



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchung der Bioaktivität von zwei möglichen
H₂S-Donatoren (SWS 48 HCl und SWS 40 HCl) an
isolierten Meerschweinchen-Präparaten

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Mayr Stefan
Matrikel-Nummer:	0156780
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, im Juli 2010

Widmung und Danksagung

Ich widme diese Diplomarbeit meiner Familie.

Meine Eltern haben mich während meines ganzen Studiums immer unterstützt, motiviert und mir sehr vieles ermöglicht, wofür ich mich herzlich bedanke!

Großen Dank möchte ich weiters meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik aussprechen, der mir mit außerordentlichem Einsatz stets zur Seite stand und mich während der ganzen Zeit als Diplomand mit seiner unkomplizierten Art professionell unterstützte.

Auch meinen Kollegen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit während der Arbeit im Labor und danach danken.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe des Departments für Medizinische/Pharmazeutische Chemie und Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker für die Bereitstellung der Testsubstanzen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
2. ZIEL DER ARBEIT	5
3. MATERIAL UND METHODIK.....	6
3.1. TESTSUBSTANZEN	6
3.1.1.SWS 48 HCl.....	6
3.1.2.SWS 40 HCl.....	6
3.1.3.Lösungsmittel	7
3.2. PHYSIOLOGISCHE ELEKTROLYTLÖSUNG.....	9
3.3. VERSUCHSTIERE	10
3.4. VERWENDETE ORGANE.....	11
3.4.1.Die Präparation.....	11
3.4.1.1. Verwendete Materialien.....	11
3.4.1.2. Atrium dexter	12
3.4.1.3. Arteria pulmonalis.....	12
3.4.1.4. Musculus papillaris.....	12
3.4.1.5. Aorta descendens.....	14
3.4.1.6. Terminales Ileum	16
3.5. VERWENDETE APPARATUREN	17
3.5.1.Apparatur 1.....	17
3.5.2.Apparatur 2.....	19
3.5.3.Kraftwandler	20
3.5.4.Begasung mit Carbogen	21
3.6. VERSUCHSABLAUF.....	21
3.6.1.Untersuchung der Substanzwirkungen	22
3.6.1.1. Aorta descendens.....	22
3.6.1.2. Arteria pulmonalis.....	22
3.6.1.3. Terminales Ileum	23
3.6.1.4. Atrium dexter	23
3.6.1.5. Musculus papillaris.....	24
3.6.2.Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS 40 an der Aorta.....	25
3.6.2.1. Glibenclamid	25

3.6.2.2. Nitro-L-Arginin	26
3.6.2.3. Durchführung der Versuche	26
3.7. AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTIK	27
3.7.1. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	27
3.7.2. Atrium dexter	27
3.7.3. Musculus papillaris	28
3.7.4. Statistik	28
4. ERGEBNISSE	29
4.1. SWS 48	29
4.1.1. Aorta descendens	29
4.1.2. Arteria pulmonalis	32
4.1.3. Terminales Ileum	34
4.1.4. Atrium dexter	38
4.1.5. Musculus papillaris	41
4.2. SWS 40 HCL	44
4.2.1. Aorta descendens	44
4.2.2. Arteria pulmonalis	47
4.2.3. Terminales Ileum	50
4.2.4. Atrium dexter	53
4.2.5. Musculus papillaris	56
4.3. WIRKMECHANISMUS VON SWS 40 HCL	59
4.3.1. Effekt von SWS 40 HCl mit Glibenclamid auf die Aorta	59
4.3.2. Effekt von SWS 40 HCl mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta	64
5. DISKUSSION	67
6. ZUSAMMENFASSUNG	72
7. LITERATURVERZEICHNIS	73
8. LEBENS LAUF	76

1. Einleitung

H₂S, also Schwefelwasserstoff, Molekulargewicht folglich 34,08 g/mol, kennt man schon seit Jahrzehnten als giftiges Gas (Winder und Winder 1933) (Smith und Gosselin 1979). Es entsteht sowohl bei der Reaktion von Säuren mit Schwermetallsulfiden als auch bei der reduktiven Zersetzung von Eiweiß und riecht bei einer Geruchsschwelle von 0,025 ml/m³ stark nach faulen Eiern (Forth et al. 2009).

Die Herstellung im Labormaßstab erfolgt aus Eisen(II)-sulfid und Salzsäure, wobei Eisen(II)-chlorid und Schwefelwasserstoff entsteht.

Reaktionsgleichung: $\text{FeS} + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{FeCl}_2 + \text{H}_2\text{S}$

Schwefelwasserstoff kann bei hohen Konzentrationen durch Sulfid- oder Disulfidbildung Enzyme blockieren. Durch den Stoffwechsel wird H₂S deprotoniert und das Hydrogensulfid-Anion entsteht, welches das III-wertige Eisen der Cytochromoxidase und ähnlich Cyanid die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung blockiert (Ester und Schmidt 2007). Die vollständige Aufklärung des Wirkmechanismus von H₂S bedarf jedoch noch einiger Forschung.

Die Warnwirkung des charakteristischen Geruchs funktioniert nur bei geringen Konzentrationen, da man sich rasch daran gewöhnt. Darüber hinaus führen hohe Konzentrationen zu einer Blockade der Geruchsrezeptoren. Bei einer akuten Vergiftung sind vor allem Organe des zentralen Nervensystems und der Atemtrakt betroffen, es kommt zum Verlust des Bewusstseins und zur zentralen Atemlähmung. Bei niedrigeren Konzentrationen treten Hyperpnoe, Krämpfe und Schwäche auf (Forth et al. 2009).

Bei einer akuten Vergiftung bedient man sich hauptsächlich einer symptomatischen Therapie, wichtig dabei ist eine gezielte Beatmung. Testweise kann man 4-Diethylaminophenol (4-DMAP) eingesetzt werden, jedoch ohne danach Natriumthiosulfat zu geben (Oberdisse et al. 2002).

H₂S entsteht jedoch endogen auch im Körper beim Cystein-Metabolismus und ist somit ein biologisches Gas. Katalysiert wird diese Reaktion von der Cystathionin-beta-Synthase (CBS) und/oder der Cystathionin-gamma-Lyase (CSE) (Stipanuk und Beck 1982) (Hosoki et al. 1997).

Bei in vivo Studien an Mäusen, bei denen CSE genetisch ausgeknockt wurde, verringerte sich die Konzentration von Schwefelwasserstoff in allen Geweben und Organen signifikant, die Mäuse zeigten erhöhten Blutdruck und verringerte Gefäßdilatation (Yang et al. 2008).

Aufgrund dieser Tatsache ist eine Analogie zu anderen Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) zu erkennen (Wang et al. 1997). Daraus schloss man, dass H₂S neben seiner toxischen auch eine physiologische Wirkung in der kardiovaskulären Regulation haben könnte, und viele Studien zu diesem Thema wurden veröffentlicht.

Hosoki et al. (1997) zeigten, dass die Aorta von Ratten in vitro durch H₂S relaxiert wird. Daraufhin wurde versucht, den Wirkmechanismus aufzuklären, der mit der glatten Muskulatur des Gefäßsystems, K_{ATP} Kanäle, NO und CO in Zusammenhang gebracht wurde.

Wang et al. (2008) bestätigten durch Versuche an Rattenaorten einen Zusammenhang zwischen NO und H₂S.

Auch der intrazelluläre pH Wert, der bei der vaskulären Regulation ebenfalls eine Rolle spielt, wird durch H₂S beeinflusst (Lee et al. 2007).

Eine weitere Studie belegt, dass die dilatierende Wirkung von Schwefelwasserstoff bei Aorten von Ratten auf die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen zurückzuführen ist (Zhao et al. 2001).

Diese K_{ATP} Kanäle sind Oktamere aus 4 Untereinheiten des KIR6.1 bzw. KIR 6.2 und 4 Untereinheiten des Sulfonylharnstoff-Rezeptors (SUR) (Manna et al. 2009) und werden bei einer Erhöhung der Adenosinriphosphat-Konzentration geschlossen (Mutschler 2008).

Aufgrund der unterschiedlichen Studien zu diesem Thema kann man aber darauf schließen, dass nicht nur die K_{ATP} Kanäle alleine für die H₂S Wirkung in physiologischen Systemen verantwortlich zeichnen.

Bei einer auf biochemischem Wege künstlich erzeugten pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) konnte man durch Einsatz von Natriumhydrogensulfid eine Linderung erreichen. (Huang et al. 2008). Dies ist eine interessante Entwicklung in der Therapie dieser seltenen Krankheit.

Diese Orphan Disease ist eine der verschiedenen Unterformen der pulmonalen Hypertonie, welche sich durch einen pulmonal arteriellen Blutdruck von mehr als 25 mm Hg in Ruhe bzw. mehr als 30 mm Hg bei Belastung erkennen lässt (Mutschler 2008).

Die Ursachen dafür sind noch nicht ausreichend bekannt. Es kommt zu einem sogenannten Remodelling, also einer pathologischen Proliferation von Endothel und glatter Muskulatur, was zu einem Ungleichgewicht zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorisches Faktoren zugunsten letzterer führt. Die fibrinolytische Aktivität ist eingeschränkt, wohingegen die Thrombogenität verstärkt ist. Daher kommt es zu einer Verringerung des Gefäßlumens und zu einem erhöhten Druck im kleinen Kreislauf, was eine Nachlastserhöhung in der rechten Herzkammer und im Endeffekt ein Rechtsherzversagen zur Folge hat (Mutschler 2008).

Nach wie vor liegt die 5-Jahres-Überlebensrate dieser schweren Krankheit nur bei 30 – 50%, geheilt werden kann sie nur durch eine Transplantation (Mutschler 2008).

Der pharmakologische Therapieansatz liegt beim Versuch, durch Vasodilatoren das verkleinerte Lumen der Lungengefäße wieder zu erweitern.

Bisher eingesetzt werden:

- Prostacyclinderivate: Iloprost
- Endothelin-Antagonisten, z.B. Bosentan
- Phosphodiesterase-5-Hemmer, z.B. Sildenafil

Bei der Therapie mit PDE5-Hemmern hat man zur Behandlung des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Versuche mit einem Sildenafil-Derivat (ACS6), welches als H₂S-Donator fungiert, durchgeführt. Zusätzlich zur eigentlichen Sildenafil Wirkung konnte hier auch der cAMP Spiegel gesenkt werden (Muzaffar et al. 2008).

SWS-Donatoren wären hinsichtlich ihrer gefäßrelaxierenden Wirkung natürlich auch bestens zur Behandlung der essentiellen Hypertonie geeignet.

Der normale Blutdruck wird von der WHO mit 130/85 mm Hg definiert, als Hypertonie bezeichnet man einen Blutdruck über 140/90 mm Hg. Der Übergangsbereich dazwischen wird mit „normal hoch“ bezeichnet. Ca. 95 % der Bluthochdruck-Patienten haben eine essentielle Hypertonie. Essentiell bedeutet, dass die Ursache dafür unklar ist. Bei den restlichen Patienten liegt eine sekundäre Hypertonie vor, die z.B. durch renale oder endokrine Erkrankungen ausgelöst wird. Hier muss man die primären Ursachen behandeln (Forth et al. 2009).

Für die Pharmakotherapie der essentiellen Hypertonie werden 5 verschiedene Arzneistoff-Typen empfohlen:

- Diuretika
- β -Blocker
- ACE-Hemmer
- AT_1 -Rezeptor Antagonisten
- Ca^{2+} -Kanalblocker

Zur nicht-pharmakologischen Behandlung zählt:

- Gewichtsreduktion
- Verringerung des Alkoholkonsums
- Kochsalzarme Ernährung
- Fettarme Ernährung
- nicht mehr Rauchen
- Stress bewältigen

In der aktuellen Literatur werden Wirksamkeit und Nebenwirkungen einer niedrig dosierten Kombinationstherapie aus Diuretikum und β -Blocker bzw. Diuretikum und ACE-Hemmer mit denen einer Monotherapie als gleichwertig betrachtet. Wird mit einer normalen therapeutischen Dosis einer einzelnen Substanz das Therapieziel nicht erreicht, sollte man die Monotherapie möglichst bald durch eine Kombinationstherapie aus 2 oder 3 Arzneistoffen ersetzen. So kann die Erfolgsrate erhöht und die UAW durch kleinere Dosen verringert werden (Forth et al. 2009).

2. Ziel der Arbeit

Ziel der Diplomarbeit war die Wirkungen zweier neu hergestellter Schwefelwasserstoff-Donatoren, SWS 48 HCl und SWS 40 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen. Dabei wurde einerseits die erwünschte vasodilatatorische Wirkung an Aorta und Arteria pulmonalis überprüft, andererseits die spasmolytische Wirkung am Darm. Zusätzlich wurde auch noch der Einfluss der Verbindungen auf die Chronotropie des Vorhofs und die Inotropie der Papillarmuskeln getestet.

Zu Beginn des praktischen Teils wurden die Technik des Präparierens und die Bedienung der Messgeräte erlernt, damit die Ergebnisse reproduzierbar und auswertbar werden.

Wenn eine Wirkung signifikant war, d.h. bei einem EC_{50} von unter 30 $\mu\text{mol/l}$, wurde zusätzlich noch der Wirkmechanismus festgestellt.

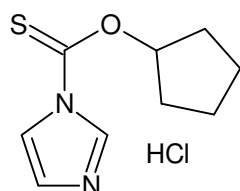
3. Material und Methodik

3.1. Testsubstanzen

Die zwei Schwefelwasserstoff-Donatoren wurden von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker an der Fakultät für Lebenswissenschaften am Department für Pharmazeutische/Medizinische Chemie synthetisiert.

3.1.1. SWS 48 HCl

Abbildung 1: chemische Struktur von SWS 48 HCl

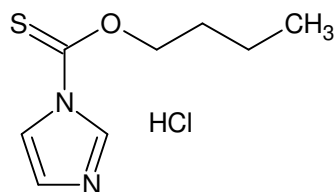


MG: 232,77 g/mol

Nomenklatur: O-Cyclopentyl 1*H*-imidazol-1-carbothioat Hydrochlorid

3.1.2. SWS 40 HCl

Abbildung 2: chemische Struktur von SWS 40 HCl



MG: 220,76 g/mol

Nomenklatur: O-Butyl 1*H*-imidazol-1-carbothioat Hydrochlorid

3.1.3. Lösungsmittel

Um die Substanzen erfolgreich am Organ applizieren zu können, mussten sie zuvor in H₂O gelöst werden. Es standen Organbäder mit 8 bzw. 25 ml Fassungsvermögen zu Verfügung, daher waren unterschiedliche Einwaagen nötig, um nach kumulativer vollständiger Zugabe der Substanz eine Endkonzentration von 100 µmol/l pro Gefäß erreichen zu können.

Tabelle 1: Einwaagen der jeweiligen Gefäße

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz (100 µmol/l)
SWS 48	232,77 g/mol	8 ml	0,19 mg
		25 ml	0,58 mg
SWS 40	220,76 g/mol	8 ml	0,18 mg
		25 ml	0,55 mg

Nachdem das Organ im Organbad in die Messapparatur eingespannt wurde, wartete man, bis sich keine Änderung der Messwerte mehr erkennen ließ. Danach wurde die Konzentration schrittweise alle 45 Minuten erhöht, indem man 1, 2, 7, 20 und 70 µl der Stammlösung mit einer Finnmikropipette applizierte. Dieser zeitliche Abstand ist nötig, um einen „steady state“ zu erreichen, der nach 45min als gesichert angenommen wird.

Die Werte der gemessenen Wirkung auf die Organe bei den sich ergebenden Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l wurden für die spätere Auswertung herangezogen.

Tabelle 2: Pipettierschema

Applizierte Menge der Stammlösung		Endkonzentration
SWS 48	SWS 40	
1 µl	1 µl	1 µmol/l
2 µl	2 µl	3 µmol/l
7 µl	7 µl	10 µmol/l
20 µl	20 µl	30 µmol/l
70 µl	70 µl	100 µmol/l

3.2. Physiologische Elektrolytlösung

Das für die Versuche und zur Aufbewahrung der Organe verwendete Medium ist eine Nährstofflösung, die nach dem Pharmakologen Maurice Vejoy Tyrode benannt ist und einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung entspricht. Diese sogenannte Tyrode wird mit Oxymix bzw. Carbogen, einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, begast, damit die optimale Versorgung der Organe gewährleistet wird.

Die Herstellung erfolgte nach den Vorschriften von Reiter (1967)

Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molekulargewicht	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,442g/mol	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,550 g/mol	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,010 g/mol	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,370 g/mol	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,090 g/mol	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,980 g/mol	34,00 g/250 ml	3,20	3,92
Glucose	180,160 g/mol	Reinsubstanz	1,98	-

Am Beginn jedes Versuchstages wurde die Tyrode frisch bereitet. Dazu wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Stammlösungen an NaCl, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ und NaHCO₃ in einem 2 Liter fassenden Messkolben mit ca. 1,5 Liter Aqua dest. vermischt und darin die Glucose gelöst. Anschließend wurde die Lösung mindestens 20 Minuten lang mit Carbogen begast, erst danach wurde das CaCl₂ mit einer Pipette tropfenweise hinzugefügt. Die Tropfgeschwindigkeit muss so langsam gewählt werden, dass sich keine schwerlöslichen Calcium-Salze bilden, was man dann an einer unerwünschten Trübung der Lösung erkennen kann. Abschließend wird der Messkolben noch bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt.

3.3. Versuchstiere

Für die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit wurden innere Organe von Meerschweinchen herangezogen, da deren Ionenkanäle denen der Menschen am ähnlichsten sind. Weiters passt die Größe der Organe zu den verwendeten Apparaturen.

Bei den ausschließlich weiblichen Nagetieren handelte es sich dabei um sogenannte „TRIK“ (Auszucht) Stämme, die also nicht durch Inzucht vermehrt wurden. Ihr Gewicht lag zwischen 300 g und 600 g.

Vor dem Versuchsbeginn stand jeden Tag die Tötung eines Nagetieres durch einen gezielten Schlag auf das Genick. Diese Methode gilt als „schonendste“, da sie schnell geht, die Tiere kaum Stress ausgesetzt sind und keine Schmerzen verspüren.

Sogleich danach wurde mit einer OP-Schere Thorax und Abdomen geöffnet sowie Herz und Lunge entnommen. Weiters wurde die Aorta sowie ein ca. 20 cm langes Stück des Ileums entfernt. Jedes der Organe wurde sofort in ein Gefäß mit begaster Elektrolytlösung gegeben.

3.4. Verwendete Organe

Um die Wirkungen der Substanzen an den Organen testen zu können, wurden Herz, Dünndarm und Aorta noch weiter präpariert

3.4.1. Die Präparation

3.4.1.1. Verwendete Materialien

Da beim Präparieren die Genauigkeit von großer Bedeutung ist, die Präparate jedoch teils sehr klein waren, was das Arbeiten mit freiem Auge erschwert, wurde oft ein Stereomikroskop verwendet. Die Organe wurden in einer mit Tyrode gefüllten Petrischale präpariert und dazu mit Präpariernadeln an einer darin liegenden Korkscheibe befestigt, die wiederum von einem Gummischlauch fixiert wurde. Verwendet wurden Pinzetten, Federgriffscheren und Pipetten.

Abbildung 3: Stereomikroskop und verwendete Werkzeuge



3.4.1.2. Atrium dexter

Bei der Präparation des rechten Vorhofes musste zuerst das umliegende Gewebe, Fett und Lunge sorgfältig vom Herzen entfernt werden. Daraufhin wurde das Organ mit 2 Präpariernadeln an einer Korkscheibe fixiert und der Vorhof vorsichtig entfernt. Dabei sollte man ihn nicht überdehnen oder das Gewebe verletzen. Um den Vorhof ins Messgerät einspannen zu können, musste er zuerst mit Nadeln an seinen beiden Enden an der Korkunterlage befestigt werden, um danach an diesen 2 Enden je ein Silberhäkchen mit einem Faden anbringen zu können. Die Häkchen wurden mithilfe je eines Knotens eingefädelt und mit je einem zweiten gesichert. Zur besseren Unterscheidung von der anatomischen „Ober“- und „Unterseite“ wurden verschiedenfarbige Bindfäden verwendet. Zum Schluss wurde das fertige Präparat in ein Becherglas mit begaster Elektrolytlösung gegeben.

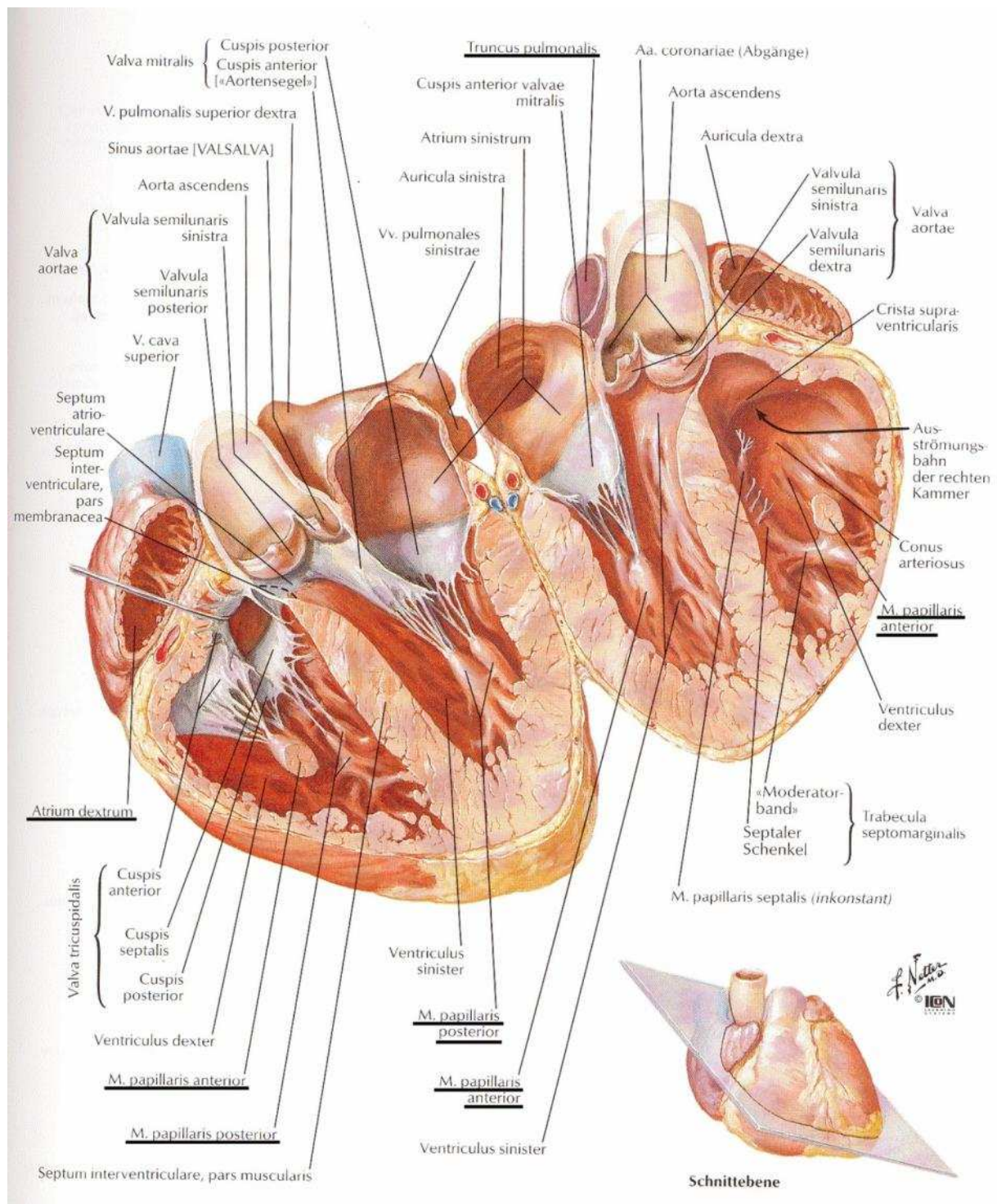
3.4.1.3. Arteria pulmonalis

Ein weiteres Organ an dem Versuche durchgeführt wurden ist der Truncus pulmonalis (Lungenstamm). Diese Arterie entspringt aus der rechten Herzkammer und führt sauerstoffarmes Blut zur Lunge. Da der freilegbare Teil davon jeweils maximal 1 cm lang war, konnte man daraus nur etwa 2 bis 3 Stücke mit je 2-3 mm Länge gewinnen, die dann noch von Fett- und Muskelgewebe sowie Blutgerinnsel befreit werden mussten.

3.4.1.4. Musculus papillaris

Vom restlichen Teil des Herzens wurden aus den beiden Herzkammern nun die Papillarmuskeln heraus präpariert. Dazu wurde entlang des Septums (Scheidewand) geöffnet und aufgeklappt. Wenn die Sicht durch das Stereomikroskop durch das meist noch vorhandene Blut beeinträchtigt wurde, musste die Tyrode öfters gewechselt werden. An die Ansätze der Papillarmuskeln wurden, sobald lokalisiert, wiederum Silberhäkchen mit einem Faden angebracht. Erst dann wurden die Muskeln herausgeschnitten und ggf. die Purkinje-Fasern entfernt. Diese würden sonst durch etwaige Spontanaktivität die Versuche stören. Auch hier wurden die Präparate wieder in begaster Tyrode aufbewahrt.

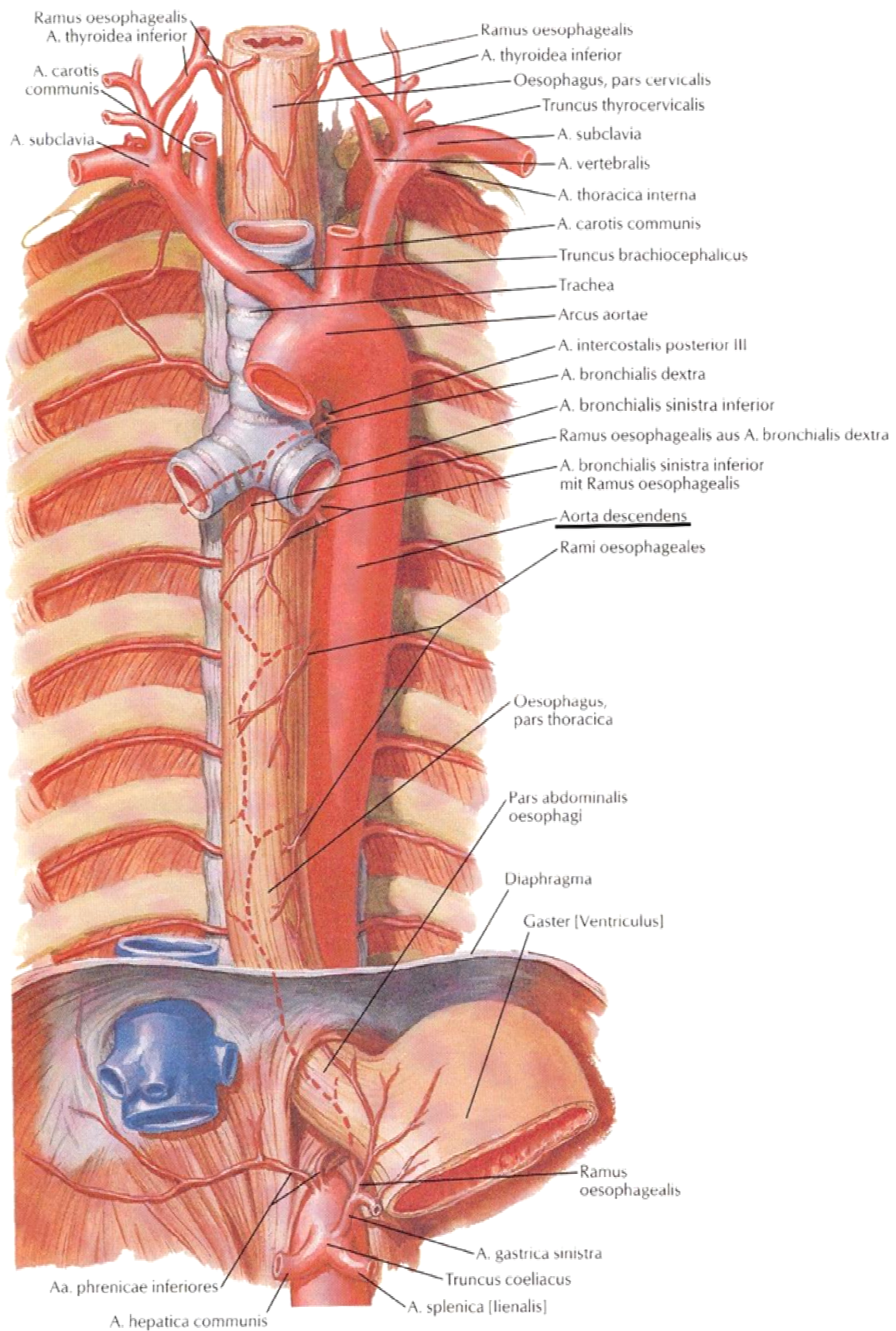
Abbildung 4: Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)



3.4.1.5. Aorta descendens

Um an die Aorta zu gelangen, musste man den Brustkorb aufdehnen und die Wirbelsäule durchbiegen. Das Blutgefäß wurde am oberen Ende durchtrennt und dann mit vorsichtigen Schnitten ein ca. 3 cm langes Stück davon entlang des Rückgrats entfernt. Dabei hielt man das obere Ende der Aorta mit einer Pinzette und zog sie leicht von der Wirbelsäule weg, jedoch ohne sie zu überdehnen.

Das Stück wurde wie schon bei anderen Organen vorher beschrieben in einer mit Tyrode gefüllten Petrischale an einer Korkunterlage befestigt und sorgfältig von Fett, anhaftendem Gewebe und Blutgerinnsel befreit. Anschließend schnitt man so viele 2 mm lange einheitliche Stücke wie möglich ab. Beschädigte oder ungleichmäßige Teile wurden entfernt, da sonst die Versuche nicht reproduzierbar gewesen wären.



3.4.1.6. Terminales Ileum

Aus dem Tierkörper wurde auch der Dünndarm entfernt. Dazu musste man nach der weiteren Öffnung des Bauchraumes mit den Fingern den Übergangsbereich zum Dickdarm suchen und durch einen Schnitt an dieser Stelle ein ca. 20 cm langes Stück des Ileums abtrennen. Am jejunalen Ende wurde ein Faden angebracht, um später nicht die Enden zu verwechseln. Der Darm sollte die ganze Zeit über nicht gedehnt werden, da sonst die Muskulatur verletzt werden hätte können, was sich wiederum nachteilig auf die Versuche ausgewirkt hätte. Nachdem das abgetrennte Stück sogleich in ein Gefäß mit begaster Tyrode überführt wurde, wobei hier die Gassättigung besonders relevant war, konnte man die Darmperistaltik sehen.

Für den Versuch wurde von diesem Stück ein ca. 1 cm langes Stück abgetrennt und an beiden Enden schräg abgeschnitten. An den entstandenen Spitzen wurde das Darmstück mit je einer Präpariernadel an der Korkunterlage befestigt, um sein Einrollen zu verhindern. Auch hier wurden an den Spitzen wieder Häkchen mit Fäden angebracht, jedoch durften die Darmöffnungen nicht zugebunden werden, da sonst später die Substanz nicht optimal wirken könnte. Mit einer Pipette wurde mehrmals Tyrode durch das Darmstück getrieben, um etwaigen Chymus zu entfernen.

3.5. Verwendete Apparaturen

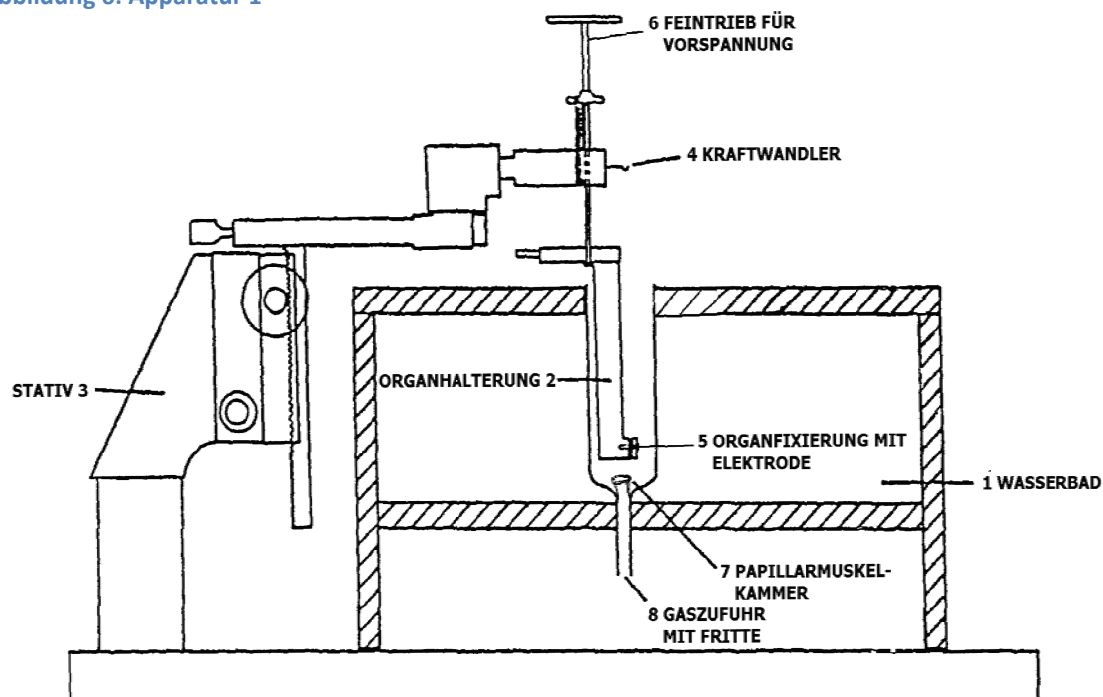
Die Versuche wurden an zwei verschiedenen Apparaturen durchgeführt. Für die Untersuchungen an den Papillarmuskeln wurde Apparatur 1 (Abbildung 6) verwendet, für Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Vorhof Apparatur 2 (Abbildung 8). Die Organe waren jeweils über einen Silberdraht mit einem Kraftwandler verbunden, der die Veränderungen an den Organen in ein elektrisches Signal umwandelte. Zwischen Kraftwandler und Schreiber, der die Messungen auf Millimeterpapier aufzeichnete, war noch ein Verstärker zwischengeschaltet.

3.5.1. Apparatur 1

Dieses Gerät wurde ausschließlich für die Versuche an den Papillarmuskeln verwendet.

Es besteht hauptsächlich aus einer Wasserbadwanne aus Acrylglas, in die eine Muskelkammer hineinragt. An einem Stativ mit Feintrieb waren die Organhalterung und der Kraftwandler befestigt.

Abbildung 6: Apparatur 1



Die Muskelkammer bot Platz für die benötigten 25ml Tyrode, an ihrer Unterseite war ein kleiner Schlauch für die Begasung angebracht. Da für die Versuche möglichst physiologische Bedingungen Voraussetzung waren, wurde das Wasserbad auf konstante 35°C erwärmt. Bis zum Versuchsbeginn wurde jeweils mindestens 10 Minuten gewartet, damit sich die Nährstofflösung in der Muskelkammer an die Temperatur des Wasserbads angleichen konnte. Das wie in Kapitel 3.4.1.4. beschriebene Präparat wurde mit einem Silberhäkchen an einen Silberdraht gehängt, der wiederum mit dem Kraftwandler verbunden war. Der Papillarmuskel wurde anschließend zwischen der Elektrode und einem kleinen Stück Plexiglas eingeklemmt, das mit einer Schraube festgezogen werden konnte. Nun wurde die Organhalterung mit dem Feintrieb komplett in die Muskelkammer abgesenkt. Aufgrund der Unfähigkeit des Papillarmuskels, spontan zu schlagen musste er über die Elektrode elektrisch gereizt werden. Dazu wurde ein Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) verwendet. Über den Silberdraht wurde die Kontraktion auf den Kraftwandler übertragen und das Signal durch einen Verstärker an einen Flachbettschreiber weitergeleitet.

Abbildung 7: Die Versuchsanordnung

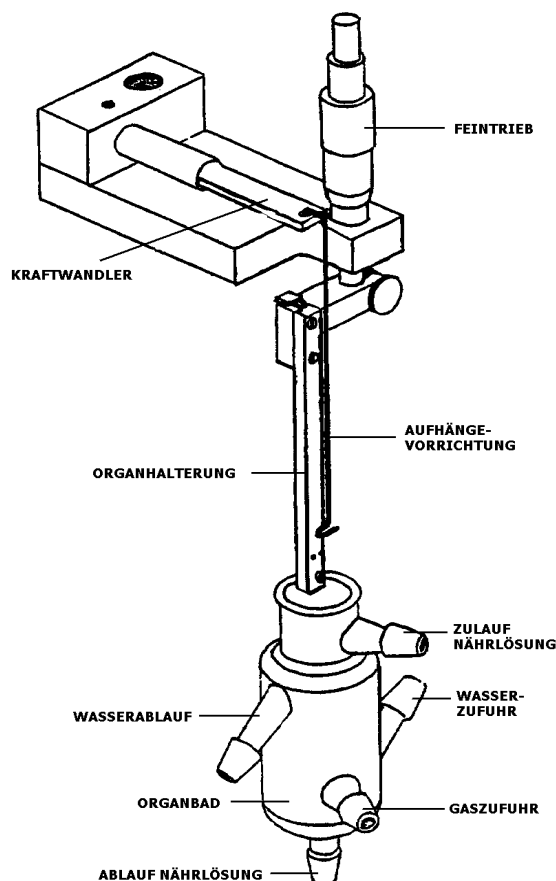


3.5.2. Apparatur 2

Diese Apparatur wurde für die Versuche an Aorta, Arteria pulmonalis, dem rechten Vorhof und dem terminalen Ileum verwendet.

Grundsätzlich entsprach das Prinzip dem des vorher beschriebenen. Unterschiede bestanden jedoch beim Einspannen der Präparate sowie bei der Organbadform und der Temperatur, die hier 37°C betrug. Die Organe wurden hier jeweils mithilfe zweier Silberdrähtchen eingespannt, jeweils eines oben und unten. Die ringförmigen Präparate der Aorta und die Pulmonalarterie konnte man direkt an die Haken der Apparatur anbringen, bei Darm und Vorhof wurden die daran befestigten Haken zum Einspannen herangezogen. Die Präparate wurden auch hier in mit Tyrode gefüllte Organbäder eingetaucht, die durch Umspülung mit zirkulierendem 37°C warmen Wasser beheizt wurden. An der Seite war jeweils wieder ein Schlauch für die Begasung angebracht, deren Intensität durch kleine Schrauben reguliert werden konnte. Die vorgegebene Vorspannung wurde mittels eines Feintriebs eingestellt und anschließend durch KCl eine Kontraktion ausgelöst, die wiederum über den Kraftwandler und einem zwischengeschalteten Verstärker als Signal an einen Schreiber weitergeleitet und aufgezeichnet wurde.

Abbildung 8: Apparatur 2



3.5.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler ist ein wichtiger Bestandteil aller für die Versuche verwendeten Apparaturen. Er wandelt mechanischen Veränderungen durch eine sogenannte „Wheatstonesche Brücke“ in elektrische Signale um, wodurch Messungen erst möglich werden. Die Kontraktion der Präparate wird auf einen Dehnungsstreifen übertragen, der bei einer Änderung über einen Widerstandswandler einen konstanten Stromfluss verändert. Diese Stromänderung wird über einen Verstärker (4-Chanel Transducer Amplifier, WPI) zu einem Flachbettschreiber (Flatbed Recorder, Modell BD 112, Kipp & Zonen) geleitet, welcher sie auf Millimeterpapier aufzeichnet.

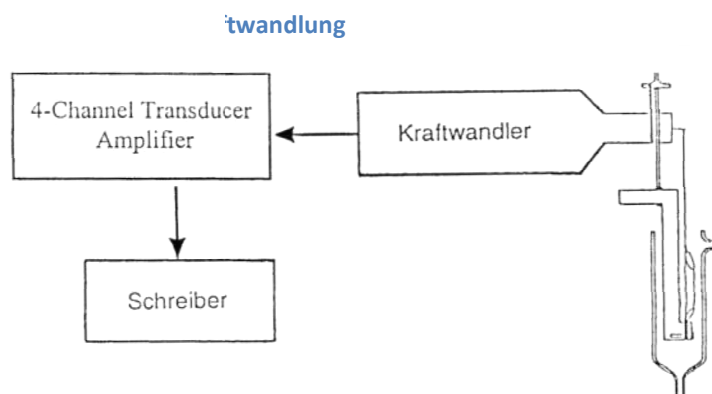
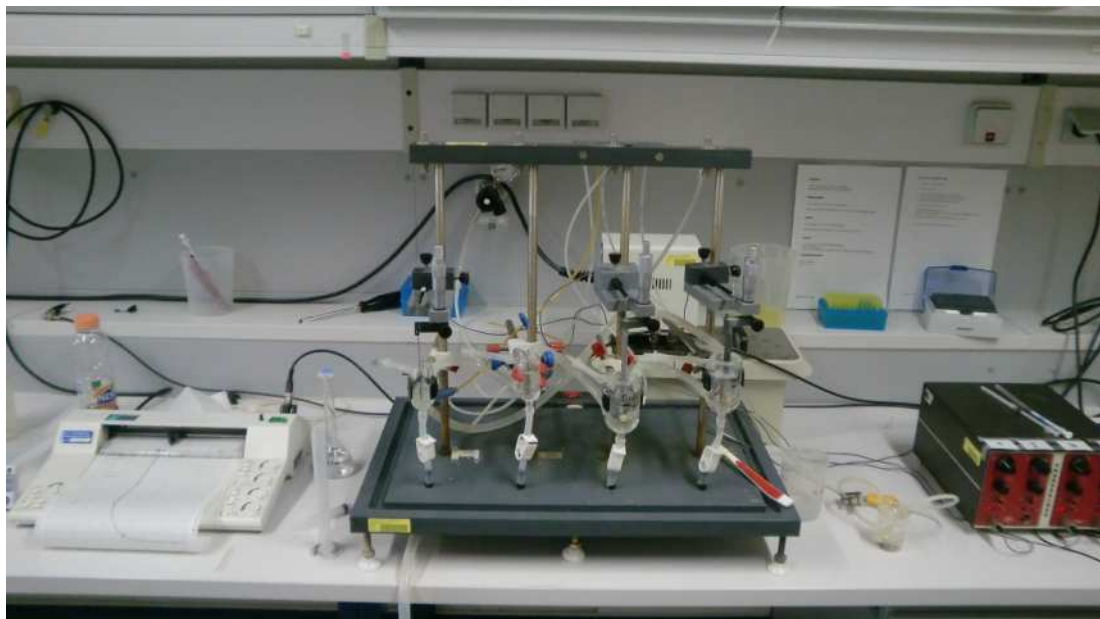


Abbildung 10: Die Versuchsanordnung



3.5.4. Begasung mit Carbogen

Eine Versorgung der Tyrode mit Carbogengas war nötig, um eine ausreichende Sauerstoffkonzentration, eine gleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe sowie einen konstanten pH-Wert zu erreichen. Die Begasung erfolgte über ein System an Schläuchen, die mit jedem Organbad verbunden waren. Vor jedem Einlass in ein Bad war eine Glasfritte angebracht, um das Gas zu zerstäuben. Über Schraubklemmen konnte man die Gaszufuhr regulieren.

Abbildung 11: Hahn der Carbogen-



3.6. Versuchsablauf

Vor jedem Versuch musste man sicherstellen, dass alle verwendeten Organbäder und Organhalterungen frei von Verunreinigungen waren. Dazu spülte man mehrmals mit destilliertem Wasser und entfernte etwaige Rückstände von Substanzen vorheriger Versuche mit einer Bürste. Nach dem Spülen der Kammern mit Tyrode wurden sie mit derselben befüllt. Die Organbäder mussten schon zuvor eingeschaltet werden, da sie eine gewisse Vorlaufzeit benötigen, bis die gewünschte Temperatur erreicht wird.

3.6.1. Untersuchung der Substanzwirkungen

3.6.1.1. Aorta descendens

Da die Präparate der Aorta ringförmig waren, konnte man sie einfach zwischen die beiden Drähte der Organhalterung der Apparatur 2 einfädeln, ohne dass jedoch eine mechanische Spannung vorliegt. Nach dem Eintauchen der Aorta in das bereits erwärmte Organbad wurde der Flachbettschreiber eingeschaltet und mittels der „Zero“-Schraube die Schreiberspitze auf den Nullpunkt des Millimeterpapiers eingestellt. Anschließend wurde der Amplifier zugeschaltet, was oft eine Veränderung der Nullposition zur Folge hatte, die aber durch eine Schraube am Verstärker selbst wieder korrigiert werden konnte. Die Aorta musste bei 10 mV auf eine Vorspannung von 10cm gebracht werden – das entspricht einem Zug von 19.6 mN – indem man den Feintrieb der Organhalterung bediente. Das war nötig, um für jedes Organ immer die gleichen Bedingungen zu schaffen. Mithilfe des Verstärkers wurde die Schreiberspitze erneut auf die Nullposition gebracht und anschließend 20 Minuten gewartet. Bei einem eventuellen Abfall der Vorspannung während dieser Einstellungsphase musste man mittels Feintrieb nachstellen. Jetzt wurde beim Schreiber auf 5 mV umgestellt, (entspricht 9.81 mN), die Aufzeichnung gestartet und die Tyrode aus dem Organbad abgelassen. Schnell wurden darin 25 ml einer 90mM Kaliumchlorid-Lösung eingefüllt, die täglich frisch durch Lösung von 670 mg KCl in 100 ml Tyrode bereitet wurde. Das KCl löste sofort eine Kontraktion aus, welche sich durch eine zuerst rasche und dann immer langsamer werdende Schreiberbewegung nach links äußerte. Im Idealfall kam die Schreiberspitze nach einiger Zeit zum Stillstand, was die maximale Kontraktion anzeigte und die Voraussetzung für die korrekte Messung der Substanzwirkung war. Deswegen wurden jeweils mindestens 45 Minuten abgewartet und erst nach Einstellen dieses Plateaus mit der Substanzzugabe nach dem in Kapitel 3.1.3. bereits beschriebenen Schema begonnen. Dabei war es äußerst wichtig, nicht den Silberdraht oder das Organ zu berühren, da die Aufzeichnung sonst verfälscht werden hätte können.

3.6.1.2. Arteria pulmonalis

Der Vorgang bei der Lungenarterie entsprach dem der Aorta – der einzige Unterschied war jedoch die Spannung, die hier den ganzen Versuch über bei 5 mV lag.

3.6.1.3. Terminales Ileum

Das Darmpräparat wurde mit den beiden an ihm angebrachten Silberhäkchen in die Organhalterung eingespannt, wiederum vorerst ohne Spannung, sodass das im Meerschweinchen jejunal gelegene Ende nach oben zeigte. Um die beiden Seiten nicht zu verwechseln, wurden – wie schon erwähnt – verschiedenfarbige Binfäden verwendet. Nach dem Absenken in das Organbad wurden die Geräte aktiviert und eine Vorspannung von 4.92 mN angelegt. Während der 20-minütigen Wartezeit wurden auch hier wiederum temperaturbedingte Änderungen der Darmspannung durch den Feintrieb ausgeglichen. Nach Starten der Aufzeichnung und Auslassen der Tyrode wurden hier 25 ml einer 60 mM Kaliumchlorid-Lösung – entsprechend 450 mg KCl pro 100 ml Tyrode – für die Auslösung der Kontraktion verwendet, welche im Vergleich zu anderen Organen sofort auch mit freiem Auge sichtbar war. Auf ihren rasanten Anstieg folgte eine rasche Abnahme, und dann wiederum ein allmähliches Kontrahieren auf ca. den halben Wert der ersten Kontraktion. Auch hier wurden mindestens 45 Minuten und das Einstellen einer Plateauphase abgewartet. Sank die Kontraktion nach Erreichen eines Maximums jedoch wieder, ohne dass Substanz zugegeben wurde, musste das Präparat verworfen und der Versuch mit einem neuen wiederholt werden. Selbstverständlich standen dazwischen die gründliche Reinigung des Organbades und das erneute Füllen mit Tyrode. Bei erfolgreicher beständiger Kontraktion wurde die Substanz wieder nach dem 45 Minuten Schema zugegeben.

3.6.1.4. Atrium dexter

Das wie im Kapitel 3.4.1.2. beschriebene Präparat wurde mit den beiden angebrachten Häkchen behutsam in die Organhalterung eingespannt. Die Länge der Silberdrähte wurde gegebenenfalls so angepasst, dass am Vorhof kein Zug war. Ein Überdehnen hätte ein Versagen bzw. eine Fehlfunktion der spontanen Kontraktion zur Folge haben können, was einen korrekten Versuch unmöglich gemacht hätte. Nach dem Einschalten der Geräte wurde auf 5 mV sowie Speed 5 mm/sec gestellt, die Spitze auf den Nullpunkt gebracht und eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt. Der in die begaste Tyrode getauchte Vorhof begann im Idealfall regelmäßig zu schlagen, was in einer Hin- und Her-Bewegung der Schreiberspitze resultierte. Nach 45 Minuten konnte man die ersten Messungen durchführen. Alle 5 Minuten wurde so lang aufgezeichnet, bis auf dem Millimeterpapier sechs 1cm lange

Kästchen beschrieben waren. Bei der gewählten Geschwindigkeit von 5 mm/sec entsprach das einer Messdauer von 12 sec. Wenn die Schläge regelmäßig waren und sich die Frequenz über 4 Messungen nicht veränderte, was durch Zählen der Zacken am Millimeterpapier überprüft wurde, konnte man mit der Substanzzugabe beginnen. Nach jeder Zugabe wurde wieder alle 5 Minuten gemessen, bis nach 45 Minuten die nächste Konzentration appliziert wurde.

3.6.1.5. *Musculus papillaris*

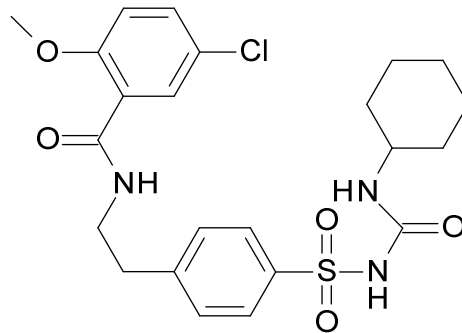
Der präparierte und wie in Kapitel 3.5.1. beschrieben in Apparatur 1 eingespannte Papillarmuskel wird nach Absenken ins Organbad auf 3.92 mN vorgespannt. Diese Spannung musste während des gesamten Versuches konstant gehalten werden und gegebenenfalls durch den Feintrieb nachjustiert werden, da die Kontraktionskraft mit der Spannung korreliert (Reiter M. 1967). Der Muskel muss um zu kontrahieren mit dem in Kapitel 3.5.1. beschriebenen Reizgerät mit 10 Rechteckimpulsen pro ms und 1 Hz Frequenz stimuliert werden. Über eine Isolation Unit wurde die Stromstärke geregelt, die ca. 10 % über der minimalen Reizschwelle liegen sollte. Bei zu hoher Stromstärke hätte es sonst zur Ausschüttung von Catecholaminen und zur Entleerung der Speicher kommen können, was zu einer selbständigen Abnahme der Amplitude der Kontraktionen geführt und somit die Reproduzierbarkeit der Versuche beeinträchtigt hätte (Furchgott RF et al. 1959).

Der Schreiber wurde auf dieselben Werte wie beim Versuch mit dem Vorhof eingestellt, jedoch wurden hier jeweils 6 Amplituden pro Messung aufgezeichnet. Die Substanzzugabe entsprach der der anderen Versuche, jedoch wurden bei der letzten Messung einer Konzentration jeweils noch zusätzlich 6 Amplituden bei 20 mm/sec aufgezeichnet um einen breiteren Graphen zu erhalten.

3.6.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS 40 an der Aorta

3.6.2.1. Glibenclamid

Abbildung 12: Strukturformel Glibenclamid

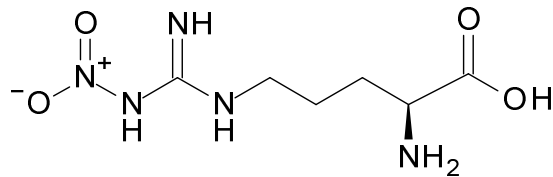


MG = 494,0 g/mol

Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoff-Derivat und wird als orales Antidiabetikum verwendet. In den B-Zellen des Pankreas bindet es an Membranen und schließt ATP-abhängige Kaliumkanäle, wodurch eine Depolarisation ausgelöst wird. In der Folge strömt durch die sich öffnenden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle Calcium in die Zelle und löst die Sekretion von Insulin aus (Forth et al. 2009). Zu den UAW der Sulfonylharnstoffe zählen hauptsächlich gastrointestinale Beschwerden und allergische Reaktionen, sie können jedoch auch schwere Hypoglykämien bei sowohl bei Gesunden als auch bei Typ-2 Diabetikern auslösen (Forth et al. 2009).

3.6.2.2. Nitro-L-Arginin

Abbildung 13: Strukturformel von Nitro-L-Arginin



MG = 219,20 g/mol

Nitro-L-Arginin ist ein Nitro-Derivat von Arginin, einer Aminosäure. Es wirkt als Vaso- und Koronarkonstriktor, indem es die Stickstoffmonoxid-Oxidase inhibiert (Bansinath et. al 1993).

Erst vor wenigen Jahren entdeckte man, dass es sich bei der früher als „Endothelium-derived relaxing factor“ bezeichneten Substanz um NO handelt.

NO, das aus dem Endothel freigesetzt wird, aktiviert die Guanylylcyclase (GC-S), welche cGMP aus GTP bildet. Dies führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum, das als second messenger zur Relaxation der glatten Muskulatur führt (Forth et al. 2009).

3.6.2.3. Durchführung der Versuche

Für die Untersuchung des Wirkmechanismus wurden sie selben ringförmigen Aorta-Präparate verwendet wie in den schon vorher beschriebenen Versuchen. Bis zum Erreichen der Maximalkontraktion war auch der Versuchsablauf gleich, jedoch wurde danach 30 bzw. 100 µmol/l Glibenclamid bzw. 100 µmol/l Nitro-L-Arginin als Antagonist zugesetzt.

Zuvor musste das lipophile und somit schwer wasserlösliche Glibenclamid jedoch in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden. Dieses Lösungsmittel konnte aufgrund seiner aprotisch-dipolaren Eigenschaften das Glibenclamid gut lösen und sich gleichzeitig mit Wasser mischen.

Nach einer Einwirkphase von 45 Minuten wurde der in den vorangegangenen Versuchen mit SWS 40 ermittelte gerundete EC₅₀ (15 µmol/l) zugesetzt und wieder 45 min gewartet. Die Auswertung der Ergebnisse wird im Kapitel 4 genauer beschrieben.

3.7. Auswertung der Daten und Statistik

3.7.1. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Das Ziel der Versuche an diesen Organen war die Überprüfung der dilatierenden Wirkung (bei Aorta und Arteria pulmonalis) bzw. der spasmolytischen Wirkung (beim Darm), nachdem eine maximale Kontraktion durch KCl erzwungen wurde. Unmittelbar vor jeder Substanzzugabe im Abstand von 45 Minuten musste der Zeitpunkt am Millimeterpapier markiert werden, um später den Grad der Kontraktion bei dieser Konzentration ablesen zu können. Das war nötig, um eine Dosis-Wirkungskurve zu erstellen, aus der dann er EC_{50} ermittelt werden konnte. Den Referenzwert bildete der Abstand von der Nulllinie bis zu dem Punkt in der Plateauphase, an dem man die erste Konzentration der Substanz applizierte. Bei den Punkten der weiteren Substanzzugaben maß man erneut die Abstände zur Nulllinie und verglich die Werte prozentuell. In die Berechnung mit einbezogen wurde ein Eichfaktor, der von dem jeweils verwendeten mV-Wert abhing. 1 cm am Millimeterpapier entsprach bei 5 mV 0,98 mN, bei 2 mV 0,196 mN und bei 10 mV 1,96 mN.

3.7.2. Atrium dexter

Bei den Versuchen am rechten Vorhof wurde die Schlagfrequenz, also die Chronotropie des Sinusknotens ermittelt. Nach Applikation der Testsubstanz konnte man eine Veränderung in der Frequenz beobachten. Die über einen Zeitraum von 12 sec gezählten Schläge mussten noch mit 5 multipliziert werden um auf die Anzahl der Schläge pro Minute zu kommen. Bei den Versuchen mit SWS 48 bzw. SWS 40 wurde jeweils eine negativ chronotrope Wirkung erzielt, also eine Verringerung der Schlagfrequenz.

3.7.3. Musculus papillaris

Beim Herzmuskel war die Änderung der Kontraktionskraft in mN Ziel der Untersuchungen. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Ergebnisse in Prozent umgerechnet.

Die durch den Flachbettschreiber aufgezeichneten Amplituden wurden vermessen und die erhaltenen Werte von cm auf mN umgerechnet. Je nachdem ob bei 2 mV oder 5 mV gemessen wurde, musste man anschließend mit 0.196 bzw. 0.98 multiplizieren, um die Werte zu standardisieren. Der Referenzwert, also der letzte Wert vor der Substanzzugabe, wurde gleich 100 % gesetzt, um die folgenden Werte als Abnahme in Prozent angeben zu können.

3.7.4. Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Werte gemittelt und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet. Für diese Berechnungen sowie die des jeweiligen EC_{50} wurde das Programm „Sigma Plot 9.0“ herangezogen. Der EC_{50} bedeutet die gemittelte effektive Konzentration der Wirksubstanz in mmol/l, bei der die Hälfte des Referenzwertes erzielt werden konnte. Weiters wurde mit Hilfe des Student-t-Tests die Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelt. Unter 5 % ($P < 0,05$) bzw. 1 % ($P < 0,01$) waren die Ergebnisse signifikant, unter 0,1 % ($P < 0,001$) hochsignifikant.

4. Ergebnisse

4.1. SWS 48

4.1.1. Aorta descendens

Es wurden 5 Versuche durchgeführt, um die dilatierende Wirkung von SWS 48 auf die glatte Muskulatur der Aorta zu testen. Die Messergebnisse wurden arithmetisch gemittelt und ein Referenz- bzw. Kontrollwert von $8,85 \pm 1,05$ mN ermittelt.

Tabelle 4: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl an der Aorta

SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,85 \pm 1,05$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$9,26 \pm 1,12$	$2,21 \pm 1,19$	5	n.s.
3	$8,86 \pm 1,13$	$-0,04 \pm 2,74$	5	n.s.
10	$7,90 \pm 1,14$	$-11,27 \pm 3,99$	5	n.s.
30	$5,19 \pm 1,08$	$-42,56 \pm 5,77$	5	0,001
100	$0,80 \pm 0,52$	$-92,41 \pm 4,68$	5	0,001

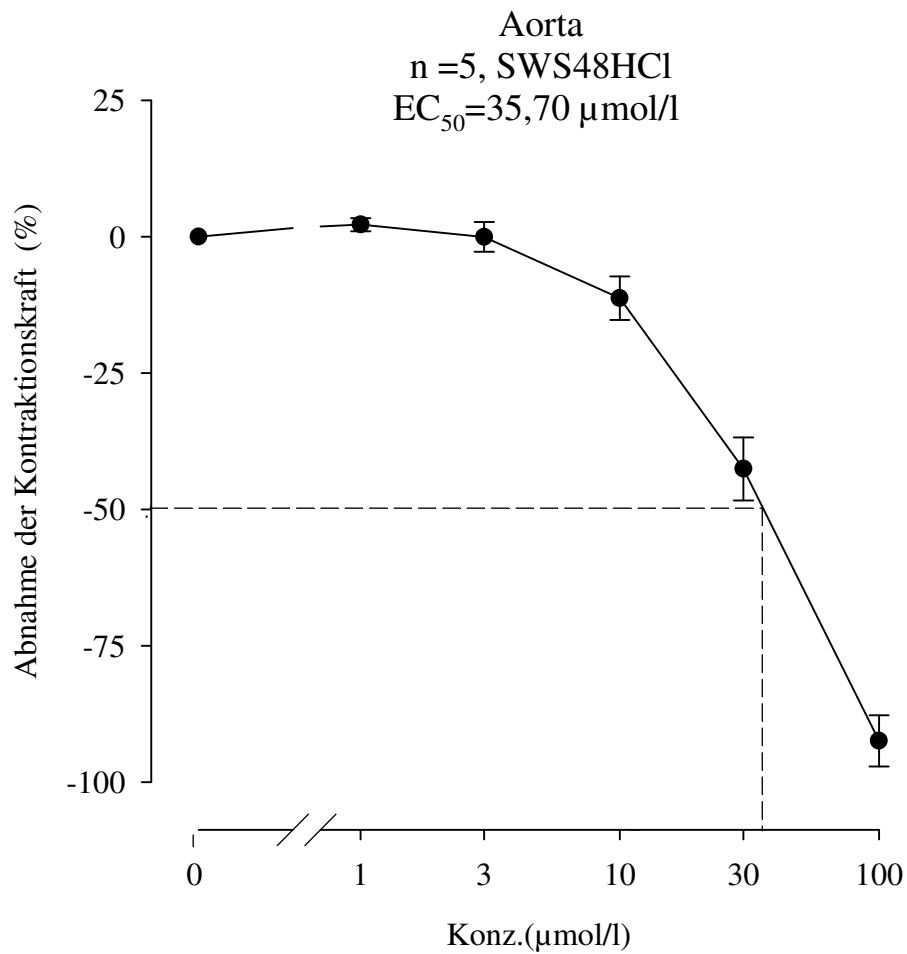
Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

Beide Größen sind sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

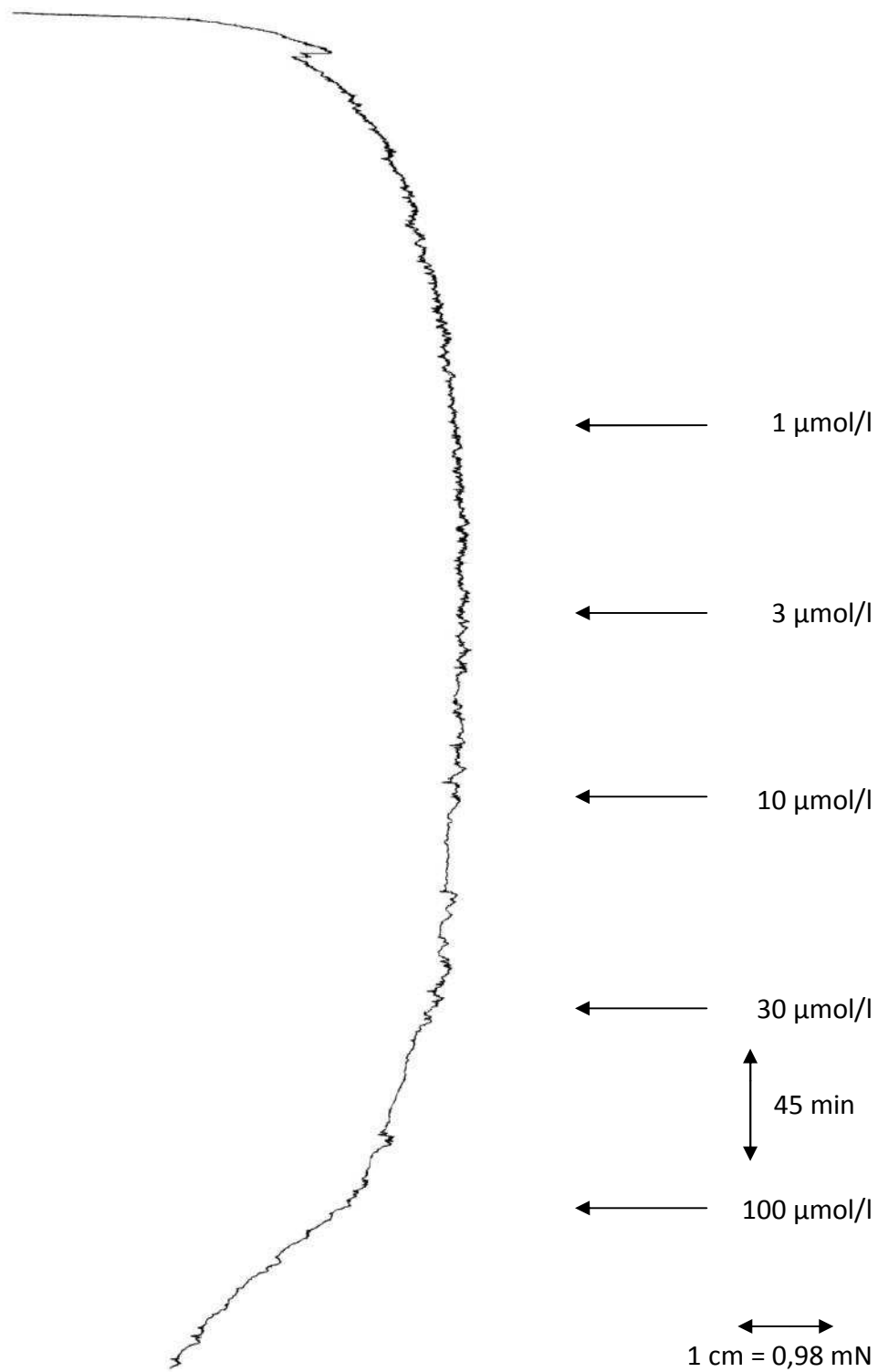
Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 48 HCl an der Aorta



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 48 HCl auf die glatte Muskulatur der Aorta. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC₅₀ wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt 35,70 µmol/l.

Abbildung 14: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 48 auf die Aorta



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

4.1.2. Arteria pulmonalis

Hier wurde die Wirkung von SWS 48 HCl auf die Lungenarterie anhand von 5 Präparaten getestet. Nach arithmetischem Mitteln der erhaltenen Werte wurde der Referenzwert mit $14,14 \pm 1,73$ mN festgelegt. Der ermittelte EC_{50} lag bei $31,50 \mu\text{mol/l}$.

Diagramm 2: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl an der Lungenarterie

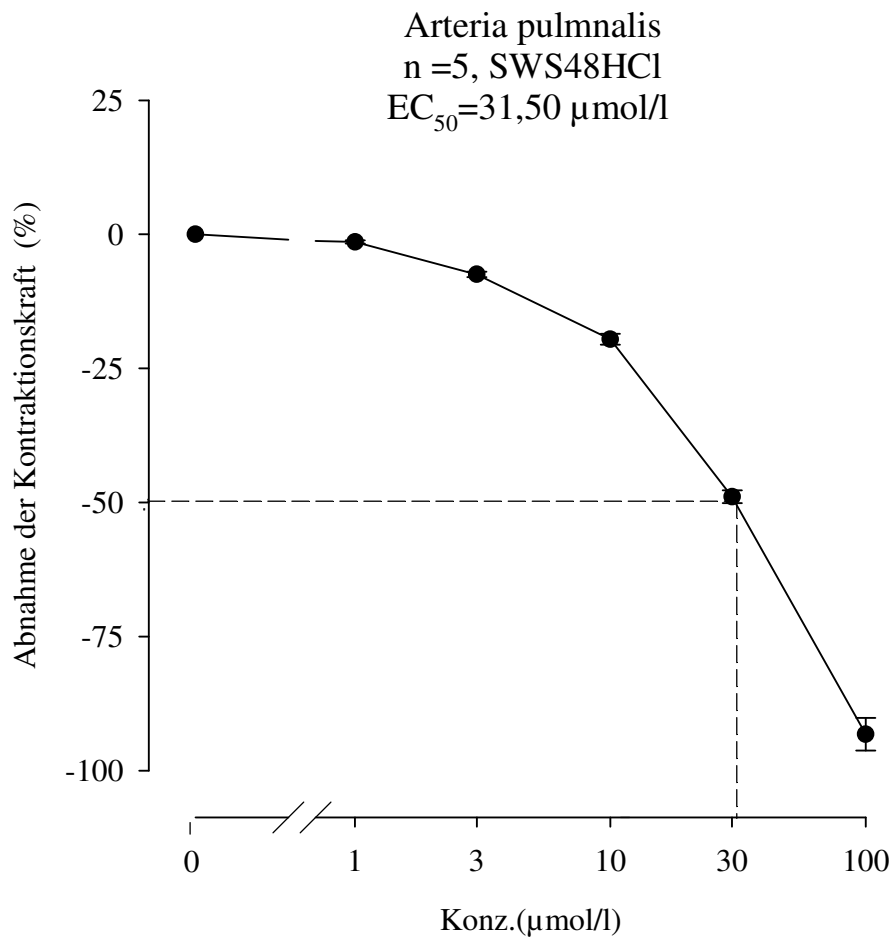
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$14,14 \pm 1,73$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$13,94 \pm 1,67$	$-1,42 \pm 0,28$	5	n.s.
3	$13,07 \pm 1,55$	$-7,47 \pm 0,49$	5	n.s.
10	$11,37 \pm 1,38$	$-19,57 \pm 1,00$	5	0,01
30	$7,27 \pm 0,99$	$-48,92 \pm 1,18$	5	0,001
100	$1,09 \pm 0,57$	$-93,24 \pm 3,04$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

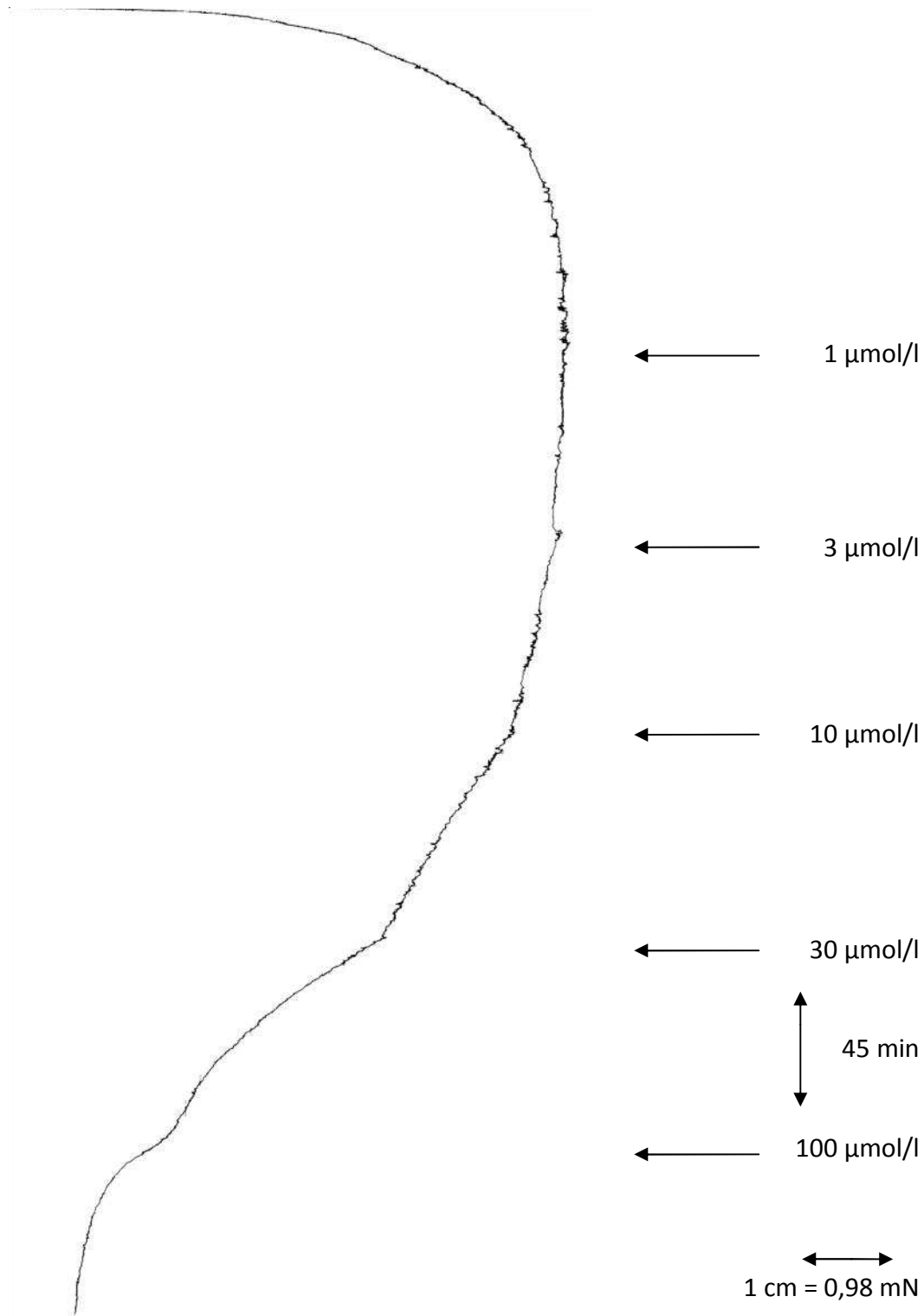
Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 48 HCl an der Lungenarterie



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 48 HCl auf die glatte Muskulatur der Lungenarterie. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC_{50} wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt $31,50 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 15: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 48 auf die Arteria pulmonalis



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

4.1.3. Terminales Ileum

Die Wirkung auf den Darm bzw. seine glatte Muskulatur wurde bei 5 Versuchen überprüft. Der Referenzwert betrug hier $11,05 \pm 1,67$ mN. Bei der letzten Konzentration war der Darm nahezu völlig relaxiert, der EC_{50} betrug $16,00 \mu\text{mol/l}$ und ist somit ein passabler Wert.

Tabelle 5: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl am Darm

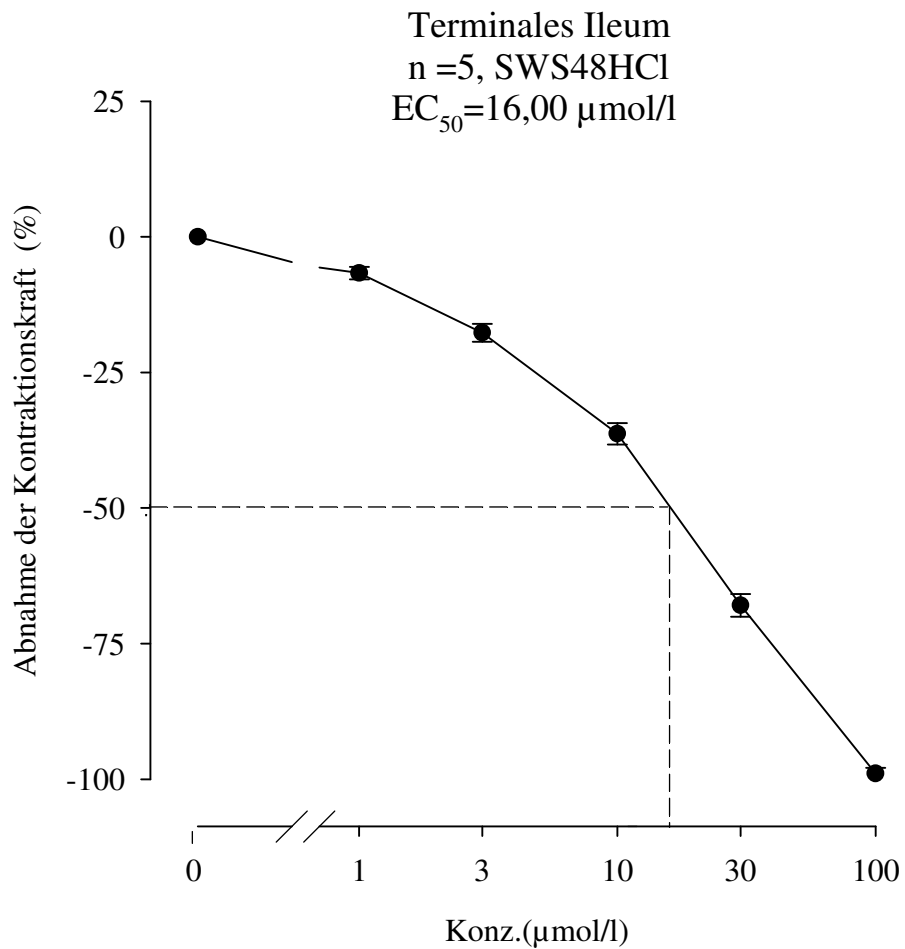
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,05 \pm 1,67$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$10,29 \pm 1,50$	$-6,68 \pm 1,16$	5	n.s.
3	$9,13 \pm 1,42$	$-17,68 \pm 1,64$	5	0,01
10	$7,13 \pm 1,20$	$-36,31 \pm 1,97$	5	0,01
30	$3,56 \pm 0,64$	$-67,95 \pm 2,08$	5	0,001
100	$0,08 \pm 0,08$	$-98,97 \pm 1,03$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

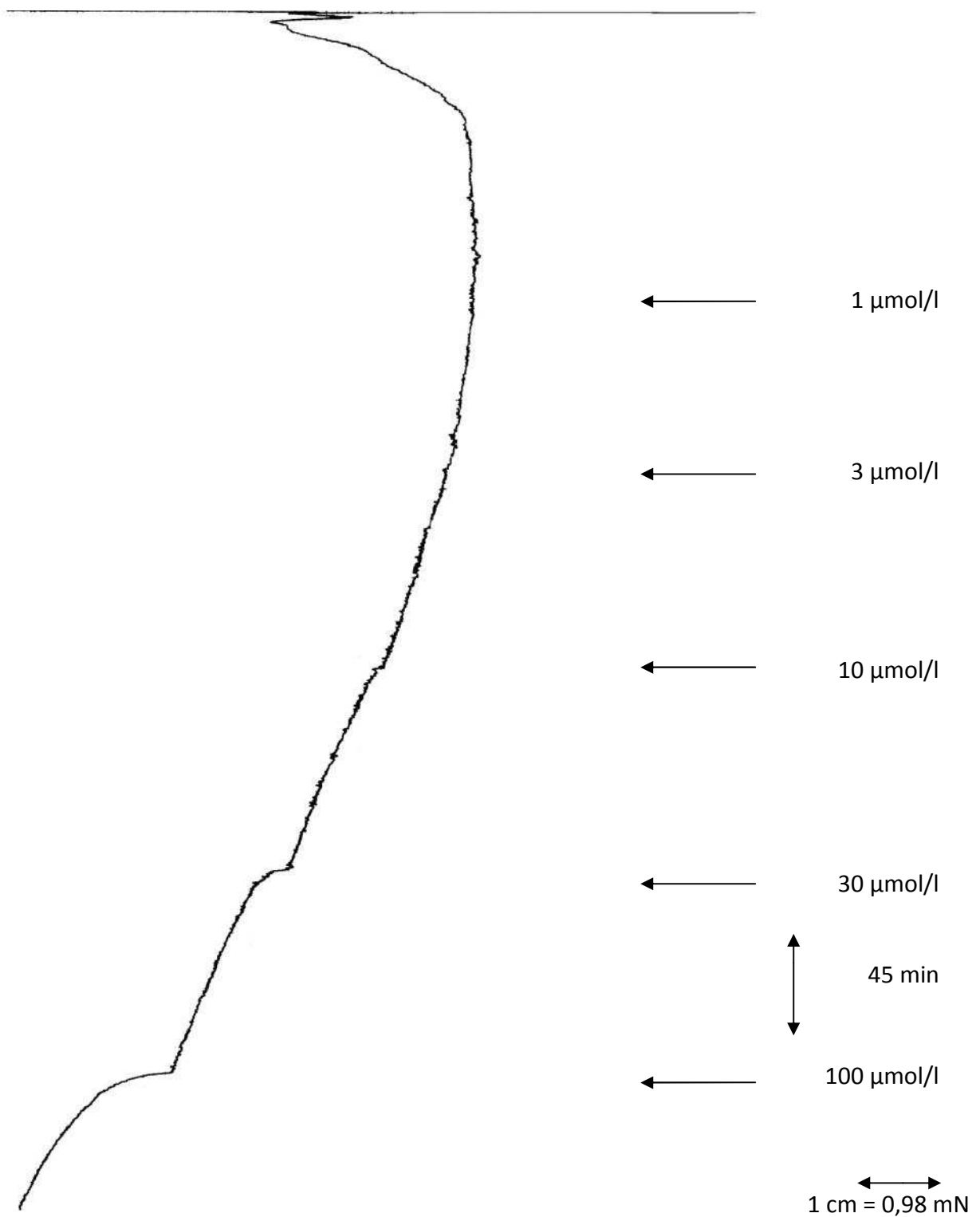
Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 48 HCl am Darm



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 48 HCl auf die glatte Muskulatur des Darmgewebes. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC_{50} wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt $16,00 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 16: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 48 HCl auf den Darm



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

4.1.4. Atrium dexter

Der Effekt von SWS 48 HCl auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes wurde anhand von 5 Versuchen gemessen. Der Kontrollwert betrug $240 \pm 12,75$ Schläge pro Minute. Während bei niedrigeren Substanzkonzentrationen kaum ein signifikanter Effekt messbar war, wirkte SWS 48 HCl in höheren Konzentrationen leicht negativ chronotrop. Ein EC_{50} konnte jedoch nicht erreicht werden.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl am Vorhof

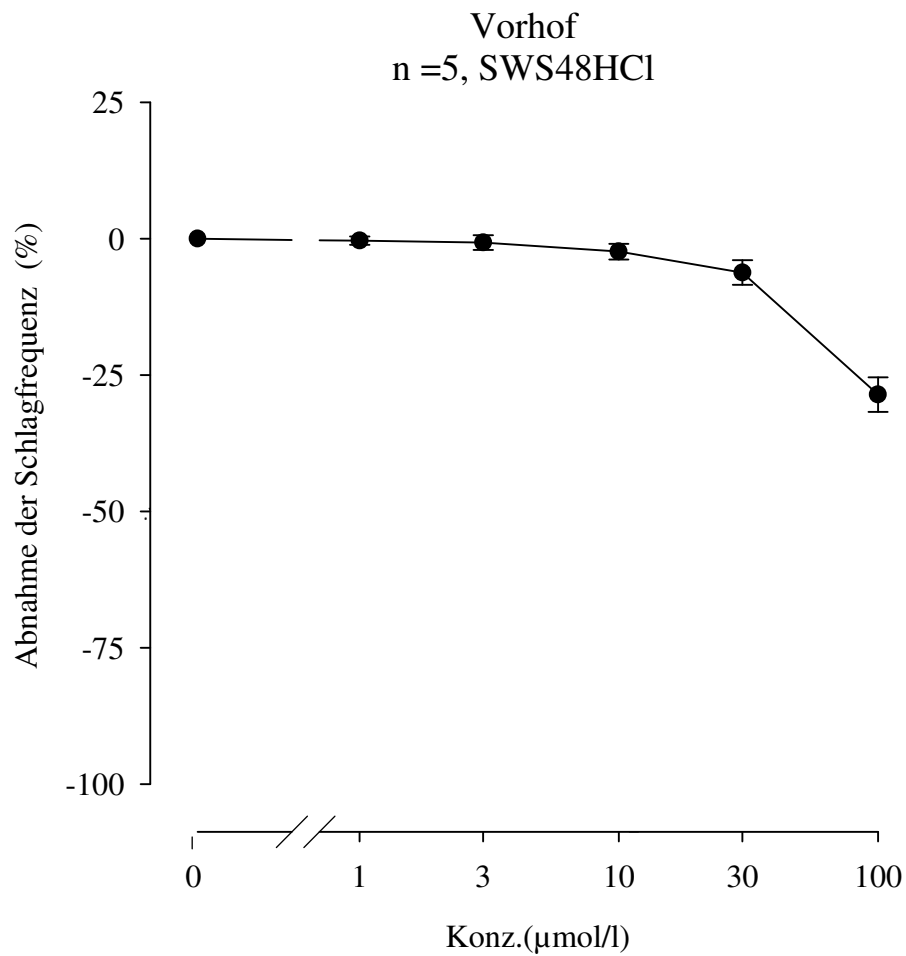
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$240 \pm 12,75$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$239 \pm 11,98$	$-0,35 \pm 0,76$	5	n.s.
3	$238 \pm 11,14$	$-0,69 \pm 1,38$	5	n.s.
10	$234 \pm 11,11$	$-2,37 \pm 1,45$	5	n.s.
30	$225 \pm 12,45$	$-6,20 \pm 2,25$	5	n.s.
100	$172 \pm 14,28$	$-28,59 \pm 3,15$	5	0,05

Legende zur Tabelle:

f Schlagfrequenz

SEM Standardabweichung

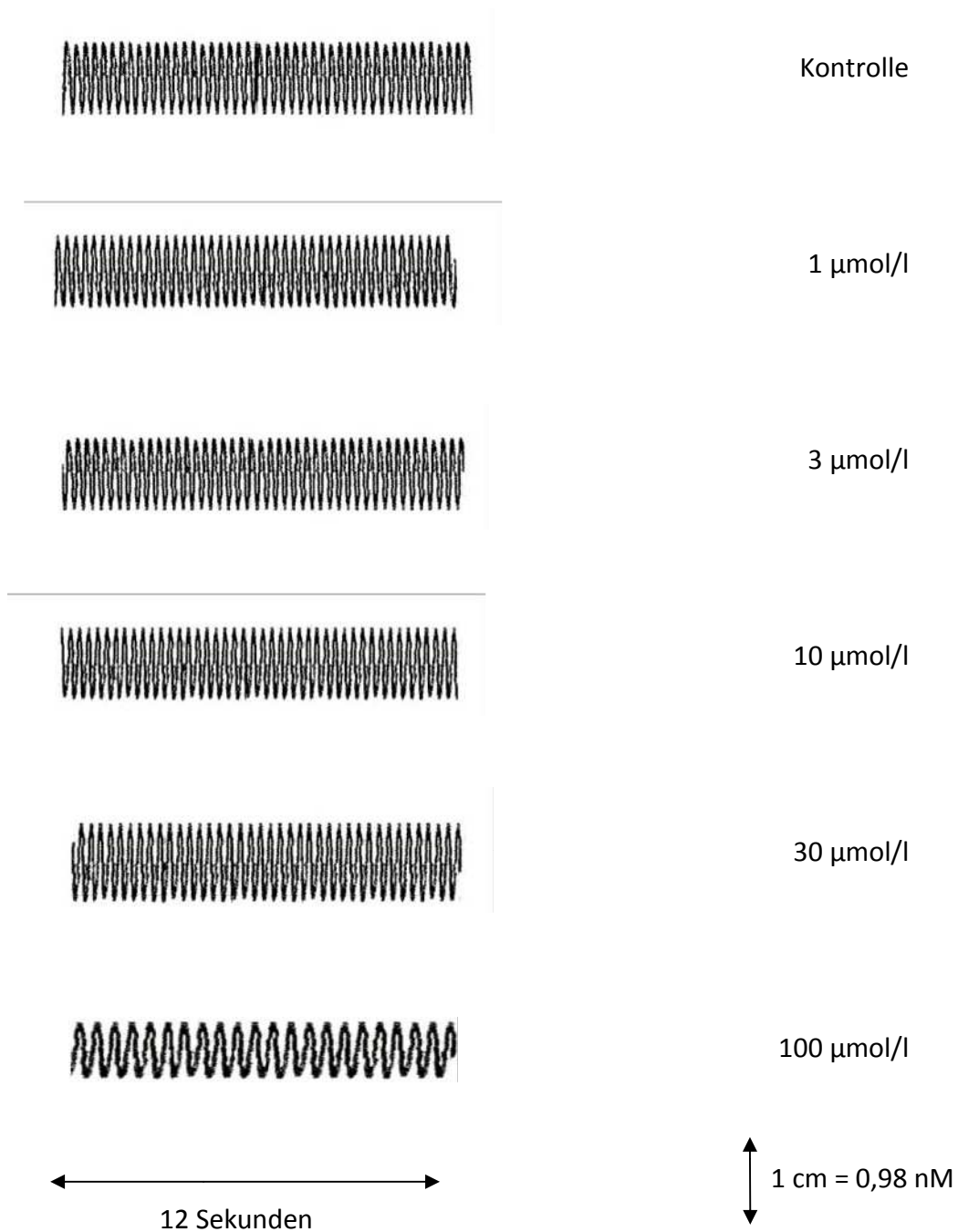
Diagramm 5: Dosis-Wirkungskurve von SWS 48 HCl am rechten Vorhof



Legende zum Diagramm:

Auf der x-Achse ist wie bisher die Konzentration von SWS 48 HCl aufgetragen, auf der y-Achse jetzt die Schlagfrequenz des Vorhofes. Hier ist ein schwacher Effekt erst bei der letzten Konzentration zu beobachten.

Abbildung 17: Aufzeichnungen der Wirkung von SWS 48 am rechten Vorhof



Legende zur Abbildung:

Hier sieht man die Aufzeichnungen der Amplituden des Vorhofs in einem Zeitraum von 12 Sekunden. Multipliziert man die gezählte Schlaganzahl mit 5, erhält man die Schlagfrequenz pro 1 Minute.

4.1.5. Musculus papillaris

Für die Untersuchung der Wirkung am Papillarmuskel wurden 5 Versuche durchgeführt. Während die Schlagkraft bei niedrigen Konzentrationen zuerst sank, stieg sie bei höheren Konzentrationen stark an. Der Kontrollwert belief sich auch $1,86 \pm 0,80$ mN

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl am Papillarmuskel

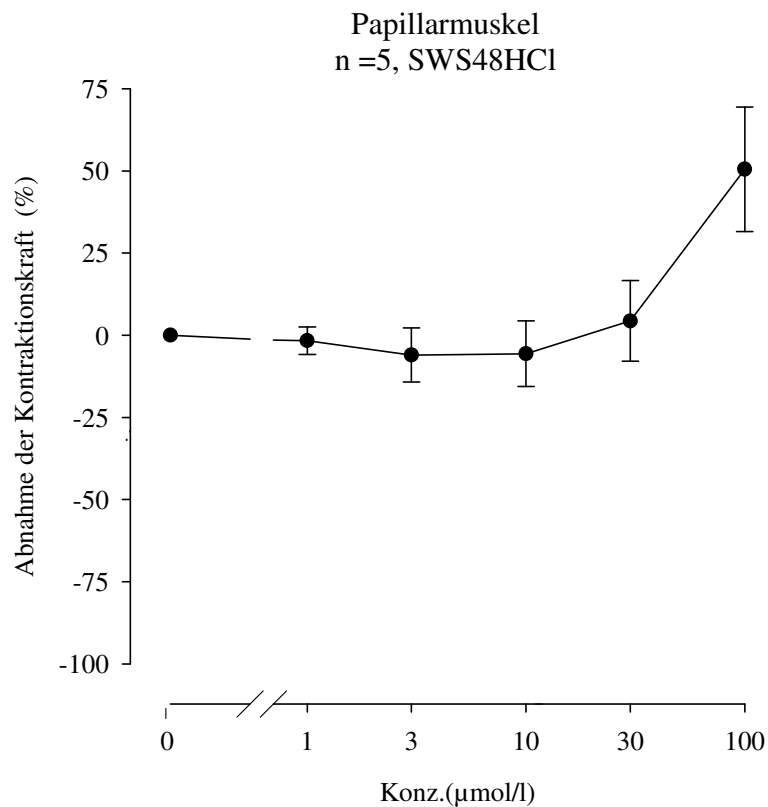
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,86 \pm 0,80$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$1,93 \pm 0,91$	$-1,68 \pm 4,19$	5	n.s.
3	$1,99 \pm 1,01$	$-6,03 \pm 8,23$	5	n.s.
10	$2,02 \pm 1,03$	$-5,61 \pm 9,96$	5	n.s.
30	$2,19 \pm 1,11$	$4,35 \pm 12,27$	5	n.s.
100	$2,98 \pm 1,38$	$50,52 \pm 18,94$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

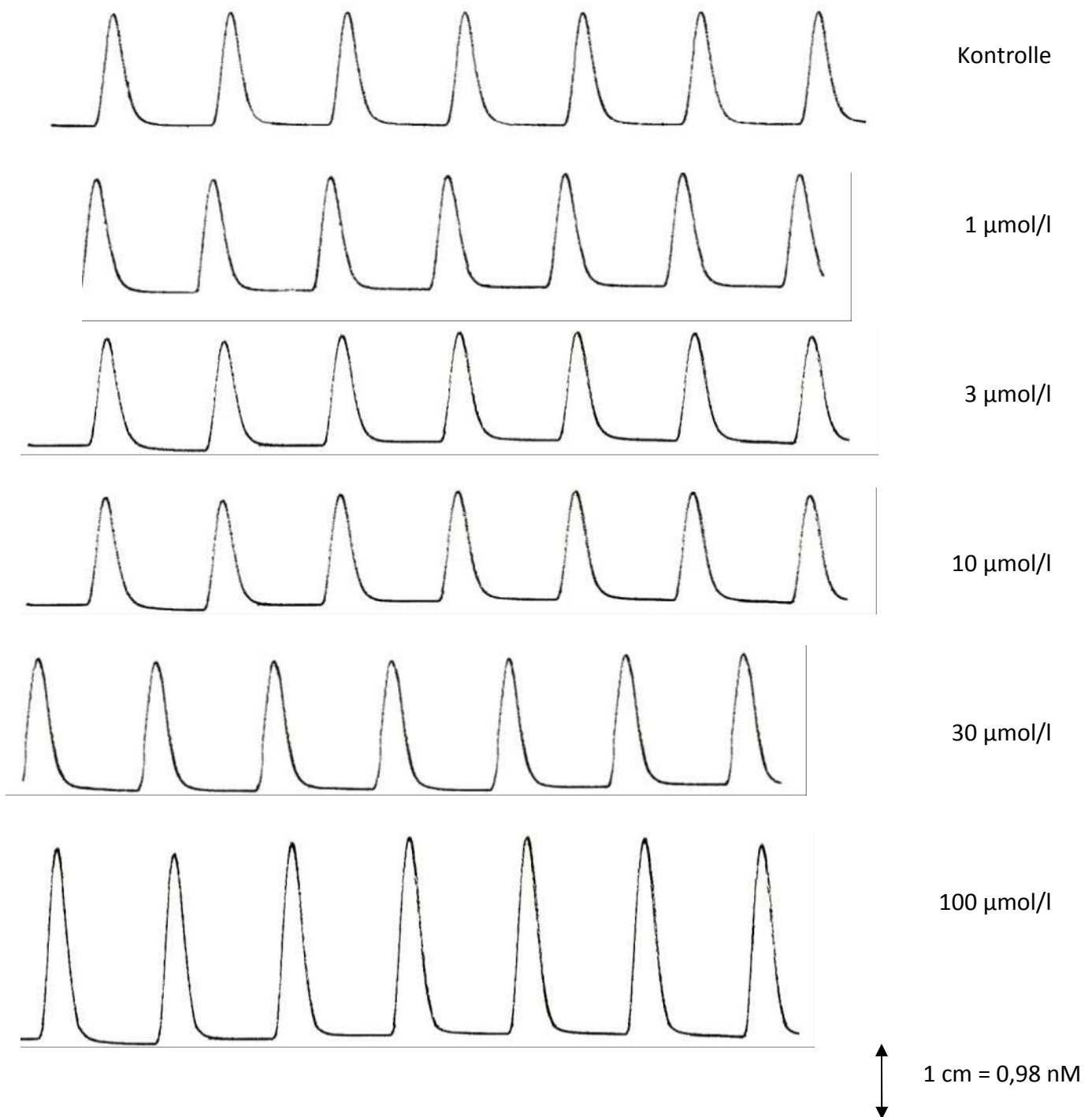
Diagramm 6: Dosis-Wirkungskurve von SWS 48 HCl am Papillarmuskel



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 48 HCl auf die Inotropie der Papillarmuskel. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Man sieht, dass bei niedrigeren Konzentrationen fast kein Effekt eintritt, bei der letzten jedoch ein signifikanter Anstieg zu bemerken ist.

Abbildung 18: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 48 HCl auf den Vorhof



Legende zur Abbildung:

Hier sieht man die Aufzeichnung der Amplituden der elektrisch gereizten Papillarmuskeln.

4.2. SWS 40 HCl

4.2.1. Aorta descendens

Bei den 5 durchgeführten Versuchen wurde ein Kontrollwert von $6,28 \pm 0,48$ mN errechnet. Schon bei der 2. Einspritzung wurde eine deutliche dilatierende Wirkung ersichtlich, bei der vorletzten Einspritzung waren die Präparate schon fast vollständig dilatiert. Das schlug sich auch auf den beachtlichen EC_{50} von $12,50 \mu\text{mol/l}$ nieder.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von SWS 40 HCl an der Aorta

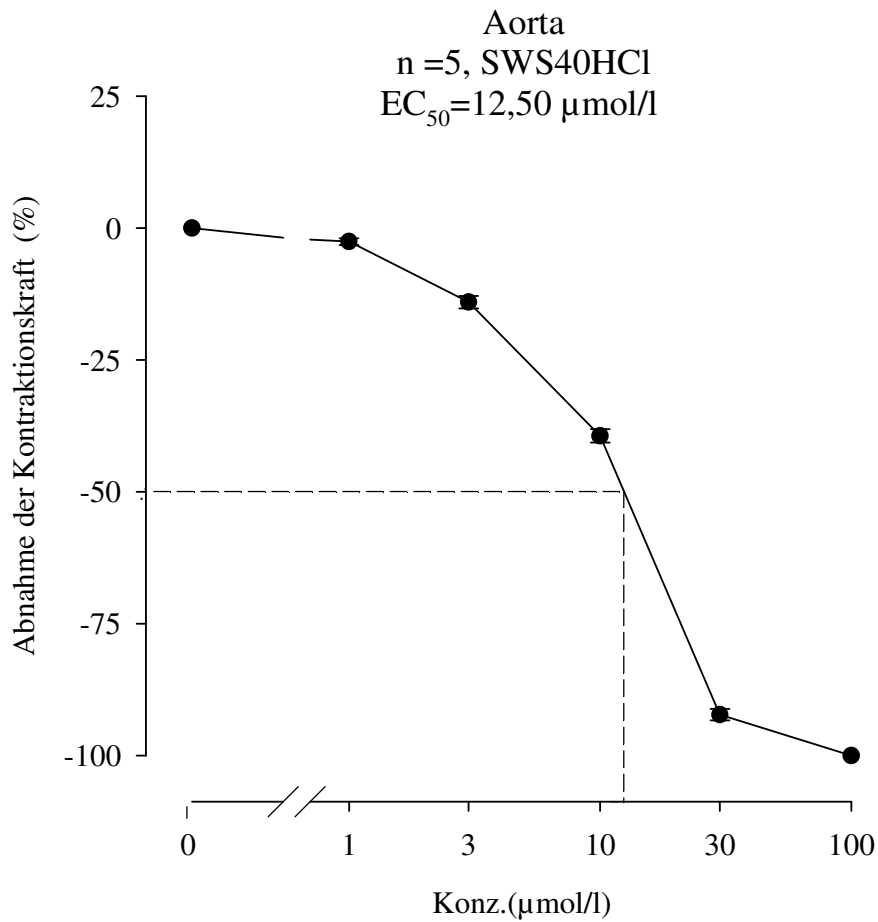
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$6,28 \pm 0,48$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$6,00 \pm 0,52$	$-2,57 \pm 0,62$	5	n.s.
3	$5,27 \pm 0,40$	$-14,03 \pm 1,19$	5	0,05
10	$3,72 \pm 0,30$	$-39,39 \pm 1,28$	5	0,01
30	$0,39 \pm 0,11$	$-92,24 \pm 1,09$	5	0,001
100	$0,00 \pm 0,00$	$-100,00 \pm 0,00$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

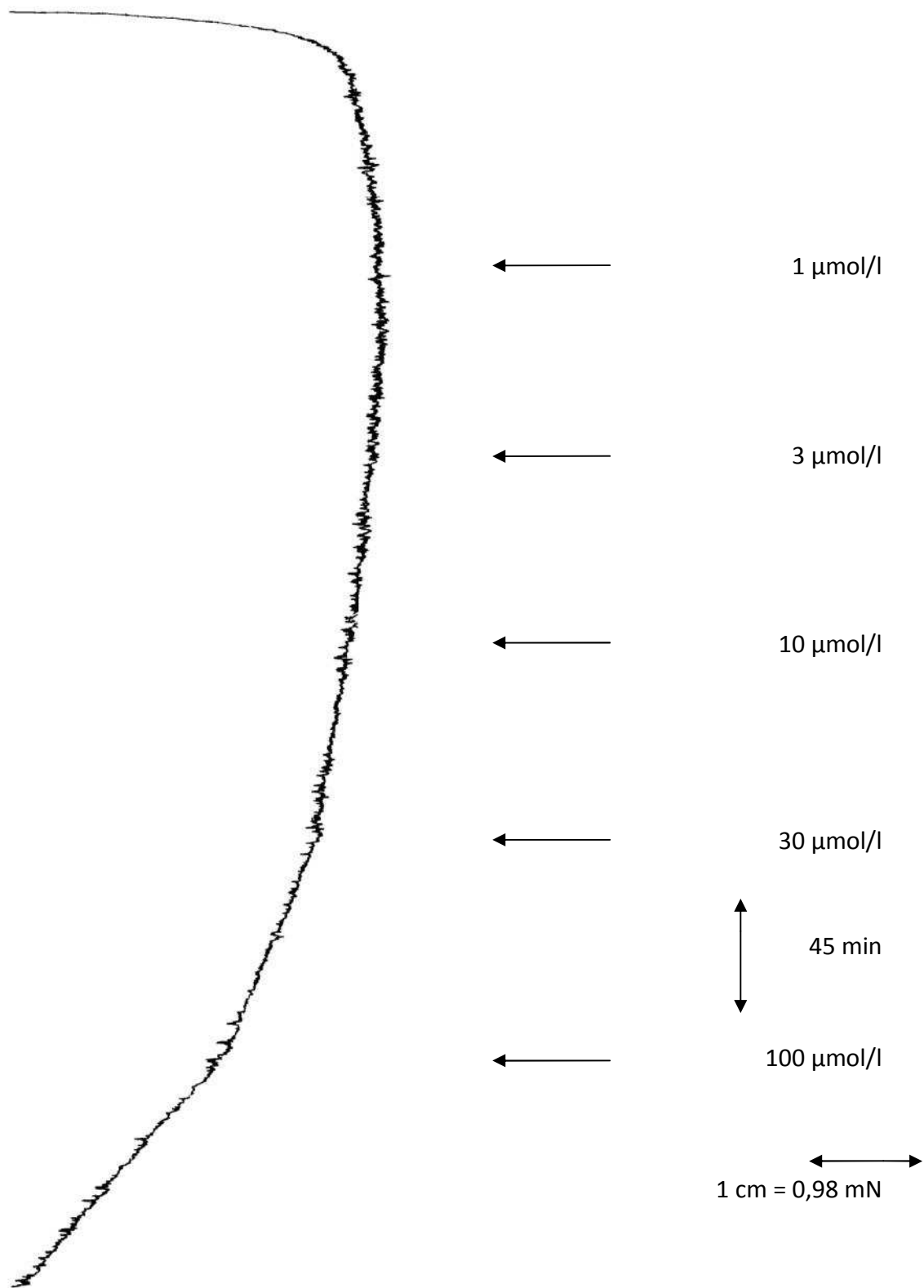
Diagramm 7: Dosis-Wirkungskurve von SWS 40 HCl an der Aorta



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 40 HCl auf die glatte Muskulatur der Aorta. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC_{50} wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt $12,50 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 19: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 40 auf die



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

4.2.2. Arteria pulmonalis

Hier wurde die Wirkung von SWS 40 HCl auf die Lungenarterie anhand mittels 5 Versuchen getestet. Nach arithmetischem Mitteln der erhaltenen Werte wurde der Referenzwert mit $17,53 \pm 1,83$ mN festgelegt. Der ermittelte EC_{50} lag bei $23,00 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von SWS 40 HCl an der Lungenarterie

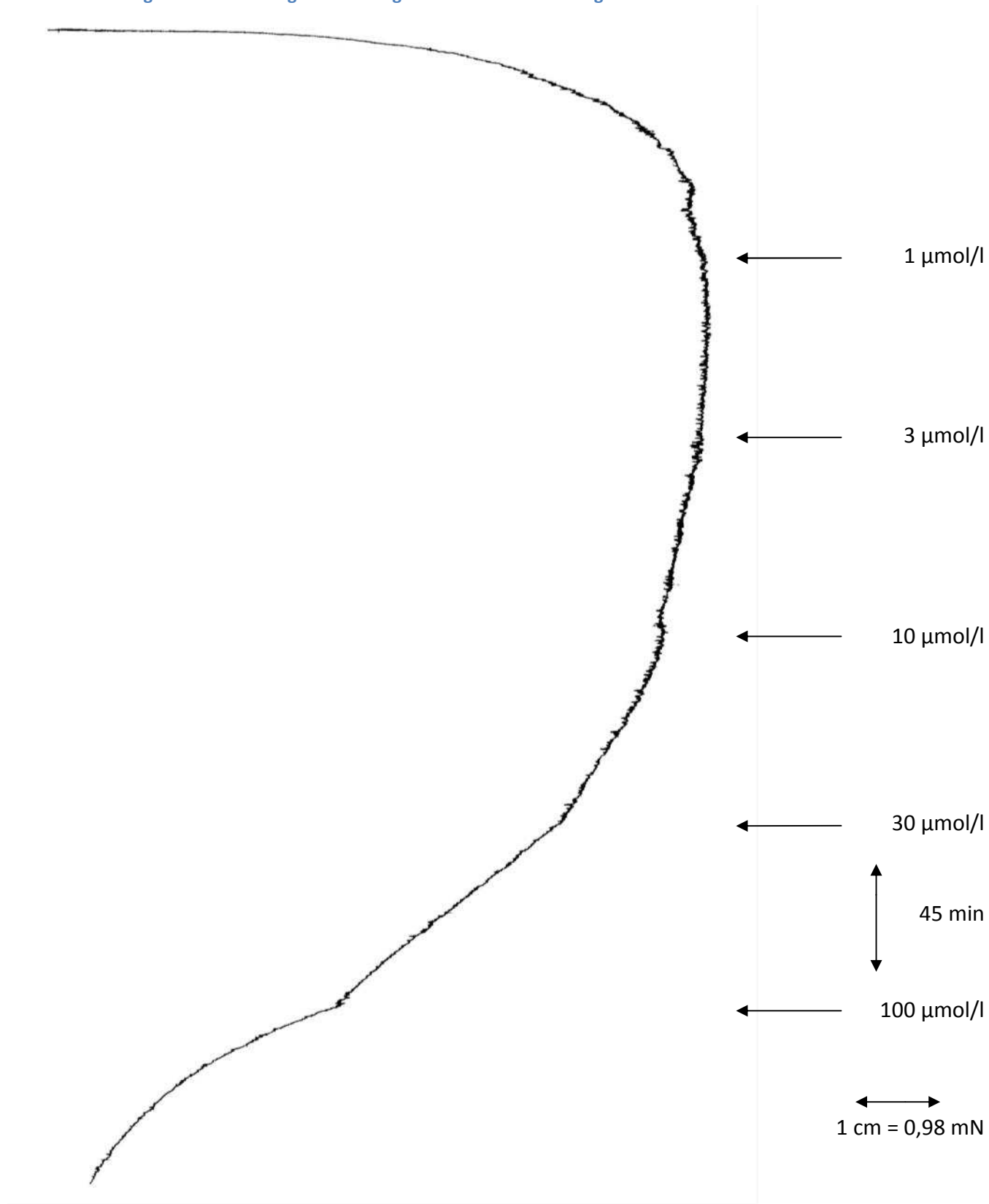
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$17,53 \pm 1,83$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$17,24 \pm 1,84$	$-1,77 \pm 0,35$	5	n.s.
3	$16,46 \pm 1,81$	$-6,29 \pm 0,59$	5	n.s.
10	$13,88 \pm 1,63$	$-21,24 \pm 1,32$	5	0,05
30	$7,19 \pm 0,95$	$-59,24 \pm 1,96$	5	0,001
100	$0,81 \pm 0,34$	$-95,67 \pm 1,44$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

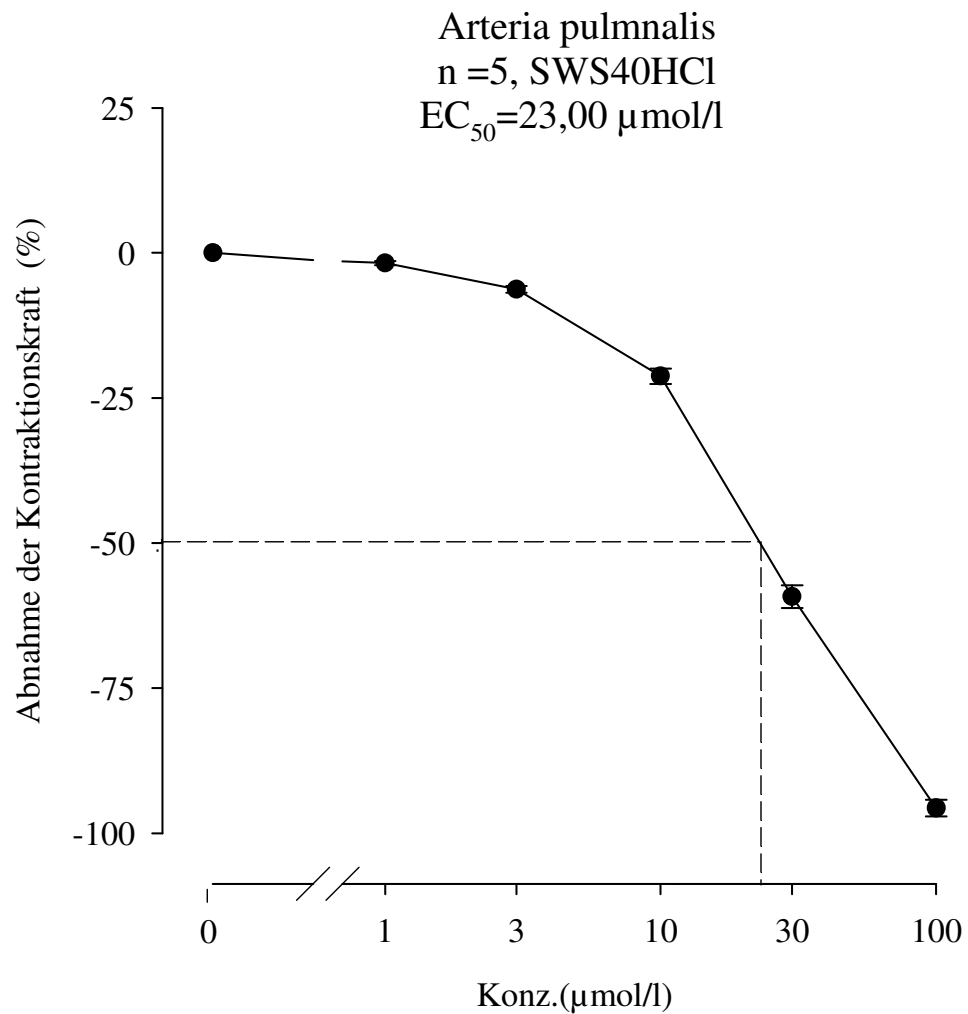
Abbildung 20: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 40 auf die Lungenarterie



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

Diagramm 8: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 40 HCl an der Lungenarterie



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 40 HCl auf die glatte Muskulatur der Lungenarterie. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC_{50} wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt $23,00 \mu\text{mol/l}$.

4.2.3. Terminales Ileum

Die Wirkung auf den Darm bzw. seine glatte Muskulatur wurde bei 5 Versuchen überprüft. Der Referenzwert betrug hier $10,92 \pm 2,45$ mN. Bei der letzten Konzentration war der Darm nahezu völlig relaxiert, der EC_{50} war mit $20,70 \mu\text{mol/l}$ ganz passabel.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse von SWS 40 HCl am Darm

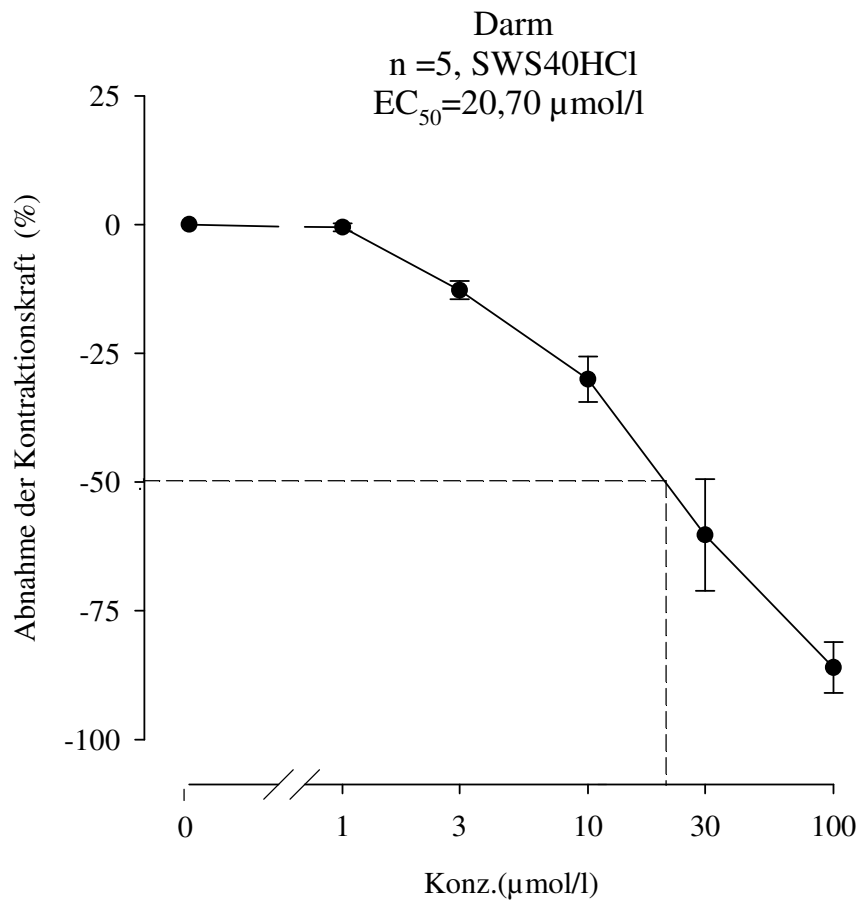
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,92 \pm 2,45$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$10,32 \pm 2,31$	$-0,53 \pm 0,77$	5	n.s.
3	$9,39 \pm 2,00$	$-12,76 \pm 1,78$	5	0,05
10	$7,78 \pm 1,86$	$-30,04 \pm 4,44$	5	0,01
30	$4,82 \pm 1,50$	$-60,30 \pm 10,83$	5	0,001
100	$1,68 \pm 0,74$	$-86,03 \pm 4,93$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

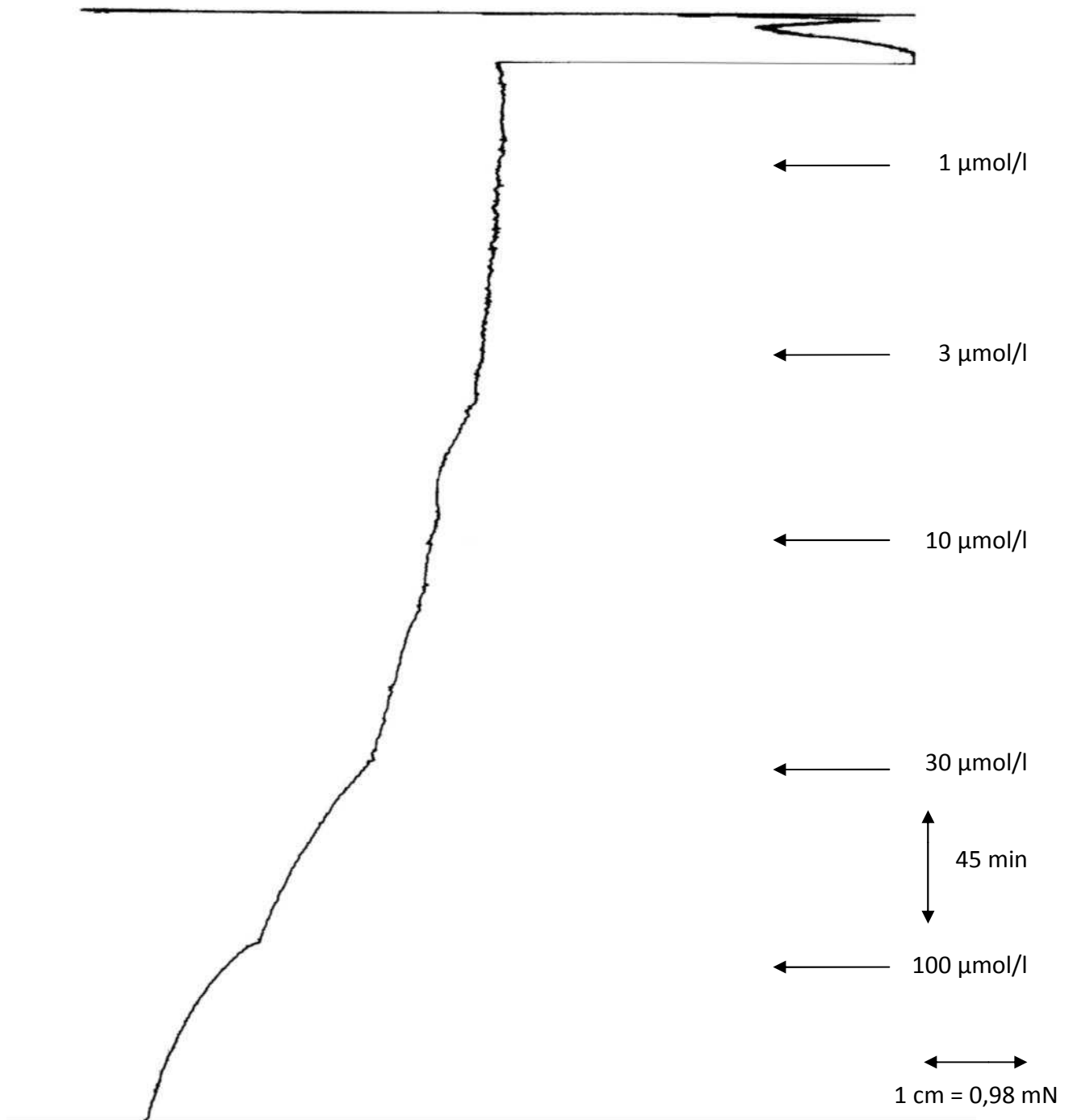
Diagramm 9: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 40 HCl am Darm



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 40 HCl auf die glatte Muskulatur des Darmgewebes. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte pro Konzentration, die Balken die Standardabweichung. Der EC₅₀ wurde mit Hilfe der strichlierten Linie graphisch ermittelt und beträgt 20,70 µmol/l.

Abbildung 21: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 40 HCl auf den Darm



Legende zur Abbildung:

Die Pfeile markieren die jeweiligen Einspritz-Zeitpunkte, die im Abstand von 45 Minuten erfolgten.

4.2.4. Atrium dexter

Der Effekt von SWS 40 HCl auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes wurde anhand von 5 Versuchen gemessen. Der Kontrollwert betrug $231 \pm 13,82$ Schläge pro Minute. Während bei niedrigeren Substanzkonzentrationen wie bei SWS 48 HCl kaum ein signifikanter Effekt messbar war, wirkte SWS 40 HCl in höheren Konzentrationen negativ chronotrop. Ein EC_{50} wurde jedoch nicht erreicht.

Tabelle 11: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl am Vorhof

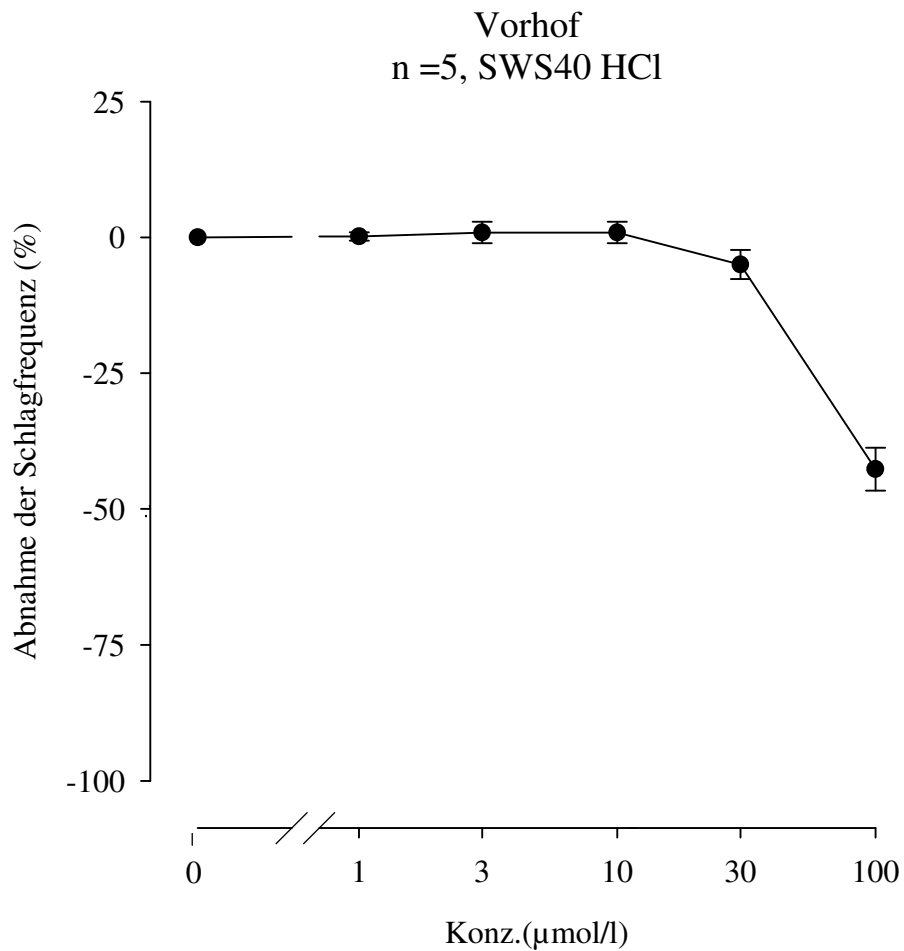
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$231 \pm 13,82$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$231 \pm 12,39$	$0,17 \pm 0,75$	5	n.s.
3	$234 \pm 10,54$	$0,90 \pm 2,00$	5	n.s.
10	$232 \pm 10,07$	$0,90 \pm 2,00$	5	n.s.
30	$218 \pm 7,84$	$-4,99 \pm 2,70$	5	n.s.
100	$132 \pm 10,07$	$-42,66 \pm 3,93$	5	0,01

Legende zur Tabelle:

f Schlagfrequenz

SEM Standardabweichung

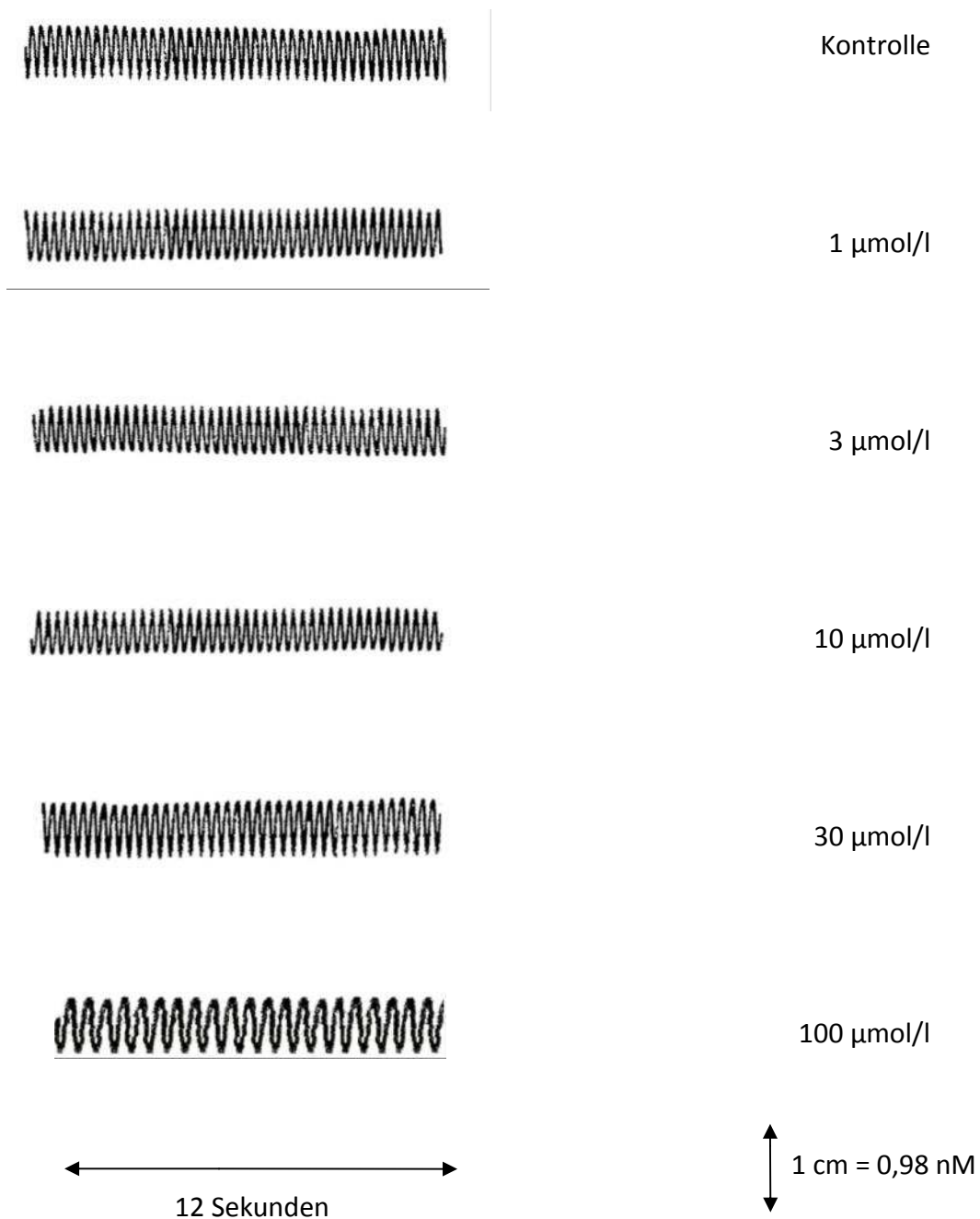
Diagramm 10: Dosis-Wirkungskurve von SWS 40 HCl am rechten Vorhof



Legende zum Diagramm:

Auf der x-Achse ist die Konzentration von SWS 40 HCl aufgetragen, auf der y-Achse die Schlagfrequenz des Vorhofes. Hier ist ein schwacher Effekt erst bei der letzten Konzentration zu beobachten.

Abbildung 22: Aufzeichnungen der Wirkung von SWS 40 am rechten Vorhof



Legende zur Abbildung:

Hier sieht man die Aufzeichnungen der Amplituden des Vorhofs in einem Zeitraum von 12 Sekunden. Multipliziert man die gezählte Schlaganzahl mit 5, erhält man die Schlagfrequenz pro 1 Minute.

4.2.5. Musculus papillaris

Für die Untersuchung der Wirkung am Papillarmuskel wurden 5 Versuche durchgeführt. Während die Schlagkraft bei niedrigen Konzentrationen zuerst sank, stieg sie bei höheren Konzentrationen wie schon bei SWS 48 HCl beobachtet stark an. Der Kontrollwert war $0,88 \pm 0,16$ mN

Tabelle 12: Versuchsergebnisse von SWS 48 HCl am Papillarmuskel

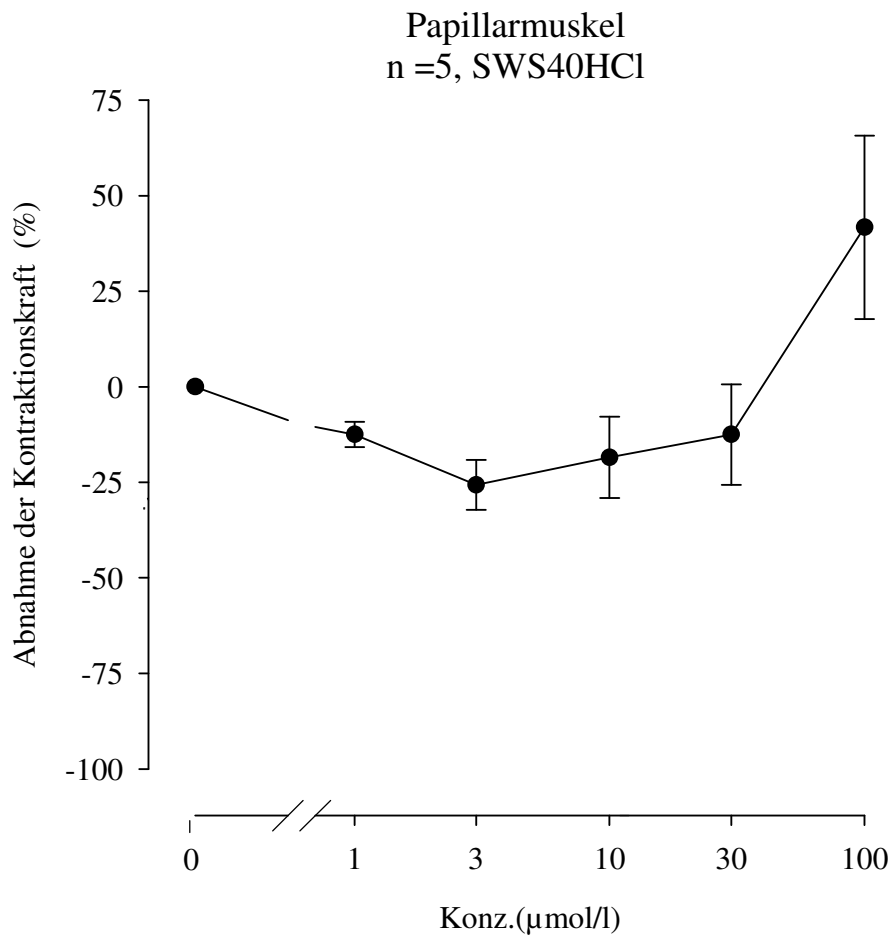
SWS 48 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$0,88 \pm 0,16$	$0,00 \pm 0,00$	5	–
1	$0,78 \pm 0,16$	$-12,48 \pm 3,30$	5	n.s.
3	$0,67 \pm 0,16$	$-25,69 \pm 6,50$	5	0,05
10	$0,76 \pm 0,21$	$-18,46 \pm 10,66$	5	0,05
30	$0,82 \pm 0,23$	$-12,52 \pm 13,10$	5	0,05
100	$1,33 \pm 0,43$	$41,74 \pm 24,00$	5	0,001

Legende zur Tabelle:

f_c Kontraktionskraft

SEM Standardabweichung

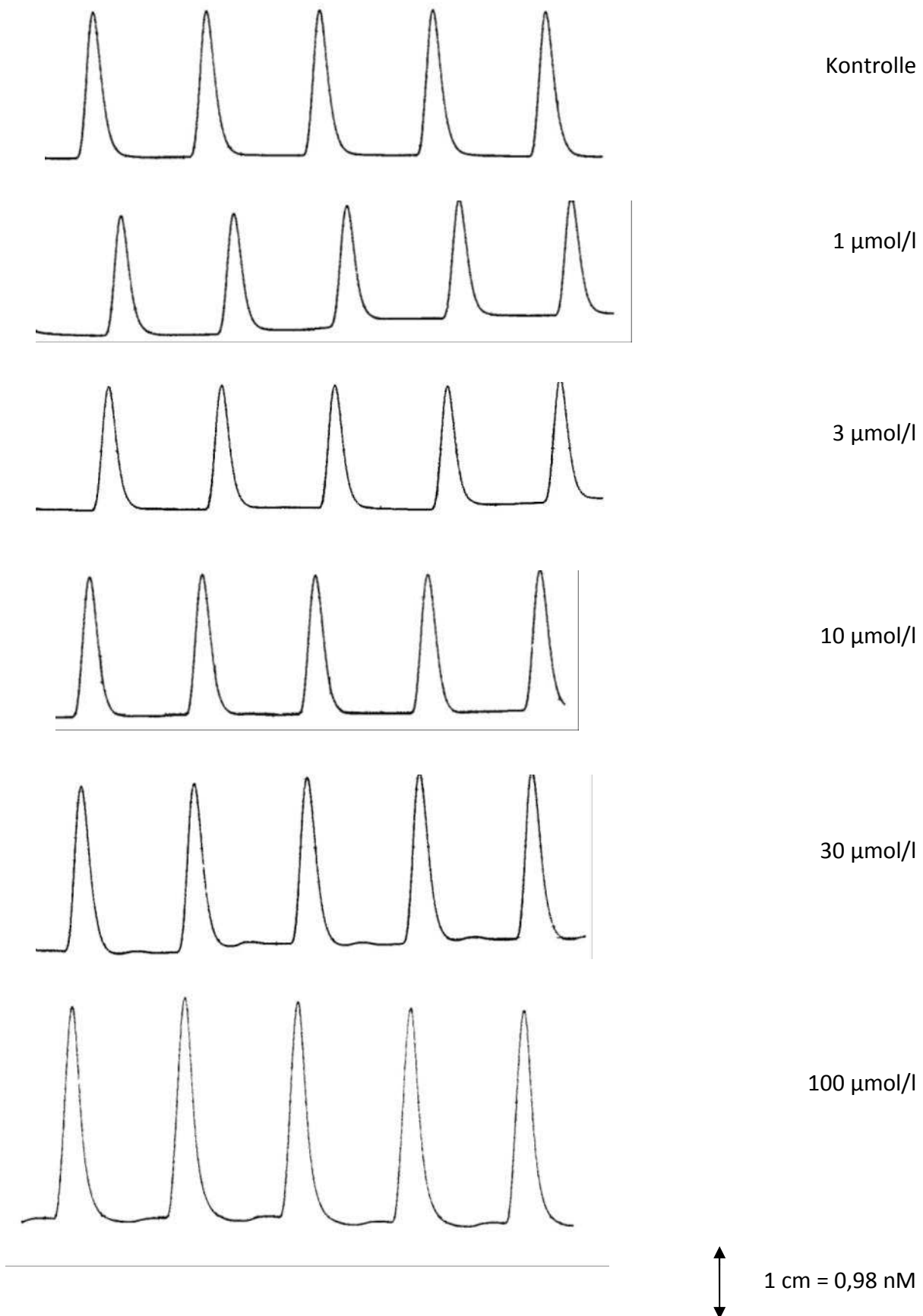
Diagramm 11: Dosis-Wirkungskurve von SWS 40 HCl am Papillarmuskel



Legende zum Diagramm:

Dieser Graph beschreibt die Wirkung von SWS 40 HCl auf die Inotropie der Papillarmuskel. Auf der x-Achse ist die Wirkstoff-Konzentration, auf der y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Man sieht, dass bei niedrigeren Konzentrationen nur ein geringer negativ inotroper Effekt eintritt, bei der letzten jedoch eine positive Inotropie zu bemerken ist.

Abbildung 23: Aufzeichnung der Wirkung von SWS 40 HCl auf den Vorhof



Legende zur Abbildung:

Hier sieht man die Aufzeichnung der Amplituden der elektrisch gereizten Papillarmuskeln.

4.3. Wirkmechanismus von SWS 40 HCl

Da der EC_{50} von SWS 40 HCl beim Versuch an der Aorta am niedrigsten war und somit die Wirkung hier am stärksten, wurde diese Kombination zur Untersuchung des Wirkmechanismus herangezogen. Bei den dazu dienenden Versuchsreihen kamen Glibenclamid bzw. Nitro-L-Arginin zum Einsatz.

4.3.1. Effekt von SWS 40 HCl mit Glibenclamid auf die Aorta

Die Versuche wurden wie bereits in Kapitel 3.6.2.1. beschrieben durchgeführt und hatten zum Ziel, herauszufinden, ob der Kaliumkanalblocker Glibenclamid die Wirkung von SWS 40 HCl antagonisieren kann. In diesem Fall könnte man den Wirkmechanismus über eine Öffnung der Kaliumkanäle erklären.

Bei je 4 Präparaten wurde eine Glibenclamid-in-DMSO-Lösung in Konzentrationen von 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ appliziert und nach 45 min der gerundete EC_{50} (15 $\mu\text{mol/l}$) von SWS 40 HCl zugegeben.

Tabelle 13: Ergebnisse Wirkmechanismus mit 30 μM Glibenclamid

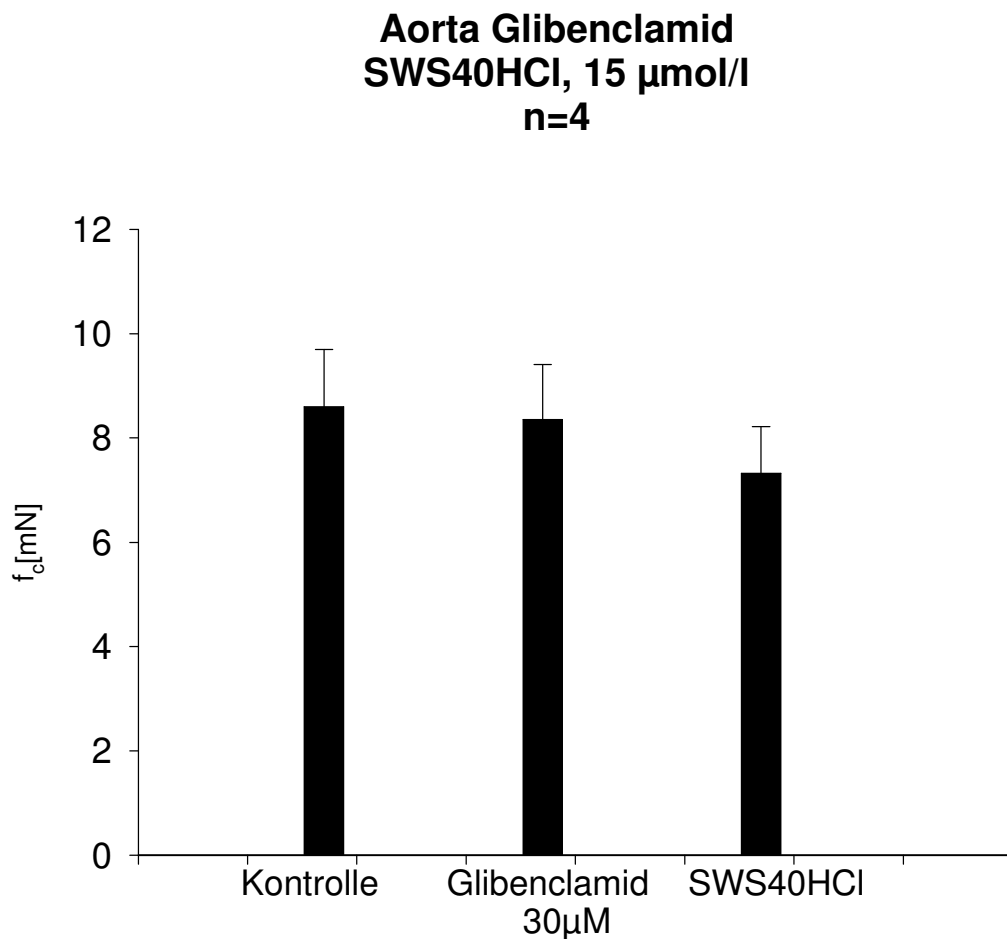
Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,60 \pm 1,10$	4	–
30 μM Glibenclamid	$8,35 \pm 1,06$	4	–
+ 15 μM SWS 40 HCl	$7,32 \pm 0,90$	4	n.s.

Tabelle 14: Ergebnisse Wirkmechanismus mit 100 μM Glibenclamid

Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,27 \pm 0,82$	4	–
100 μM Glibenclamid	$9,02 \pm 0,48$	4	–
+ 15 μM SWS 40 HCl	$7,47 \pm 0,38$	4	0,05

Während es nach der Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid nur zu einer schwachen Änderung der Kontraktion kam, konnte bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine Abnahme um fast 20% festgestellt werden.

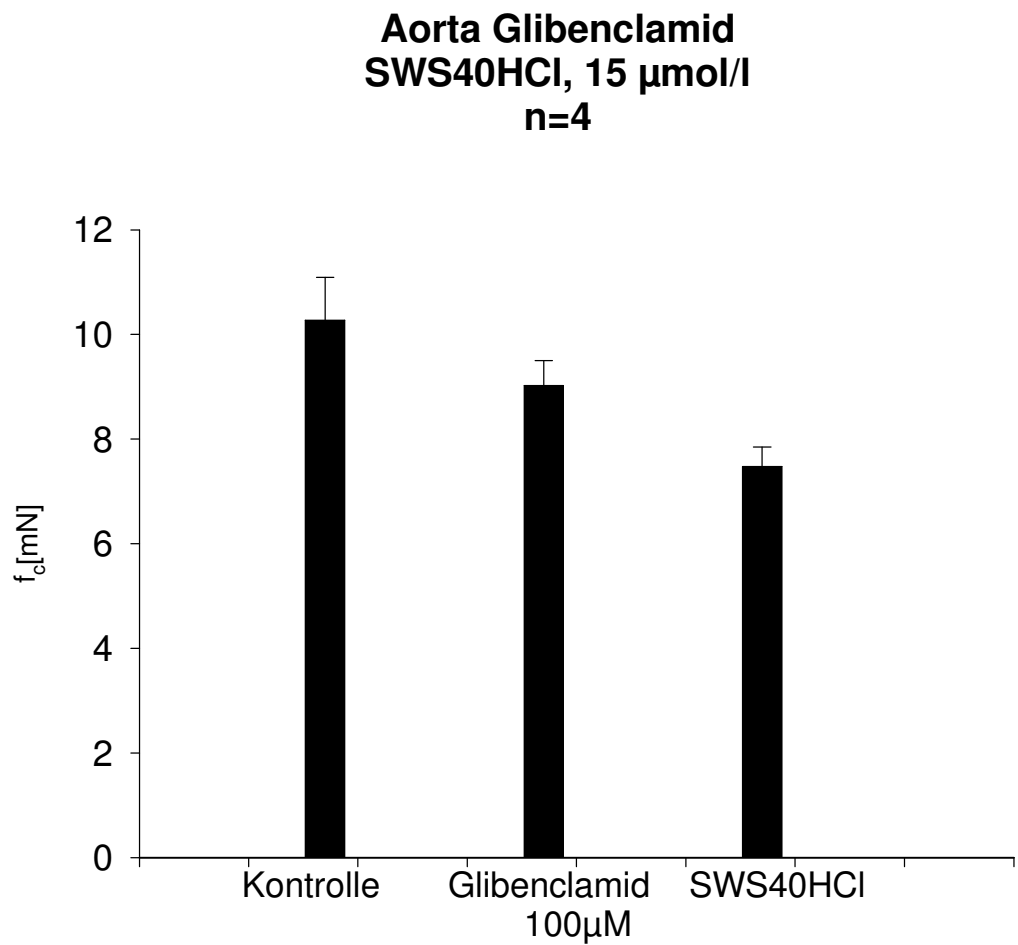
Diagramm 12: Ergebnisse der Versuche mit 30 μM Glibenclamid im Balkendiagramm



Legende zum Diagramm:

Hier sieht man den Effekt des EC_{50} von SWS 40 HCl auf die Kontraktion einer Aorta nach der Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid. Die Balken stehen für die Kontraktionskraft in mN, die dünnen Linien für die Standardabweichung.

Diagramm 13: Ergebnisse der Versuche mit 100 μ M Glibenclamid im Balkendiagramm

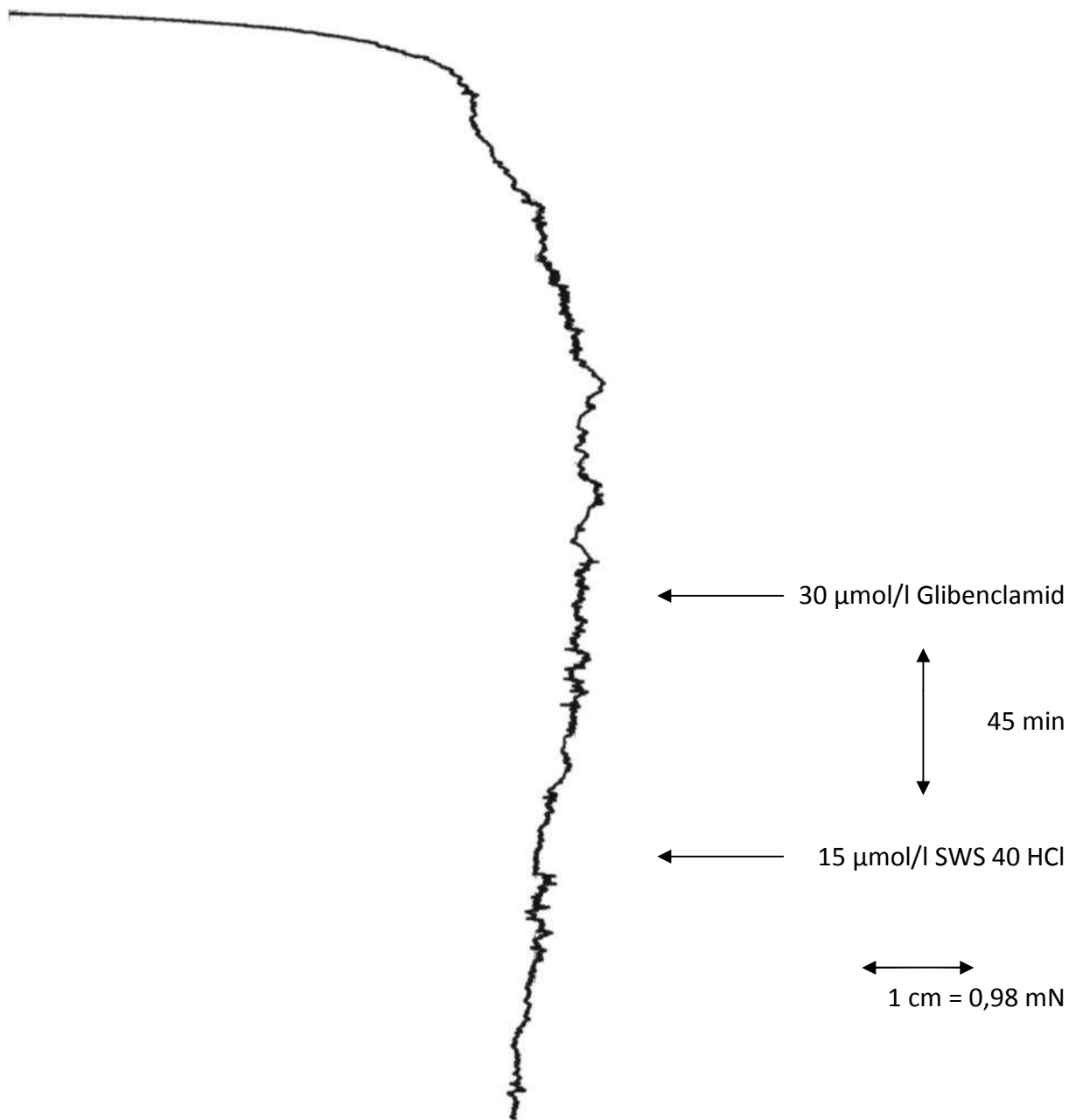


#

Legende zum Diagramm:

Hier sieht man den Effekt des EC_{50} von SWS 40 HCl auf die Kontraktion einer Aorta nach der Applikation von 100 μ mol/l Glibenclamid. Die Balken stehen für die Kontraktionskraft in mN, die dünnen Linien für die Standardabweichung.

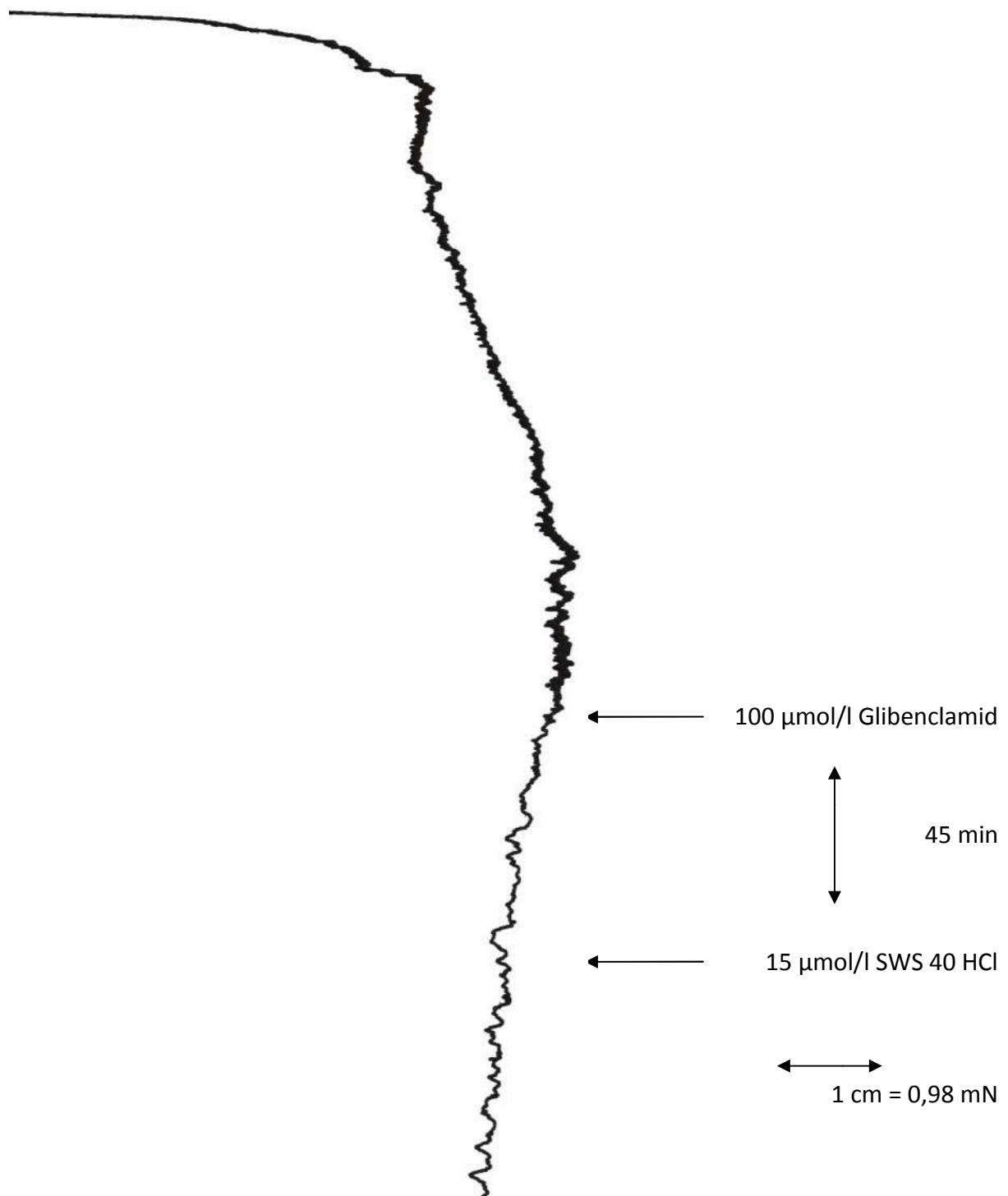
Abbildung 24: Aufzeichnung des Versuchs mit 30 μM Glibenclamid



Legende zur Abbildung:

Aufzeichnung des Versuchs zur Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus von SWS 40 HCl nach Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid an der Aorta.

Abbildung 25: Aufzeichnung des Versuchs mit 100 μ M Glibenclamid



Legende zur Abbildung:

Aufzeichnung des Versuchs zur Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus von SWS 40 HCl nach Zugabe von 100 μ mol/l Glibenclamid an der Aorta.

4.3.2. Effekt von SWS 40 HCl mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta

Hier wurde analog zu den Versuchen mit Glibenclamid an 3 Präparaten gearbeitet, jedoch wurde diesmal getestet, ob SWS 40 über das NO-System wirkt. Nitro-L-Arginin inhibiert die NO-Synthase – falls also H₂S diese stimulieren würde, könnte man hier keine Reaktion beobachten.

Nach der maximalen Kontraktion durch KCl wurden 100 µmol/l Nitro-L-Arginin zugegeben und 45 min gewartet. Anschließend applizierte man ebenfalls 15 µmol/l der Substanz.

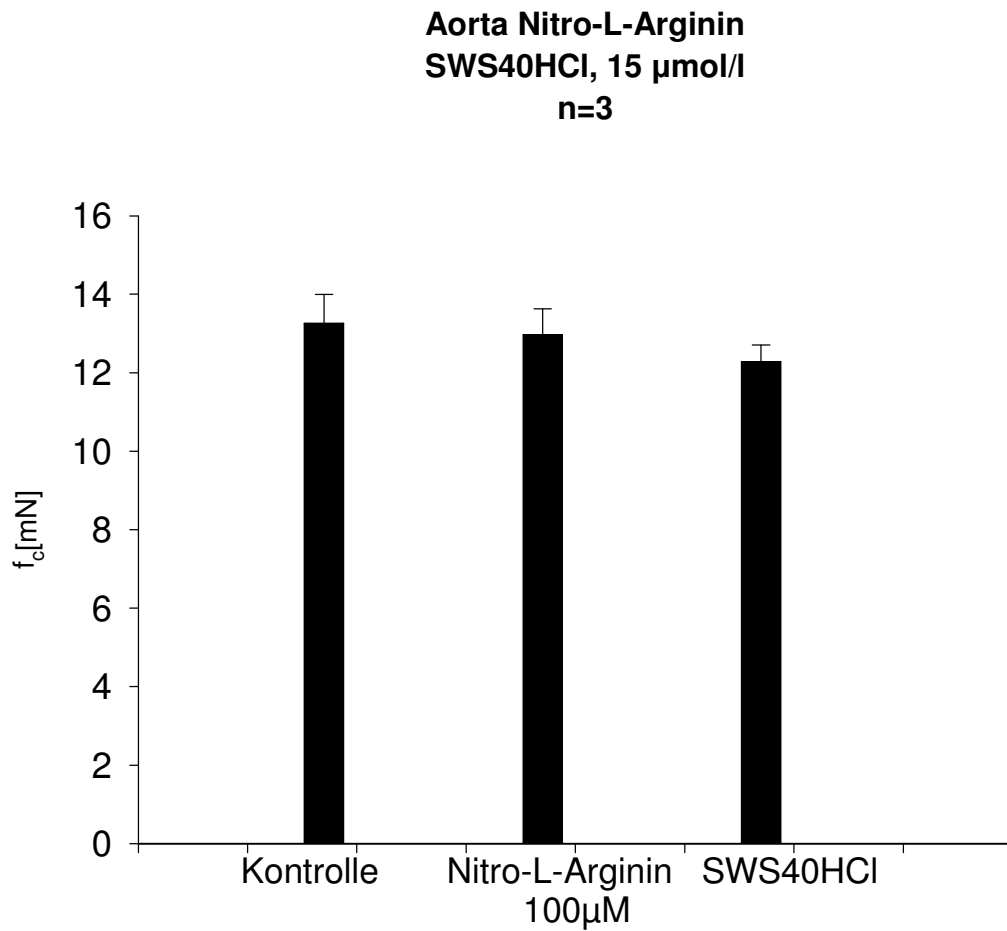
Tabelle 15: Ergebnisse Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin

Konzentrationen (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	10,27 ± 0,82	3	–
100 µM Nitro-L-Arginin	9,02 ± 0,48	3	–
+ 15 µM SWS 40 HCl	7,47 ± 0,38	3	0,05

Legende zur Tabelle:

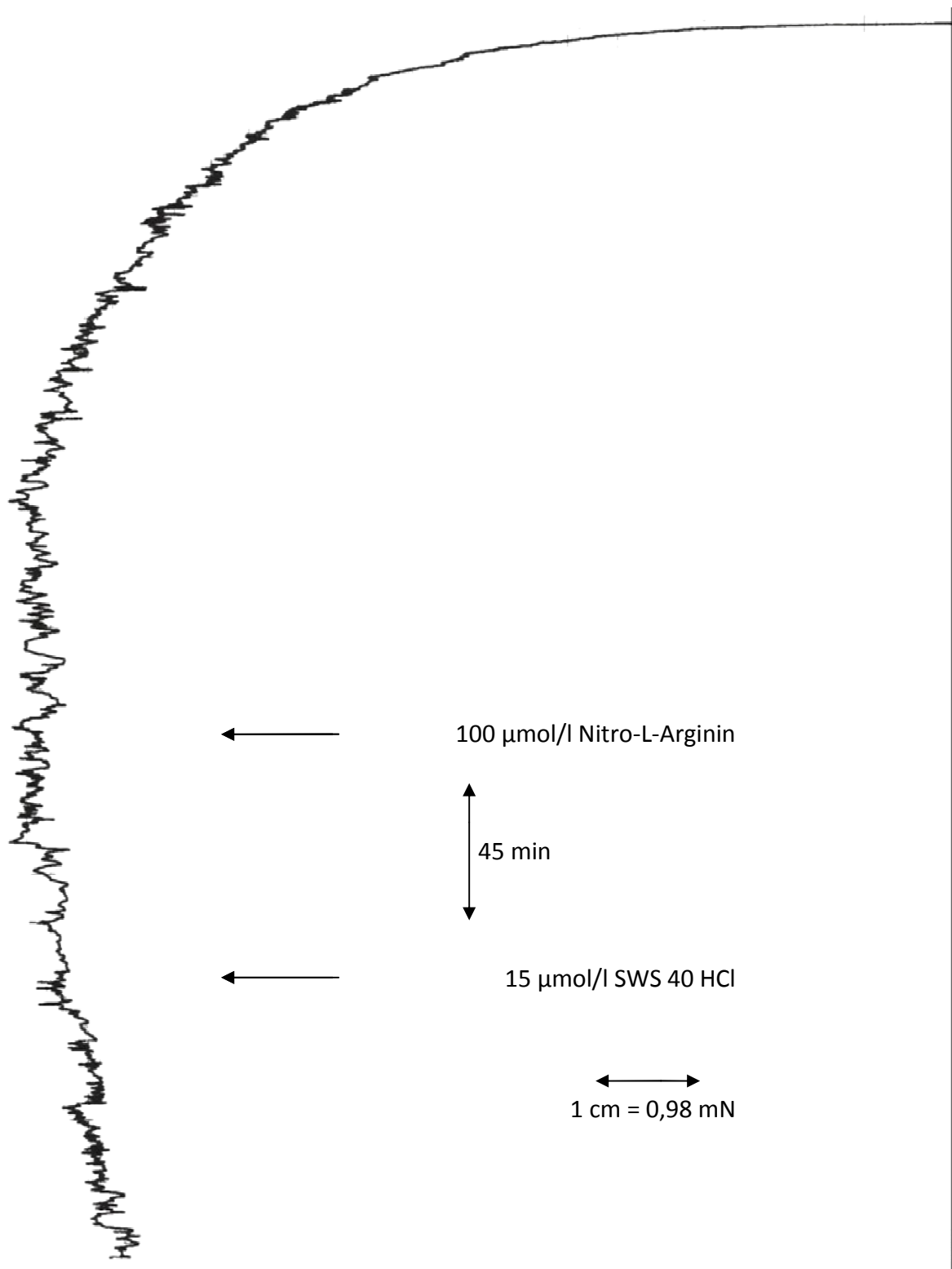
Hier sind die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft f_c und die jeweilige Standardabweichung SEM der Ergebnisse aufgelistet.

Diagramm 14: Ergebnisse der Versuche mit Nitro-L-Arginin im Balkendiagramm



Legende zum Diagramm:

Hier sieht man den Effekt des EC_{50} von SWS 40 HCl auf die Kontraktion einer Aorta nach der Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin. Die Balken stehen für die Kontraktionskraft in mN, die dünnen Linien für die Standardabweichung.



Legende zur Abbildung:

Aufzeichnung des Versuchs zur Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus von SWS 40 HCl nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin an der Aorta.

5. Diskussion

Im praktischen Teil der Diplomarbeit wurden die Effekte von zwei neu hergestellten Schwefelwasserstoff-Donatoren, SWS 48 HCl und SWS 40 HCl, an isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht.

Die Beschreibung der Ergebnisse der Versuche und deren Auswertung sind im Kapitel 4 zu finden. In dem nun folgenden Kapitel werden die Ergebnisse bewertet und diskutiert. Die Wirkung auf die glatte Muskulatur kann der auf die Herzmuskulatur gegenübergestellt werden.

Die Wirkung von SWS 48 HCl und SWS 40 HCl unterschied sich insofern nur, dass bei SWS 40 HCl bei Aorta und Arteria pulmonalis schon eine niedrigere Dosis ausreichte, um einen signifikanten Effekt zu erreichen.

Organpräparat	EC ₅₀ SWS 48 HCl (µmol/l)	EC ₅₀ SWS 40 HCl (µmol/l)
Aorta	35,70	12,50
Arteria pulmonalis	31,50	23,00
Terminales Ileum	16,00	20,70

Die stärkste Wirkung zeigte sich bei SWS 40 HCl an der Aorta. Bereits bei 10 µmol/l der Substanzkonzentration kam es zu einer Kontraktionsabnahme von $39,39 \pm 1,28$ %. Bei 30 µmol/l waren die Präparate schon fast vollständig dilatiert, was man auch gut in der Konzentrations-Wirkungskurve aus Kapitel 4.2.1. sehen kann.

Vergleichend dazu war die dilatierende Wirkung von SWS 48 HCl nicht so ausgeprägt. Nach der ersten Einspritzung zeigte sich sogar ein minimaler Anstieg der Kontraktion um $2,21 \pm 1,19$ %, welche jedoch bei der nächsten Konzentration wieder aufgehoben wurde. Bei der Endkonzentration von 100 µmol/l der Substanz hatte die Kontraktion um $92,41 \pm 4,68$ % abgenommen.

Aufgrund des Ergebnisses von SWS 40 HCl und des beachtlichen EC_{50} -Wertes von 12,50 $\mu\text{mol/l}$ wurde die Substanz auch bei der Untersuchung des Wirkmechanismus SWS 48 bevorzugt. Dazu wurden die Antagonisten Glibenclamid und Nitro-L-Arginin eingesetzt.

Man untersuchte zuerst, ob die Wirkung von SWS 40 HCl mit dem NO-System in Zusammenhang gebracht werden kann. Nach Zugabe von Nitro-L-Arginin, welches die Stickstoffmonoxid-Oxidase hemmt (Bansinath et. al 1993), wurde untersucht, ob SWS 40 HCl trotzdem eine Wirkung aufweisen konnte. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich verminderte Wirkung der Testsubstanz als sie in Versuchen ohne Nitro-L-Arginin auftraten. Die Kontraktionsabnahme vom Referenzwert $12,97 \pm 0,66 \text{ mN}$ war mit nur 0,69 mN sehr gering. Daraus lässt sich auf eine Signifikanz im Zusammenspiel mit dem NO-System schließen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Ursache der dilatierenden Wirkung von SWS 40 HCl die Öffnung von Kaliumkanälen sein könnte. Man gab daher das Sulfonylharnstoffderivat Glibenclamid, welches die Kaliumkanäle blockiert, in zwei unterschiedlichen Konzentrationen hinzu. Auch hier war die Wirkung in Kombination mit Glibenclamid deutlich schwächer, was einen Zusammenhang mit den Kaliumkanälen vermuten lässt.

Fasst man beide Ergebnisse zusammen, muss man annehmen, dass die Wirkung von SWS 40 HCl in erster Linie auf dem NO-System und der Öffnung von Kaliumkanälen beruht. Grundsätzlich kann man auch annehmen, dass SWS 48 HCl aufgrund seiner Strukturähnlichkeit derselbe Wirkmechanismus zugrunde liegen muss.

Auch am terminalen Ileum hatte SWS 40 HCl bei einem EC_{50} von 20,70 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Wirkung. Bei einer Substanzkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Abnahme der Kontraktion ausgehend vom Referenzwert $30,04 \pm 4,44 \%$, bei 100 $\mu\text{mol/l}$ waren es immerhin $86,03 \pm 4,93 \%$.

Vergleicht man die Wirkung jedoch mit der von SWS 48 HCl, kann man bei letzterer eine größere Signifikanz feststellen, denn der EC_{50} betrug hier 16,00 $\mu\text{mol/l}$. Interessant war auch, dass die Kontraktionsabnahme nach der ersten Substanz-Einspritzung von 1 $\mu\text{mol/l}$ mit $6,68 \pm 1,16 \%$ bereits ziemlich stark war. Das war auch die zweitgrößte Veränderung eines Organzustands bei dieser geringen Konzentration verglichen mit den anderen Versuchen. Bei

der Endkonzentration wurde eine Abnahme der Kontraktion verglichen mit dem Referenzwert um $98,97 \pm 1,03$ % erreicht.

Durchaus signifikant war auch die Wirkung von SWS 40 HCl auf die Arteria pulmonalis. Hier betrug der EC_{50} $23,00 \mu\text{mol/l}$. Es kam zwar ebenfalls wie beim Darm zu keiner vollständigen Dilatation bei $100 \mu\text{mol/l}$, jedoch war die Kontraktionsabnahme bei dieser Konzentration mit $95,67 \pm 1,44$ % größer.

Vergleicht man dazu die Wirkung von SWS 48 HCl auf die Lungenarterie, konnte mit dieser Substanz nur ein EC_{50} von $31,50 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden.

Nun zur Wirkung von SWS 48 und 40 HCl auf die Herzmuskulatur:

Organpräparat	f_c (%) bzw. f (%) ± SEM bei $100 \mu\text{mol/l}$ SWS 48 HCl	f_c (%) bzw. f (%) ± SEM bei $100 \mu\text{mol/l}$ SWS 40 HCl
Musculus papillaris	$50,52 \pm 18,94$	$41,74 \pm 24,00$
Atrium dexter	$-28,59 \pm 3,15$	$-42,66 \pm 3,9$

Bei SWS 48 HCl konnte man vor allem beim Papillarmuskel eine Signifikanz in der Änderung der Inotropie feststellen. Während sich bis zur Einspritzung von $10 \mu\text{mol/l}$ Substanz die Amplitude um $5,61 \pm 9,96$ % leicht verringerte, stieg sie danach allmählich an. Bei der letzten Konzentration erreichte sie sogar ein Plus von $50,52 \pm 18,94$ % gegenüber dem Kontrollwert.

Ähnlich verliefen auch die Versuche mit SWS 40 HCl am Papillarmuskel. Hier zeigte sich jedoch schon bei einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ eine Abnahme der Amplitude um $12,48 \pm 3,30$ %, bei $3 \mu\text{mol/l}$ betrug sie sogar $25,69 \pm 6,50$ %. Danach folgte wiederum ein Anstieg, der jedoch erst bei der Endkonzentration einsetzte und $41,74 \pm 24,00$ % betrug.

Auch am Vorhof zeigten beide Substanzen eine Wirkung, wenn auch erst in höheren Konzentrationen. Dies ist schön anhand der Konzentrations-Wirkungskurven im Kapitel 4.1.4. bzw. 4.2.4. zu sehen.

Zu Beginn der Versuche wies SWS 48 HCl fast keinen Effekt auf die Chronotropie auf, nach der Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ lag die Verringerung der Frequenz nur bei $6,20 \pm 2,25 \%$. Erst bei der Endkonzentration betrug sie $28,59 \pm 3,15 \%$.

Auch bei SWS 40 HCl konnte man bis zur vorletzten Einspritzung fast keinen Einfluss feststellen, bei 30 $\mu\text{mol/l}$ wurde die Anzahl der Schläge pro Minute nur um $4,99 \pm 2,70 \%$ vermindert. Nach der Applikation der letzten Konzentration kam es jedoch zu einem Abfall um $42,66 \pm 3,93 \%$ verglichen mit dem Ausgangswert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass beide Substanzen eigentlich nur bei hohen Konzentrationen die Herzmuskelpräparate beeinflussen.

Der mögliche Mechanismus der dilatierenden Wirkung über Öffnung von K_{ATP} -Kanälen wird in vielen Studien behandelt.

18 bzw. 60 μM H_2S konnte mit 20 μM KCl bzw. Phenylephrin kontrahierte Aorten von Ratten wieder relaxieren (Zhao et al. 2001).

Versuche mit Blockern Ca^{2+} abhängiger Kaliumkanäle führten zu keinem dilatierenden Effekt. Jedoch konnte man zeigen, dass die relaxierende Schwefelwasserstoff-Wirkung durch Blockierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle mittels Glibenclamid antagonisiert und durch Öffnung dieser Kanäle mittels Pinacidil nachgeahmt werden kann (Zhao et al. 2001). Es wurden auch Untersuchungen über die Plasmaspiegel von H_2S durchgeführt, bei Ratten betrug er ca. 50 μM . In Geweben ist er jedoch um einiges höher, im Hirn z.B. 50-160 μM (Hosoki et al. 1997).

H_2S löst also bei physiologischen Konzentrationen eine Relaxierung der Gefäße aus und stellt neben Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid einen weiteren intrinsischen, gasförmigen vasoaktiven Faktor dar (Zhao et al. 2001).

Jedoch wird vermutet, dass Schwefelwasserstoff nicht wie NO und CO nur an der glatten Muskulatur des Gefäßsystems angreift, sondern darüber hinaus wenn auch nur schwach am Endothel wirkt (Zhao et al. 2001). Das kann man über die notwendige Aktivierung der cGMP-Kaskade bei Freisetzung von NO und CO erklären, wobei der H_2S -Wirkung jedoch die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle und zusätzlich eine Veränderung der K^+ -Leitfähigkeit im

Endothel zugrunde liegen könnte. Bei Versuchen mit unterschiedlichen Kaliumchlorid-Konzentrationen zur Auslösung der Kontraktion kam es bei 20 mmol KCl zu einer Dilatation von $90 \pm 8,2 \%$, bei 100 mmol jedoch nur zu $19 \pm 3,9 \%$. Diese Differenz könnte durch die mögliche Zusatzwirkung einer veränderten K^+ -Leitfähigkeit der Zellen zustande gekommen sein.

Wendet man diese Ergebnisse auf die Versuche von SWS 40 HCl an der Aorta an, muss man annehmen, dass noch andere Faktoren neben der Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle die Wirkung beeinflussen. Hier wurde nämlich mit 90 mmol KCl maximal kontrahiert und trotzdem kam es zu einer Dilatation von 100 %.

In einer Studie von Elsey et al. (2010) wird diese Vermutung untermauert.

2008 konnte eine Studie auch zeigen, dass Glibenclamid, welches K_{ATP} -Kanäle blockiert, die Schwefelwasserstoff-Wirkung nicht signifikant mindern konnte. Daraus wurde geschlossen, dass die Kaliumkanäle womöglich doch keine so große Rolle spielen. Stattdessen wurde eher der cAMP Weg über die Adenylatcyclase in Betracht gezogen. NaHS wirkte kontrahierend auf Aorten von Ratten, die zuvor mit Phenylephrin kontrahiert und mit β -Sympathomimetika wieder relaxiert wurden. Das würde auf eine β -adrenerge Wirkung von H_2S an hinweisen, also eine Stimulation von β -Rezeptoren, welche über die Adenylatcyclase den cAMP-Spiegel beeinflussen könnte. Zur Untersuchung dieser These wurden auch noch Experimente mit einem Stimulator der Adenylatcyclase, dem Diterpen Forskolin, durchgeführt. Es müssen jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Wirkmechanismus genau aufklären zu können (Lim et al. 2008).

6. Zusammenfassung

Die Diplomarbeit umfasste die Testung der Wirkung zweier Substanzen, die Schwefelwasserstoff freisetzen, auf isolierte Organe von Meerschweinchen. Hauptaugenmerk wurde auf die Erreichung eines EC_{50} gelegt, das bedeutet die Konzentration bei der die Hälfte des Referenzwertes erreicht werden konnte

Sowohl die Wirkung auf die glatte Muskulatur durch Versuche an Aorta, Arteria pulmonalis und Darm, als auch auf die quergestreifte Muskulatur bei Vorhof und Papillarmuskeln wurden gemessen. Der dilatierende bzw. spasmolytische und ino- bzw. chronotrope Effekt wurde durch isometrische Kontraktionsmessungen untersucht.

Die Testorgane wurden jeden Tag frisch dem getöteten Meerschweinchen entnommen, präpariert und in mit physiologischer Nährlösung gefüllten Organbädern den Versuchen unterzogen. Die Testsubstanzen wurden frisch in Wasser gelöst und in je 5 unterschiedlichen Konzentrationen durch kumulative Zugabe appliziert. Die Wirkungen der Substanzen äußerten sich in Zustandsänderungen der Organe, die über Kraftwandler und Verstärker an einen Flachbettschreiber geleitet und von ihm aufgezeichnet wurden.

SWS 48 HCl und SWS 40 HCl konnten ähnliche Effekte erzielen, die Unterschiede bestanden lediglich in ihrer der Stärke bzw. der Konzentration. Mit SWS 40 HCl konnte bei der Relaxierung der Aorta ein EC_{50} von 12,50 $\mu\text{mol/l}$ erzielt werden, an der Lungenarterie betrug er 23,00 $\mu\text{mol/l}$ und am Darm 20,70 $\mu\text{mol/l}$.

Bei SWS 48 HCl konnte bei einem EC_{50} von 16,00 $\mu\text{mol/l}$ die stärkste Wirkung am Darm gemessen werden, an der Aorta lag er bei 35,70 $\mu\text{mol/l}$ und bei der Lungenarterie bei 31,50 $\mu\text{mol/l}$.

Aufgrund der starken Wirkung von SWS 40 HCl an der Aorta wurden an diesem Organ auch Experimente zur Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Versuche lässt auf eine Beteiligung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und des NO-Systems an der dilatierenden Wirkung schließen.

7. Literaturverzeichnis

Bansinath M, Arbabha B; Turndorf H; Garg U C (1993) Chronic administration of a nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine, and drug-induced increase in cerebellar cyclic GMP in vivo. *Neurochem Res* 18:1063–1066.

Cooper DW, Mowbray P (2004) Advantages of using a prophylactic phenylephrine infusion during spinal anaesthesia for caesarean section. *Int J Obst Anest* 13:124–125.

Elsej DJ, Fowkes RC, Baxter GF (2010) Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct* 28:95–106.

Estler CJ, Schmidt H (2007) *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. 6. Auflage, F.K. Verlag GmbH

Forth W, Henschler D, Rummel W (2009) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage, Elsevier München

Furchgott RF, De Gubareff T, Grossman A (1959) Release of autonomic mediators in cardiac tissue by suprathreshold stimulation. *Science* 129:328-329.

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 XL, Zhou XH, Wei P, Zhang XJ, Meng XY, Xian XH (2008) Role of endogenous hydrogen sulfide in pulmonary hypertension induced by lipopolysaccharide. *Sheng Li Xue Bao* 60:211-215.

Hunnius *Pharmazeutisches Wörterbuch* (2004). 9. Auflage, Gruyter

Lee SW, Cheng Y, Moore PK, Bian JS (2007) Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:1142-1147.

Lim JJ, Liu YH, Khin ESW, Bian JS (2008) Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C1261-C1270.

Manna PT, Smith AJ, Taneja TK, Howell GJ, Lippiat JD, Sivaprasadarao A (2010) Constitutive endocytic recycling and pkc mediated lysosomal degradation control Katp channel surface Density *J Biol Chem* 285: 5963-5973.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Kortnig M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Muzaffar S, Jeremy JY, Sparatore A, Del Soldato P, Angelini GD, Shukla N (2008) H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G. *Br J Pharmacol* 155:984-994.

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

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2001) Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage, Springer Berlin

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. *Arzeim Forsch* 17:1249-1253.

Smith RP, Gosselin RE (1979) Hydrogen sulfide poisoning *J Occup Med* 21:93-97.

Stipanuk MH, Beck PW (1992) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206:267-277.

Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16:1792-1798

Wang YF, Mainali P., Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu Xq, Du JB (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J* 121:420-423.

Winder CV, Winder HO (1933) The seat of action of sulfide on pulmonary ventilation. *Am J Physiol* 105:337-352.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322:587-590.

Zhao WM, Zhang J, Lu YJ, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am: 20.02.1986 in Linz

Religionsbekenntnis: röm. kath.

Familienstand: ledig

Schulausbildung

09/1996 – 06/2004 BRG Linz Fadingerstraße, Matura mit Auszeichnung

Präsenzdienst

09/2004 – 04/2005 Panzerstabsbatallion 4 in Linz-Ebelsberg, Fernmeldekompanie gepanzert

Studium

ab 10/2005 Studium der Pharmazie, Universität Wien
Abschluss des 1. Studienabschnitts am 6. Oktober 2006
Abschluss des 2. Studienabschnitts am

Stipendien

2007, 2008 & 2009: Leistungsstipendien der Universität Wien nach den StudFG

Ferialarbeit

08/2008 – 08/2008 **Kreuz-Apotheke Leonding**

08/2007 – 08/2007 **Sonnenapotheke Linz**

05/2005 – 06/2005 **Kwizda Linz**