



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Neue H₂S-Donatoren (SWS 60 HCl, SWS 51 HCl) und ihre Wirkung auf isolierte Organe

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Dipl. Ing. (FH) Christina Kern
Matrikelnummer:	0601102
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, im September 2010

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer, Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik, bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, meine Diplomarbeit in seinem Labor zu verfassen. Es herrscht dort eine sehr familiäre Atmosphäre und auch bei Problemen war immer jemand zur Stelle.

Weiters möchte ich Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Testsubstanzen danken. Hier gilt ein besonderer Dank Mario Gabriel, der die beiden Substanzen für diese Diplomarbeit synthetisiert hat und auch im Labor jedem und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen bedanken, die mit mir gemeinsam im Labor an ihrer Diplomarbeit gebastelt haben, vor allem bei Marlene, die uns oft den Tag mit ihren guten Mehlspeisen versüßt hat! Auch über alle Freunde, die ich während der Studienzeit kennen gelernt habe, freue ich mich sehr und hoffe, dass so viele Kontakte wie möglich erhalten bleiben.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und bei meinem Freund bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert haben, dieses „Zweitstudium“ auch wirklich in Angriff zu nehmen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Testsubstanzen.....	8
3.1.1	SWS 60 HCl	8
3.1.2	SWS 51 HCl	8
3.1.3	Herstellung der Testlösung.....	9
3.2	Versuchstiere	10
3.3	Physiologische Elektrolytlösung	11
3.3.1	Kaliumchlorid-Lösung für Darm, Aorta und Pulmonalarterie	12
3.4	Organentnahme und Präparierung	12
3.4.1	Entnahme der Organe	12
3.4.2	Präparierung der Organe.....	13
3.4.2.1	Präparierung des rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter)....	14
3.4.2.2	Präparierung der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	15
3.4.2.3	Präparierung der Papillarmuskel (Musculus papillaris)	15
3.4.2.4	Präparierung des Dünndarms (Terminales Ileum).....	15
3.4.2.5	Präparierung der Aorta (Aorta descendens)	16
3.5	Versuchsaufbau und Apparatur	17
3.5.1	Apparatur I.....	18
3.5.2	Apparatur II	19
3.5.3	Der Kraftwandler.....	21
3.5.4	Gasversorgung	22
3.6	Durchführung der Versuche	23
3.6.1	Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane.....	23
3.6.1.1	Wirkung der Substanzen auf den rechten Vorhof	23
3.6.1.2	Wirkung der Substanzen auf den Papillarmuskel.....	24
3.6.1.3	Wirkung der Substanzen auf den Darm.....	25
3.6.1.4	Wirkung der Substanzen auf die Aorta	26
3.6.1.5	Wirkung der Substanzen auf die Lungenarterie	26
3.6.2	Untersuchung der Abspaltung von H ₂ S bei SWS 51 HCl.....	27
3.7	Substanz zur Untersuchung der H ₂ S Abspaltung	27

3.7.1	Acetylcholinesterase gewonnen aus <i>Electrophorus electricus</i>	27
3.8	Auswertung der Daten und Statistik	28
3.8.1	Atrium dexter	28
3.8.2	Musculus papillaris	28
3.8.3	Aorta, Arteria Pulmonalis und Terminales Ileum	28
3.8.4	Statistik	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Ergebnisse der Testsubstanz SWS 60 HCl	30
4.1.1	Atrium cordis dexter	30
4.1.2	Musculus papillaris	33
4.1.3	Aorta descendens	36
4.1.4	Arteria pulmonalis	39
4.1.5	Terminales Ileum	42
4.2	Ergebnisse der Testsubstanz SWS 51 HCl	45
4.2.1	Atrium cordis dexter	45
4.2.2	Musculus papillaris	48
4.2.3	Aorta descendens	51
4.2.4	Arteria pulmonalis	54
4.2.5	Terminales Ileum	57
4.3	Analyse des Wirkmechanismus von SWS 51 HCl auf die Aorta	60
5	Diskussion	61
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Lebenslauf	72

1 EINLEITUNG

Schwefelwasserstoff, auch als H_2S bezeichnet, ist ein farbloses, brennbares, wasserlösliches Gas mit einem charakteristischen Geruch nach verfaulten Eiern (Wang, 2002).

Dieser Geruch entsteht einerseits bei der Zersetzung von schwefelhaltigen Aminosäuren und andererseits bei der Reaktion von Säuren mit Schwermetallsulfiden. Der stechende Geruch von H_2S wird vom Menschen nur wahrgenommen, wenn das Gas in sehr geringen Konzentrationen vorliegt. Es kommt relativ schnell zu einem Gewöhnungseffekt und in höheren Konzentrationen wird Schwefelwasserstoff überhaupt nicht mehr bemerkt, da es zu einer Blockade der Geruchsrezeptoren kommt. Bei einer akuten H_2S -Intoxikation sind in erster Linie das zentrale Nervensystem und der Atemtrakt betroffen. Nach der Aufnahme geringer Mengen des Gases kommt es zu Hyperpnoe, Schwäche und Krämpfen. Wurden höhere Dosen inhaliert, treten Bewusstseinsverlust und zentrale Atemlähmung auf (Forth et. al., 2009).

Eine akute Vergiftung wird vor allem symptomatisch therapiert, wichtig dabei ist eine gezielte Beatmung. Sollte das zu keinem Erfolg führen, kann eventuell auch 4-DMAP (Diethylaminophenol) angewendet werden ohne anschließende Natriumthiosulfat Gabe (Oberdisse et.al., 2001).

Der exakte Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass H_2S in hohen Konzentrationen Enzyme durch Sulfid- oder Disulfidbildung blockieren kann. Im Laufe der Stoffwechselvorgänge entsteht das Hydrogensulfid-Anion durch Deprotonierung von H_2S . Dieses Anion blockiert das III-wertige Eisen der Cytochromoxidase und auch die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler und Schmidt, 2007).

Über viele Jahrzehnte wurde H_2S in erster Linie als giftiges Gas und Umweltschadstoff wahrgenommen, bis man erkannte, dass es auch endogen in Säugetieren, darunter dem Menschen, produziert wird und in ganz beträchtlichen Mengen detektiert werden kann (Fiorucci et. al., 2006, Kamoun, 2004). Heute wird H_2S daher als wichtiges Signalmolekül im kardiovaskulären System und im Nervensystem anerkannt.

H₂S wird endogen in verschiedenen Geweben von zwei Pyridoxal-5'-Phosphat abhängigen Enzymen, die verantwortlich sind für den Cystein-Metabolismus, synthetisiert. Diese sind Cystathionin-β-Synthase (CBS) und Cystathionin-γ-Lyase (CSE). Das Substrat für CBS und CSE ist Cystein, das sowohl über die Nahrung aufgenommen, als auch aus endogenen Proteinen frei gesetzt werden kann. Diese beiden Enzyme besitzen ein Organ-spezifisches Expressionsmuster, das heißt sie sind in bestimmten Regionen vermehrt zu finden. CBS ist das vorherrschende H₂S-produzierende Enzym in Gehirn und Nervensystem, es wird auch in Leber und Niere sehr stark exprimiert. CSE findet man vor allem in der Leber und in vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskelzellen (Szabo, 2007). Die Aktivität von CBS kann direkt durch Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) inhibiert werden (Puranik et. al., 2006). Über CSE ist weniger bekannt, es wurde jedoch gefunden, dass Endotoxine die Aktivität steigern (Ishii et.al, 2004).

Schwefelwasserstoff wird in mikromolaren Konzentrationen (10-100µM) im Gewebe produziert und übt eine große Zahl wichtiger zytoprotektiver Effekte auf das kardiovaskuläre System aus (Lefer, 2007). Als Gas penetriert H₂S sehr schnell Zellmembranen ohne einen spezifischen Transporter zu benötigen.

H₂S führt zu Vasodilatation, es entspannt auch isolierte Blutgefäße, und in weiterer Folge verringert sich dadurch der Blutdruck (Pryor et. al., 2006, Elrod et.al., 2007). Das Gas verhindert Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Zarnado et. al., 2006). H₂S ist weiters ein wichtiges antiinflammatorisches Molekül, es besitzt starke antioxidative Eigenschaften und kann die Apoptose von verschiedenen Zelltypen hemmen (Kimura und Kimura, 2004). Schwefelwasserstoff besitzt auch metabolische Effekte (Blackstone et. al., 2005) und es beeinflusst die Funktion der Mitochondrien (Elrod et. al., 2007).

All diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass H₂S als ebenso wichtiges Signalmolekül wie Stichstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) angesehen wird und seine Rolle in der kardiovaskulären Regulation von vielen Forschungsgruppen untersucht wird (Wang, 2002). Lefer beschreibt H₂S sogar als Molekül, das scheinbar alle positiven Eigenschaften von NO besitzt, aber ohne die Fähigkeit, toxische Metabolite zu bilden (Lefer, 2007). Diese toxischen Effekte von NO sind dadurch

bedingt, dass NO ein hoch reaktives Molekül ist. Es interagiert leicht mit Superoxid und dadurch kommt es zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) (Elrod et. al., 2006).

Interessanterweise beruht auch der gefäßprotektive und blutdrucksenkende Effekt von Knoblauch (*Allium sativum*) auf der Bildung von H_2S . Die organischen Polysulfide aus dem Knoblauch werden mithilfe roter Blutkörperchen in Schwefelwasserstoff umgewandelt. Das so entstandene H_2S ist ein potenter Vasodilatator, wobei die Entspannung der vaskulären glatten Muskelzellen auf eine K_{ATP} -Kanal vermittelte Hyperpolarisation zurückzuführen ist (Benavides et. al., 2007).

Zhao et. al. berichteten zum ersten Mal über eine mögliche Beteiligung des K_{ATP} -Kanals am Wirkmechanismus von H_2S . Sie zeigten auch, dass die kardioprotektiven Effekte durch eine Vorbehandlung mit K_{ATP} -Kanal Blockern wie Glibenclamid verhindert werden (Zhao et. al., 2001).

Weitere Studien an Aortenringen von Ratten stellen aber K_{ATP} -Kanäle als einzige Angriffspunkte von H_2S in Frage. Neben der Beteiligung von Kaliumkanälen und der glatten Gefäßmuskulatur scheinen auch NO- und CO-bezogene Faktoren eine wichtige Rolle bei den physiologischen Wirkmechanismen zu spielen (Kubo et. al., 2007). Eine weitere Studie impliziert, dass H_2S seine blutdruckregulierenden Eigenschaften über Interaktionen mit dem NO-System ausübt (Ali et. al., 2006). Wang et. al. bestätigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen NO und H_2S bei der Relaxation von pulmonalen Rattenaorten (Wang et. al., 2008).

Der vaskuläre Effekt von H_2S hängt sehr stark von der umgebenden Sauerstoffkonzentration ab. In gut begasten Versuchsanordnungen mit Aortenringen von Ratten, wo die Sauerstoffversorgung ausgesprochen intensiv war, wirkt H_2S als schneller Vasokonstriktor (Koenitzer et. al., 2007). Auch intrazelluläre pH-Wert Änderungen sind ein wichtiger Parameter und stehen in Zusammenhang mit der Gefäßrelaxation (Lee et. al., 2007).

Die direkte Injektion von H_2S -Donatoren in tierisches Gewebe führt zu einer vorübergehenden Blutdrucksenkung (Wang, 2002, Zhao et. al., 2001).

Huang et. al. zeigten, dass die Gabe von Natriumhydrogensulfid (NaHS), ein H₂S-Donator, bei einer biochemisch künstlich hervorgerufene pulmonale Hypertonie zu einer Besserung der Symptome führt (Huang et. al., 2008).

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH), eine besondere Unterform der pulmonalen Hypertonie, zählt zu den Orphan Diseases. Sie ist durch einen mittleren pulmonalarteriellen Blutdruck von > 25 mmHg in Ruhe oder > 30 mmHg unter Belastung gekennzeichnet. Die Krankheitsauslöser sind nach wie vor unbekannt. Pathophysiologisch gesehen kommt es zur Proliferation von Endothel und glatten Muskelzellen, vasokonstriktorisches Faktoren dominieren und die Thrombogenität ist erhöht. All diese Effekte führen zu einer Verringerung des Gefäßlumens, das wiederum resultiert in einer Druckerhöhung im kleinen Kreislauf, einer Erhöhung der Nachlast im rechten Ventrikel und endet schließlich in einem Rechtsherzversagen (Mutschler et. al., 2008).

PAH ist eine schwerwiegende Erkrankung mit einer sehr schlechten Prognose, 5 Jahre überleben nur 30-50% der Patienten. Die einzige Chance auf Heilung besteht in einer Transplantation (Mutschler et. al., 2008).

Die Pharmakotherapie von PAH zielt darauf ab, das Lumen der pulmonalen Gefäße durch Vasodilatoren zu vergrößern und somit den Blutfluss zu verbessern. Daher wäre eine Therapie mit H₂S-freisetzenden Substanzen eine mögliche neue Behandlungsoption. Zurzeit stehen nämlich für die Therapie einer PAH nur folgende Möglichkeiten mit eingeschränkter Erfolgsquote zur Verfügung (Mutschler et. al., 2008):

- Iloprost, ein Prostacyclinderivat
- Bosentan, ein Endothelinantagonist
- PDE₅-Hemmer wie Sildenafil

H₂S-freisetzende Substanzen wären natürlich auch zur Therapie der essentiellen Hypertonie einsetzbar, die natürlich weit häufiger zu finden ist als die pulmonale Hypertonie.

Laut WHO Definition gilt der Blutdruck als normal bis zu einem Wert von 130/85 mmHg, ab 140/90 mmHg spricht man von einer Hypertonie. Der dazwischen liegende Bereich wird als normal hoch bezeichnet. Ca. 95% der Betroffenen leiden an der sogenannten essentiellen oder primären Hypertonie. Hier sind die Ursachen für die Erkrankung unbekannt, es wird aber ein Zusammenspiel mehrerer genetischer Faktoren und Umweltfaktoren angenommen. Bei den restlichen 5%, die an der sekundären Hypertonie leiden, werden die Ursachen, die meist renaler oder endokriner Art sind, direkt behandelt (Forth et. al., 2009).

Bei einer milden bis moderaten Hypertonie steht eine Änderung der Lebensgewohnheiten an erster Stelle. Oft greifen die folgenden Maßnahmen so gut, dass von einer Pharmakotherapie abgesehen werden kann. Dazu zählen:

- Gewichtsreduktion
- Rauchstopp
- Alkoholkonsum einschränken
- Kochsalzarme Ernährung
- Fettarme Ernährung
- Stressbewältigung

Führen diese Faktoren zu keinem Erfolg, ist man gezwungen, auf die konventionelle Pharmakotherapie zurückzugreifen. Dazu werden generell fünf verschiedene Substanzklassen eingesetzt:

- ACE-Hemmer
- β -Blocker
- Diuretika
- Kalziumantagonisten
- AT₁-Rezeptorblocker

Aus aktuellen Studien ist ersichtlich, dass zu Beginn einer Hypertonie Behandlung eine niedrig dosierte Kombinationstherapie aus β -Blocker mit Diuretikum oder ACE-Hemmer mit Diuretikum betreffend Wirksamkeit und Nebenwirkungen einer Monotherapie gleichwertig ist. Wenn der gewünschte Effekt mit der Monosubstanz nicht mehr erzielt werden kann, sollte so schnell wie möglich eine Kombinationstherapie aus zwei bis drei Substanzen angestrebt werden. So wird nicht nur der therapeutische Erfolg erhöht, sondern auch die unerwünschten Nebenwirkungen durch die geringere Dosis der jeweiligen Kombinationspartner limitiert (Forth et. al., 2009).

2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die potentiellen Wirkungen der neu synthetisierten Schwefelwasserstoff oder Carbonylsulfid freisetzenden Verbindungen SWS 60 HCl und SWS 51 HCl an bestimmten isolierten Organen von Meerschweinchen aufzudecken.

Um einen möglichen Effekt an der glatten Muskulatur zu eruieren, werden Präparate von Aorta, Lungenarterie und Dünndarm vorbereitet, und mit den beiden Testsubstanzen in Kontakt gebracht.

Eine Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens ist in diesem Fall nicht erwünscht, daher soll durch Testung der beiden Substanzen am rechten Vorhof und am Papillarmuskel eine Änderung in Chronotropie bzw. Inotropie ausgeschlossen werden.

Sollte an einem der isolierten Organe eine signifikante Wirkung durch die neu synthetisierten Testsubstanzen SWS 60 HCl oder SWS 51 HCl auftreten, so wird in weiterer Folge auch der beteiligte Wirkmechanismus aufgeklärt. Eine Wirkung liegt dann vor, wenn ein EC_{50} von unter 30 $\mu\text{mol/l}$ vorhanden ist. Sollte keine Wirkung gefunden werden, wird mithilfe des Enzyms Acetylcholinesterase untersucht, ob dieses Enzym eine Abspaltung von H_2S bzw. COS hervorrufen kann und es somit zu einer Wirkung kommt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 TESTSUBSTANZEN

Die Testsubstanzen, mit denen die folgenden Versuchsreihen durchgeführt wurden, stammen von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien.

3.1.1 SWS 60 HCl

Die erste Substanz die getestet wurde ist SWS 60 HCl. Das Molekulargewicht beträgt 190,63 g/mol und der systematische Name lautet 2-[[[(1-Imidazolyl) carbonyl] oxy] propan-hydrochlorid.

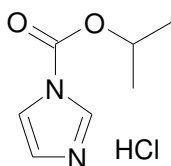


Abbildung. 3.1: Strukturformel von SWS 60 HCl

3.1.2 SWS 51 HCl

Die zweite Substanz die getestet wurde ist SWS 51 HCl. Das Molekulargewicht beträgt 229,73 g/mol und der systematische Name lautet Imidazol-1-yl-piperidin-1-yl-methanthion-hydrochlorid.

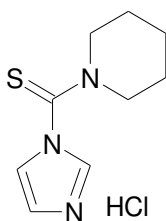


Abbildung. 3.2: Strukturformel von SWS 51 HCl

3.1.3 Herstellung der Testlösung

Die Testlösung der Schwefelwasserstoff bzw. Carbonylsulfid freisetzenden Verbindungen wurde jeden Tag frisch bereitet und zwar durch Lösen der entsprechenden Substanzmenge in Wasser. Pro Versuch wurden 100µl Testlösung benötigt. Die Einwaage der Substanz richtete sich nach dem Fassungsvermögen des Organbades. In Tabelle 3.1 ist die Berechnung der Einwaage zusammengefasst:

Tabelle. 3.1: Berechnung für die Einwaage der Testsubstanz

Testsubstanz	Volumen Organbad [ml]	Molekulargewicht Testsubstanz [g/mol]	Einwaage Testsubstanz [mg]
SWS 60 HCl	8	190,63	0,15
	25		0,47
SWS 51 HCl	8	229,73	0,18
	25		0,57

Die Substanzzugabe erfolgte - nach einer Kontrollphase von mindestens 45 Minuten - alle 45 Minuten nach einem kumulativen Schema, bis mit der letzten Substanzzugabe eine Konzentration von 100µmol/l im Organbad erreicht war. Die Intervalle von 45 Minuten sollen eine steady-state Einstellung im Organbad gewährleisten, was übertragen auf den menschlichen Körper eine konstante Plasmaspiegelkonzentration bedeuten soll. Bei der Substanzzugabe wurde nach folgendem Pipettiermuster vorgegangen:

Tabelle. 3.2: Pipettierschema der kumulativen Substanzzugabe

Zugegebenes Volumen [μl]	Endkonzentration im Organbad [μmol/l]
1	1
2	3
7	10
20	30
70	100

3.2 VERSUCHSTIERE

Für die folgenden Versuche wurden isolierte Organe von Meerschweinchen verwendet, weil die Beschaffenheit ihrer Organe und vor allem die Ionenverhältnisse am Herzen denen der Menschen am meisten ähnelt, und man außerdem von der Größe her durch die Versuchsaapparaturen beschränkt war.

Bei den nun beschriebenen Versuchen wurden Tiere vom TRIK Stamm, das bedeutet diese wurden nicht durch Inzucht vermehrt, von der Reptilientierhandlung Hubmann aus Graz verwendet. Außerdem waren die Tiere ausschließlich weiblich, ca. 300-600 g schwer und maximal 30 Tage alt.

3.3 PHYSIOLOGISCHE ELEKTROLYTLÖSUNG

Von der physiologischen Nährlösung, im Folgenden als Tyrode bezeichnet, wurden jeden Tag in der Früh 2 Liter nach den Vorschriften von Reiter (1967) frisch hergestellt. Die Tyrode, benannt nach dem Pharmakologen Maurice Veaux Tyrode, entsprach einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Für die Herstellung wurden fertig bereitete Lösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat in einem 2-Liter Kolben gemischt, Glucose als Feststoff zugesetzt und mit 1,5 L destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurde für 20 Minuten mit einer Gasmischung, dem sogenannten Oxymix bzw. Carbogen, bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂, begast und anschließend wurde die Kalziumchlorid-Lösung langsam und tropfenweise zugesetzt, um ein Ausfallen schwer löslicher Kalziumsalze zu verhindern. Zuletzt wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt. Tabelle 3.3 fasst die Inhaltsstoffe der Elektrolytlösung zusammen:

Tabelle. 3.3: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Stocklösung	Menge [für 2 L Tyrode]	mmol/L
NaCl	58,442	1000,25g/5l	67,2 ml	115,01
KCl	74,55	50,33 g/5l	70 ml	4,73
NaHCO ₃	84,01	125,00 g/5l	167,4 ml	24,91
MgSO ₄	120,37	147,02 g/5l	2,36 ml	0,29
KH ₂ PO ₄	136,09	62,00 g/250 ml	2,36 ml	2,15
CaCl ₂	110,98	34g/250 ml	6,4 ml	3,92
Glucose	180,16	Reinsubstanz	3,96 g	-

3.3.1 Kaliumchlorid-Lösung für Darm, Aorta und Pulmonalarterie

Für die Untersuchungen der Testsubstanz an Darm, Aorta und Pulmonalarterie war die Herstellung einer Kaliumchlorid-Lösung notwendig, diese gewährleistet eine maximale Kontraktion der Präparate, um im Anschluss die durch die Testsubstanz hervorgerufene vasodilatierende bzw. spasmolytische Aktivität feststellen zu können. Für die Kontraktion des Darmes wurde ein 60 mmol Lösung benötigt. Dafür wurden 0,45 g Kaliumchlorid in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und mit Tyrode auf 100 ml aufgefüllt. Für die Kontraktion von Aorta und Pulmonalarterie war eine 90 mmol Lösung vonnöten. Hierfür wurden 0,67 g Kaliumchlorid eingewogen und ebenfalls mit Tyrode auf 100 ml ergänzt.

3.4 ORGANENTNAHME UND PRÄPARIERUNG

3.4.1 Entnahme der Organe

An jedem Versuchstag wurde in der Früh ein Meerschweinchen mit einem gezielten Genickbruch getötet. Im Anschluss daran wurden Bauch- und Brustraum mit einer Schere geöffnet und das Herz, das Ileum und die Aorta entnommen. Die Organe mussten sofort in die physiologische Nährlösung, die auch stets begast wurde, übergeführt werden. Das Herz musste sogleich weiter präpariert werden. Abbildung 3.3 zeigt das verwendete Sezierbesteck.

Egal bei welchem Arbeitsschritt man sich gerade befand, war es die Lagerung der Organe, Präparierung oder der Versuch selbst, die Organe mussten sich immer in der physiologischen Nährlösung, die auch permanent begast wurde, befinden, ansonsten war ein Durchführen der Versuche nicht mehr möglich da die Organe sonst abgestorben wären.



Abbildung. 3.3: Sezierbesteck

3.4.2 Präparierung der Organe

Die Präparierung der einzelnen Organe erfolgte unter dem Auflichtmikroskop in Glaspetrishalen, die mit einem Korkboden ausgelegt und mit einem Gummischlauch am Rand fixiert wurden. Die Petrischale wurde mit Tyrode gefüllt und begast, um eine optimale Versorgung zu gewährleisten. Die einzelnen Organe wurden mit Präpariernadeln fixiert und die Pinzetten und Federgriffscheren dienten dazu, überschüssiges Fett- oder Muskelgewebe zu entfernen. An den Darm, den Papillarmuskel und den Vorhof wurden Silberhaken mithilfe von Bindfäden befestigt, die bei der Verankerung der Organe in den Versuchsaapparaturen vonnöten waren. Generell sollte während des Präpariervorganges vorsichtig gearbeitet werden, denn ein Verletzen oder Überdehnen der Organe führte zu dessen Absterben, sodass sie für die folgenden Versuche nutzlos gewesen wären. In Abbildung 3.4 sind Präparierbesteck und das Auflichtmikroskop dargestellt.



Abbildung. 3.4: Präparierbesteck mit Auflichtmikroskop

3.4.2.1 Präparierung des rechten Vorhofes (Atrium cordis dexter)

Das Herz wurde mit zwei Präpariernadeln am Korkboden fixiert und etwaiges Fett- oder Lungengewebe wurde mit den Federgriffscheren entfernt. Der rechte Vorhof musste inklusive dem Sinusknoten entnommen werden, um die autonome Schlagkraft des Herzens zu gewährleisten. Anfang und Ende des Vorhofes wurden vorsichtig mit zwei Nadeln fixiert. Ein Faden wurde unter einen fixierten Teil gelegt und ein Knoten gemacht. In diesen Knoten wurde ein Silberhaken eingesetzt, der mit einem zweiten Knoten befestigt wurde. Derselbe Vorgang wurde auch auf der anderen Seite des Vorhofs wiederholt, sodass letzten Endes im Vorhof oben und unten ein Silberhaken eingearbeitet war. Das fertige Präparat wurde in die begaste Tyrode gegeben und konnte nun in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

3.4.2.2 Präparierung der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Die Lungenarterie wurde im Anschluss an den Vorhof aus dem Herz entnommen. Für die folgenden Versuche wurde nur ein Teil der Arterie entnommen, nämlich der Truncus pulmonalis, der aus der rechten Herzkammer hervorgeht. Ein ca. 1 cm langes Stück der Arterie wurde herausgeschnitten und von Fett- und Muskelgewebe befreit. Dieses Stück wurde nochmal zerteilt und in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten. Das Präparat der Lungenarterie war so bereits gebrauchsfertig, daher wurde es in die begaste Tyrode gegeben und konnte direkt in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

3.4.2.3 Präparierung der Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Zuletzt wurden aus dem Herz die Papillarmuskeln entfernt. Dafür wurde der rechte Ventrikel entlang des Septums geöffnet, aufgeklappt und mit einer Präpariernadel fixiert. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde ein Silberhaken mithilfe eines Bindfadens auf dieselbe Weise wie beim Vorhof befestigt. Anschließend wurde der Muskel aus der Herzwand geschnitten. Derselbe Vorgang konnte auch mit dem linken Ventrikel wiederholt werden. Besonders wichtig war hier, eventuell vorhandene Purkinje-Fasern zu entfernen, da diese einen Teil des Erregungsleitungssystems am Herzen darstellen und somit störend wirken können. Die fertigen Präparate wurden in die begaste Tyrode gegeben und konnten nun in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

3.4.2.4 Präparierung des Dünndarms (Terminales Ileum)

Nach der Entnahme des Herzens wurde der Bauchraum weiter geöffnet und der Darm herausgezogen. Für die folgenden Versuchsreihen wurde lediglich das terminale Ileum verwendet. Der Darm wurde in der Nähe des Caecums durchtrennt und der jejunale Bereich mit einem Bindfaden markiert. Ein ca. 30 cm langes Darmstück wurde abgeschnitten und in der begasten Tyrode zwischengelagert. Für den Darm ist eine ausreichende Gasversorgung besonders wichtig. In weiterer Folge wurde vom 30 cm langen Darm ein ca. 1 cm großes Stück abgeschnitten und mit Präpariernadeln am

Korkboden der Petrischale fixiert. Das Darmfragment wurde mit einer kleinen Pipette durchgespült, um den Darminhalt zu beseitigen. Dann wurden die beiden Enden des Darmes schräg abgeschnitten und auf jeder Seite wurde - in derselben Weise wie beim Vorhof - ein Silberhaken mit Bindfaden fixiert. Die Abschrägung ist notwendig, damit nach dem Anbringen der Haken das Darmlumen nach wie vor offen bleibt und die Testsubstanz durchströmen kann. Mit der kleinen Pipette kann zum Schluss getestet werden, ob das Lumen wirklich offen geblieben ist. Das fertige Präparat wurde in die begaste Tyrode gegeben und konnte dann in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

3.4.2.5 Präparierung der Aorta (Aorta descendens)

Zum Schluss wurde die Aorta aus dem Meerschweinchen entnommen. Dafür musste die Wirbelsäule durchgebogen werden und der Teil der Aorta, der oberhalb des Herzens liegt, wurde oben abgetrennt. Mit einer Pinzette wurde die Aorta gehalten und mithilfe einer Schere vom Rückgrat abgeschnitten. Danach wurde die Aorta mit zwei Präpariernadeln im Korkboden der Petrischale befestigt und mit der Federschere wurde störendes Fett- und Muskelgewebe abgetrennt. Aus der sauberen Aorta wurden ca. 2 mm breite Ringe geschnitten, die direkt für die Versuche verwendet werden konnten. Die fertigen Präparate wurden in die begaste Tyrode gegeben und konnten nun in die Versuchsanordnung eingespannt werden.

3.5 VERSUCHSAUFBAU UND APPARATUR

Für die Untersuchung der Wirkungen von SWS 60 HCl und SWS 51 HCl an isolierten Meerschweinchenorganen standen zwei verschiedene Apparaturen zur Verfügung. Apparatur I wurde ausschließlich für den Papillarmuskel verwendet, mit Apparatur II testete man Darm, Aorta, Vorhof und Lungenarterie. Das Schema der Versuchsanordnung und das Prinzip der Messung waren aber bei beiden Apparaturen ident. Im Zentrum befand sich das isolierte Organ, das mithilfe der Silberhaken am Draht befestigt war. Der Draht war verbunden mit einem Kraftwandler, der elektrische Impulse an einen Amplifier weitergibt. Dieser verstärkte das Signal und führte es zum Schreiber, der die Messergebnisse auf Millimeterpapier aufzeichnete.

Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten mussten die physiologischen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration bis zum Ende des Versuchs konstant gehalten werden.

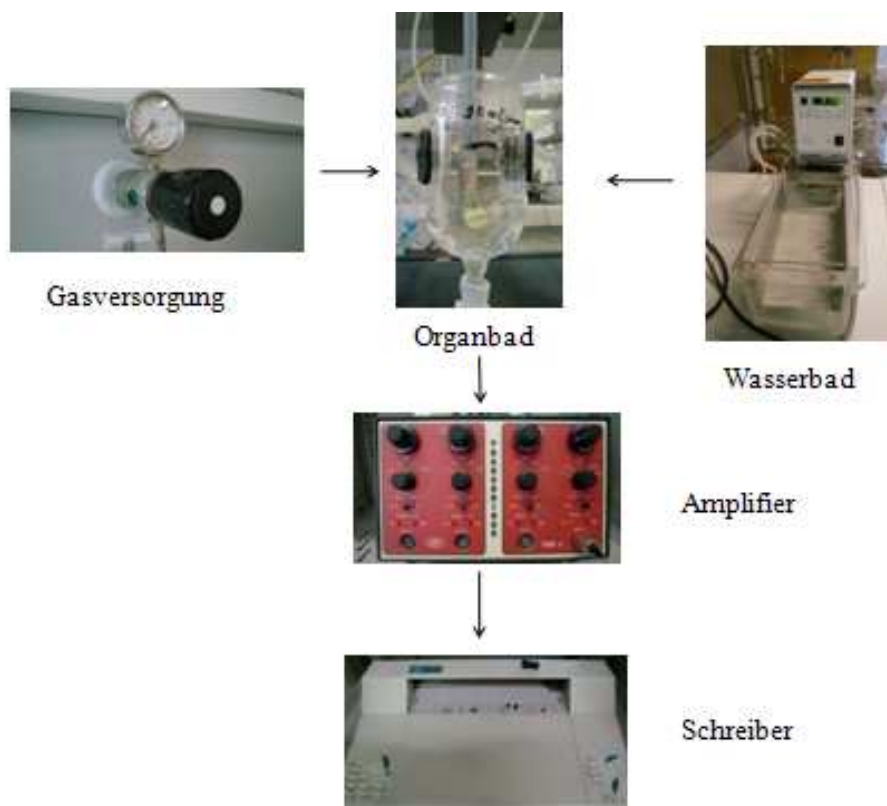


Abbildung 3.5: Versuchsanordnung

3.5.1 Apparatur I

Apparatur I (Abbildung 3.6) wurde ausschließlich für den Papillarmuskel verwendet. In das temperierte Wasserbad von $35,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ragte die Papillarmuskelkammer. In dieser Kammer befanden sich 25 ml Tyrode, die von unten durch eine Glasfritte mit dem Oxygasmix begast wurde. Bevor der Muskel befestigt wurde, musste die Tyrode die richtige Temperatur erreichen, daher sollte nach dem Befüllen noch ca. 10 min gewartet werden bevor der Papillarmuskel eingespannt wurde. Das Präparat wurde dann über den Haken auf den Draht gehängt und die untere Spitze des Muskels wurde zwischen Platinelektrode und Plexiglasscheibe eingeklemmt. Die Organhalterung auf dem Stativ konnte anschließend in die Papillarmuskelkammer abgesenkt werden. Mithilfe des Feintriebs wurde die Vorspannung des Organs eingestellt. Die Vorspannung ist für jedes Organ individuell verschieden und wurde empirisch ermittelt, um gleiche und vor allem reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen.

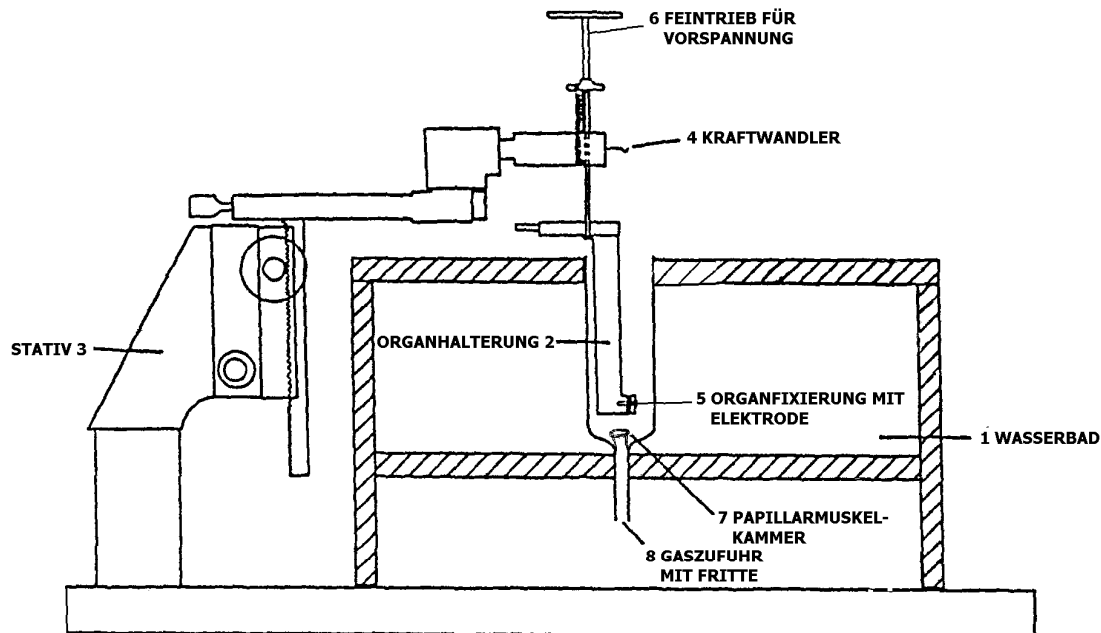


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Apparatur I

Die Muskelkontraktionen wurden über den Draht auf den Kraftwandler übertragen und in elektrische Signale umgewandelt. Da der Papillarmuskel nicht von selbst kontrahiert, musste er elektrisch stimuliert werden über den Anapulse Stimulator. Der Kraftwandler war mit einem Verstärker verbunden, am Ende stand der Schreiber. Abbildung 3.7 zeigt die Originalapparatur.



Abbildung 3.7: Originalabbildung des Versuchsaufbaus

3.5.2 Apparatur II

Apparatur II (Abbildung 3.8) wurde für Aorta, Vorhof, Darm und Lungenarterie verwendet. Das Organbad wurde in diesem Fall von einem Plexiglasmantel umgeben, durch den das temperierte Wasserbad von $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ floss. In diesem Fall standen Organbäder mit einem Fassungsvermögen von 8 ml oder 25 ml zur Verfügung, die ebenfalls begast wurden. Nach dem Fassungsvermögen richtete sich die Einwaage der Testsubstanz.

Am Darm und am Vorhof waren nach dem Präparieren bereits zwei Silberhaken befestigt, mit denen die Präparate nun in die Aufhängevorrichtung eingespannt werden konnten. Aorta und Lungenarterie lagen nach dem Präparieren als Ringe vor, die direkt

ohne zusätzliche Haken in die Aufhängevorrichtung eingehängt wurden. Der Feintrieb ist wiederum nötig für die erforderliche Vorspannung des Organs.

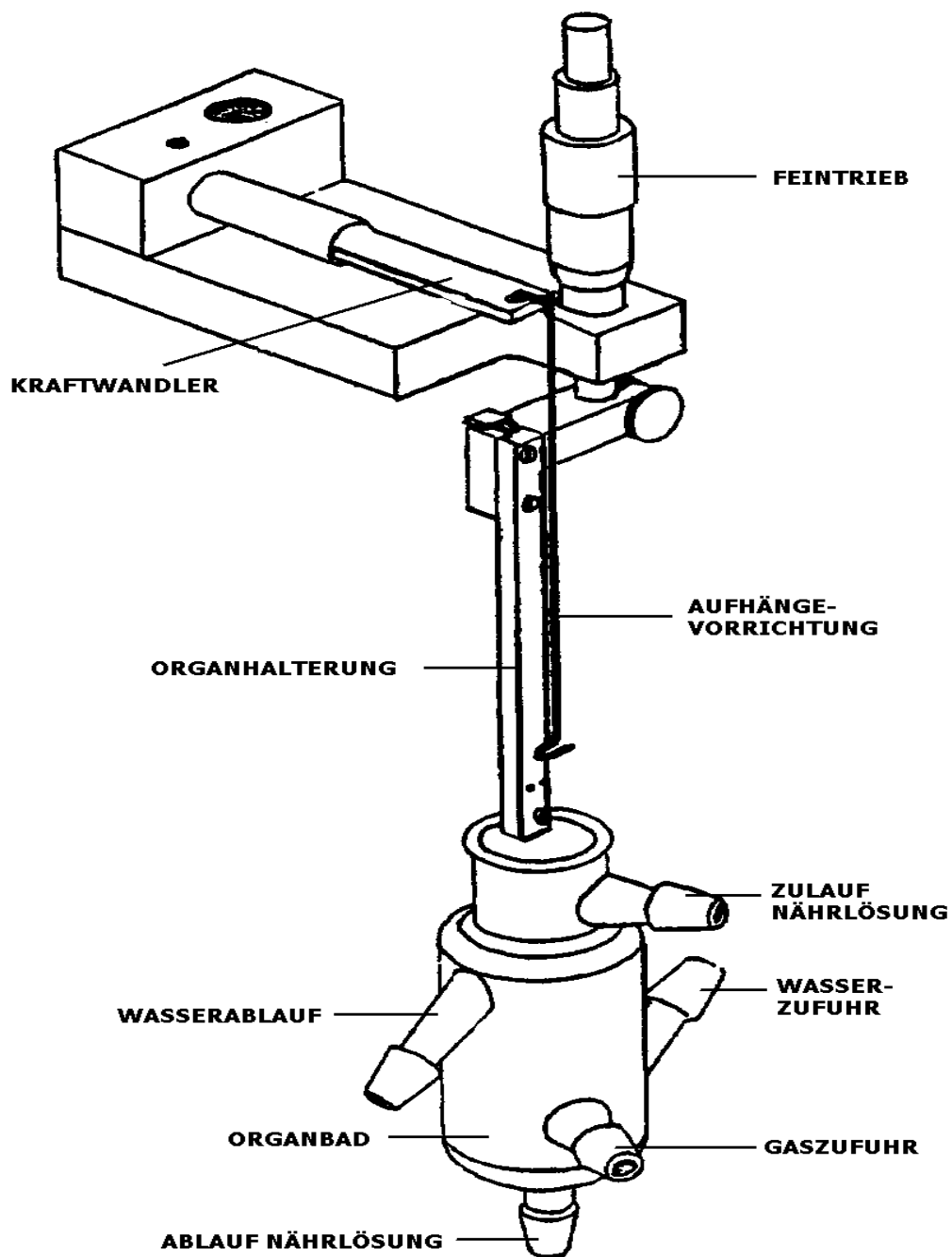


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Apparatur II

Die Muskelkontraktionen wurden in Stromimpulse umgewandelt und vom Schreiber aufgezeichnet. Abbildung 3.9 zeigt den originalen Versuchsaufbau.

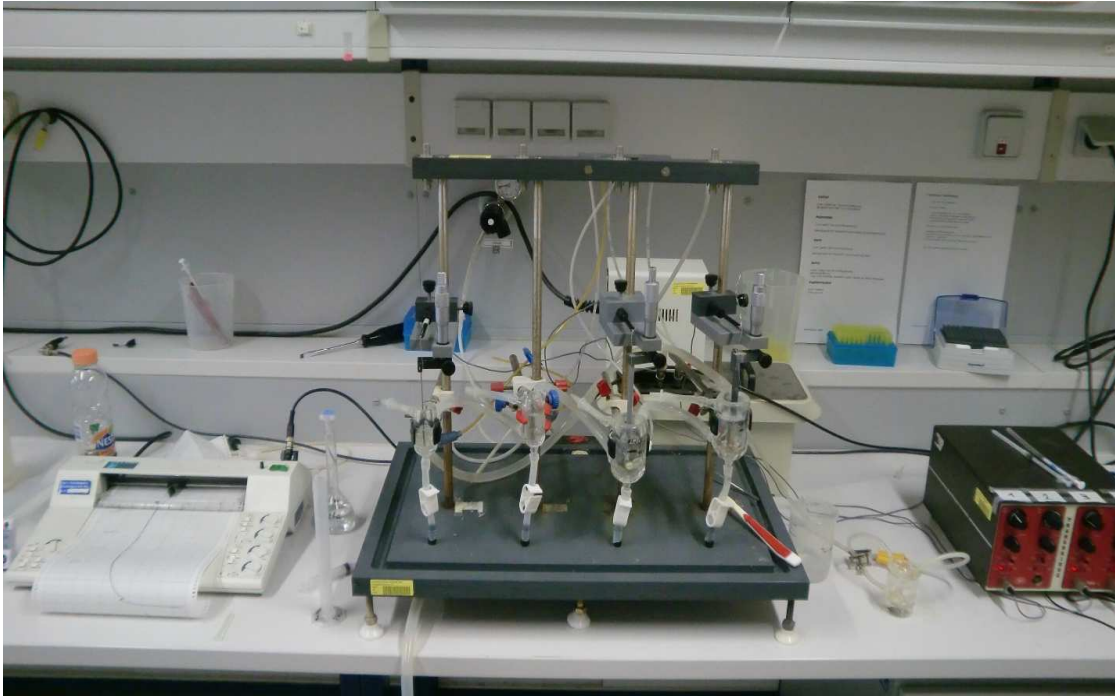


Abbildung 3.9: Originalabbildung von Versuchsausrüstung II

3.5.3 Der Kraftwandler

Einen essentiellen Teil der Versuchsausrüstung stellte der Kraftwandler dar. Er verband die Versuchsausrüstung mit dem Verstärker und war dafür zuständig, mechanische Signale in elektrische Signale umzuwandeln, die dann gemessen werden konnten. Dem Prinzip der Messung liegt ein Dehnungsmessstreifen zugrunde. Bei Änderung der Kontraktionskraft ändert sich der Widerstand, was sich wiederum in einer Änderung eines angelegten Stromflusses niederschlägt. In dieser Weise wurden Kontraktionsänderungen über einen Verstärker (4-Chanel Transducer Ampilfier, Firma WPI) zu einem Schreiber (Flatbed Recorder Modell BD 112, Firma Kipp & Zonen) transferiert, der die entstandenen Impulse aufzeichnete.

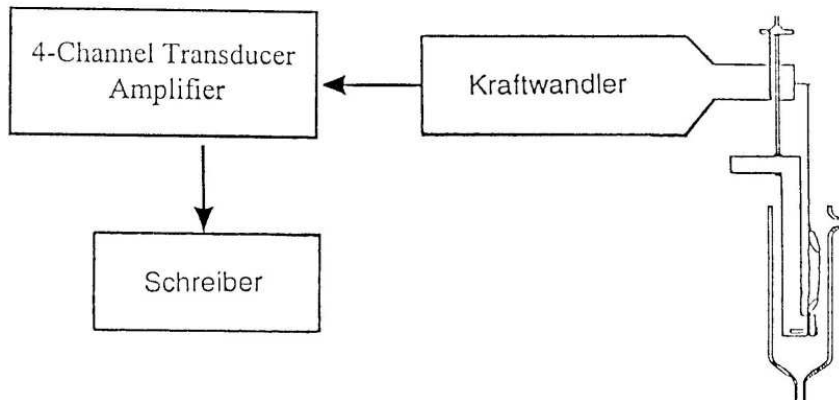


Abbildung 3.10: Arbeitsprinzip des Kraftwandlers

3.5.4 Gasversorgung

Um eine optimale Versorgung der Organe zu gewährleisten, war eine konstante Gasversorgung unerlässlich. Wie bereits erwähnt bestand der verwendete Gasmix aus 95% O₂ und 5% CO₂ und diente ebenfalls dazu den pH-Wert konstant zu halten und die zugegebene Testsubstanz homogen im Organbad zu verteilen. Das Gas gelangte über ein Schlauchsystem zu den Organbädern, am Einlasspunkt befand sich eine Glasfritte, die eine feine Zerstäubung und somit eine ideale Dosierung des Gases versprach.



Abbildung 3.11: Originalabbildung der Gasversorgung

3.6 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

Bevor mit den eigentlichen Versuchen gestartet werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die verwendeten Apparaturen sauber waren. Dafür wurden die Organbäder und die zugehörigen Halterungen zwei bis drei Mal mit destilliertem Wasser gespült und nötigenfalls mithilfe einer Bürste gereinigt. Anschließend wurde auch einmal mit Tyrode gespült und dann wurden die Organbäder mit Tyrode gefüllt.

3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane

3.6.1.1 Wirkung der Substanzen auf den rechten Vorhof

Die Isolierung und Präparierung vom rechten Vorhof wurde bereits in Kapitel 3.4 besprochen. Mithilfe der befestigten Silberdrahthaken wurde das Präparat nun in Apparatur II eingespannt. Dabei war darauf zu achten, den Vorhof nicht zu überdehnen und dabei die Autonomie des Sinusknotens zu gefährden. Falls erforderlich konnte die Länge der Silberdrähte verändert werden, sodass das Präparat locker in der Apparatur hing. Nach dem Eintauchen ins Organbad wurden die nötigen Einstellungen an den Geräten vorgenommen.

Zuerst wurde der Schreiber eingeschaltet und auf 5 mV und Speed 5 mm/sec eingestellt. Mit dem „Zero“ Drehrad wurde der Nullpunkt am Millimeterpapier eingestellt. Dann wurde der Amplifier eingeschaltet und entriegelt, der verstellte Schreiber wurde mit einer Drehschraube am Verstärker wieder in die Nullposition gebracht. Nun konnte mithilfe des Feintriebes die Vorspannung des Organs von 10,4 cm vorgenommen werden. Dieser Vorgang ist nötig, um für alle Versuche die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen. Mit der Drehschraube am Verstärker wurde erneut die Nullposition eingestellt. Bei Bedarf, das heißt wenn die erhaltenen Amplituden zu klein zum Zählen wären, konnte auch statt mit 5 mV mit 2 mV oder 1 mV gearbeitet werden.

Im Anschluss an die Vorbereitungen folgte eine ca. 20 minütige Gewöhnungsphase des Präparates an die neue Umgebung. Dann konnte mit den Messungen begonnen werden, wobei die ersten Messungen lediglich Kontrollmessungen waren. Dafür wurde in Intervallen von 5 Minuten der Schreiber abgesenkt und für 12 Sekunden erfolgte die Messung. Dies entsprach auf dem Millimeterpapier einer Länge von 6 Kästchen, wobei ein Kästchen 1cm lang ist. Sobald die Schlagfrequenz bei 4 Messungen konstant blieb, konnte mit der Substanzzugabe begonnen werden. Nach Zugabe der ersten Konzentration wurde erneut alle 5 Minuten gemessen, über einen Zeitraum von 45 Minuten. Danach erfolgt die Zugabe der nächsten Konzentration nach dem bereits bekannten Pipettierschema aus Tabelle 3.2.

Die Substanzzugabe musste vorsichtig erfolgen, sodass Silberdrähte und Kraftwandler nicht berührt wurden, da es sonst zu Fehlaufzeichnungen kam.

3.6.1.2 Wirkung der Substanzen auf den Papillarmuskel

Die Isolierung und Präparierung der Papillarmuskel wurde bereits in Kapitel 3.4 besprochen. Das Organ wurde mithilfe des befestigten Silberhakens an der vorgesehenen Halterung eingehängt, zwischen Platinelektrode und Plexiglasscheibe fixiert und ins Organbad abgesenkt. Dort verweilte es einige Zeit zur Gewöhnung an die neue Umgebung. Beim Papillarmuskel wurde eine Vorspannung von 4 cm, das entspricht 3,92 mN, angelegt. Diese Spannung sollte während des gesamten Versuchs konstant gehalten werden, deshalb war es oftmals vonnöten während des Versuchs den Feintrieb nachzujustieren.

Da der Papillarmuskel keine Spontanaktivität wie der Vorhof aufwies, war eine elektronische Reizung nötig, die mit dem Reizgerät A310 Accupulser von der Firma WPI durchgeführt wurde. Es wurden Rechteckimpulse von 10 ms mit einer Dauer von 3 ms und einer Frequenz von 1 Hz angelegt, das entsprach 60 Amplituden pro Minute. Die eingebrachte Stromstärke sollte ungefähr 10% über der minimalen Reizschwelle liegen, um ein kontinuierliches Schlagen des Muskels zu gewährleisten. Wurde über die Dauer des Versuchs kontinuierlich eine zu hohe Stromstärke angelegt, kam es zur

Entleerung der Katecholaminspeicher, was sich in einer signifikanten Abnahme der Amplitude niederschlug.

Sollte bereits eine Aktivität vorliegen, ohne dass Stromschläge angewendet wurden, so waren nicht entfernte Purkinje-Fasern dafür verantwortlich. Diese mussten nötigenfalls nachträglich entfernt werden, um eine Versuchsdurchführung zu ermöglichen.

Die Einstellungen von Amplifier und Schreiber entsprachen denen beim Vorhof, es wurde unter 5 mV gearbeitet und bei einem speed von 5 mm/sec alle 5 Minuten 5 Amplituden aufgezeichnet. Die letzte Messung bei jeder Konzentration wurde bei 20 mm/sec durchgeführt, damit die Länge der Amplitude besser gemessen werden konnte. Die Substanzzugabe erfolgte nach dem bekannten Schema alle 45 Minuten.

3.6.1.3 Wirkung der Substanzen auf den Darm

Die Präparierung des Darms erfolgte wie bereits in Kapitel 3.4 besprochen und mithilfe der zwei befestigten Silberhaken wurde das Präparat in Apparatur II eingespannt. Nach dem Absenken ins Organbad erfolgte die Einschaltung und Justierung der benötigten Geräte in derselben Reihenfolge wie beim Vorhof, lediglich die gewählte Vorspannung betrug beim Darm 5 cm, das entspricht 4,92 mN. Während der nun folgenden 20 minütigen Equilibrierungsphase waren die Kontraktionen der Darmmuskulatur an der Bewegung des Schreibers erkennbar. Daher musste vor Beginn des Versuchs der Schreiber mittels Feintrieb wieder auf Null gestellt werden. Danach wurde der Schreiber abgesenkt und die Nährlösung über einen Ablaufschlauch aus dem Organbad entfernt. Die Tyrode wurde ersetzt durch genau 25 ml einer 60 mmol Kaliumchlorid-Lösung, die, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, hergestellt wurde.

Nach Zugabe der Kaliumchloridlösung war eine sofortige Kontraktion des Darmes zu erkennen, diese nahm aber auch schnell wieder ab und pendelt sich bei ungefähr der Hälfte der maximalen Kontraktion ein. Diese maximale Kontraktion aller Organe - außer der Herzpräparate - ist nötig, um eine mögliche dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanzen belegen zu können. Nun musste wieder die mindestens 45

minütige Gleichgewichtseinstellung abgewartet werden, die sich auf dem Millimeterpapier in Form einer Geraden zeigte. Wurde keine stabile Phase erreicht, das heißt pro Zeiteinheit verlor der Darm kontinuierlich an Spannung, konnte das Präparat nicht mehr verwendet werden. Ansonsten wurde mit der Zugabe der Testsubstanzen begonnen und alle 45 Minuten wurden die Konzentration gesteigert.

3.6.1.4 Wirkung der Substanzen auf die Aorta

Da die Aorta bereits nach der Präparierung in Form eines Ringes vorlag, konnte sie direkt zwischen die zwei Drähte der Apparatur II eingehängt werden, wobei die Präparate nicht gedehnt werden sollten. Nach dem Absenken ins Organbad wurden Schreiber und Verstärker eingeschaltet und die Nullpunkteinstellungen vorgenommen. Die Vorspannung für die Aorta betrug 10 cm bei 10 mV, das entspricht 19,6 mN. Nach 20 Minuten Gleichgewichtseinstellung in der Nährlösung wurde der Schreiber auf 5 mV umgeschaltet und der Nullpunkt mithilfe des Feintriebs wieder eingestellt. Dann wurde wie beim Darm die Tyrode abgelassen und durch eine 90 mmol Kaliumchlorid Lösung ersetzt, die laut Kapitel 3.3.1 hergestellt wurde.

Nach Zugabe der Kaliumchlorid Lösung konnte eine Kontraktion beobachtet werden, die nach mindestens 45 Minuten erneut in einer Geraden enden sollte, damit der Versuch erfolgreich durchgeführt werden konnte. Danach wurden alle 45 Minuten die Testsubstanzen nach dem bekannten Schema zugegeben.

3.6.1.5 Wirkung der Substanzen auf die Lungenarterie

Der Versuchsablauf der Lungenarterie glich dem der Aorta, außer dass konstant bei 5 mV, also bei 9,81 mN, gearbeitet wurde. Die Messung der Kontraktionsabnahme und die Substanzzugabe erfolgten aber in derselben Weise wie bei der Aorta.

3.6.2 Untersuchung der Abspaltung von H₂S bei SWS 51 HCl

Um herauszufinden ob es sich bei der Abspaltung von H₂S aus SWS 51 HCl um einen enzymatisch gesteuerten Vorgang handelt, wurde auch ein Versuch mit einer Acetylcholinesterase durchgeführt, da für die Abspaltung im menschlichen Körper vermutlich Esterasen verantwortlich sind.

Dafür wurde ein Aorta Präparat in die Versuchsanordnung eingespannt und die 45-minütige Equilibrierungsphase abgewartet. Anschließend wurden 0,5mg Enzym gelöst in 100µl dest. Wasser, das entspricht einer Enzymaktivität von 118 units, ins Organbad eingespritzt. Nach 45 Minuten wurde SWS 51 HCl in einer Konzentration von 100µmol/l dazugegeben und weitere 45 Minuten wurden abgewartet.

3.7 SUBSTANZ ZUR UNTERSUCHUNG DER H₂S ABSPALTUNG

3.7.1 Acetylcholinesterase gewonnen aus *Electrophorus electricus*

Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wird der Familie der Cholinesterasen zugeordnet und besitzt die spezifische Fähigkeit, den Neurotransmitter Acetylcholin durch Hydrolyse in Acetat und Cholin zu spalten. Diese Reaktion geht extrem schnell vonstatten, da die Neurone sofort wieder neu ankommende Reize verarbeiten müssen. AChE wirkt vor allem im ZNS, an neuromuskulären Synapsen und im vegetativen Nervensystem wo Acetylcholin den dominanten Neurotransmitter darstellt.

Die Acetylcholinesterase, die für die folgenden Versuchsreihen verwendet wurden, stammen vom Zitteraal.

3.8 AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTIK

3.8.1 Atrium dexter

Am Vorhof wurde die Chronotropie, das heißt die Schlagfrequenz des Herzens überprüft. Wie in Kapitel 3.6 beschrieben erhielt man bei diesen Versuchen die Anzahl der Herzschläge für jeweils 12 Sekunden. Um die Zahl der Schläge pro Minute zu eruieren, musste der erhaltene Wert mit 5 multipliziert werden. Durch die Zugabe der Testsubstanz konnte eine mögliche Veränderung der Zahl der Herzschläge nachgewiesen werden, das heißt es war eine neutrale, positive oder negative chronotrope Wirkung feststellbar.

3.8.2 Musculus papillaris

Am Papillarmuskel wurde die Inotropie, das heißt die Kontraktionskraft, getestet. Dafür wurden die erhaltenen Amplituden mit einem Lineal vermessen und die jeweiligen cm mit dem Faktor 0,4 multipliziert, wenn bei 2mV gearbeitet wurde. Wurde aber eine Versuchsreihe mit 5mV durchgeführt, so war der Korrekturfaktor 0,98.

3.8.3 Aorta, Arteria Pulmonalis und Terminales Ileum

An diesen Organen wurde eine mögliche vasodilatierende bzw. spasmolytische Aktivität der Testsubstanzen untersucht. Dafür war eine maximale Vorkontraktion der Organe mit einer Kaliumchlorid-Lösung notwendig. Der Zeitpunkt der Substanzzugabe wurde am Millimeterpapier markiert, um jegliche Veränderungen nach jeder Substanzzugabe berechnen zu können. Nach der Plateauphase und nach jeder Substanzzugabe wurde der Abstand von der Nulllinie gemessen und bei 5mV mit dem Korrekturfaktor 0,98 multipliziert. Wurde mit 2mV oder 10mV gearbeitet, betrug der Korrekturfaktor 0,2 bzw. 2.

3.8.4 Statistik

Mithilfe des Programms "Sigma Plot 9.0" wurden Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und EC_{50} berechnet. Um auch die Irrtumswahrscheinlichkeit der Versuchsreihen mit einzubeziehen wurde der "Student-T-Test" für gepaarte Beobachtungen durchgeführt. Hierbei galten Werte $< 5\%$ ($P < 0,05$) und $< 1\%$ ($P < 0,01$) als signifikant, Werte $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hoch signifikant.

4 ERGEBNISSE

4.1 ERGEBNISSE DER TESTSUBSTANZ SWS 60 HCl

4.1.1 Atrium cordis dexter

Am rechten Vorhof wurde eine potentielle Änderung der Schlagfrequenz durch die Testsubstanz in vier verschiedenen Versuchen untersucht. Der exakte Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben.

Für die Auswertung wurde der arithmetische Mittelwert aus den aufgezeichneten Schlägen pro Minute aller vier Versuche ermittelt. Ein Kontrollwert (0%) von $225 \pm 8,66$ wurde definiert, bei dem noch keine Substanzzugabe erfolgt war.

Eine signifikante Wirkung auf die Chronotropie war nicht feststellbar, es kam lediglich zu einer leichten positiv chronotropen Wirkung. Folglich wurde auch kein EC_{50} erreicht. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den rechten Vorhof zusammen, wobei f dem arithmetischen Mittelwert der Herzschläge pro Minute entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den rechten Vorhof

SWS 60 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f \pm \text{SEM}$ [x/min]	$f \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$225 \pm 8,66$	0 ± 0	4	-
1	$233,75 \pm 7,47$	$4 \pm 1,54$	4	n.s.
3	$241,24 \pm 8,75$	$7,30 \pm 1,75$	4	n.s.
10	$246,25 \pm 8,26$	$9,61 \pm 2,69$	4	n.s.
30	$247,5 \pm 10,31$	$10,08 \pm 2,81$	4	n.s.
100	$245 \pm 10,21$	$9,01 \pm 3,32$	4	n.s.

Abbildung 4.1 stellt den Effekt von SWS 60 HCl auf die Chronotropie graphisch dar. Auf der x-Achse wurden die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in %. Die Punkte symbolisieren die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen, die Balken geben die Größe des Standardfehlers an.

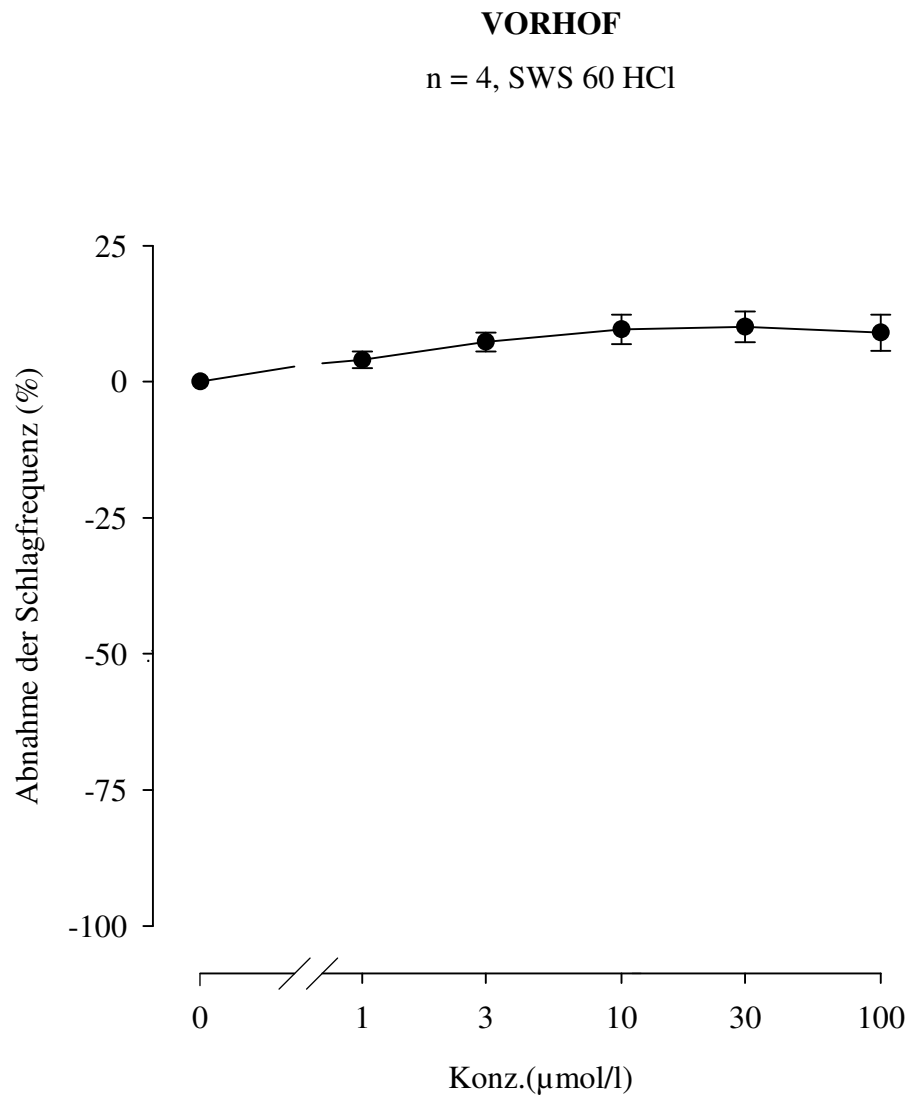


Abbildung 4.1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 60 HCl am rechten Vorhof

Abbildung 4.2 zeigt eine Originalaufzeichnung des Schreibers der chronotropen Wirkung von SWS 60 HCl.

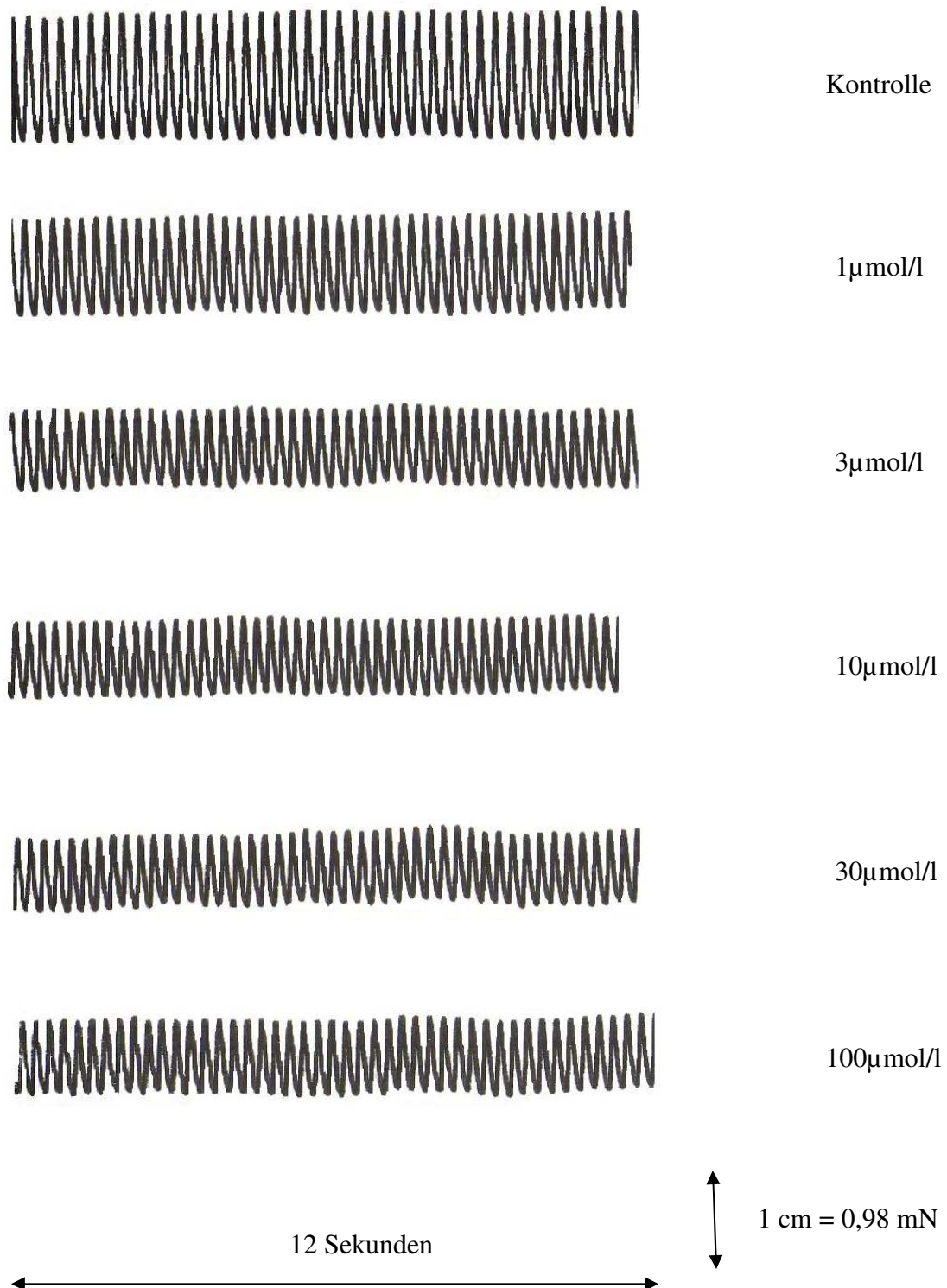


Abbildung 4.2: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von SWS 60 HCl

4.1.2 Musculus papillaris

Am Papillarmuskel wurde eine mögliche Veränderung der Kontraktionskraft durch die Testsubstanz in vier Versuchen ermittelt. Auf den genauen Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.2 eingegangen.

Ein Kontrollwert von $2,33 \pm 1,03$ wurde berechnet. Eine leichte Wirkung auf die Inotropie wurde gefunden, die Testsubstanz SWS 60 HCl besitzt negative inotrope Eigenschaften, es wurde allerdings keine EC_{50} erreicht.

Tabelle 4.2 zeigt die Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den Papillarmuskel, wobei f_c die Kontraktionskraft in mN und % darstellt, SEM den Standardfehler des Mittelwertes, n die Anzahl der Versuche und P die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den Papillarmuskel

SWS 60 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$2,33 \pm 1,03$	0 ± 0	4	-
1	$2,32 \pm 0,99$	$0,62 \pm 1,68$	4	n.s.
3	$2,11 \pm 0,90$	$-7,52 \pm 4,69$	4	n.s.
10	$1,92 \pm 0,87$	$-18,04 \pm 5,41$	4	n.s.
30	$1,78 \pm 0,87$	$-27,38 \pm 4,37$	4	0,05
100	$1,75 \pm 0,86$	$-28,28 \pm 5,49$	4	0,05

Abbildung 4.3 zeigt den Einfluss von SWS 60 HCl auf die Inotropie graphisch. Es ist deutlich sichtbar, dass es ab einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Auf der x-Achse wurden die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

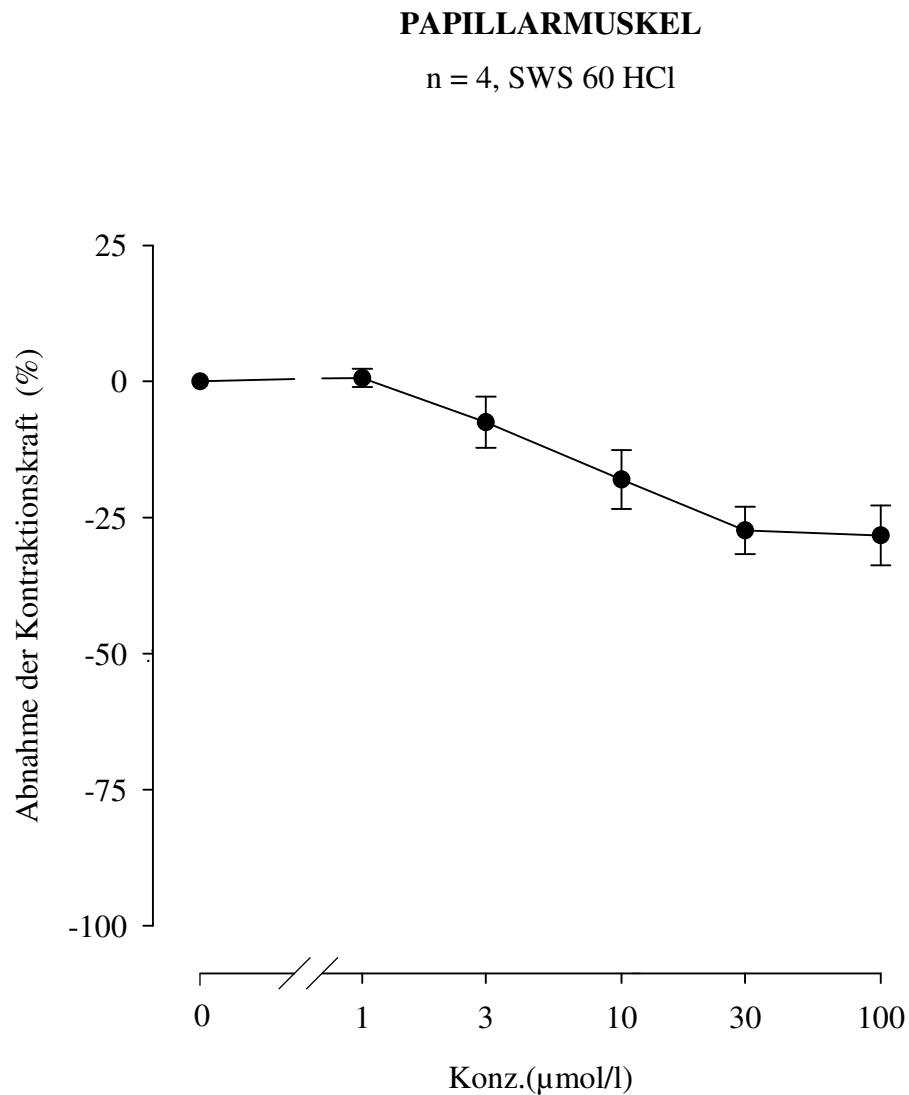


Abbildung 4.3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 60 HCl am Papillarmuskel

Abbildung 4.4 zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers der negative inotropen Wirkung von SWS 60 HCl. Ein cm der Amplitude entsprechen wiederum 0,98 mN.

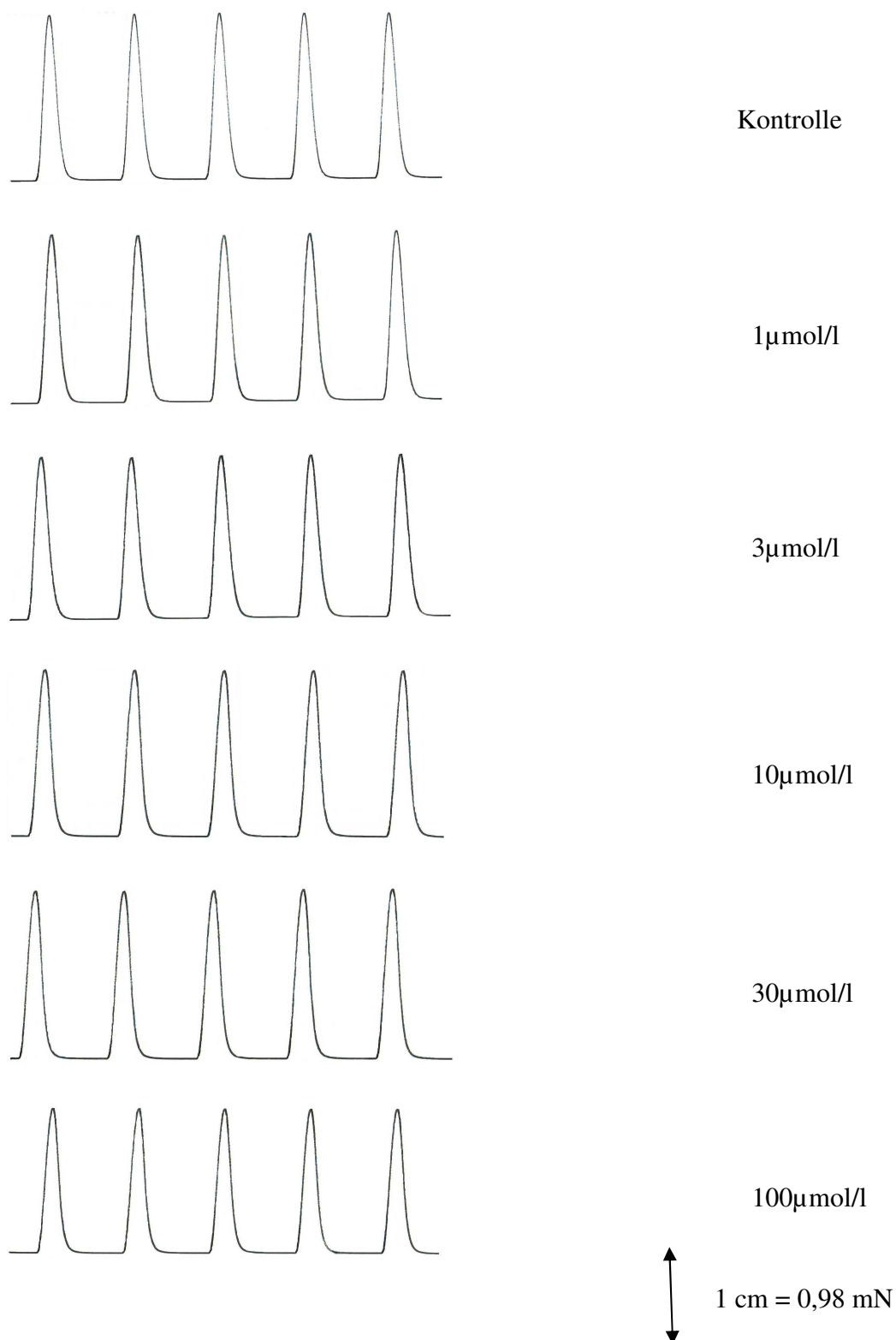


Abbildung 4.4: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von SWS 60 HCl

4.1.3 Aorta descendens

An der Aorta wurde eine potentielle vasodilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, hervorgerufen durch SWS 60 HCl, untersucht. Dafür wurden vier Versuche nach der Beschreibung in Kapitel 3.6.1.4 durchgeführt.

Für die Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte jeder Konzentration berechnet und ein Kontrollwert von $6,88 \pm 0,62$ mN bestimmt.

Nach der Zugabe von $1\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz kam es zu einer weiteren leichten Kontraktion der Aorta, die aber nach Zugabe der restlichen Konzentrationen relativ konstant blieb. Eine dilatierende Wirkung konnte nicht festgestellt werden. Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse von SWS 60 HCl auf die Aorta zusammen, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 60 HCl auf die Aorta

SWS 60 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$6,88 \pm 0,62$	0 ± 0	4	-
1	$6,91 \pm 0,66$	$0,17 \pm 1,07$	4	n.s.
3	$7,22 \pm 0,58$	$5,21 \pm 2,05$	4	n.s.
10	$7,23 \pm 0,46$	$5,80 \pm 3,14$	4	n.s.
30	$7,24 \pm 0,45$	$6,05 \pm 3,41$	4	n.s.
100	$7,24 \pm 0,46$	$6,05 \pm 3,63$	4	n.s.

Abbildung 4.5 stellt die Wirkung von SWS 60 HCl auf die Aorta graphisch dar. Nach der ersten Zugabe der Testsubstanz kommt es zu einer weiteren leichten Kontraktion, die anschließend konstant bleibt. Es wurde keine vasodilatierende Wirkung gefunden. Die x-Achse bezeichnet die jeweiligen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

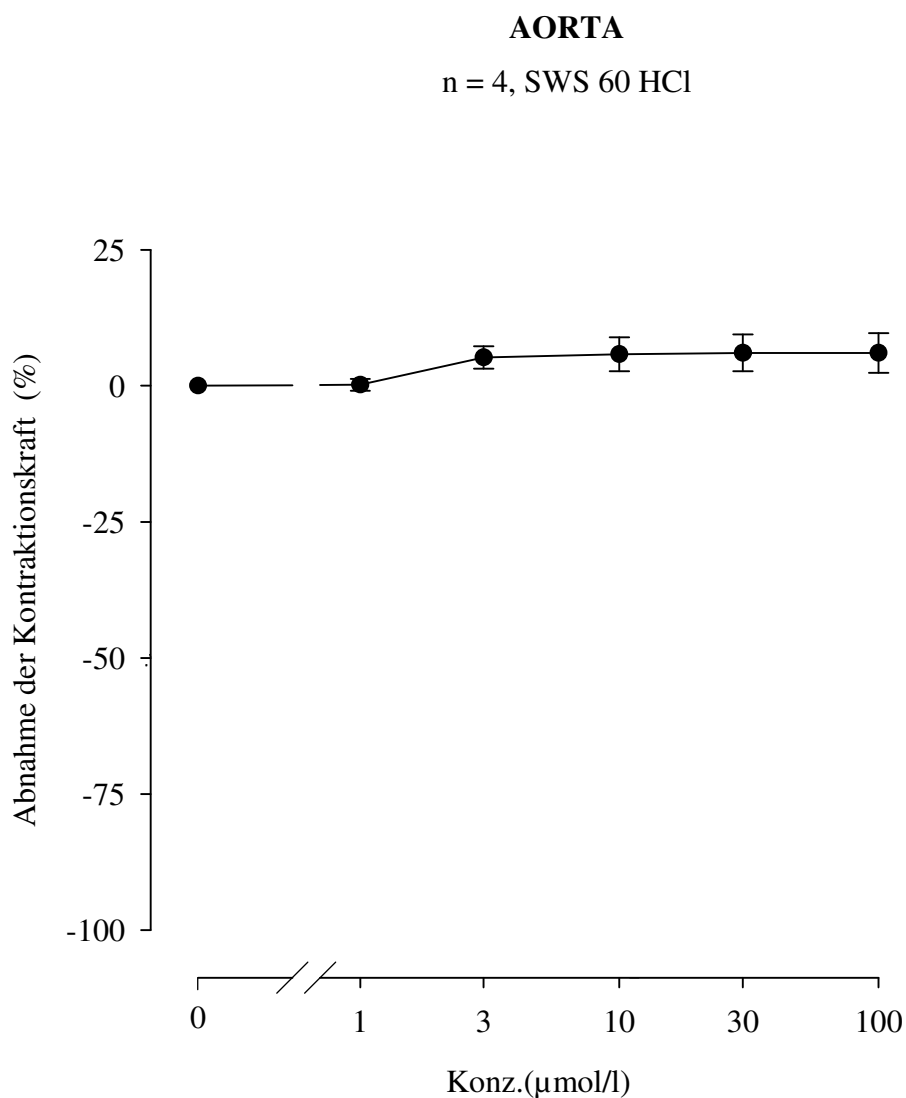


Abbildung 4.5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 60 HCl an der Aorta

Abbildung 4.6 zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 60 HCl auf die Aorta. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen stellen die Equilibrierungsphase von 45 min dar.

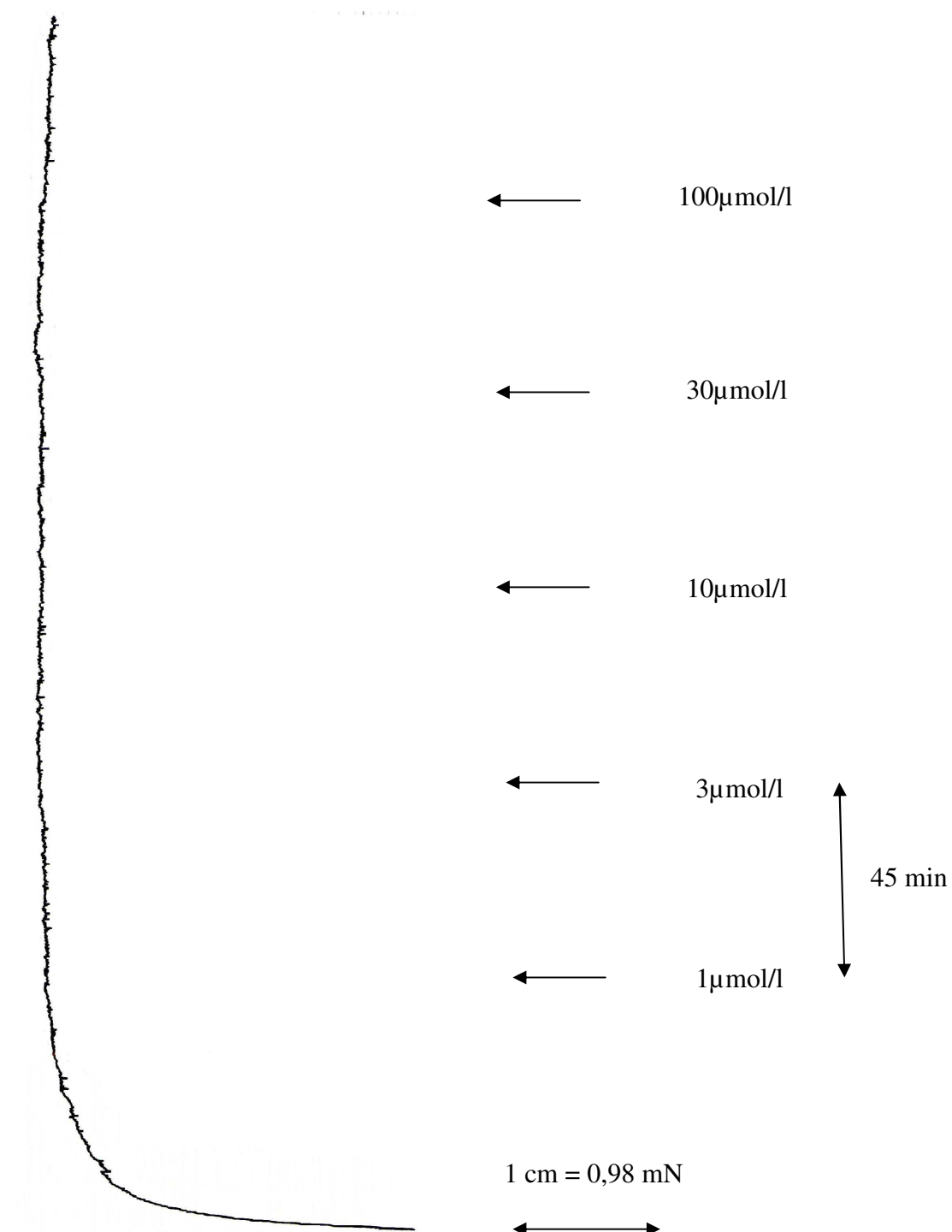


Abbildung 4.6: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 60 HCl auf die Aorta

4.1.4 Arteria pulmonalis

An der Lungenarterie wurde ebenfalls in vier Versuchen eine mögliche dilatierende Wirkung untersucht. Der genaue Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.5 beschrieben.

Für die Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte jeder Konzentration berechnet und ein Kontrollwert von $13,71 \pm 1,74$ mN bestimmt.

Die Substanz SWS 60 HCl besitzt keine dilatierenden Eigenschaften auf die Lungenarterie. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse von SWS 60 HCl auf die Lungenarterie zusammengefasst, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 60 HCl auf die Lungenarterie

SWS 60 HCl [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$13,71 \pm 1,74$	0 ± 0	4	-
1	$13,68 \pm 1,71$	$-0,13 \pm 0,46$	4	n.s.
3	$13,46 \pm 1,76$	$-2,06 \pm 1,21$	4	n.s.
10	$13,36 \pm 1,74$	$-2,7 \pm 1,38$	4	n.s.
30	$13,11 \pm 1,74$	$-4,71 \pm 2,18$	4	n.s.
100	$13,03 \pm 1,60$	$-4,73 \pm 2,25$	4	n.s.

Abbildung 4.7 stellt den Effekt von SWS 60 HCl auf die Lungenarterie graphisch dar. Die x-Achse bezeichnet die jeweiligen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

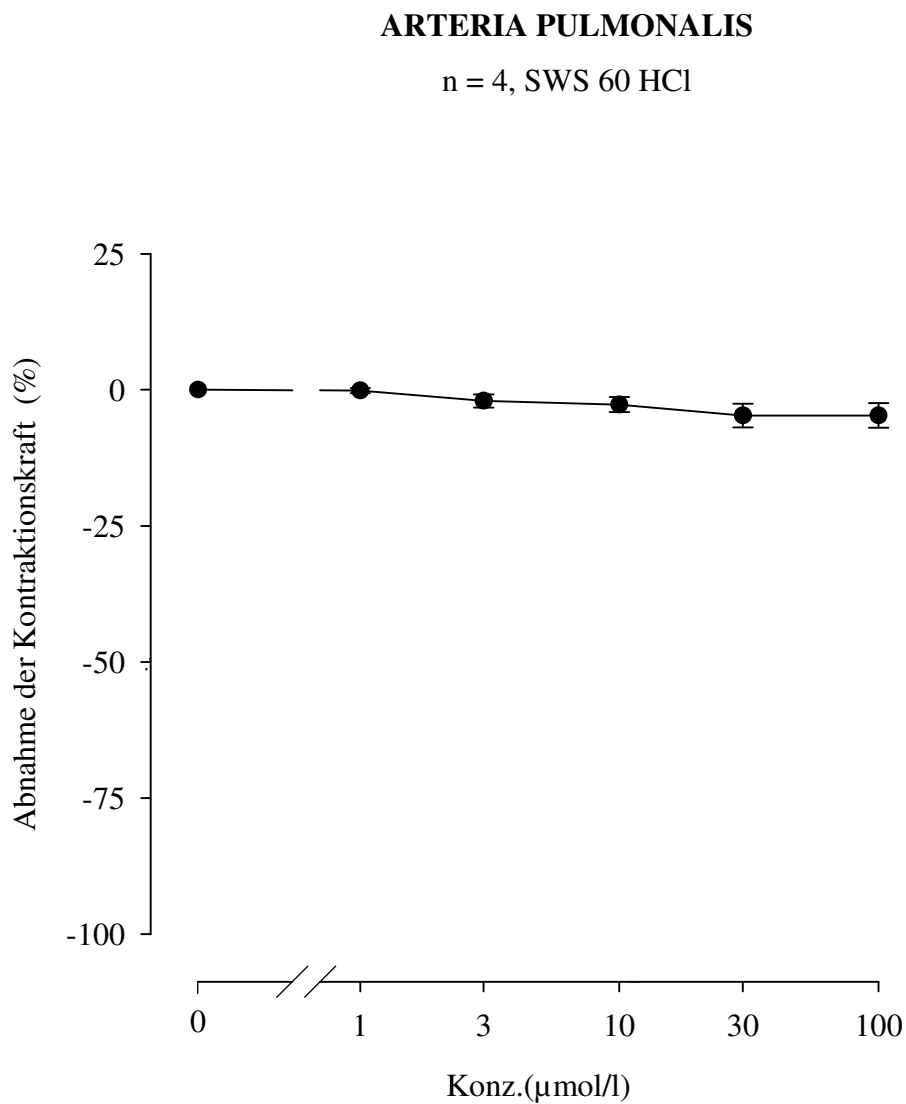


Abbildung 4.7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 60 HCl an der Lungenarterie

Abbildung 4.8 repräsentiert die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 60 HCl auf die Lungenarterie. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen stellen die Equilibrierungsphase von 45 min dar.

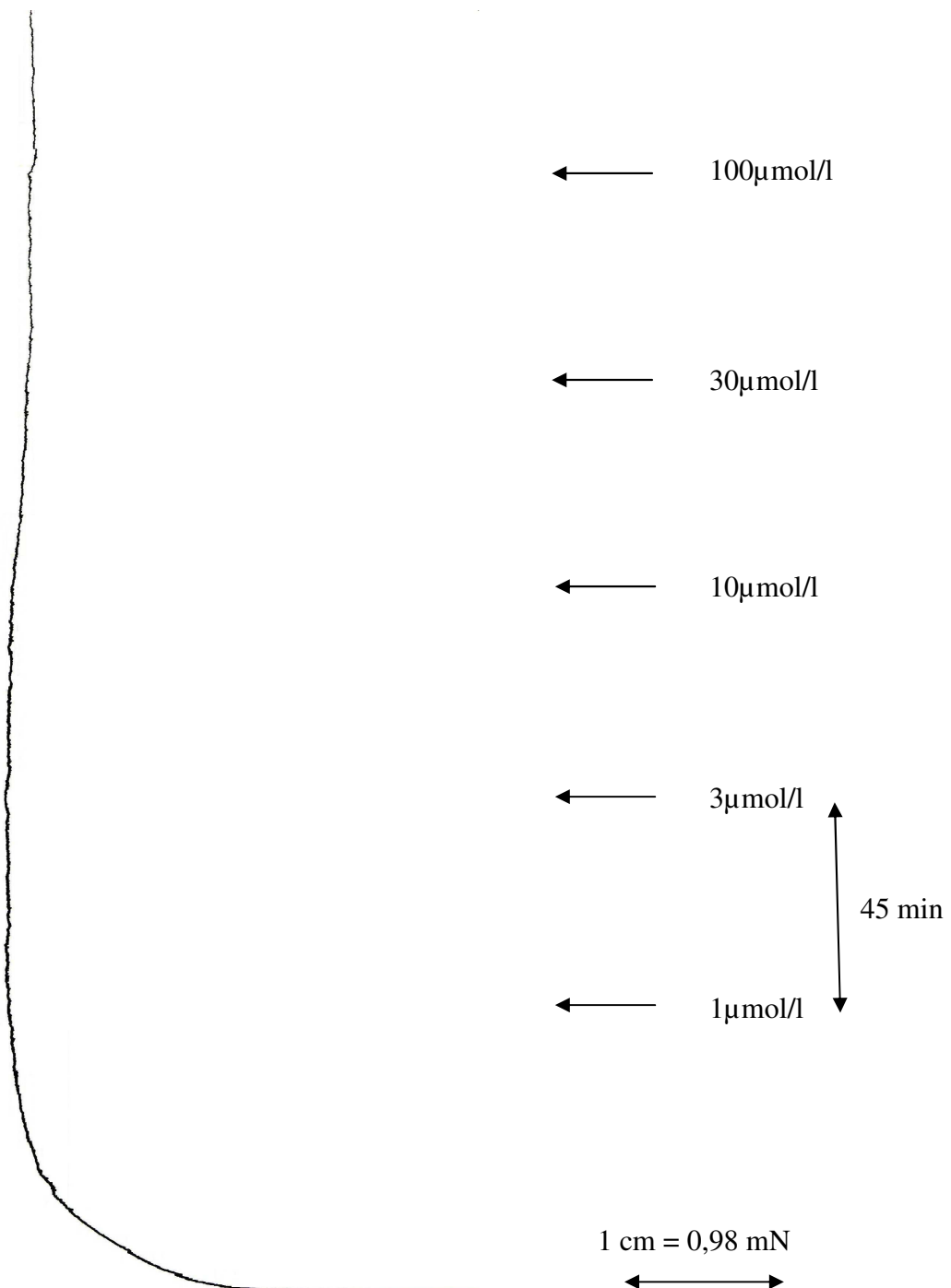


Abbildung 4.8: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 60 HCl auf die Lungenarterie

4.1.5 Terminales Ileum

Eine mögliche spasmolytische Wirkung von SWS 60 HCl auf die glatte Muskulatur des Darms wurde mit sechs Versuchen getestet. Der Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.3 erläutert.

Für die Auswertung wurden erneut die arithmetischen Mittelwerte jeder Konzentration berechnet und ein Kontrollwert von $8,29 \pm 1,43$ mN bestimmt.

Nach der Zugabe von $3\mu\text{mol/l}$ konnte eine leichte spasmolytische Aktivität beobachtet werden, wobei allerdings keine EC50 erreicht wurde.

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den Darm zusammengefasst, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 60 HCl auf den Darm

SWS 60 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$8,29 \pm 1,43$	0 ± 0	6	-
1	$8,02 \pm 1,44$	$-3,83 \pm 1,24$	6	n.s.
3	$7,75 \pm 1,38$	$-6,92 \pm 2,89$	6	n.s.
10	$7,38 \pm 1,32$	$-11,20 \pm 3,76$	6	n.s.
30	$6,88 \pm 1,19$	$-16,49 \pm 4,49$	6	0,05
100	$6,19 \pm 1,10$	$-24,40 \pm 5,55$	6	0,05

Abbildung 4.9 zeigt den Einfluss von SWS 60 HCl auf den Dünndarm graphisch. Es kommt zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft, das heißt die Substanz besitzt eine leichte spasmolytische Aktivität. Auf der x-Achse ist wiederum die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft.

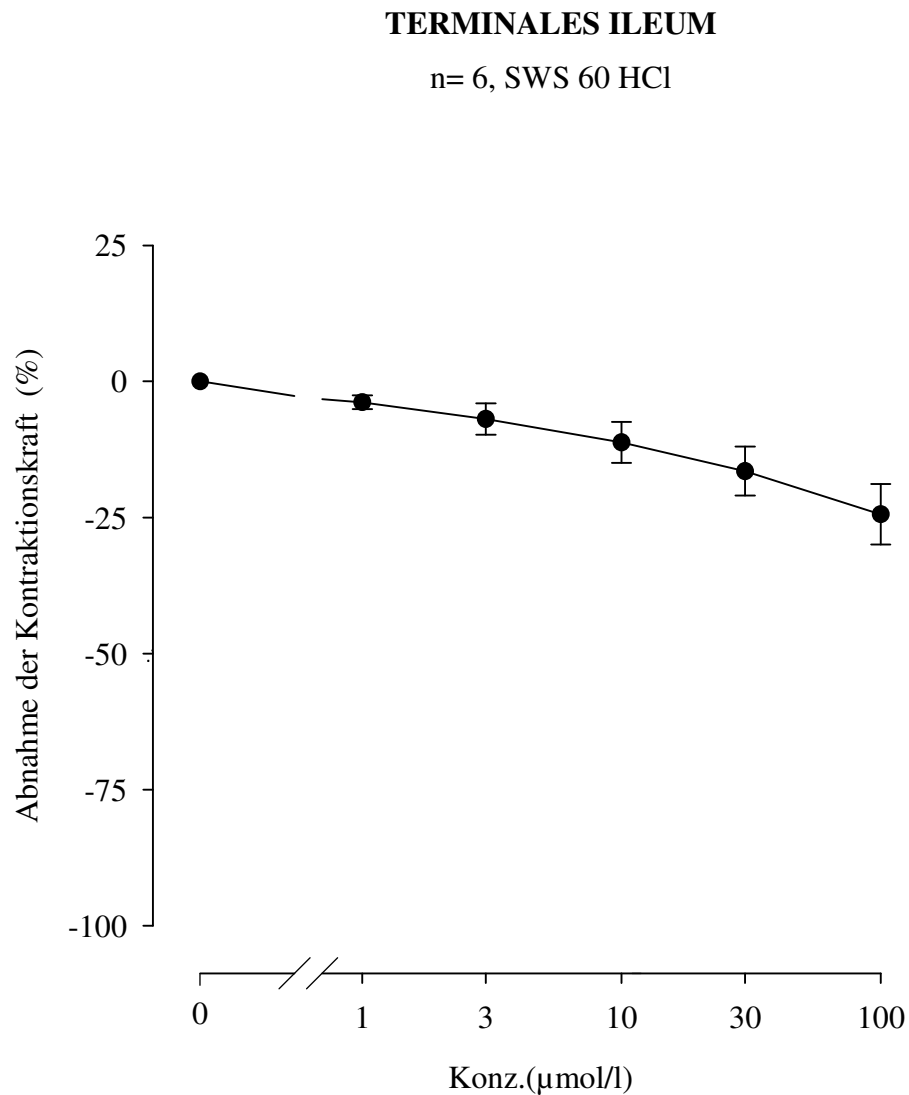


Abbildung 4.9: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 60 HCl am Dünndarm

Abbildung 4.10 stellt die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 60 HCl auf den Dünndarm dar. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen entsprechen den 45 min Equilibrierung.

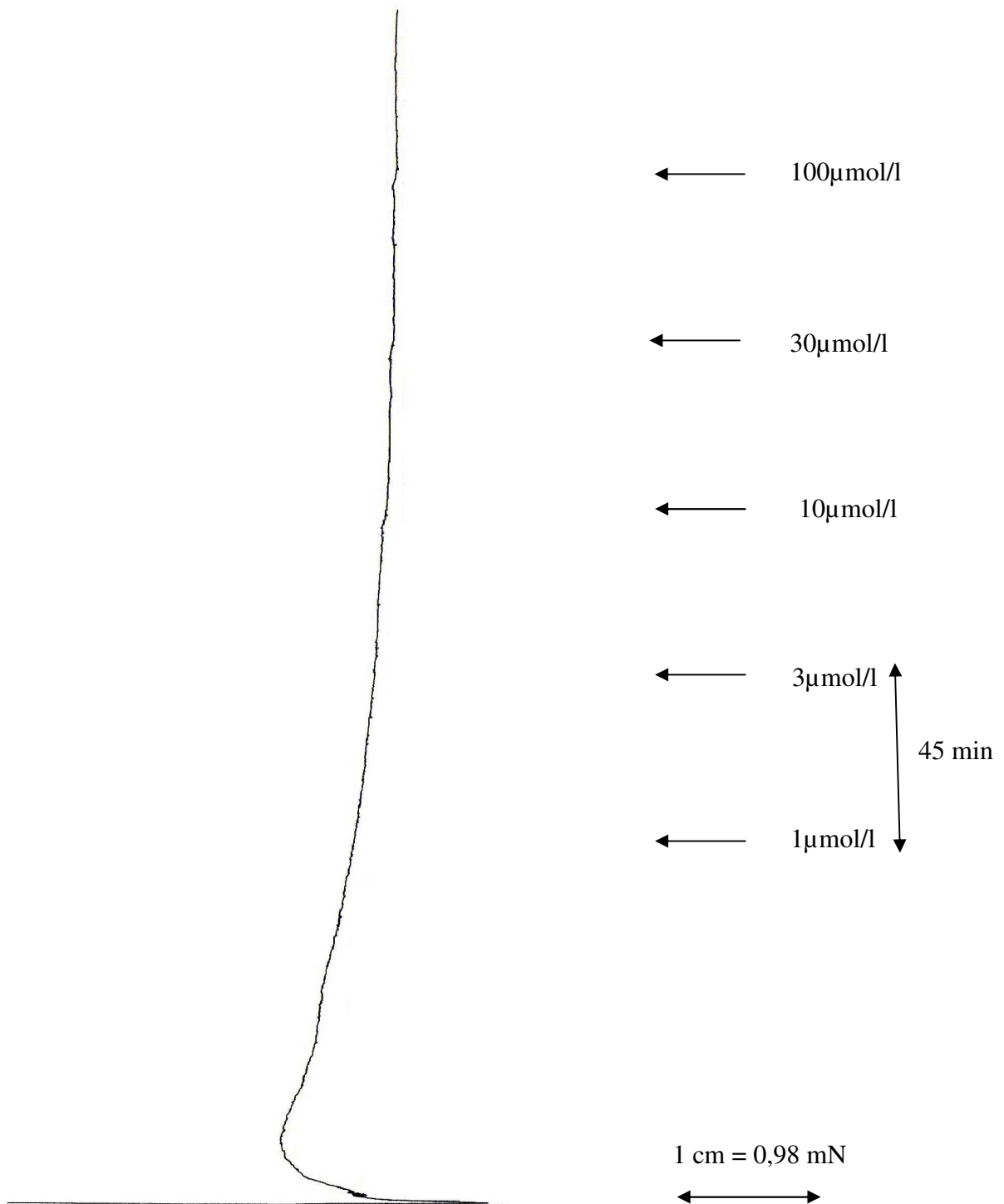


Abbildung 4.10: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 60 HCl auf den Dünndarm

4.2 ERGEBNISSE DER TESTSUBSTANZ SWS 51 HCl

4.2.1 Atrium cordis dexter

Die chronotrope Wirkung der Substanz SWS 51 HCl auf den rechten Vorhof wurde in vier Versuchen untersucht. Die genauen Versuchsvorschriften dafür finden sich in Kapitel 3.6.1.1.

Aus den aufgezeichneten Schlägen pro Minute wurde der arithmetische Mittelwert aus allen vier Versuchen ermittelt. Ein Kontrollwert von $210 \pm 7,36$ wurde festgelegt.

SWS 51 HCl zeigte ebenso wie SWS 60 HCl eine leichte positiv chronotrope Wirkung, die aber nicht signifikant war. Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den rechten Vorhof zusammen. F entspricht dem arithmetischen Mittelwert der Herzschläge pro Minute, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit P ist ebenfalls angegeben.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den rechten Vorhof

SWS 51 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	f $\pm$ SEM [x/min]	f $\pm$ SEM [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$210 \pm 7,36$	0 ± 0	4	-
1	$212,5 \pm 8,29$	$1,14 \pm 0,66$	4	n.s.
3	$220 \pm 9,79$	$4,71 \pm 2,15$	4	n.s.
10	$226,25 \pm 9,66$	$7,84 \pm 3,93$	4	n.s.
30	$230 \pm 9,13$	$9,69 \pm 4,15$	4	n.s.
100	$225 \pm 12,91$	$7,24 \pm 5,74$	4	n.s.

Abbildung 4.11 stellt den Effekt von SWS 51 HCl auf die Chronotropie graphisch dar. Auf der x-Achse wurden die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in %. Die Punkte symbolisieren die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen, die Balken geben die Größe des Standardfehlers an.

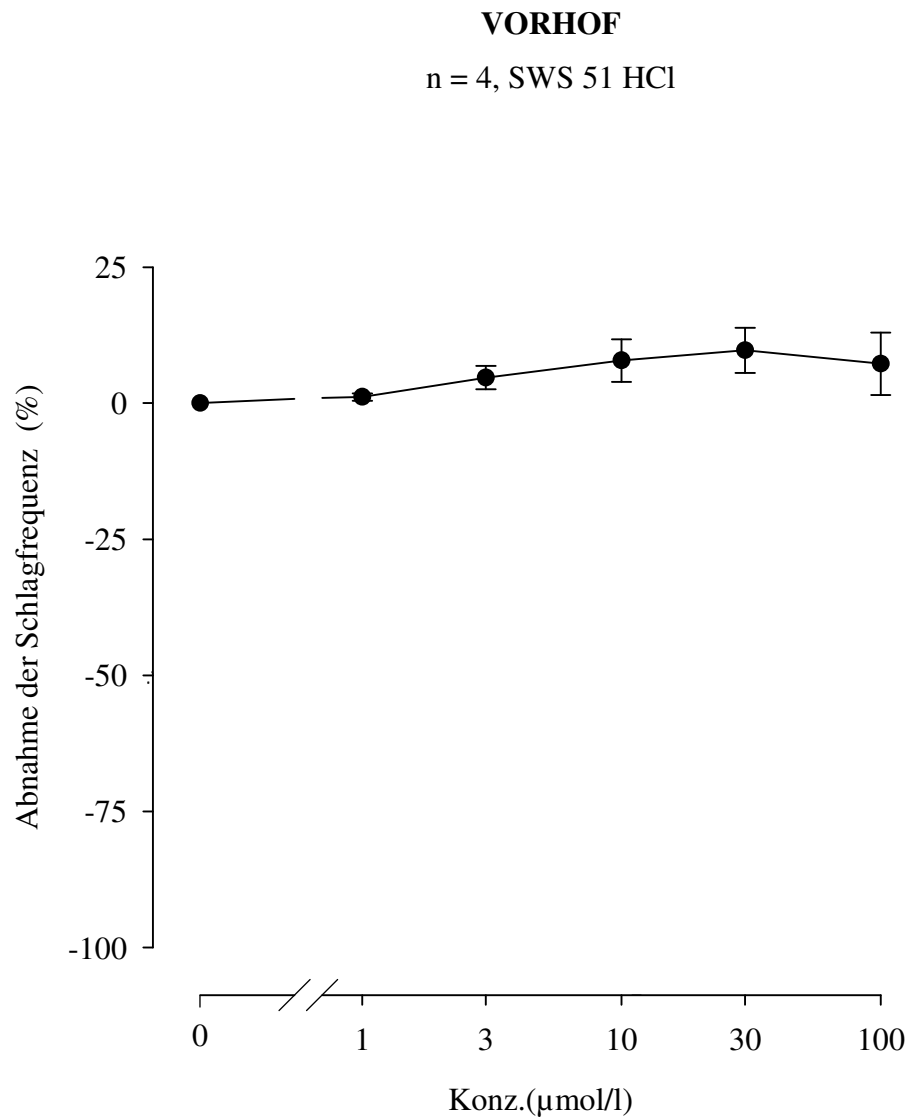


Abbildung 4.11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 51 HCl am rechten Vorhof

Abbildung 4.12 zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers der chronotropen Wirkung von SWS 51 HCl.

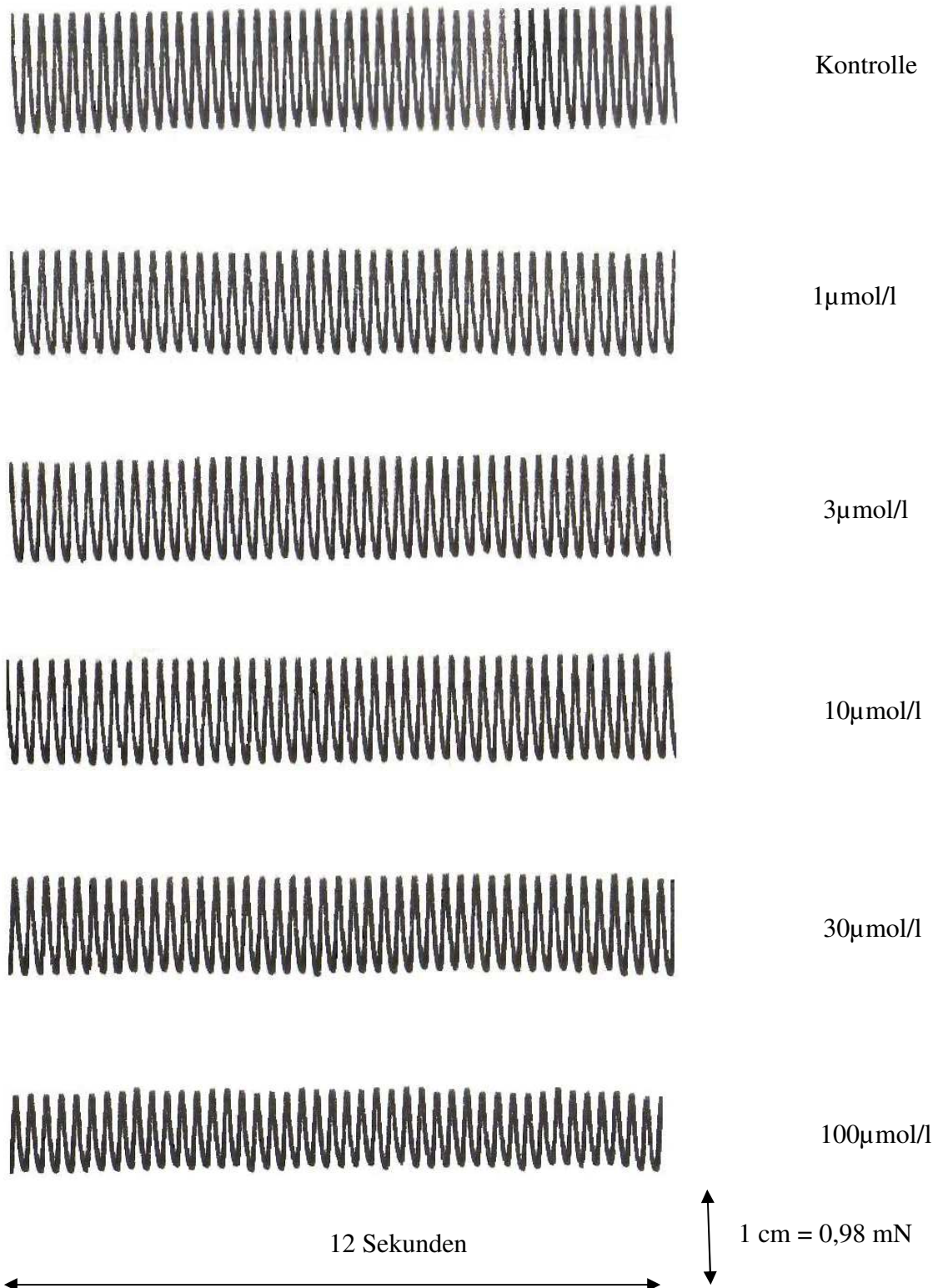


Abbildung 4.12: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von SWS 51 HCl

4.2.2 Musculus papillaris

Mögliche Veränderungen der Inotropie durch SWS 51 HCl wurden am Papillarmuskel in fünf verschiedenen Versuchen ermittelt. Näheres zur Durchführung der Versuche ist in Kapitel 3.6.1.2 zu finden.

Also Kontrollwert (0%) wurde $1,33 \pm 0,30$ mN berechnet. Wie auch bei Substanz SWS 60 HCl wurde eine leichte negativ inotrope Wirkung festgestellt, es wurde allerdings erneut keine EC_{50} erreicht.

In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den Papillarmuskel zusammengefasst, wobei f_c die Kontraktionskraft in mN und % darstellt, SEM den Standardfehler des Mittelwertes, n die Anzahl der Versuche und P die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den Papillarmuskel

SWS 51 HCl [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$1,33 \pm 0,30$	0 ± 0	5	-
1	$1,31 \pm 0,30$	$-1,78 \pm 1,09$	5	n.s.
3	$1,28 \pm 0,34$	$-7,05 \pm 4,70$	5	n.s.
10	$1,19 \pm 0,32$	$-14,05 \pm 4,88$	5	n.s.
30	$1,08 \pm 0,29$	$-22,06 \pm 5,46$	5	0,05
100	$1,0 \pm 0,27$	$-26,0 \pm 5,02$	5	0,05

Abbildung 4.13 zeigt die inotrope Wirkung graphisch als Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die x-Achse bezeichnet dabei die Konzentration der Substanz in $\mu\text{mol/l}$, die y-Achse veranschaulicht die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

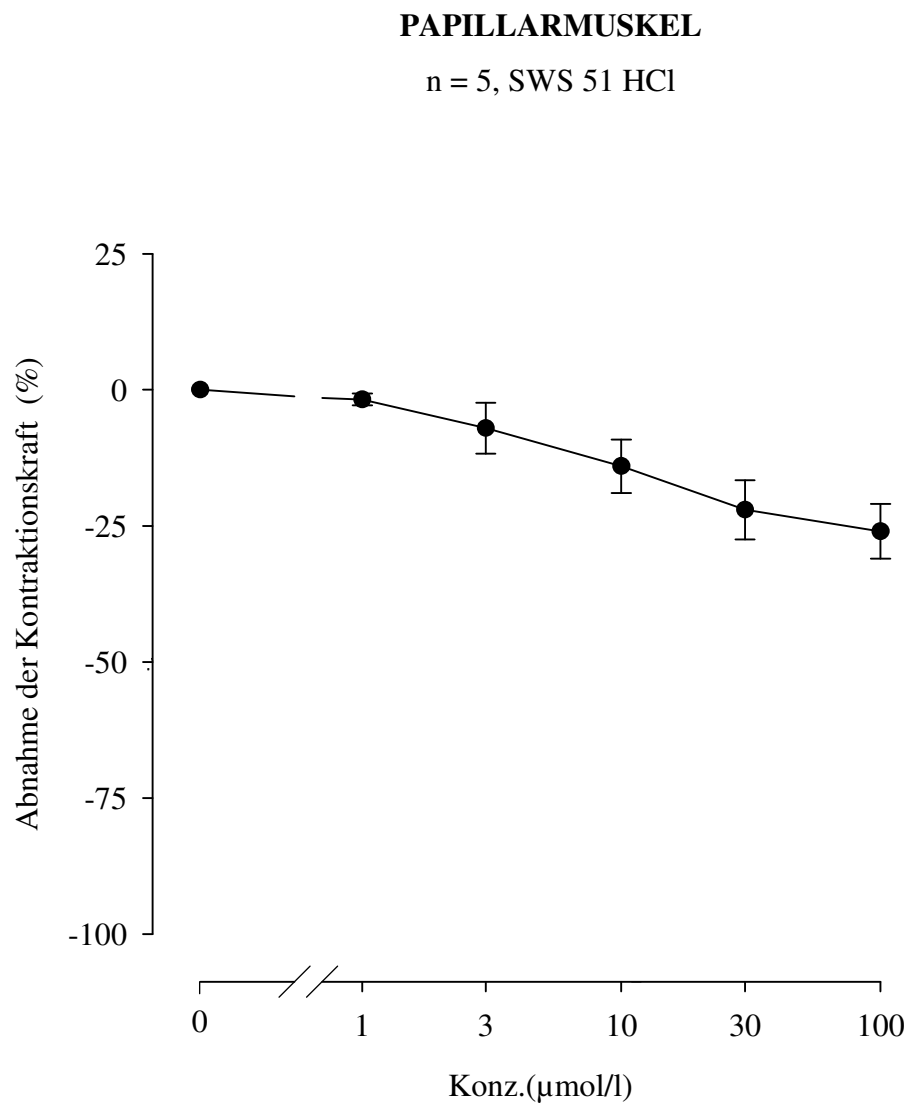


Abbildung 4.13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 51 HCl am Papillarmuskel

In Abbildung 4.14 sind die Originalaufzeichnungen des Schreibers der inotropen Wirkung von SWS 51 HCl zu sehen. Ein cm der Amplitude entsprechen 0,98 mN.

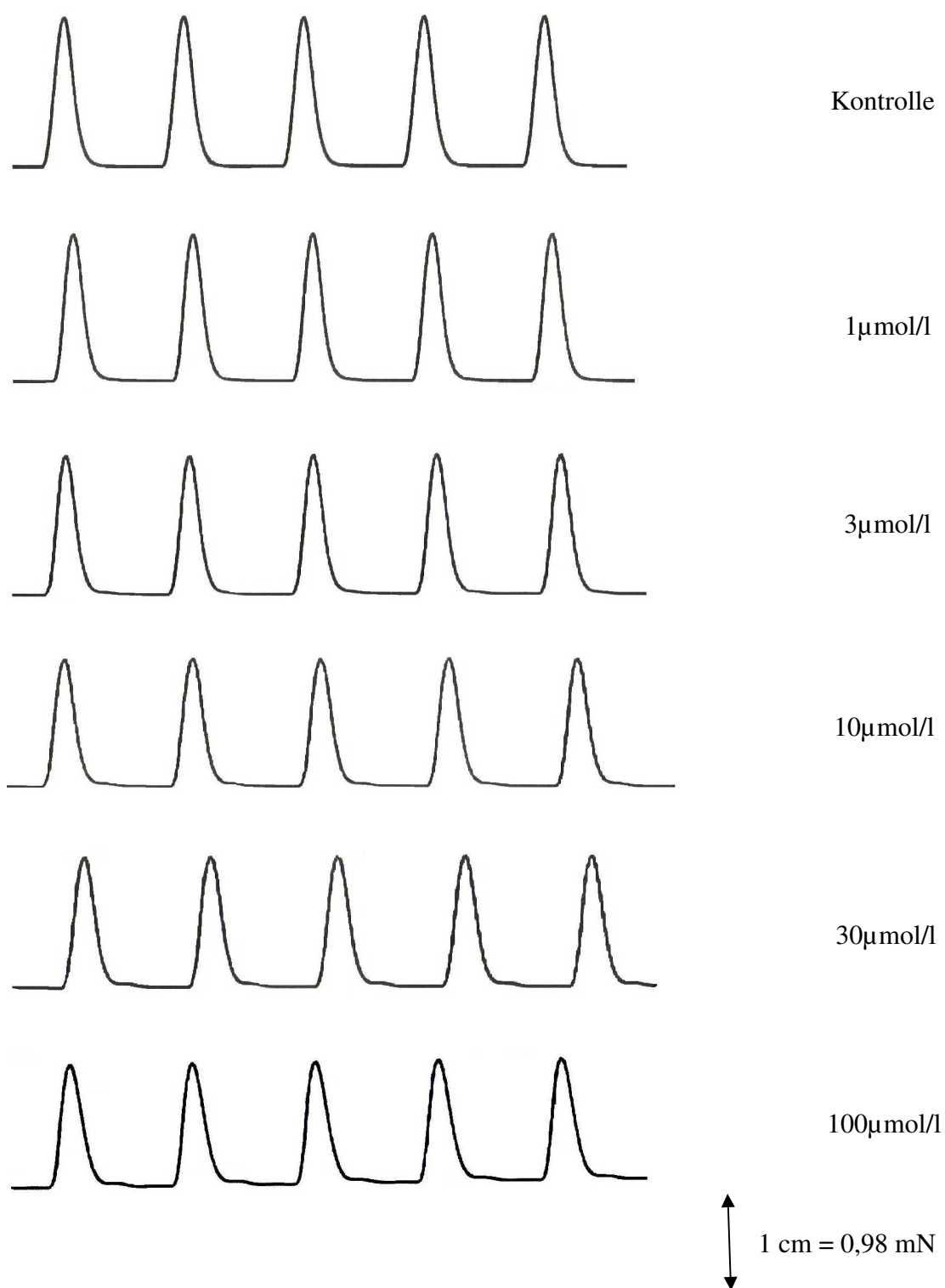


Abbildung 4.14: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von SWS 51 HCl

4.2.3 Aorta descendens

Um eine potentielle vasodilatierende Wirkung an der Aorta zu finden, wurden fünf Versuche mit SWS 51 HCl nach den Vorschriften in Kapitel 3.6.1.4 durchgeführt.

SWS 51 HCl besitzt kaum einen Effekt auf die Aorta, ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine ganz schwache dilatierende Wirkung festgestellt, allerdings weit entfernt von einer EC_{50} . Der Kontrollwert wurde mit $8,99 \pm 1,38 \text{ mN}$ festgelegt.

Tabelle 4.8 fasst die Ergebnisse von SWS 51 HCl auf die Aorta zusammen, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen in mN und % entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche, und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 51 HCl auf die Aorta

SWS 51 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$8,99 \pm 1,38$	0 ± 0	5	-
1	$9,02 \pm 1,40$	$0,26 \pm 1,06$	5	n.s.
3	$8,94 \pm 1,44$	$-0,88 \pm 2,13$	5	n.s.
10	$8,75 \pm 1,44$	$-3,08 \pm 2,88$	5	n.s.
30	$8,46 \pm 1,44$	$-6,58 \pm 3,42$	5	n.s.
100	$8,24 \pm 1,48$	$-9,39 \pm 4,36$	5	n.s.

Abbildung 4.15 stellt die Wirkung von SWS 51 HCl auf die Aorta graphisch dar. Es wurde eine sehr geringe vasodilatierende Wirkung gefunden. Die x-Achse bezeichnet die jeweiligen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

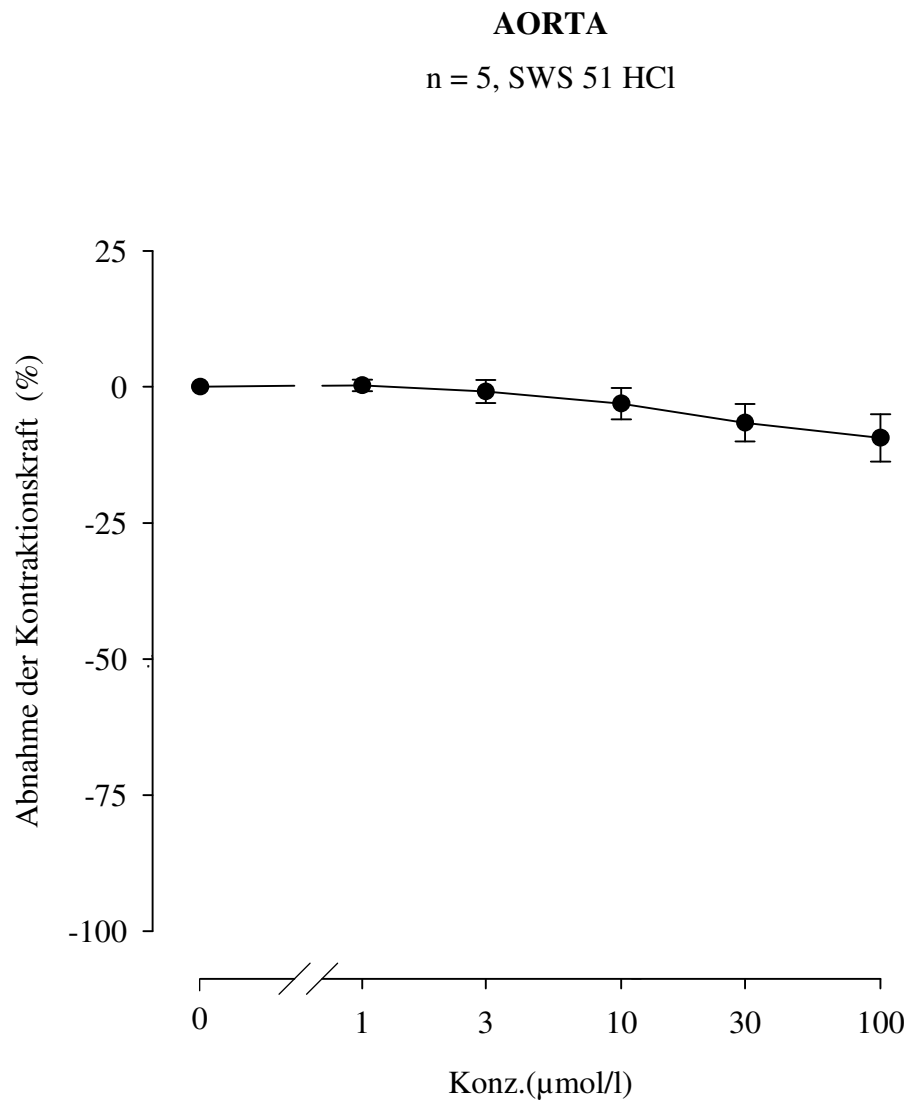


Abbildung 4.15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 51 HCl an der Aorta

Abbildung 4.16 ist die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 51 HCl auf die Aorta zu entnehmen. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen stellen den Equilibrierungszeitraum von 45 min dar.

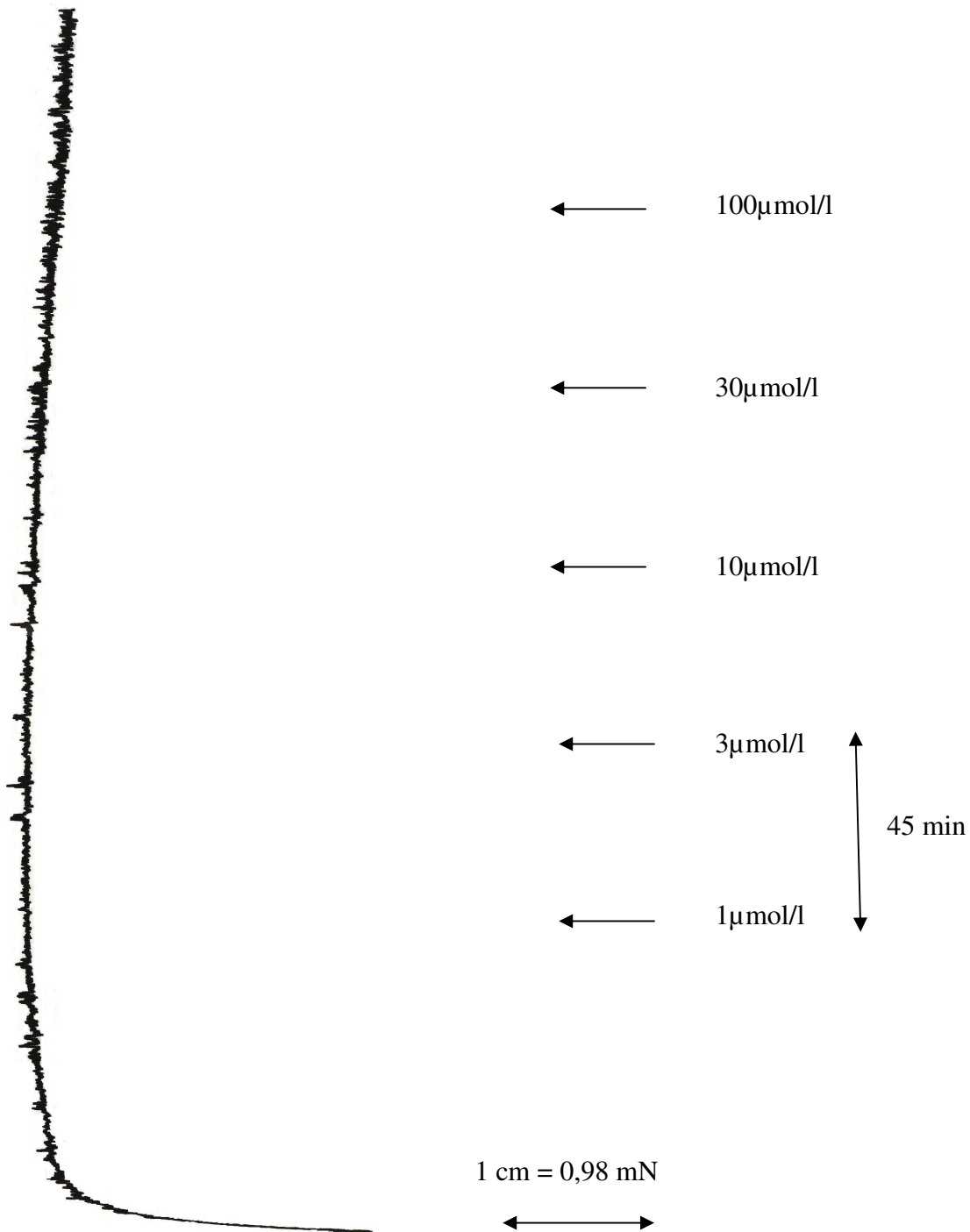


Abbildung 4.16: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 51 HCl auf die Aorta

4.2.4 Arteria pulmonalis

Auch an der Lungenarterie wurde eine mögliche dilatierende Wirkung der glatten Gefäßmuskulatur durch SWS 51 HCl untersucht. Der exakte Versuchsablauf der fünf durchgeführten Versuche wurde schon in Kapitel 3.6.1.5 erläutert.

Für die Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte jeder Konzentration berechnet und ein Kontrollwert von $12,03 \pm 2,01$ mN bestimmt.

Die Substanz SWS 51 HCl besitzt, ebenso wie SWS 60 HCl, keine dilatierenden Eigenschaften auf die Lungenarterie. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse von SWS 51 HCl auf die Lungenarterie zusammengefasst, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen in mN und % entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.9: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 51 HCl auf die Lungenarterie

SWS 51 HCl [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$12,03 \pm 2,01$	0 ± 0	5	-
1	$11,99 \pm 1,99$	$-0,31 \pm 0,22$	5	n.s.
3	$11,86 \pm 1,95$	$-1,14 \pm 1,17$	5	n.s.
10	$11,58 \pm 1,88$	$-3,16 \pm 1,73$	5	n.s.
30	$11,41 \pm 1,83$	$-4,51 \pm 1,99$	5	n.s.
100	$11,07 \pm 1,78$	$-7,20 \pm 2,40$	5	n.s.

Abbildung 4.17 stellt den Effekt von SWS 51 HCl auf die Lungenarterie graphisch dar. Die x-Achse bezeichnet die jeweiligen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

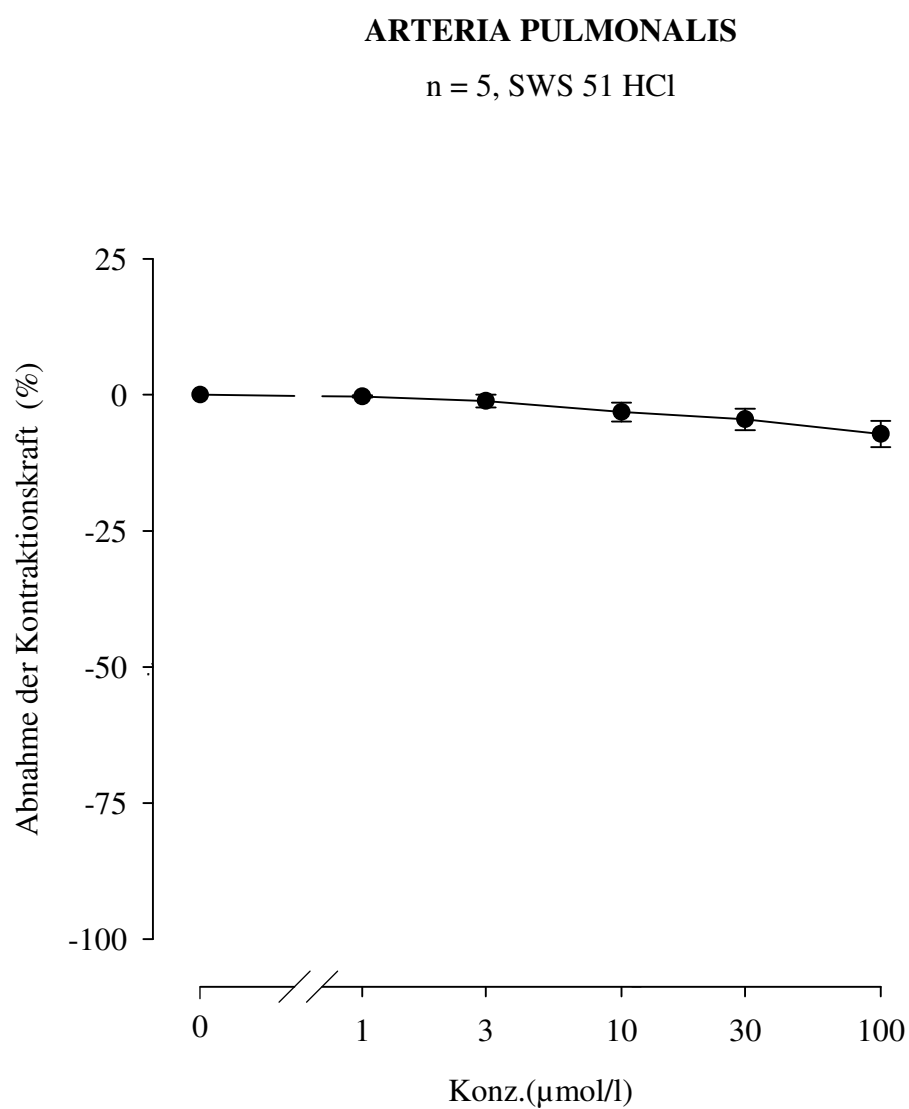


Abbildung 4.17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 51 HCl an der Lungenarterie

Abbildung 4.18 repräsentiert die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 51 HCl auf die Lungenarterie. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen zeigen die Equilibrierungsphase von 45 min.

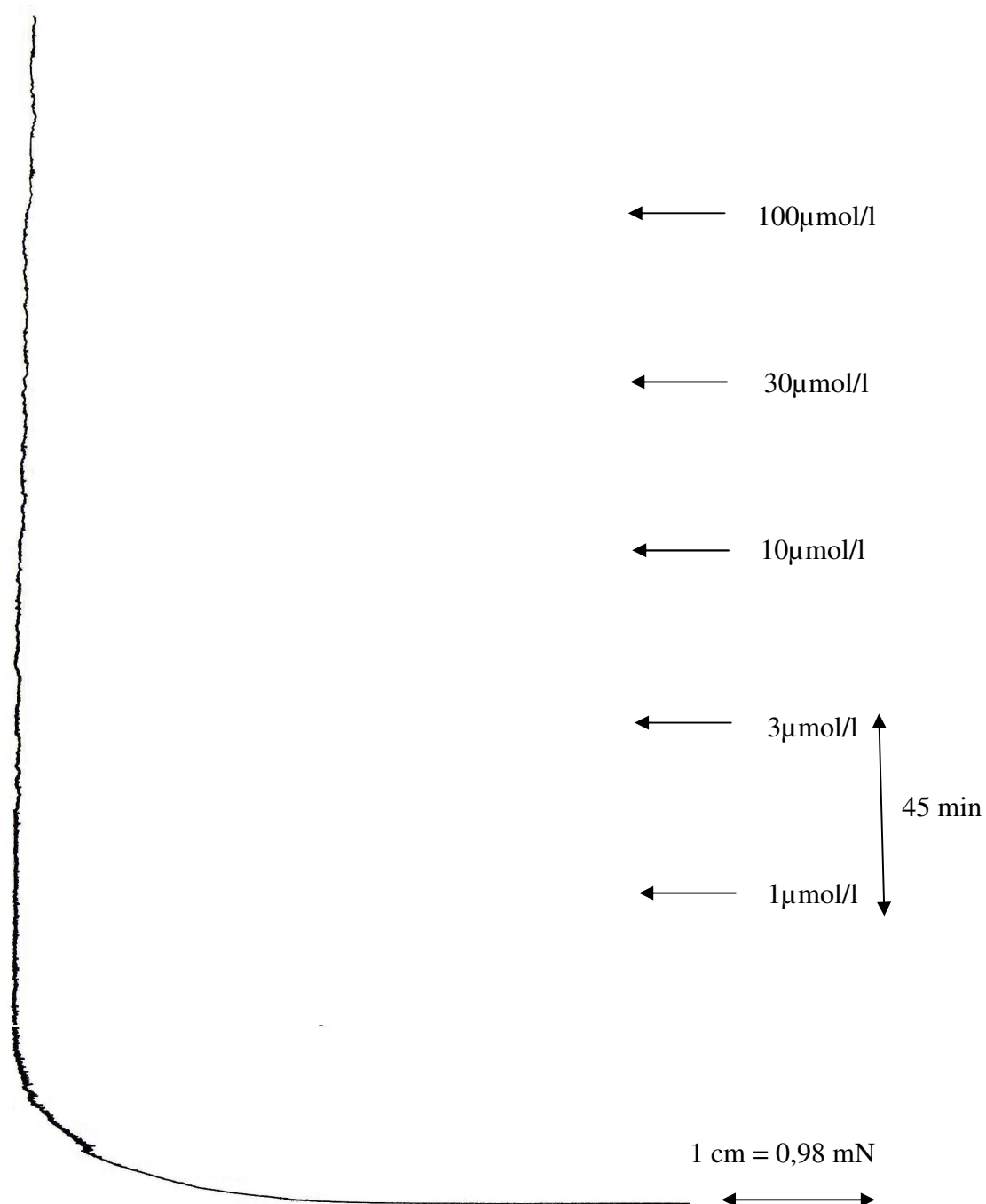


Abbildung 4.18: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 51 HCl auf die Lungenarterie

4.2.5 Terminales Ileum

Die spasmolytische Wirkung von SWS 51 HCl wurde mit fünf Versuchen näher untersucht. Der genaue Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.3 beschrieben.

Zur Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte jeder Konzentration berechnet und ein Kontrollwert von $7,36 \pm 0,87$ mN berechnet.

Bereits nach der Zugabe von $1\mu\text{mol/l}$ war eine leichte spasmolytische Aktivität von SWS 51 HCl ersichtlich. Nach $100\mu\text{mol/l}$ ist eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft sichtbar. Diese Aktivität war ein wenig ausgeprägter als bei der Substanz SWS 60 HCl. Es wurde allerdings wieder keine EC_{50} erreicht.

Tabelle 4.10 fasst die Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den Darm zusammen, wobei f_c dem arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Konzentrationen in mN und % entspricht, SEM dem Standardfehler des Mittelwertes, n der Anzahl der Versuche und P der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Ergebnisse von SWS 51 HCl auf den Darm

SWS 51 HCl [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche [n]	Irrtums- wahrscheinlichkeit [P]
Kontrolle	$7,36 \pm 0,87$	0 ± 0	5	-
1	$6,93 \pm 0,84$	$-5,98 \pm 1,17$	5	n.s.
3	$6,40 \pm 0,82$	$-13,33 \pm 2,65$	5	n.s.
10	$5,94 \pm 0,75$	$-19,27 \pm 3,92$	5	0,05
30	$5,49 \pm 0,72$	$-25,48 \pm 3,89$	5	0,01
100	$4,65 \pm 0,72$	$-37,38 \pm 4,42$	5	0,01

Abbildung 4.19 zeigt den Einfluss von SWS 51 HCl auf den Dünndarm in Form einer Graphik. Die geringfügige Abnahme der Kontraktionskraft ist auf eine leichte spasmolytische Aktivität von SWS 51 HCl zurückzuführen. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft.

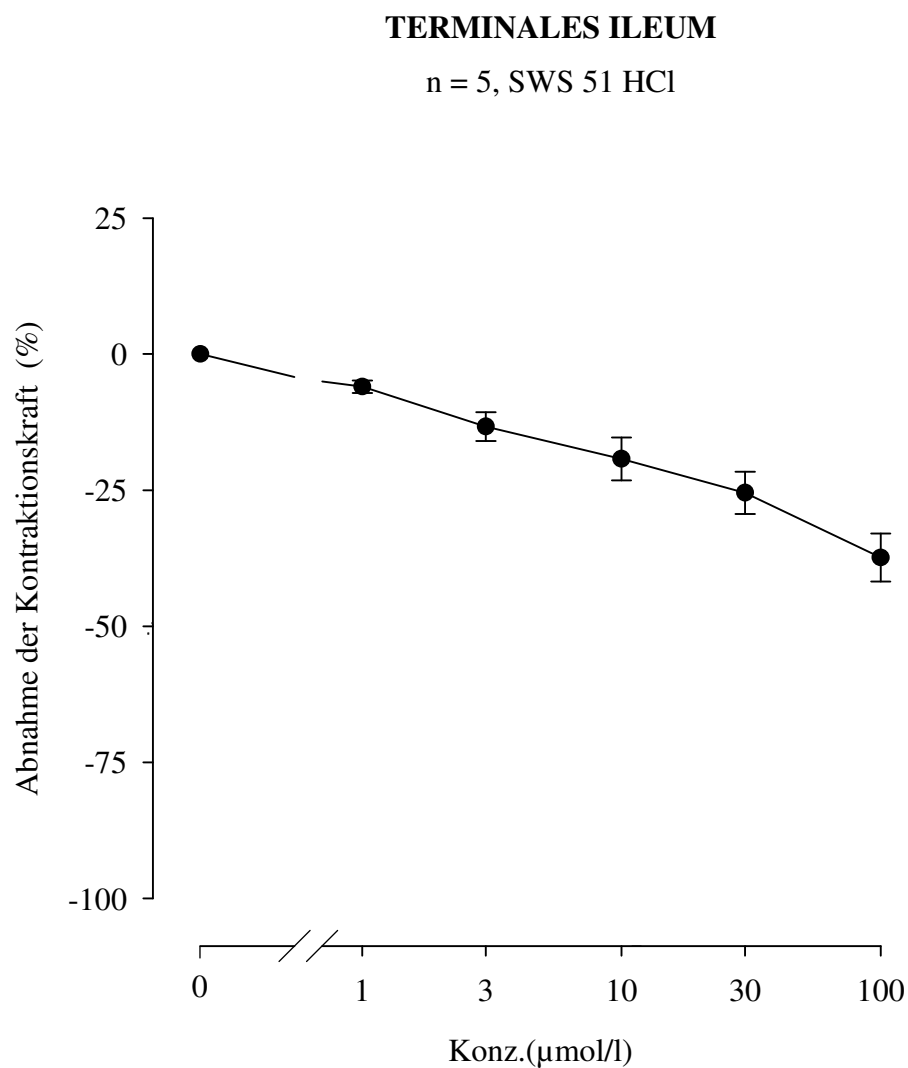


Abbildung 4.19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS 51 HCl am Darm

Abbildung 4.20 stellt die Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von SWS 51 HCl auf den Dünndarm dar. Die Pfeile markieren die jeweiligen Zeitpunkte der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen entsprechen den 45 min Equilibrierung.

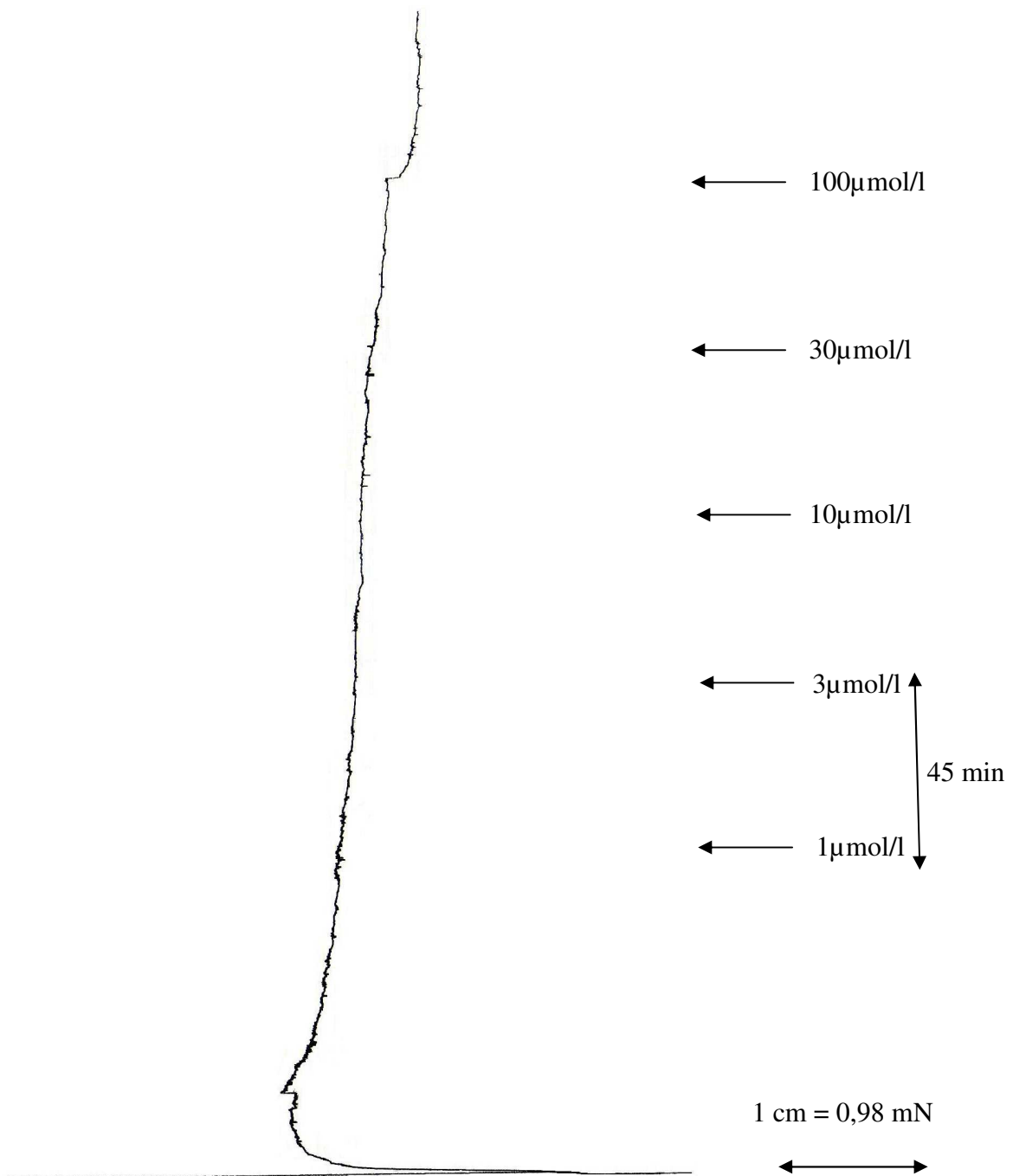


Abbildung 4.20: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 51 HCl auf den Darm

4.3 ANALYSE DES WIRKMECHANISMUS VON SWS 51 HCL AUF DIE AORTA

Weder SWS 60 HCl noch SWS 51 HCl besaßen eine signifikante Wirkung auf ein isoliertes Organ von Meerschweinchen. Eine Wirkung liegt dann vor, wenn ein EC_{50} von unter $30 \mu\text{mol/l}$ erreicht wird, dies war bei keinem Versuch der Fall.

Daher konnte in weiterer Folge auch keine Analyse des Wirkmechanismus stattfinden. Für diese Analyse werden typischerweise die Antagonisten Nitro-L-Arginin, Glibenclamid und Phenylephrin verwendet um eine Beteiligung der NO-Synthase, der K_{ATP} -Kanäle und der α -Adrenorezeptoren zu eruieren.

In diesem Fall wurde eine Acetylcholinesterase eingesetzt, da bei der H_2S Abspaltung sowohl hydrolytische als auch enzymatische Vorgänge diskutiert werden. Es wurde allerdings nur ein Versuch durchgeführt, der keine Wirkung gezeigt hat, das heißt es war auch nach der Enzymzugabe keine Dilatation der Aorta zu beobachten.

5 DISKUSSION

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von zwei neu synthetisierten potentiellen Schwefelwasserstoff-Donatoren, SWS 60 HCl und SWS 51 HCl, an isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht.

In Kapitel 4 wurden die Ergebnisse bereits präsentiert und ausgewertet, in diesem Kapitel sollen die gewonnenen Ergebnisse nun bewertet und diskutiert werden. Hierfür kann man die Organe der glatten Muskulatur denen der quergestreiften Muskulatur gegenüber stellen.

SWS 60 HCl ist im Vergleich zu SWS 51 HCl die eher inaktive Substanz. Das ist schon alleine dadurch bedingt, dass SWS 60 HCl gar kein Schwefelatom besitzt, und somit auch keine H_2S Freisetzung stattfinden kann.

Versuche mit dieser Art von Substanz sind aber trotzdem wichtig, um sicherzustellen, dass eine mögliche Wirkung auf die isolierten Meerschweinchenorgane wirklich nur auf den beteiligten Schwefel, bzw. H_2S zurückzuführen ist und nicht auf eine andere strukturelle Komponente der Substanzen oder gar auf die Versuchsbedingungen. Bei SWS 60 HCl wäre nämlich auch eine Kohlenstoffmonoxid (CO) Freisetzung möglich.

CO gehört neben NO zu den wichtigsten Signalmolekülen im menschlichen Körper. Es übt vielfältige Effekte aus wie Hemmung der Thrombozytenaggregation, Proliferationshemmung der glatten Muskelzellen, es besitzt anti-apoptotische Eigenschaften und wirkt als Neurotransmitter (Li und Moore, 2007). Weiters vermittelt CO genauso wie NO Vasodilatation über eine Erhöhung der zellulären cGMP Aktivität und über die Stimulation von K_{Ca} Kanälen in vaskulären glatten Muskelzellen (Zhao et. al., 2001). Den Hauptangriffspunkt für NO und CO stellt aber die lösliche Guanylatcylase dar, sie wird von den beiden Gasen aktiviert, das führt zum Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration (Hobbs, 1997). NO und CO können aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen freigesetzt werden und direkt auf glatte Muskelzellen wirken (Zhao et. al., 2001).

Auf die glattemuskulären Organe besitzt SWS 60 HCl keine signifikante Wirkung, lediglich am Darm kam es zu einer leichten spasmolytischen Aktivität, die allerdings durch relativ große Standardabweichungen gekennzeichnet ist und auch in einem Verlust der Qualität der Darmpräparate über die Dauer der Versuche erklärt werden kann. Ein EC_{50} wurde nicht erreicht. Es war eine relativ kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft bis zu einem Abfall von $24,4 \pm 5,55 \%$ feststellbar. Eine ziemlich gleich bleibende Abnahme der Kontraktionskraft pro Zeiteinheit deutet wieder auf eine mangelnde Qualität der Präparate hin.

Am Herzen war sowohl eine leicht positiv chronotrope als auch eine leicht negativ inotrope Wirkung feststellbar. Die Schlagfrequenz erreichte bei einer Konzentration von $30\mu\text{mol/l}$ ihr Maximum mit einer Zunahme von $10,08 \pm 2,81 \%$, bei der höchsten Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ wurde wieder eine Abnahme beobachtet. Die Kontraktionskraft nahm bereits nach der Zugabe von $1\mu\text{mol/l}$ ab und sank rasch bis zu einer Konzentration von $30\mu\text{mol/l}$. Dort konnte eine Abnahme von $27,38 \pm 4,37 \%$ beobachtet werden, bei der weiteren Substanzzugabe auf eine Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ war lediglich eine geringfügige Abnahme um weitere 1% sichtbar. Beide Effekte waren aber wieder nicht signifikant und somit ebenfalls nicht weiter von Bedeutung.

Da nun keine vasodilatierenden Effekte mit SWS 60 HCl gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass CO nicht freigesetzt wurde, allerdings wurden in diese Richtung keine Untersuchungen durchgeführt. Es wäre natürlich vorstellbar, dass eine etwaige CO Freisetzung im verwendeten Versuchsaufbau gar nicht möglich ist, weil dafür andere Umgebungsbedingungen benötigt worden wären.

Betrachtet man nun SWS 51 HCl, so sehen der Ergebnisse nicht wesentlich anders aus als bei SWS 60 HCl, obwohl diesmal ein Schwefelatom im Molekül durchaus vorhanden war. Die Wirkung am Darm war allerdings etwas ausgeprägter.

Bei den Präparaten der glatten Muskulatur konnte wiederum nur eine geringe bis gar keine Wirkung bezüglich der Vasodilatation festgestellt werden. Die stärkste Wirkung war noch am Darm zu beobachten, mit einer maximalen Abnahme der Kontraktionskraft von $37,38 \pm 4,42 \%$, ein EC_{50} wurde aber nicht erreicht. An der Aorta

wurde eine vergleichsweise schwache Wirkung gefunden mit einer maximalen Abnahme von $9,39 \pm 4,36 \%$, ebenso an der Lungenarterie.

Die Herzmuskelpräparate verhielten sich ident mit denen der Substanz SWS 60 HCl. Am rechten Vorhof war die Zahl der Herzschläge bei einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ am höchsten mit $9,69 \pm 4,15 \%$, bei weiterer Substanzzugabe kam es zu einer Abnahme der Chronotropie. Am Papillarmuskel war eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft bis auf $26,0 \pm 3,02 \%$ zu verzeichnen.

Im Folgenden soll nun eruiert werden, warum es mit der Substanz SWS 51 HCl zu keiner signifikanten Wirkung kam, obwohl ein Schwefelatom im Molekül vorhanden war und somit eine H_2S -Abspaltung eigentlich erfolgen sollte.

Eine erste Vermutung wäre, dass es an der Struktur des Moleküls liegt und der Schwefel einfach zu stark gebunden ist um freigesetzt zu werden. Die Carbothio-Gruppe ist an beiden Seiten an ein Stickstoffmolekül gebunden, die C-N Bindung besitzt eine Bindungsenergie von 293 kJ/mol . In anderen SWS-Verbindungen, die eine Wirkung besitzen, liegt eine Carbothionat-Gruppe vor, die Bindungsenergie einer C-O Bindung beträgt 335 kJ/mol und wäre somit stärker als bei C-N. Die tatsächliche Stärke einer Bindung in einem Molekül hängt aber letzten Endes von der Struktur des Gesamt-moleküls ab (Mortimer und Müller, 2003). Diese Theorie würde auch von der Tatsache unterstützt werden, dass am Darm bei der Zugabe von $100 \mu\text{mol/l}$ eine kurze aber deutliche Abnahme der Kontraktionskraft sichtbar ist. Dies lässt darauf schließen dass entweder zu wenig H_2S abgespalten wird, oder zu wenig vorhanden ist um eine signifikante Wirkung auszulösen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nicht wie bisher vermutet H_2S alleine verantwortlich für die dilatierende Wirkung ist, sondern auch Carbonylsulfid (COS), das sich natürlich im Fall von SWS 51 HCl nicht bilden kann, weil kein Sauerstoffatom im Molekül vorhanden ist. Dieser Theorie widersprechen allerdings die Publikationen von zahlreichen anderen Gruppen, wo H_2S als der zentrale Vasodilatator angesehen wird und die Freisetzung auch zum Beispiel photometrisch bewiesen wurde (Linden et. al., 2008, Zhao et. al., 2001, Elrod et. al., 2007, Li et. al., 2008).

So zeigten bereits 1997 Hosoki et.al. dass H_2S die Aorten von Ratten in vitro relaxiert (Hosoki et. al., 1997). Die zellulären Mechanismen der H_2S Wirkung sind allerdings bis heute nicht ganz geklärt. 2001 wurde die Rolle der K_{ATP} -Kanäle in diesem Zusammenhang als wichtigster Angriffspunkt identifiziert (Zhao et. al., 2001). Aber auch über eine Beteiligung von anderen Systemen, insbesondere des NO-Systems, ist man sich sicher (Elsey et al., 2010).

Einer Gruppe gelang es, in lebendem Hirngewebe und Darmgewebe von Mäusen H_2S zu produzieren, freizusetzen und zu detektieren (Linden et. al., 2008).

Li et.al. synthetisierten ebenfalls ein H_2S freisetzendes Molekül (Li et. al., 2008). Die meisten zurzeit zur Verfügung stehenden H_2S Donatoren sind einfache Sulfid Salze, meisten Natriumhydrogensulfid (NaHS), die H_2S sofort in wässriger Umgebung freisetzen. Li et. al. postulierten allerdings, dass die H_2S Freisetzung im biologischen Gewebe sowohl in viel kleineren Mengen als auch viel langsamer vonstatten geht und daher diese Salze der ursprünglichen physiologischen Rolle überhaupt nicht gerecht werden. Sie stellten daher eine Verbindung her, die H_2S über längere Zeit und langsam sowohl in vitro als auch in vivo freisetzt. Der entsprechende vasodilatierende und blutdrucksenkende Effekt wurde an der Aorta und Niere von Ratten gezeigt (Li et. al., 2008).

Laggner et. al. zeigten, dass H_2S in der Lage ist, das Angiotensin-converting enzyme (ACE) direkt zu hemmen, und zwar durch Bindung an das Zink Ion im aktiven Zentrum des Enzyms. Somit kommt der blutdrucksenkende Effekt des H_2S nicht nur über Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zustande, sondern auch über eine verminderte Angiotension II Produktion und über die Hemmung des Bradykinin Abbaus (Laggner et. al., 2007).

Eine große Anzahl von Studien hat sich auch mit den protektiven Eigenschaften von H_2S im Rahmen einer myocardialen Beeinträchtigung beschäftigt (Elrod et. al., 2007). So vermindert eine Vorbehandlung mit NaHS myocardiale Verletzungen in isolierten Rattenherzen, die einer kardialen Ischämie-Reperfusion unterworfen waren (Johansen et. al., 2006). Auch in vivo kam es nach der Verabreichung eines H_2S -Donors zu einer 25%-igen Reduktion der Größe des Myokardinfarkts (Sivarajah et.al., 2006).

Zuletzt kann noch der Mechanismus der Abspaltung untersucht werden. Bis jetzt wurde generell angenommen, da die SWS-Substanzen wasserlöslich sind, dass sie ganz einfach hydrolytisch in Wasser zerfallen und das Gas dadurch freigesetzt wird. Nun wird aber auch eine mögliche enzymatische Abspaltung, die im menschlichen Körper in erster Linie durch Esterasen vonstattengehen soll, diskutiert. Eine nicht-Wirkung wäre daher in der vorliegenden Versuchsanordnung durch das Fehlen dieses Enzyms erklärt.

Um diese Theorie zu untermauern wurde im Rahmen der Diplomarbeit auch ein Versuch mit einer Acetylcholinesterase durchgeführt. Diese sollte theoretisch zur H_2S Abspaltung führen, und dieses wiederum die verwendete Aorta entspannen. In der Praxis allerdings konnte kein positives Ergebnis verzeichnet werden.

Man könnte nun natürlich kritisieren, dass aus einem einmalig durchgeführten Versuch noch kein allgemein gültiges Statement abgeleitet werden kann. Allerdings wurden diese Versuche mit dem Enzym auch von einem Kollegen durchgeführt, der damit ebenso wenig erfolgreich war, daher wurde von einer Vertiefung in diese Richtung abgesehen.

Acetylcholinesterase ist ein äußerst empfindliches Enzym, das in vivo sehr schnell wirkt (Müller-Esterl, 2004). Für ein Versagen bei der H_2S -Abspaltung gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Einerseits braucht Acetylcholinesterase einen optimalen pH Wert wie alle Enzyme, der in der vorliegenden Versuchsanordnung möglicherweise nicht gegeben war. Somit konnte das Enzym wahrscheinlich gar keine Wirkung entfalten und wurde sofort zersetzt.

Weiters wirkt AchE extrem schnell und hat somit nur eine kurze Wirkungsdauer. Beim durchgeführten Versuch wurde allerdings zuerst das Enzym zugefügt und nach 45 Minuten erst SWS 51 HCl dazugegeben. Somit hatte das Enzym praktisch kaum eine Chance mehr zu wirken.

Zuletzt muss auch noch festgehalten werden, dass AchE in vivo unter Wasseranlagerung zur Spaltung einer Esterbindung führt. Bei der Substanz SWS 51

HCl liegt allerdings kein Ester vor, das heißt das Enzym hätte eigentlich gar keinen optimalen Angriffspunkt an diesem Substrat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass weder SWS 60 HCl noch SWS 51 HCl eine signifikante Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen ausgelöst haben, wobei SWS 51 HCl eine kleine Wirkung am Darm zeigte. Warum es bei SWS 51 HCl zu keiner Wirkung kam kann nur vermutet werden. Der Einsatz einer bakteriellen Esterase führte ebenfalls zu keiner Wirkung.

Um sich über die Rolle von Esterasen in diesem Zusammenhang klar zu werden, sind auf jeden Fall weitere Untersuchungen nötig. So sollte der Einsatz von Spezies spezifischen Esterasen diskutiert werden, da Enzyme im Allgemeinen eigentlich nur bei der Spezies eine Wirkung zeigen, von der sie auch physiologisch synthetisiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz eines Serums, bevorzugt natürlich menschlicher Natur, das unter anderem einen großen Pool an Esterasen enthält, die womöglich in der Lage wären, eine H_2S -Abspaltung herbeizuführen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von zwei potentiellen Schwefelwasserstoff freisetzenden Verbindungen, SWS 60 HCl und SWS 51 HCl, auf bestimmte isolierte Organe von Meerschweinchen. Im Idealfall sollte eine EC_{50} erreicht werden, also die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.

Für die Testung der Substanzen wurden einerseits Organe mit glatter Muskulatur, nämlich Aorta, Dünndarm und Lungenarterie, andererseits Organe mit quergestreifter Muskulatur, und zwar der rechte Vorhof und Papillarmuskel, verwendet. Mithilfe von isometrischen Kontraktionsmessungen wurden die dilatierenden, spasmolytischen, inotropen und chronotropen Effekte bestimmt.

Die einzelnen Organe wurden jeden Tag einem frisch getöteten Meerschweinchen entnommen und in eine physiologische Elektrolytlösung übergeführt, in der sie sich auch während der Versuche ständig befinden mussten. Die Testsubstanzen wurden in Wasser gelöst und nach einem kumulativen Schema in fünf verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Kam es nach der Substanzzugabe zu einer Veränderung, so wurde diese über den Kraftwandler und Verstärker am Flachbrettschreiber aufgezeichnet.

SWS 60 HCl erzielte kaum Wirkungen an den isolierten Organen, keine davon war signifikant. Bei SWS 51 HCl konnten ebenfalls keine signifikanten Wirkungen beobachtet werden, der stärkste Effekt war am Darm zu beobachten mit einer maximalen Abnahme der Kontraktionskraft von $37,38 \pm 4,42 \%$. Ein EC_{50} Wert wurde nicht erreicht.

Daher war es auch nicht möglich, eine Analyse des Wirkmechanismus durchzuführen. In weiterer Folge wurde versucht, mithilfe eines bakteriellen Enzyms die Abspaltung von H_2S aus SWS 51 HCl herbeizuführen und dadurch eine Dilatation der Aorta zu bewirken, was ebenfalls nicht gelungen ist. In dieser Richtung ist aber durchaus noch Potential vorhanden, das auf jeden Fall durch weitere Untersuchungen mit anderen Esterasen oder mit Serum genauer betrachtet werden sollte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali, M.Y., Ping, C.Y., Mok, Y.Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., Moore, P.K. (2006): Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 149(6):625-34
- Benavides, G.A., Squadrito, G.L., Mills, R.W., Patel, H.D., Isbell, T.S., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., Doeller, J.E., Kraus, D.W. (2007): Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(46):17977-82
- Blackstone, E., Morrison, M., Roth, M.B. (2005): H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308(5721):518
- Elrod, J.W., Duranski, M.R., Langston, W., Greer, J.J., Tao, L., Dugas, T.R., Kevil, C.G., Champion, H.C., Lefer, D.J. (2006): eNOS gene therapy exacerbates hepatic ischemia-reperfusion injury in diabetes: a role for eNOS uncoupling. *Circ Res* 99(1):78-85
- Elrod, J.W., Calvert, J.W., Morrison, J., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C.W., Lefer, D.J. (2007): Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(39):15560-5
- Else, D.J., Fowkes, R.C., Baxter, G.F. (2010): Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct* 28(2):95-106
- Estler, C.J., Schmidt, H. (2007): *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. 6.Auflage, F.K. Verlag GmbH
- Fiorucci, S., Distrutti, E., Cirino, G., Wallace, J.L. (2006): The emerging role of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131:259-271
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (2009): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10.Auflage, Elsevier München
- Hobbs, A.J. (1997): Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 18(12):484-491

- Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H. (1997): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237:527-531
- Huang, X.L., Zhou, X.H., Wei, P., Zhang, X.J., Meng, X.Y., Xian, X.H. (2008): Role of endogenous hydrogen sulfide in pulmonary hypertension induced by lipopolysaccharide. *Sheng Li Xue Bao* 60:211-215.
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X.N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., Kimura, H. (2004): Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 381:113-23
- Johansen, D., Ytrehus, K., Baxter, G.F. (2006): Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury. Evidence for a role of K_{ATP} channels. *Basic Res. Cardiol* 101(1):53-60
- Kamoun, P. (2004): Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26:243-254
- Kimura, Y., Kimura, H. (2004): Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18:1165-1167
- Koenitzer, J.R., Isbell, T.S., Patel, H.D., Benavides, G.A., Dickinson, D.A., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., Lancaster, J.R. Jr., Doeller, J.E., Kraus, D.W. (2007): Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4):1953-60
- Kubo, S., Doe, I., Kurokawa, Y., Nishikawa, H., Kawabata, A. (2007): Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 232:138-146
- Laggner, H., Hermann, M., Esterbauer, H., Muellner, M.K., Exner, M., Gmeiner, B.M., Kapiotis, S. (2007): The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens* 25(10):2100-2104
- Lee, S.W., Cheng, Y., Moore, P.K., Bian, J.S. (2007): Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 358:1142-1147

- Lefer, D.J. (2007): A new gaseous signaling molecule emerges: Cardioprotective role of hydrogen sulfide. PNAS, 104:17907-17908
- Li, L., Moore, P.K. (2007): An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. Biochem Soc Transact 35(5):1138-1141
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y.Y., Neo, K.L., Cheng, Y., Lee, S.W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C.H., Moore, P.K. (2008): Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation 117:2351-2360
- Linden, D.R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G.J., Bernard, C.E., Furne, J.K., Levitt, M.D., Farrugia, G., Szurszewski, J.H. (2008): Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in more tissues. J Neurochem 106:1577-1585
- Mortimer, C.E., Müller, U. (2003): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. Thieme Verlag, 8. Auflage
- Müller-Esterl, W. (2004): Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Oberdisse, E., Hackenthal, E., Kuschinsky, K. (2001): Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage, Springer Berlin
- Puranik, M., Weeks, C.L., Lahaye, D., Kabil, O., Taoka, S., Nielsen, S.B., Groves, J.T., Banerjee, R., Spiro, T.G. (2006): Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase. J Biol Chem 281(19): 13433-8
- Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J. (2006): Free radical biology and medicine: it's a gas, man! Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291(3):491-511

- Sivarajah, A., McDonald, M.C., Thiernemann, C. (2006): The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 26(2): 154-61
- Szabó, C. (2007): Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews* 6:917-935
- Wang, R. (2002): Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16:1792-1798
- Wang, Y.F., Mainali, P., Tang, C.S., Shi, L., Zhang, C.Y., Yan, H., Liu, X.Q., Du, J.B. (2008): Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J* 121:420-423.
- Zanardo, R.C., Brancalone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., Wallace, J.L. (2006): Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* 20(12):2118-20
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. (2001): The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J.* 20:6008-6016

8 LEBENS LAUF

Dipl. Ing. (FH) Christina Kern

Dr. Ernst Franz-Str. 15

A-7071 Rust

Österreich

0043 650 60 63 187

Christina.kern1@gmx.at

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 06.06.1984

Nationalität: Österreich

Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung

2006 – 2010: Universität Wien
Pharmaziestudium

2002 – 2006: IMC University of Applied Sciences in Krems
Studiengang “Medizinische und Pharmazeutische Biotechnologie”

1994 – 2002: Gymnasium in Eisenstadt

1990 – 1994: Volksschule in Rust

Arbeitserfahrung

Dezember 2007 – Mag. Job’s Marienapotheke in Eisenstadt
September 2010 Studienbegleitende Tätigkeit und Ferialpraktika

Februar 2007 – Tissue Gnostics GmbH
September 2007 Studienbegleitende Tätigkeit und Ferialpraktikum

Juli 2005 – Praxissemester und Diplomarbeit bei Ars Arthro AG in
Jänner 2006: Esslingen, Deutschland
Diplomarbeit: ”Development of an anterior cruciate ligament
transplant”

August 2004: Igeneon Krebs-Immuntherapie Forschungs- und Entwicklungs-
AG

Juni – Juli 2004: Vogelbusch GmbH, Department Biopharma
