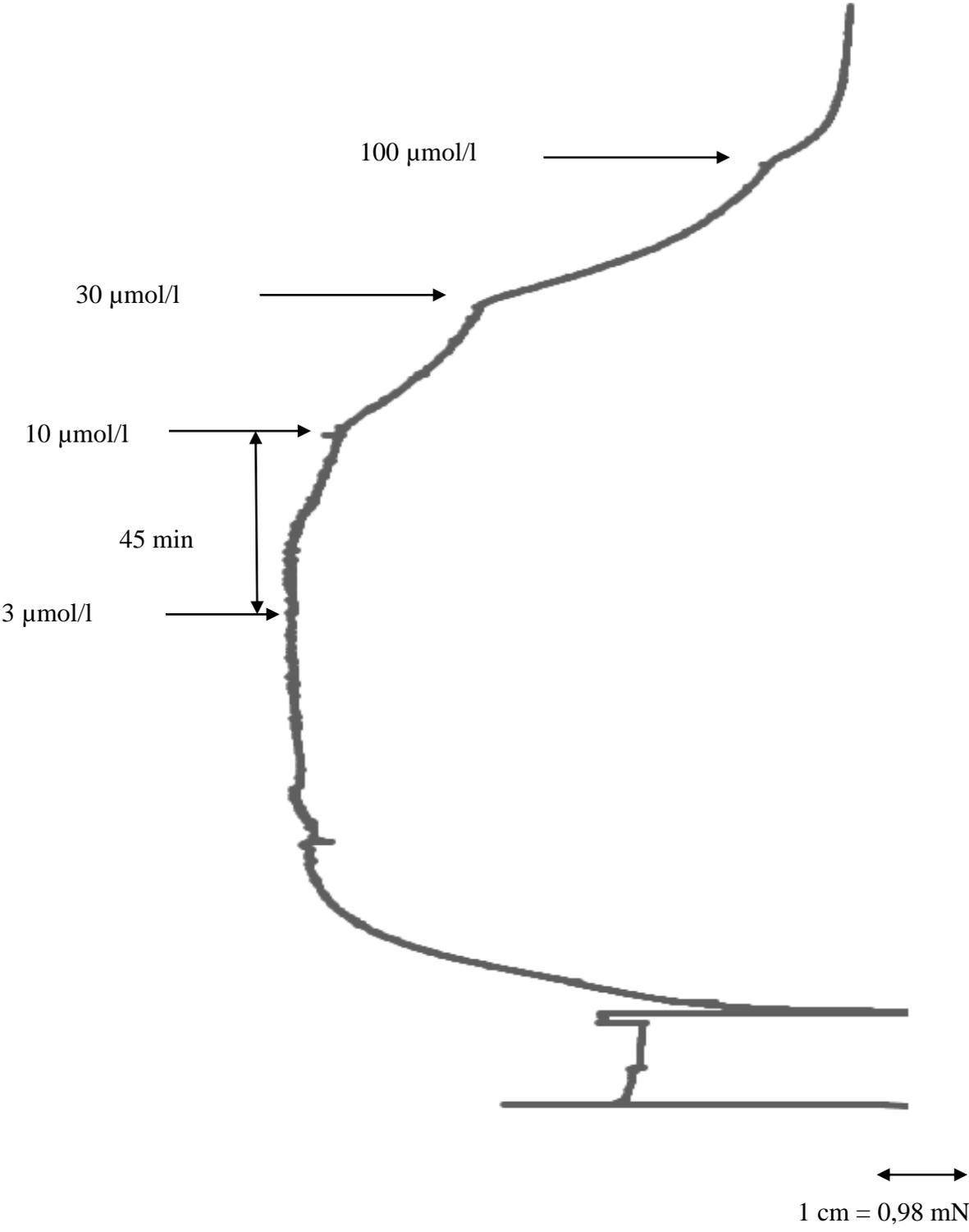
Auf der x-Achse ist die Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % aufgetragen.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt eine EC₅₀ bei einer Konzentration von 23,5 µmol/l. Setzt man als dritte Konzentration nun 30 µl aus der Pipette zu, so fällt die Kontraktilität um -57,16 ± 8,48 %, wie in Tabelle 8 angegeben. Es ergibt sich ein potentieller Angriffsort für die Substanz STM10.HCl, da es zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktilität kommt.

Abbildung 10: Originalaufzeichnung einer Kontraktionskurve der Ateria pulmonalis

Diese Abbildung zeigt die Originalaufzeichnung des Versuchs. Durch Zusetzen der ersten Konzentration von 3 µmol/l ist noch keine Abnahme der Kurve ersichtlich. Bei Zugabe der zweiten Konzentration von 10 µmol/l nimmt die Kurve schon leicht ab. Ab dem Zupipettieren von 30 µmol/l lässt sich eine deutliche Abnahme der Kontraktilität verzeichnen.

Abbildung 10: Originalaufzeichnung Kontraktionskurve der Ateria pulmonalis



4.3. Wirkung von STM10.HCl auf das terminale Ileum

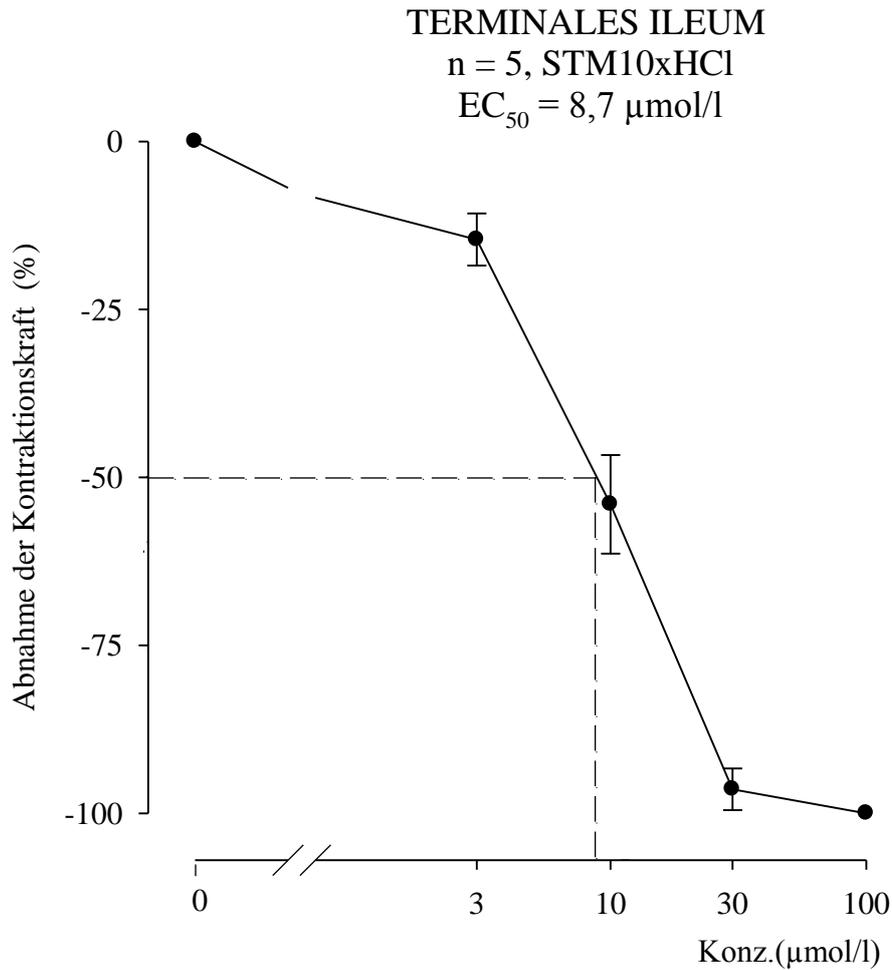
Am Krummdarm wurden ebenso 5 Versuchsabfolgen durchgeführt, um die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz nachzuweisen. Der Kontrollwert pendelte sich bei einem arithmetischen Mittelwert von $8,67 \pm 1,41$ mN ein. Schon die niedrigste Dosis von STM10.HCl zeigt eine Abnahme der Kontraktilität um $-14,60 \pm 3,88\%$. Bereits beim Zusatz von $10 \mu\text{mol/l}$ wird die EC_{50} erreicht, somit sinkt die Kontraktionskraft auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes ab. Es lässt sich eine stark ausgeprägte Spasmolyse durch STM10.HCl-Zusatz feststellen, denn schon nach dem Zugeben von $30 \mu\text{mol/l}$ nimmt die Kontraktionskraft um $-96,43 \pm 3,11\%$ ab. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Maximaldosis, die im Versuch eingesetzt wird, zur vollständigen Hemmung der Kontraktion des terminalen Ileums führt.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am terminalen Ileum

STM10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$8,67 \pm 1,41$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$7,36 \pm 1,15$	$-14,60 \pm 3,88$	5	0,05
10	$3,96 \pm 1,45$	$-54,01 \pm 7,33$	5	0,01
30	$0,25 \pm 0,45$	$-96,43 \pm 3,11$	5	0,01
100	$0,00 \pm 0,00$	$-100,00 \pm 0,00$	5	0,01

Diese Tabelle zeigt das arithmetische Mittel in mN und rechts davon gleich den Mittelwert in % ausgedrückt. Außerdem sind die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben.

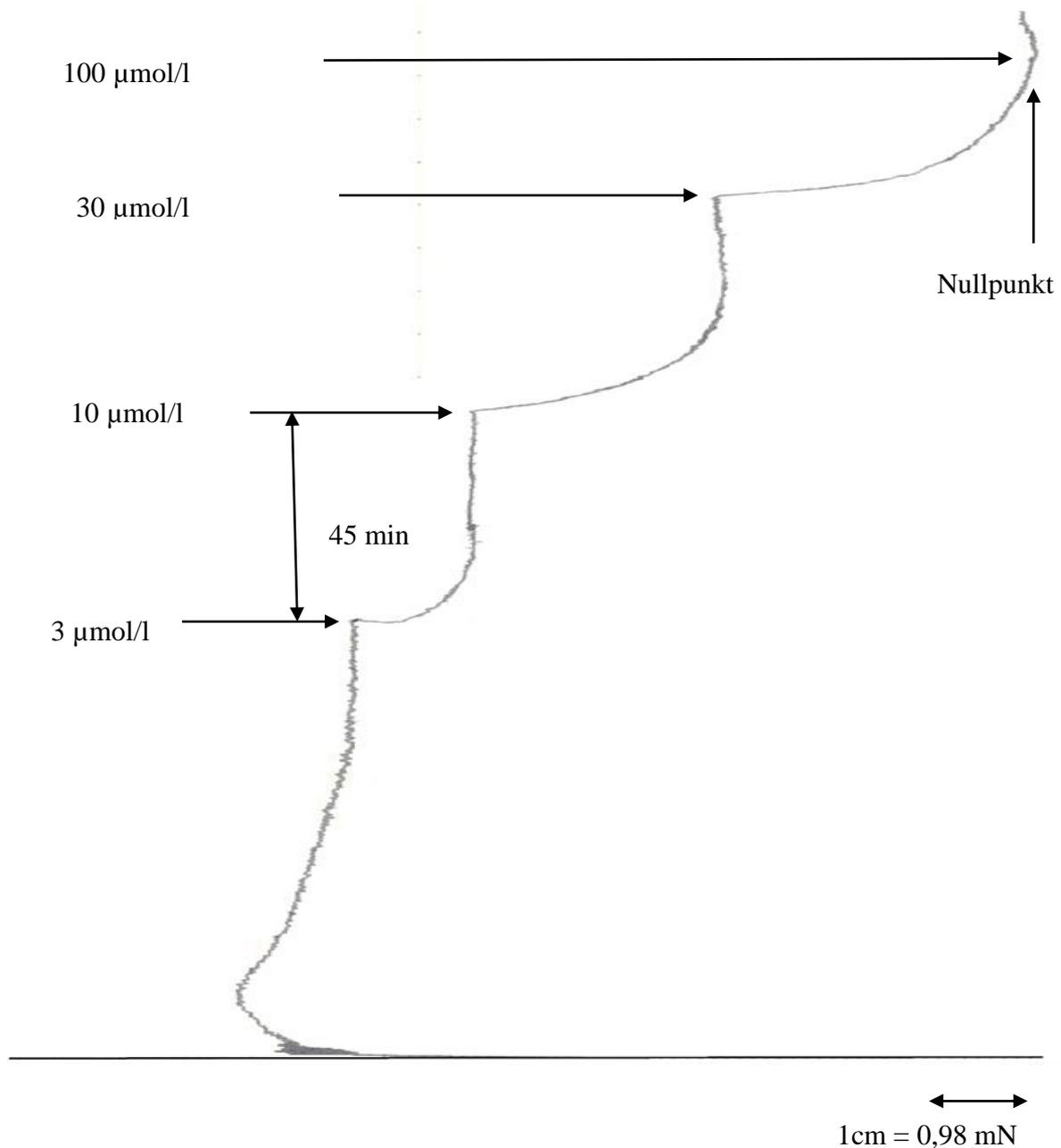
Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl am terminalen Ileum



Auf der x-Achse ist die Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % aufgetragen.

Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve wird die halbmaximale Konzentration bestimmt. Dies ist jene Konzentration, die angewendet werden muss um 50 % der Maximalwirkung hervorzurufen. Im Fall von STM10.HCl beträgt diese am Krummdarm 8,7 µmol/l. Aufgrund der außerordentlich kleinen EC₅₀ kann man resümieren, dass die Testsubstanz am terminalen Ileum eine gute Wirksamkeit aufweist.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve am terminalen Ileum



Gut zu erkennen ist, dass man solange wartet bis man die erste Dosis des Wirkstoffes zusetzt, bis der Darm konstant schlägt. Dieser Wert dient als Kontrollwert. Danach erhöht man die Konzentration im Abstand von 45 min. Die Abbildung zeigt eine deutliche Abnahme des Tonus der Darmmuskulatur, die sich durch eine Dosissteigerung erhöhen lässt. Es ist besonders gut zu erkennen, wie schnell und wie signifikant die Spasmolyse eintritt. Nach dem Einspritzen der 3. Konzentration sinkt die Kontraktionskraft sehr schnell gegen Null. Gibt man die letzte Dosis zu, tritt innerhalb weniger Minuten eine vollständige Dilatation der Darmmuskulatur ein. Es ist gut zu erkennen, dass man ab dem Zusatz von 30 $\mu\text{mol/l}$, den

nicht mehr durch das Gerät erfassbaren Bereich, von kleiner 0 mN erreicht. Beim Zusatz von 100 $\mu\text{mol/l}$ nach 45 Minuten liegt der Wert der Kontraktionskraft schon unter dem Nullpunkt.

4.4. Wirkung von STM10.HCl auf das Atrium dextrum

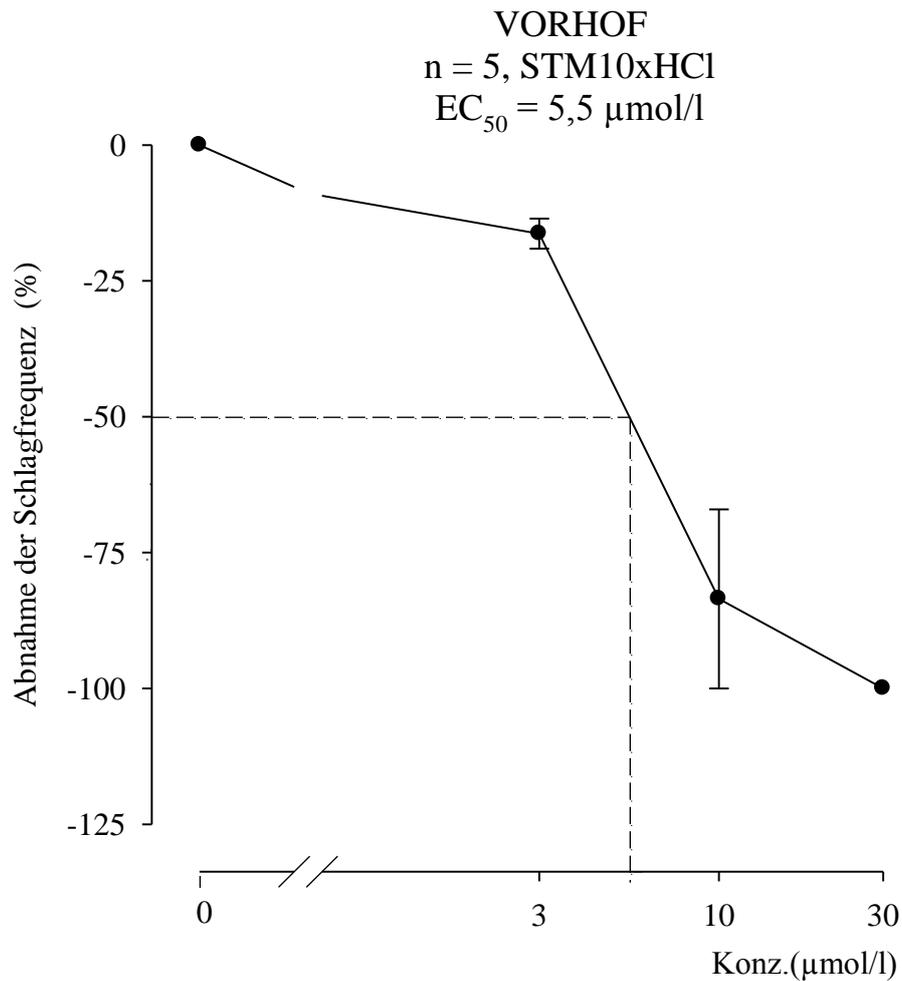
Der Kontrollwert wird aus den Mittelwerten berechnet und beträgt $235 \pm 38,08$ Schläge pro Minute. Dieser Wert entspricht der Sinusfrequenz, welche die Herzaktion auch noch nach der Organentnahme antreibt. Schon bei einem Zusatz der Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ erkennt man eine deutliche Reduktion der Sinusknotenfrequenz um $-16,30 \pm 2,77\%$. Gibt man nun weitere 7 μl der Standardlösung von STM10.HCl zu, und erhöht somit die Konzentration des Wirkstoffes im Organbad auf 10 $\mu\text{mol/l}$, nimmt die Herzfrequenz der spontanen Erregungsbildung gar um $-83,53 \pm 16,47\%$ ab, jedoch ist der Sinusrhythmus noch marginal vorhanden. Durch Zugabe von noch weiteren 20 μl werden Dosen erreicht, die zum irreversiblen Herzstillstand führen. Man kann daher postulieren, dass STM10.HCl eine deutlich negativ chronotrope Wirkung aufweist.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am Atrium dextrum

STM10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$235 \pm 38,08$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$195 \pm 22,36$	$-16,30 \pm 2,77$	5	0,05
10	$28 \pm 62,61$	$-83,53 \pm 16,47$	5	0,01
30	$0,00 \pm 0,00$	$-100,00 \pm 0,00$	5	0,01

Die tabellarische Übersicht gibt das arithmetische Mittel in mN, den Mittelwert in % ausgedrückt, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P an.

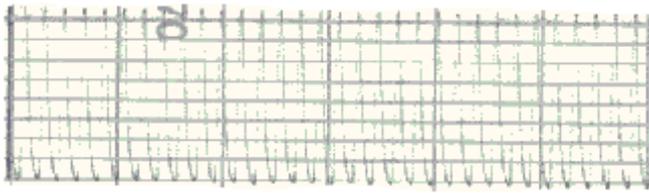
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von STM10.HCl am Atrium dextrum



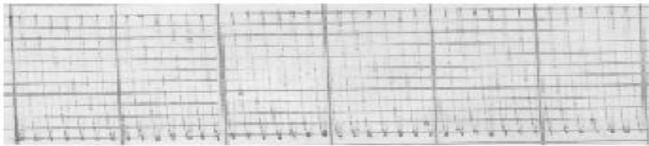
Auf der x-Achse ist die Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in % aufgetragen.

STM10.HCl zeigt durch die EC₅₀ von 5,5 µmol/l eine deutliche Abnahme der Herzfrequenz schon bei geringen Dosen. Beim Überschreiten dieser Dosierung um das doppelte kommt es zu einer stark eingeschränkten Automatie des Herzens. Der Herzstillstand tritt nach Erhöhung dieser Konzentration binnen weniger Minuten ein.

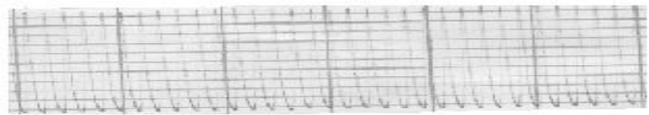
Abbildung 14: Originalaufzeichnung des Sinusrhythmus



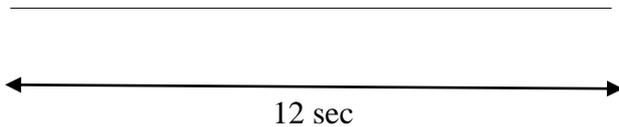
Kontrolle



3 µmol/l



10 µmol/l



12 sec



30 µmol/l

1 cm = 0,98 mV

Die Abbildungen zeigen die Abnahme der Amplitudehöhe und der Schlagfrequenz mit steigender Konzentration des Wirkstoffes auf. Kein Präparat überlebte eine Dosissteigerung auf 30 µmol/l von STM10.HCl.

4.5. Wirkung von STM10.HCl auf den Musculus papillaris

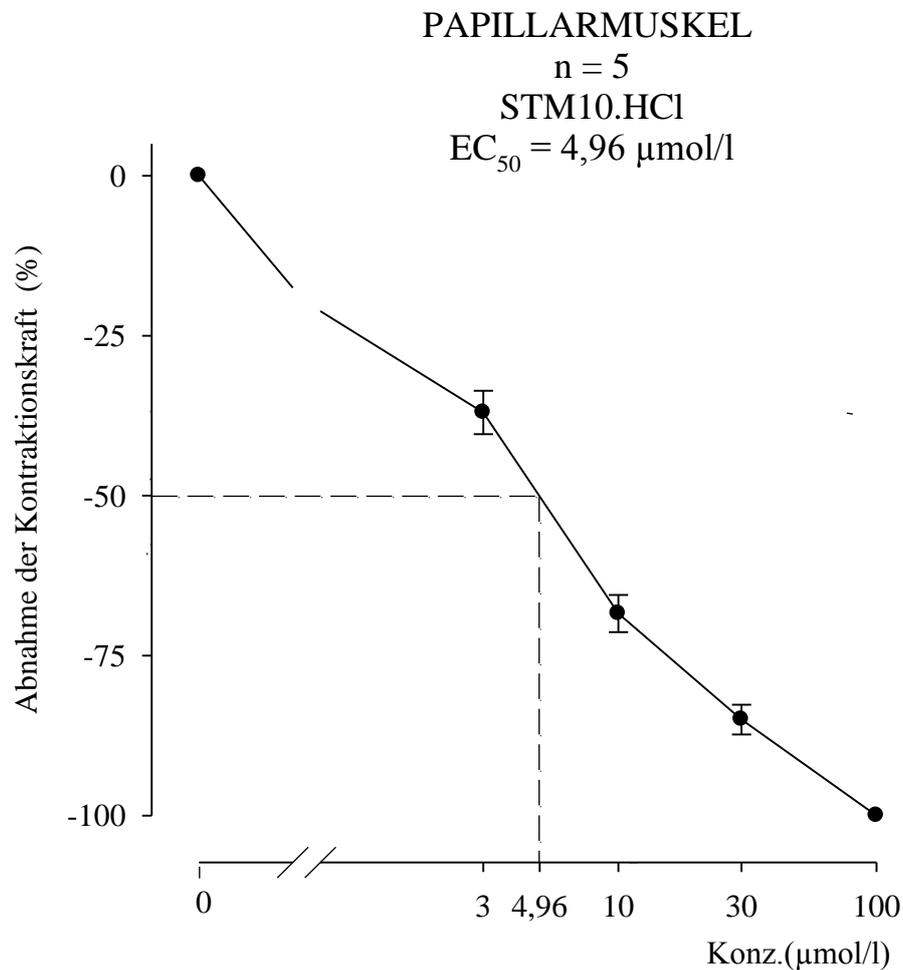
Der errechnete Kontrollwert der Papillarmuskeln beträgt $18,93 \pm 6,89$ mN. Schon bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$, wirkt STM10.HCl negativ inotrop. Die Kontraktionskraft des Papillarmuskels nimmt mit steigender Konzentration ab, und sinkt bei einer $100 \mu\text{molaren}$ Wirkstofflösung auf $-68,00 \pm 8,65\%$.

Tabelle 11: Versuchsergebnisse von STM10.HCl am Musculus papillaris

STM10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$18,93 \pm 6,89$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$17,80 \pm 16,40$	$-5,38 \pm 2,30$	5	n. s.
10	$13,66 \pm 4,73$	$-25,11 \pm 6,90$	5	0,05
30	$8,06 \pm 4,84$	$-57,16 \pm 8,48$	5	0,01
100	$6,40 \pm 4,88$	$-68,00 \pm 8,65$	5	0,01

Die tabellarische Übersicht gibt das arithmetische Mittel in mN, den Mittelwert in % ausgedrückt, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P an.

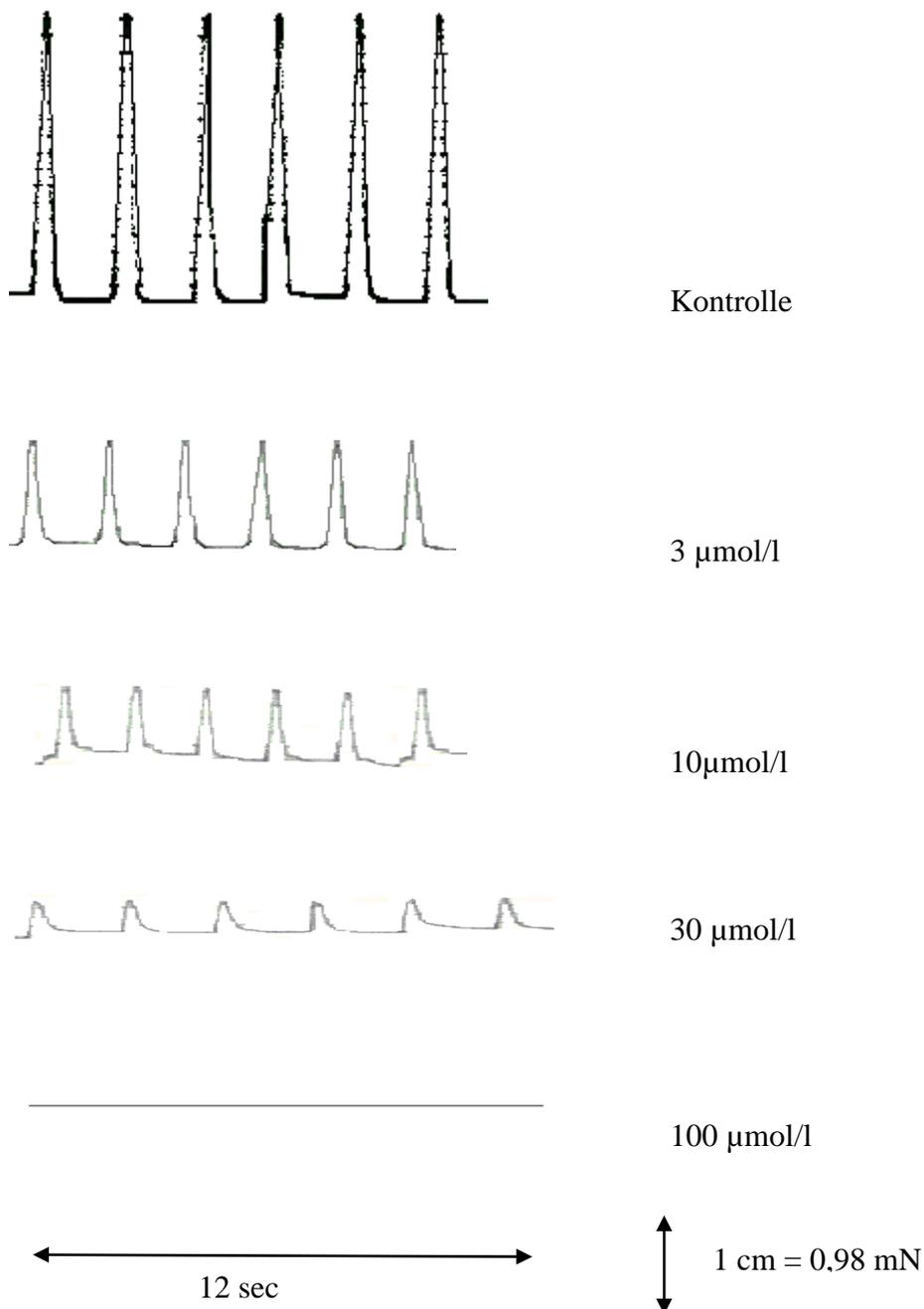
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Musculus papillaris



Auf der x-Achse ist die Konzentrationen in µmol/l, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % aufgetragen.

Die EC₅₀ des Papillarmuskels ist die kleinste EC₅₀ der gesamten Versuchsreihen und beträgt nur 4,96 µmol/l. Schon nach dem Zusatz der ersten Wirkstoffkonzentration von 3 µmol/l kommt man an diesen Bereich heran, sodass eine negative Inotropie hervorgerufen wird. Dieser Effekt verstärkt sich, wenn man die Dosis des Wirkstoffes erhöht.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung Musculus papillaris



Die quergestreifte Muskulatur des Musculus papillaris reagierte auf Zusatz von STM10.HCl negativ inotrop. Schon bei dem Zupipettieren von 3 μl Stammlösung geht die Kontraktionskraft merklich zurück. Je mehr Substanz man zum Organbad gibt umso stärker nimmt die Amplitudenhöhe und Schlagfrequenz der Papillarmuskeln ab.

4.6. Wirkung von STM10.HCl nach Blockade mit Nitro-L-Arginin 30 $\mu\text{mol/l}$

Nach der Zugabe des Blockers der Stickstoffmonoxid-Synthase kommt es zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft des Krummdarms von $6,80 \pm 1,02\text{mN}$ auf $6,95 \pm 0,78\text{ mN}$, da nun kein NO mehr gebildet werden kann. Die EC_{50} von STM10.HCl beträgt am terminalen Ileum $8,7\text{ }\mu\text{mol/l}$. Nun setzt man $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ STM10.HCl zu, um den Effekt zu prüfen. Dabei kommt es zur Reduktion der Kontraktionskraft von $6,95 \pm 0,78\text{ mN}$ auf $1,72 \pm 1,45\text{ mN}$.

Tabelle 12: Versuchsergebnisse von $10\mu\text{M}$ STM10.HCl am terminalen Ileum nach Blockade mit $30\text{ }\mu\text{M}$ Nitro-L-Arginin

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrschein- lichkeit (P)
Kontrolle	$6,80 \pm 1,02$	4	-
Nitro-L-Arginin 30 $\mu\text{mol/l}$	$6,95 \pm 0,78$	4	-
STM10.HCl $10\text{ }\mu\text{mol/l}$	$1,72 \pm 1,45$	4	0,05

Die tabellarische Übersicht gibt das arithmetische Mittel in mN, den Mittelwert in % ausgedrückt, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P an.

Abbildung 17: Balkendiagramm Wirkmechanismus 30 μ M Nitro-L-Arginin

**Terminales Ileum, Nitro-L-Arginin (30 μ M)
STM10.HCl, 10 μ mol/l
n=4**

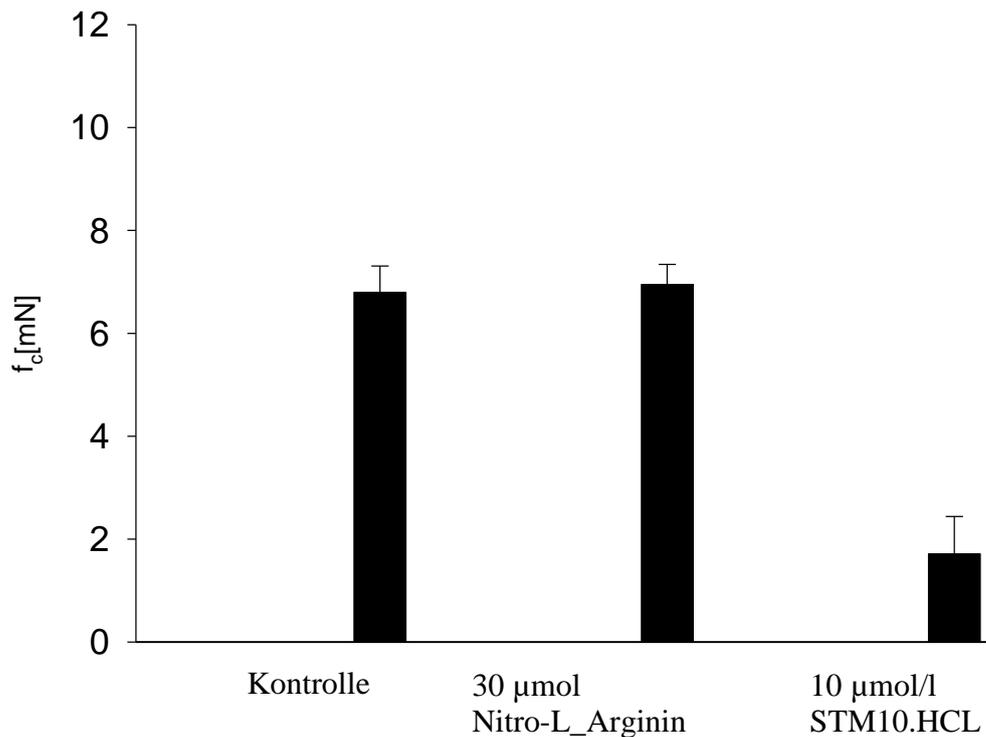
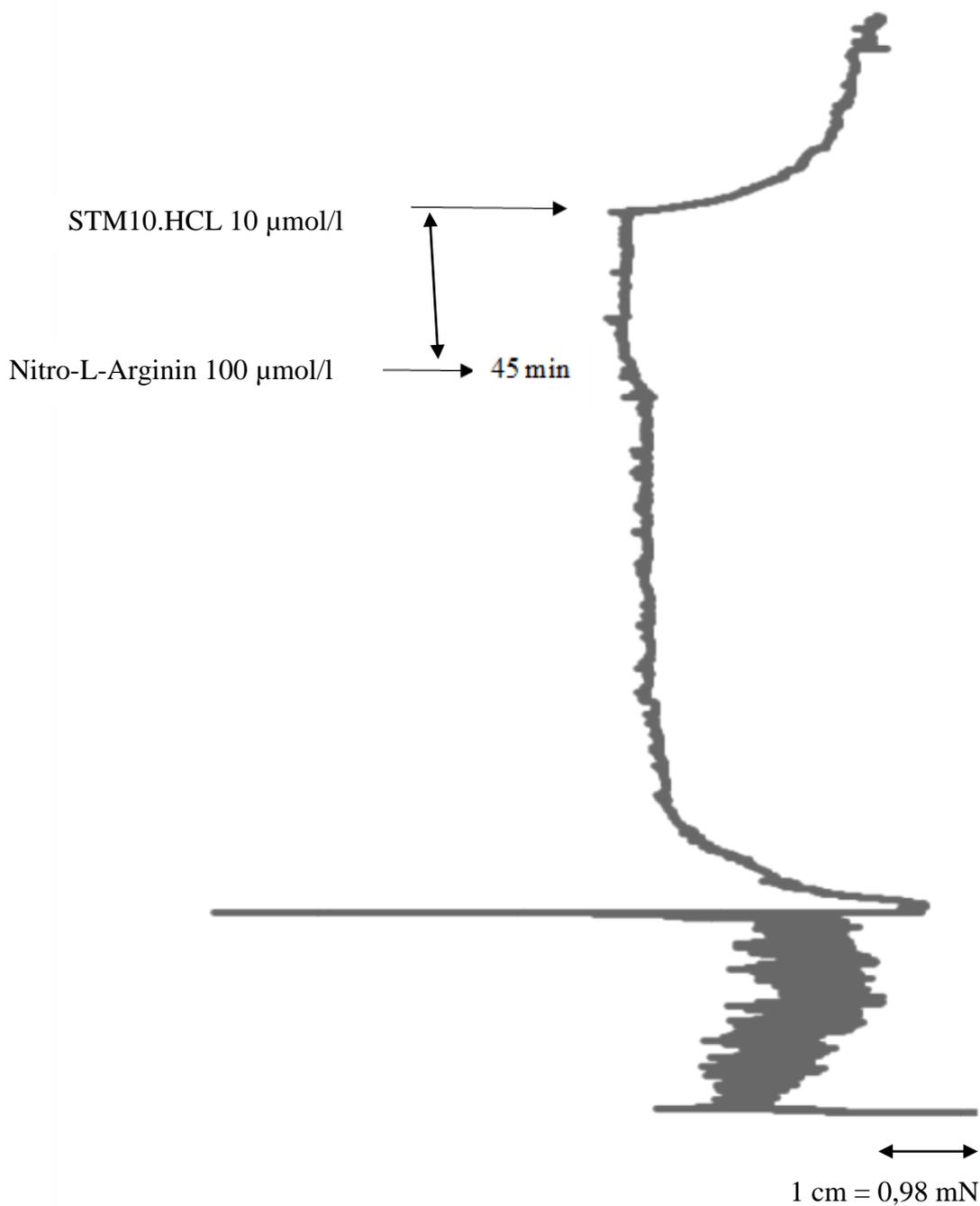


Diagramm x zeigt auf der x-Achse die Konzentrationen in μ mol/l, auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN.

Vergleicht man den Balken der Kontrolle mit dem Balken des Inhibitors, so ist ein leichter Anstieg der Kontraktionskraft durch Zugabe des Blockers erkennbar. Deutlich zu sehen ist der Abfall der Kontraktilität nach Zusatz der Testsubstanz.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung Wirkmechanismus 30 μ M Nitro-L-Arginin



Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugaben. Nachdem sich die Präparate auf den Kontrollwert eingependelt haben, kann man die Hemmung der NOS durch Zunahme der Kontraktion beobachten. Nach 45 min erfolgt die Zugabe von STM10.HCL. Die vasodilatierende Wirkung ist stark und tritt sofort nach Zusatz ein.

4.7. Wirkung von STM10.HCl nach Blockade mit Nitro-L-Arginin 100 µmol/l

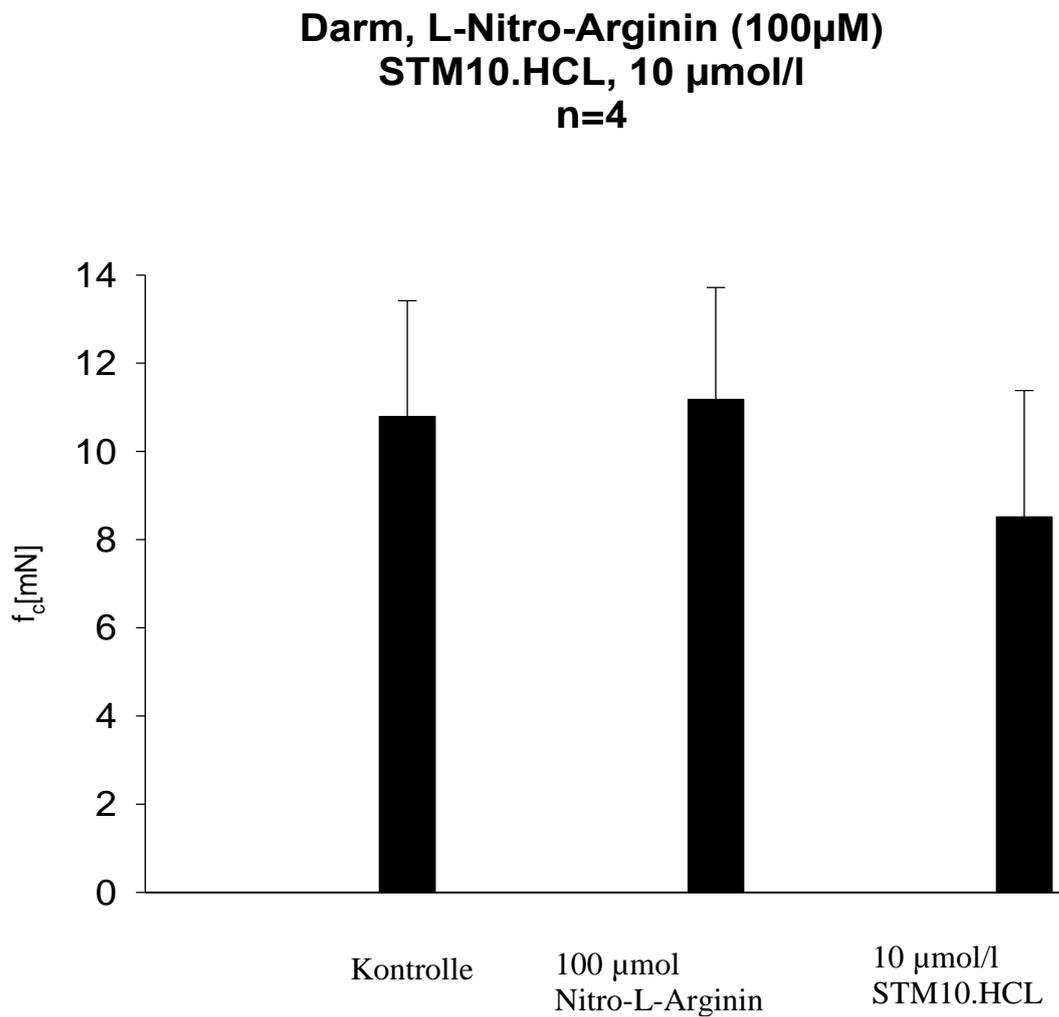
Der Kontrollwert in Tabelle 13 zeigt einen Wert von $10,79 \pm 5,25$ mN. Mit dem Einspritzen des Blockers geht eine Steigerung der Kontraktionskraft auf $11,18 \pm 5,07$ mN einher. Diese sinkt nach dem Zupipettieren von STM10.HCl auf $8,51 \pm 5,73$ mN.

Tabelle 13: Versuchsergebnisse mit 10 µM STM10.HCl am terminalen Ileum nach Blockade mit 100 µM Nitro-L-Arginin

Konzentration (µmol/l)	fc ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,79 \pm 5,25$	4	-
Nitro-L-Arginin 100 µmol/l	$11,18 \pm 5,07$	4	-
STM10.HCl 10 µmol/l	$8,51 \pm 5,73$	4	0,05

Die tabellarische Übersicht gibt das arithmetische Mittel in mN, den Mittelwert in % ausgedrückt, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P an.

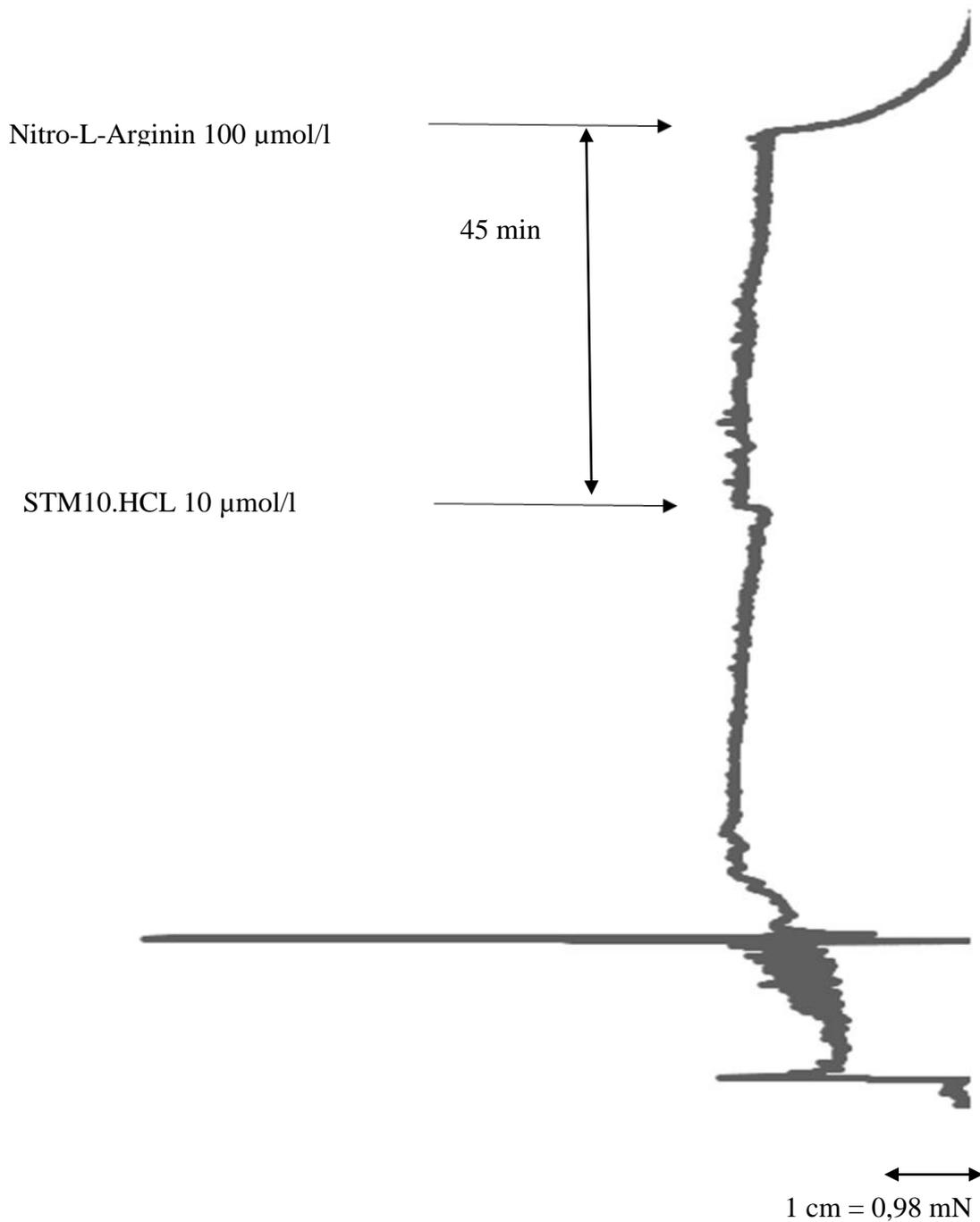
Abbildung 19: Balkendiagramm Wirkmechanismus 100 M Nitro-L-Arginin



Die tabellarische Übersicht gibt das arithmetische Mittel in mN, den Mittelwert in % ausgedrückt, die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P an.

Durch die Blockade der nNOS steigt der Tonus des Krummdarms leicht an, währenddessen eine deutliche Verminderung derselben nach Zugabe von 10 μ M STM10.HCL erreicht wird.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Kontraktionskurve von 10 μ M STM10.HCl nach Blockade mit 100 μ M Nitro-L-Arginin



Die Kontraktionskurve des Wirkmechanismus mit 100 μ mol/l zeigt den gleichen Verlauf, wie jene mit 30 μ mol/l des Inhibitors. Setzt man den Blocker zu, so wird die Kontraktilität marginal erhöht. Ein rascher und deutlicher Abfall des Muskeltonus wird durch die Gabe von STM10.HCl erreicht.

5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Diplomarbeit ist die Prüfung von STM10.HCl an Organen der glatten Muskulatur und an Herzpräparaten. An der Aorta und Pulmonalarterie wird die vasodilatierende Wirkung bestimmt. Am Krummdarm testet man die Substanz auf ihre spasmolytischen Eigenschaften. An den Herzmuskelpräparaten können die chronotropen (Vorhof) sowie inotropen (Papillarmuskel) Effekte der neu synthetisierten Substanz nachgewiesen werden. Kapitel 5 enthält die Vorschriften zur Versuchsdurchführung.

5.1. Effekte von STM10.HCl auf die glatte Muskulatur

An der Aorta descendens wurde nur eine geringe Wirkung der Substanz nachgewiesen und es konnte keine halbmaximale Wirkung gefunden werden. Die Pulmonalarterie und der Krummdarm reagierten auf die Substanzzugabe mit einer starken Vasodilatation sowie mit einer sehr ausgeprägten spasmolytischen Wirkung. Daher wurde das terminale Ileum als Präparat ausgewählt, um den Wirkmechanismus zu prüfen. Durch die durchgeführten Versuche, konnte ich feststellen, dass STM10.HCl leider keine selektive Wirkung auf die Organe des arteriellen Systems aufweist. Vielmehr konnte ich an allen glattmuskulären Präparaten Effekte nachweisen. Am geringsten waren die Wirkungen an den eigentlichen Zielorganen der Aorta descendens und an der Ateria pulmonalis.

Abbildung 21: Wirkung von STM10.HCl auf die glatte Muskulatur

Organ	STM10.HCl fc (%) \pm SEM bei 100 μ mol/l	EC ₅₀ (μ mol/l)
Aorta	-20,28 \pm 7,68	> 100
Ateria pulmonalis	-68,00 \pm 8,65	23,5
Terminales Ileum	-100,00 \pm 0,00	8,7

Die Abnahme der Kontraktionskraft in % bei einer Konzentration von 100 μ mol/l und die effektive Konzentration in μ mol/l der glattmuskulären Organe werden gezeigt.

5.1.1. Effekte auf die Aorta descendens

Es stellte sich heraus, dass die Aorta am schlechtesten auf die zu testende Substanz reagierte. Bei den Versuchen kam es zu einer geringen Vasodilatation mit knapp 20%. Des Weiteren konnte keine effektive Konzentration festgestellt werden. Der Originalverlauf der Kontraktionskurve des Organs, sowie die Dosis-Wirkungs-Kurve verlaufen flach und

annähernd gerade. STM10.HCl wurde mit dem Ziel synthetisiert, am arteriellen Gefäßsystem eine Vasodilatation hervorzurufen, um den Blutdruck zu senken.

Die arterielle Hypertonie, definiert als systolischer Blutdruck > 140 mm Hg und diastolischer Blutdruck > 90 mm Hg, ist die häufigste kardiovaskuläre Erkrankung weltweit (Lenz 2008).

5.1.2. Effekte auf die Ateria pulmonalis

STM10.HCl rief an der Pulmonalarterie eine starke Vasodilatation hervor. Die Abnahme der Kontraktionskraft erfolgte gestaffelt und ging mit dem Einspritzen der nächstgrößeren Konzentration einher. Dieser Effekt wurde mit zunehmender Dosis immer ausgeprägter. Bei einer Konzentration im Organbad von 30 $\mu\text{mol/l}$ wurde die EC_{50} von 23,5 $\mu\text{mol/l}$ überschritten. STM10.HCl liefert an der Pulmonalarterie ein gutes Ergebnis, was die Vasodilatation und die EC_{50} angeht. Die Vasodilatation ist ausgeprägt und steigt proportional mit der Dosiserhöhung an.

Seit 1980 ist bekannt, dass ein vom Endothel freigesetzter Faktor, der sog. EDRF („endothelium-derived vascular relaxant factor“), die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt (Diehm 1999).

Vergleicht man jedoch die Resultate der Pulmonalarterie mit denen der Aorta, so wirft sich die Frage auf, warum bei der Aorta selbst bei der Maximalkonzentration von 100 μM des Wirkstoffs, grademal eine Gefäßdilataion von 20% stattfindet. Diese Kontroverse lässt vermuten, dass STM10.HCl nicht nur über eNOS wirkt, sondern noch andere Mechanismen der Gefäßdilataion an der Wirkung beteiligt sind.

5.1.3. Effekte auf das terminale Ileum

Die kleinste EC_{50} und somit die größte Wirkung an glattemuskulären Präparaten konnte am Krummdarm festgestellt werden. Die halbmaximale Wirkung wurde bereits bei einer Konzentration im Organbad von 8,7 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Die Spasmolyse tritt bereits bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ ein und dabei wird eine Reduktion der Kontraktionskraft um bereits $-14,60 \pm 3,88 \%$ erreicht. Mit der Dosiserhöhung auf 10 $\mu\text{mol/l}$ wird die EC_{50} schon sehr schnell überschritten. Die Kontraktionskraft nimmt mit Erhöhung der Wirkstoffkonzentration ab. Dies ist im Originalverlauf der Kontraktionskurve als eine gestaffelte Abnahme der Kurve ersichtlich. Bei der finalen Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ verliert das Organ seine Kontraktionsfähigkeit und es kommt zur vollständigen

Spasmolyse. Da die EC_{50} am Krummdarm sehr klein ist, werden in vivo wahrscheinlich am Darm Effekte hervorgerufen, bevor sie noch an der Pulmonalarterie zu erkennen sind. Diese Wirkungen müssen daher als Nebenwirkungen angesehen werden, denn STM10.HCl soll seine Wirkung selektiv am Gefäßsystem zeigen.

5.1.4. Effekte auf das terminale Ileum in Gegenwart von Nitro-L-Arginin

Wie in den Punkten 8.6 und 8.7 ersichtlich, nimmt die Kontraktionskraft am terminalen Ileum auch ab, wenn man die Stickstoffmonoxid-Synthase vor der Zugabe von STM10.HCl blockiert. Dieses Ergebnis liefert den Nachweis, dass STM10.HCl einerseits spasmolytisch wirkt und andererseits dies auch tut, wenn die Bildung von NO selektiv blockiert ist.

Der spasmolytische Effekt durch STM10.HCl nach der Blockade der NOS mit 30 $\mu\text{mol/l}$ des Inhibitors ist deutlich ausgeprägter als die spasmolytische Wirkung des Wirkstoffes nach einer Blockade mit 100 $\mu\text{mol/l}$ von Nitro-L-Arginin.

Daher ziehe ich die Konsequenz, dass die NOS durch den Zusatz von 30 μM Nitro-L-Arginin nicht vollständig gehemmt wird, sodass STM10.HCl die Bildung von NO noch weiter forcieren kann. Gibt man dem Organbad die höhere Konzentration des Inhibitors zu, wird zwar eine Spasmolyse erreicht, jedoch ist dieser Effekt kleiner.

Da der Darmtonus bei einer erhöhten Inhibitorkonzentration weniger stark durch STM10.HCl abnimmt, vermittelt STM10.HCl seine spasmolytische und vasodilatierende Wirkung vermutlich noch über andere Mechanismen der Gefäßtonusregulation.

Diese Annahme wird durch die kontroversen Ergebnisse der Untersuchungen der Ateria pulmonalis und der Aorta descendens verstärkt. Bei beiden Organen handelt es sich um glatte Muskulatur, in der die eNOS vorkommt.

Währenddessen die gefäßerweiternde Wirkung auf die Aorta jedoch nur ca. bei 20% der liegt, kommt es an der Pulmonalarterie zu einer dreifach höheren Vasodilatation von fast 75%. Die EC_{50} der Aorta konnte in meinen Versuchsreihen nicht bestimmt werden, währenddessen die EC_{50} der Pulmonalarterie bei 23,5 $\mu\text{mol/l}$ liegt.

Da diese Resultate stark voneinander abweichen, ist es unwahrscheinlich, dass die Effekte allein über die Bildung von NO hervorgerufen werden. Auch das terminale Ileum besitzt eine Stickstoffmonoxid-Synthase, die nNOS.

Im enterischen Nervensystem findet die NO-Produktion vor allem in nichtadrenergen, nichtcholingergen inhibitorischen Neuronen statt und stellt den wichtigsten, den glatte Muskulatur relaxierenden Neurotransmitter dar (Riemann 2008).

Zur endgültigen Aufklärung des Wirkmechanismus müssen deshalb weitere Prüfungen im Rahmen neuer Diplomarbeiten angestrebt werden.

5.2. Effekte von STM10.HCl auf das Herz

In meiner Arbeit führte ich Versuche an isolierten Organen des Herzens durch. Zum einen machte ich Untersuchungen am Vorhof, um die chronotropen Eigenschaften der Substanz STM10.HCl zu testen. Zum anderen habe ich die Substanz an Papillarmuskelpräparaten untersucht. STM10.HCl löste bei beiden Organen einen deutlichen Effekt aus. Am Vorhof konnte eine überaus starke Abnahme der Herzfrequenz nachgewiesen werden, und auch an der quergestreiften Muskulatur des Papillarmuskels war eine signifikante Reduktion der Kontraktionskraft feststellbar. Die EC₅₀ beider Präparate liegt nahe beieinander, wobei die halbmaximale Konzentration am Papillarmuskel mit 4,96 µmol/l schneller als am Atrium dextrum erreicht wird.

Abbildung 22: Wirkung von STM10.HCl auf das Herz

Organ	STM10.HCl fc (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Atrium dextrum	-100,00 ± 0,00	5,5
Musculus papillaris	-68,00 ± 8,65	4,96

Die Abnahme der Kontraktionskraft in % bei einer Konzentration von 100 µmol/l und die effektive Konzentration in µmol/l der glattmuskulären Organe werden gezeigt.

5.2.1. Effekte auf den rechten Vorhof

Bei den Versuchsreihen mit dem rechten Vorhof wurde eine außerordentlich hohe negativ chronotrope Wirkung von STM10.HCl festgestellt. Dies konnte man anhand der Abnahme der Sinusfrequenz und auch an der Reduktion der Amplitudenhöhe eruieren. Mit 5,5 µmol/l hat dieser Wirkstoff eine sehr kleine EC₅₀, was eine sehr geringe therapeutische Breite mit sich bringt. Eine EC₅₀ von 30 µmol/l gilt in meinen Versuchsreihen als optimaler Zielwert. Die Chronotropie war schon deutlich nach der Zugabe der ersten Konzentration von 3 µmol/l zu erkennen, und die Herzfrequenz nahm bei einer Konzentration von 10 µmol/l im Organbad

gar um $-83,53 \pm 16,47\%$ ab. Eine weitere Erhöhung der Wirkstoffkonzentration auf $30 \mu\text{mol/l}$ wurde von keinem vermessenen Vorhofpräparat toleriert. Vielmehr kam es innerhalb weniger Minuten nach dem Zusetzen der Substanz in dieser Konzentration, zum Erliegen des Sinusrhythmus. Eine ausgeprägte negativ chronotrope Wirkung von STM10.HCl auf das Schrittmachersystem des Herzens ist das Resultat meiner Untersuchungen. Da der Wirkstoff eine so prägnante und starke Wirkung am Vorhof ausübt, schätze ich die Chancen für die Weiterentwicklung dieses Wirkstoffkandidaten als gering ein.

5.2.2. Effekte auf den Papillarmuskel

Die Kontraktionskraft wird in einem hohen Maß von STM10.HCl beeinflusst. Es zeigte sich in den von mir durchgeführten Versuchsreihen ein stark negativ inotroper Effekt. Wie bei den Präparaten von Ateria pulmonalis, terminalem Ileum und auch Atrium cordis dextrum wird schon bei der geringsten Konzentration ein Effekt sichtbar. Dieser steigt proportional mit der Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Organbad an. Wieder kam ich bei meinen Untersuchungen zum Resultat, dass der Wirkstoff mit einer EC_{50} von $4,96 \mu\text{mol/l}$ eine sehr geringe therapeutische Breite aufweisen muss und schon bei kleinen Konzentrationen Nebenwirkungen am Herzen auftreten können. Des Weiteren war der negativ inotrope Effekt so stark, dass bei dem Zusatz von einer Wirkstoffkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ der Tonus der quergestreiften Muskulatur völlig zum Erliegen kam. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit dem rechten Vorhof und dem Krummdarm. Da der Papillarmuskeltonus gänzlich blockiert wird, werde ich in meiner Einschätzung bestärkt, dass STM10.HCl ohne Veränderung seiner chemischen Struktur, keinen Weg in die Entwicklung eines neuen Arzneistoffes finden wird, da das Risiko von schweren Nebenwirkungen zu hoch ist.

6. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit werden die Wirkungen einer neu synthetisierten Substanz STM10.HCl auf glattmuskuläre Organe wie Aorta descendens, Ateria pulmonalis und terminales Ileum sowie auf Organe des Herzens wie Atrium cordis dextrum und Musculus papillaris untersucht. Die Versuche sollen Kenntnis darüber bringen welche Wirkungen STM10.HCl aufweist. Die Substanz hat das Ziel am glattmuskulären Gefäßsystem anzugreifen. An diesen Organen (Aorta descendens, Ateria pulmonalis) soll eine Gefäßdilatation, vermittelt durch STM10.HCl stattfinden. Dieser Effekt könnte therapeutisch zur Blutdrucksenkung ausgenutzt werden und somit bei Hypertonie eingesetzt werden. Des Weiteren testet man die spasmolytische Wirkung Wirkstoffs am Krummdarm. Ein wichtiges Element meiner Arbeit ist der Nachweis ob sich die Substanz auf die Herzfrequenz und die Kontraktionskraft des Herzens auswirkt. Am Vorhof soll festgestellt werden, ob die Frequenz nach Substanzgabe, zu- oder abnimmt. An den Papillarmuskelpräparaten gewinnt man die Information, ob die Kontraktionskraft nach STM10.HCl-Zusatz erhöht oder erniedrigt wird.

Der Versuchsablauf beginnt jeden Morgen mit der Organentnahme an Meerschweinchen. Sogleich werden die noch lebenden Organe in eine Nährlösung eingebracht und mit speziellen Apparaturen kann die Chronotropie, Inotropie, Vasodilatation und Spasmolyse vermessen werden. Um aussagekräftige Resultate zu erhalten wartet man bis sich die Organe im Organbad angewöhnt haben. Damit reproduzierbare Daten erhalten werden, legt man an jedem Organ eine definierte Vorspannung an. Hernach gibt man STM10.HCl zum Organbad. Dazu wird die Substanz in Wasser gelöst und in vier ansteigenden Konzentrationen in definierten Zeitabständen zugesetzt. Wenn ein Effekt am Organ entsteht, weil der Wirkstoff angreift, so wird das mechanische Signal des Organs über einen Kraftwandler zu einem Verstärker und schlussendlich zu einem Schreiber geleitet. Man zeichnet die Originalverläufe der Kontraktionskurven der Präparate auf. Diese können im Anschluss ausgewertet werden.

STM10.HCl hat an allen Organen eine Wirkung gezeigt. An dem Hauptziel der Aorta konnte jedoch nur ein geringer Effekt und leider keine EC_{50} nachgewiesen werden. Alle anderen geprüften Organe zeigten deutliche Wirkungen und die halbmaximalen Konzentrationen konnten mittels Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt werden.

Den stärksten Effekt hat STM10.HCl auf den rechten Vorhof und somit das Erregungsbildungssystem des Herzens. Eine sehr kleine EC_{50} von $5,5 \mu\text{mol/l}$ lässt auf eine geringe therapeutische Breite schließen. Auch brachten die Ergebnisse zum Vorschein, dass die Testsubstanz derart negativ chronotrop wirkt, dass es zum Erliegen des Sinusrhythmus kommt. Fast ident sind die Ergebnisse, die die Untersuchungen am Papillarmuskel hervorbringen: eine sehr ausgeprägte negativ inotrope Wirkung, gepaart mit der kleinsten EC_{50} von $4,96 \mu\text{mol/l}$ und der vollständige Verlust der Vitalfunktion mit steigenden Konzentrationen von STM10.HCl. Leider sind diese ausgeprägten Wirkungen am Herzen unerwünscht, denn daraus können sich letale Nebenwirkungen ergeben.

Ähnliche Daten liefern die Aufzeichnungen zum terminalen Ileum. Hier konnte eine signifikante und ausgeprägte Spasmolyse nachgewiesen werden, wobei die EC_{50} wieder unter $10 \mu\text{mol/l}$ liegt. Ebenso wie beim Vorhof und beim Papillarmuskel lähmte STM10.HCl in höheren Konzentrationen auch am Krummdarm die Kontraktion vollständig, sodass die Gefahr einer Darmatonie gegeben ist.

Am terminalen Ileum wurde auch bestimmt, ob die Testsubstanz ihre Wirkungen über die Stickstoffmonoxid-Synthase vermittelt. Dazu wurde zu den konstanten Organen im Organbad zuerst ein spezifischer Inhibitor der NOS zugesetzt. Nach Einstellung des Fließgleichgewichtes setzte man $10 \mu\text{mol/l}$ STM10.HCl zu. Da es auch in diesem Fall zu einer Vasodilatation gekommen ist, postuliere ich die Beteiligung der eNOS und weiteren zellulären Mechanismen der Vasodilatation an der Relaxation der Gefäßmuskulatur.

Eine mittlere EC_{50} von $23,5 \mu\text{mol/l}$ erhielt ich in den Versuchen an der Pulmonalarterie. Es kam durch Zusatz von höheren Konzentrationen, jeweils zu einem Abfall der Kontraktionskraft. Bis zur geprüften Maximalkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ des Wirkstoffes kam es zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Vitalität der Ateria pulmonalis.

Leider erreicht die Substanz an den Aortenpräparaten nur einen geringen dilatierenden Effekt von ca. 20%. Somit kann keine EC_{50} festgestellt werden. Dies ist ein Rückschlag, da die Aorta der Hauptangriffspunkt von STM10.HCl sein soll und die oben beschriebenen Wirkungen daher als Nebenwirkungen angesehen werden müssen.

7. Literaturverzeichnis

Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (2004) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, 9. Auflage

Diehm, Allenberg., Nimura-Eckert (1999) Farbatlas der Gefäßkrankheiten, Kartonierte Sonderausgabe, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Efferth Thomas (2006) Molekulare Pharmakologie und Toxikologie, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Europäische Gesellschaft für Kardiologie (2013), Deutsche Hochdruckliga (2008) Antihypertensive Therapiegrundlagen nach Karow (2015)

Ganten, Ruckpaul (2006) Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Gekle, Wischmeyer, Gründer, Petersen, Schwab (2010) Taschenlehrbuch Physiologie, Georg Thieme Verlag

Greiling, Neumann (1992) Pathobiochemie, Molekularbiologie und moderne Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen, Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie Merck-Symposium 1992, Springer Verlag

Karow, Lang-Roth (2015) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 23. Auflage

Lenz (2008) Hypertonie in Klinik und Praxis, Schattauer GmbH

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel, Arzneimittelforschung 17: 1249-1253

Riemann Jürgen F, Fischbach, Galle R, Mössner (2008) Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 1, Georg Thieme Verlag KG

Staessen JA, Wang JG, Thijs L (2003) Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003, J Hypertens 21:1055-1076

Thews, Mutschler, Vaupel (1999) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage