



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„PHARMAKOLOGISCHES PROFIL EINER NEU SYNTHETISIERTEN
SUBSTANZ (MAH 29) AN ISOLIERTEN ORGANEN VON
MEERSCHWEINCHEN“

Verfasserin

Emina Polimac

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Diese Diplomarbeit möchte ich meinen Eltern Tarik und Esma Polimac widmen, da sie nicht nur mein Studium zum größten Teil finanziert haben, sondern auch ständig ein sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigten und mich so gut es ging unterstützten. Spezieller Dank gilt dabei meinem Bruder Kenan, der mich während meines gesamten Studiums motiviert hat und mich auch an schlechten Tagen sowie bei Prüfungsstress wieder aufheitern konnte.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Diplomarbeitbetreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für die verständnisvolle und freundliche Betreuung während meiner Diplomarbeit.

Außerdem danke ich meiner Cousine Nermina Čelović für die schönen und lustigen Momente sowie für die gute Laune, die sie immer verbreitete hat.

Bei meinen Studienkollegen und -kolleginnen bedanke ich mich für die wunderbaren Stunden, insbesondere Mia Krušić für die entstandene Freundschaft, die Zusammenarbeit und den gemeinsamen Weg durch das ganze Studium.

Zuletzt möchte ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitsstellung der Testsubstanz MAH 29 bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Diplomarbeit	1
1.2. Schwefelwasserstoff	2
1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften	2
1.2.2. Biologische Funktion	3
1.3. ATP-abhängige Kaliumkanäle - Aufbau und Funktion/Bedeutung und Anwendung	4
1.4. ATP-abhängige Kaliumkanäle als Arzneistoff-Targets	4
1.4.1. Kaliumkanalaktivatoren	5
1.4.2. Kaliumkanalinhibitoren	5
2. Material und Methodik	7
2.1. Testsubstanz MAH 29	7
2.2. Glibenclamid	7
2.3. Lösungsmittel und Pipettierschema	8
2.4. Versuchstiere	9
2.5. Herstellung der Tyrode (Physiologische Elektrolytlösung)	10
2.6. Kaliumchloridlösung zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate	12
2.7. Durchführungen der Versuche	13
2.7.1. Isolierung und Präparation der Tierorgane	15
2.7.1.1. Verwendete Materialien	15
2.7.1.2. Atrium cordis dexter (Rechter Vorhof)	16
2.7.1.3. Musculus papillaris (Papillarmuskel)	17
2.7.1.4. Arteria pulmonalis (Lungenarterie)	17
2.7.1.5. Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)	18
2.7.1.6. Terminales Ileum (Darm)	18
2.8. Versuchsanordnung und Apparaturen	20
2.8.1. Apparatur A	21
2.8.2. Apparatur B	24
2.8.3. Kraftwandler, Verstärker und Schreibgerät	25
2.8.4. Gasversorgung mit Oxymix	26
2.9. Versuchsablauf	27

2.9.1. Versuchsablauf - Atrium cordis dexter	27
2.9.2. Versuchsablauf - Terminales Ileum	28
2.9.3. Versuchsablauf - Aorta descendes	29
2.9.4. Versuchsablauf - Arteria pulmonalis	29
2.9.5. Versuchsablauf - Musculus papillaris	30
2.10. Auswertung der Ergebnisse	31
2.10.1. Auswertung - Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	31
2.10.2. Auswertung - Atrium cordis dexter	32
2.10.3. Auswertung - Musculus papillaris	32
2.10.4. Statistik	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Wirkung der Testsubstanz MAH 29 HCl auf die isolierten Meerschweinchenorganpräparate	34
3.1.1. MAH 29 HCl - Wirkung auf die Aorta	34
3.1.2. MAH 29 HCl - Wirkung auf die Arteria pulmonalis	37
3.1.3. MAH 29 HCl - Wirkung auf das terminale Ileum	40
3.1.4. MAH 29 HCl - Wirkung auf das Atrium cordis dexter	43
3.1.5. MAH 29 HCl - Wirkung auf den Musculus papillaris	46
3.2. Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)	49
3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid	50
3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid	53
4. Diskussion	56
4.1. Allgemein	56
4.2. Wirkung der Testsubstanz MAH 29 HCl an der glatten Muskulatur	56
4.3. Wirkung der Testsubstanz MAH 29 HCl an der quergestreiften Muskulatur	58
4.4. Versuche mit MAH 29 und Glibenclamid	59
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Lebenslauf	63

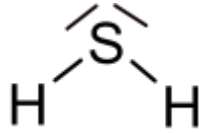
1. Einleitung

1.1. Ziel der Diplomarbeit

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Wirkung von Testsubstanz MAH 29 an die isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Die Testsubstanz, die am Department für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert wurde, gehört zu der Gruppe H₂S-Donatoren, d.h. dass die Substanz unter hydrolytischer oder enzymatischer Spaltung, die eigentliche Wirkform-Schwefelwasserstoff freisetzen soll. Pharmakologisch wird dann ihre Wirkung an der glatten oder quergestreiften Muskulatur von isolierten Organen untersucht; wobei die spasmolytische bzw. vasodilatierende Wirkung an der glatten Muskulatur der Pulmonalarterie, der Aorta und des terminalen Ileums beobachtet wird und die Änderung der Inotropie bzw. Chronotropie an der quergestreiften Muskulatur des Papillarmuskels bzw. am rechten Vorhof untersucht wird.

Zum Schluß wird dann der mögliche Wirkmechanismus und zwar an dem Organ, an dem die Substanz die stärkste Wirkung gezeigt hat, untersucht.

1.2. Schwefelwasserstoff



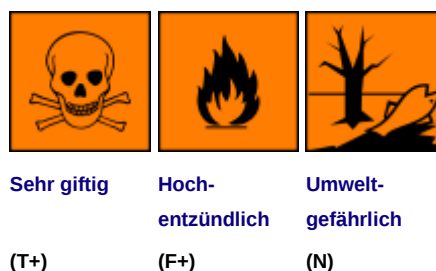
1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften

Schwefelwasserstoff (Wasserstoffsulfid) ist ein farbloses, stark giftiges und nach faulen Eiern riechendes Gas.

Als sehr variabler Bestandteil (von Spuren bis zu 80 Vol-%) kommt Schwefelwasserstoff in Erdgas und in Erdöl sowie als vulkanisches Gas und in Quellwasser gelöst vor. Es entsteht bei Zersetzungs- und Fäulnisprozessen und auch bei Verdauungsvorgängen im Darm.

Für den Menschen ist Schwefelwasserstoff ein äußerst giftiges Gas, das zur H₂S-Vergiftung führen kann. Vor allem bewirkt H₂S eine Geruchsrezeptorenbetäubung, wobei man eine Konzentrationssteigerung nicht mehr über den Geruch wahrnehmen kann (Aktories et al. 2009).

Abbildung 1: EU-Gefahrstoffkennzeichnung aus EU-Verordnung



Eine reizende Wirkung kann H_2S im Bereich von Schleimhäuten der Nase, des Rachens, in der Lunge sowie im Auge verursachen.

Giftwirkung beruht auf einer Zerstörung des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin, wobei die genaue Wirkmechanismus unklar ist. Man vermutet dass die O_2 -übertragenden Enzyme inaktiviert werden. Außerdem kann H_2S Schäden im zentralen- und auch im peripheren-Nervensystem verursachen (Aktories et al. 2009).

1.2.2. Biologische Funktion

Scwefelwasserstoff ist nicht nur an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Es zeigt eine Ähnlichkeit mit Stickstoffmonoxid (NO), dem im Organismus vorkommenden Botenstoff, und wird in Endothelzellen der Blutgefäße sowie in glatten Muskelzellen aus der schwefelhaltige Aminosäuren wie L-Methionin und L-Cystein gebildet (Moore et al. 2003).

Freigesetztes H_2S führt zu einer Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation) wobei die ATP-abhängige Kaliumkanäle aktiviert werden und eine Hyperpolarisation ausgelöst wird. Durch die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und Auslösung der Hyperpolarisation der Zellmembran werden die spannungsabhängige Calciumkanäle (L-Typ) inaktiviert, wodurch die intrazelluläre Calciumkonzentration sinkt, was dann weiter zur Erweiterung (Dilatation) des glattmuskulären Gefäßsystems führt (Zhao et al. 2001, Moore et al. 2003, Nelson et al. 1995, Cheng et al. 2004).

1.3. ATP-abhängige Kaliumkanäle - Aufbau und Funktion/Bedeutung und Anwendung

ATP-abhängige Kaliumkanäle stellen eine Subpopulation von transmembranären K-Kanälen dar (einen hetero-octameren Komplex aus je vier identischen, inneren porenbildenden (Kir6.x) und äußeren regulatorischen Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SURx) Untereinheiten), die an die verschiedenen Vorgängen im Organismus beteiligt sind. So steuern die K_{ATP} -Kanäle am Pankreas Insulinfreisetzung aus den pankreatischen β -Zellen. Am Myokard sind die für ischämieassoziierten Prozesse und an den glatten Muskelzellen für den Gefäßtonus verantwortlich. Aufgrund der Lokalisation ergibt sich auch die pharmakologische Anwendung von Substanzen die an die K_{ATP} -Kanälen wirken. Als K_{ATP} -Kanal-Aktivatoren sind z.B. Minoxidil, Nicorandil von Bedeutung und demgegenüber Sulfonylharnstoffe als Kaliumkanalinhibitoren (Gasser et al. 2003, Seino und Miki 2003, Ashcroft 2005, Kane et al. 2005, Clement et al. 1997).

Der endogene Ligand an diesem Rezeptor ist das Nucleotid Adenosintriphosphat (ATP). Steigerung der intrazelluläre ATP-Konzentration verschließt die Kanäle und verhindert einen Kaliumausstrom, was weiter zu einer Depolarisation und Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle führt (Nelson et al. 2009).

1.4. ATP-abhängige Kaliumkanäle als Arzneistoff-Targets

Wie schon erwähnt, dienen die ATP-abhängigen Kaliumkanäle als wichtiger Angriffspunkt von zahlreichen Arzneistoffen. Auf diese Weise beruht deren Anwendung in der Therapie, wobei man zwischen Kaliumkanalaktivatoren, die dann die Öffnungswahrscheinlichkeit steigern und dem gegenüber Kaliumkanalinhibitoren welche die Kanäle verschließen, unterscheidet (Aktories et al. 2009).

1.4.1. Kaliumkanalaktivatoren

Durch Aktivierung und nachfolgender Öffnung ATP-abhängigen Kaliumkanäle kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und gleichzeitiger Inaktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, wobei intrazelluläre Calciumkonzentration sinkt. Dies dann weiter zur glattmuskulären Erweiterung und Relaxation führt und schließlich zur Blutdrucksenkung (Mutschler et al. 2001).

Therapeutisch eingesetzte Kaliumkanalaktivatoren

- **Minoxidil**, ein Pyrimidinderivat, das peroral als Antihypertonikum sowie topisch zur Behandlung erblich bedingten Haarausfalls (Alopecia androgenetica) verwendet wird. Die zweite Indikation wurde aber zufällig als unerwünschte Wirkung bei Anwendung in der Hypertonie-Therapie entdeckt.

-**Nicorandil** (dualer Wirkmechanismus) ist ein gefäßerweiternder und blutdrucksenkender Wirkstoff, der neben der Aktivierung ATP-abhängiger Kaliumkanäle auch das Enzym Guanylylcyclase stimuliert (Nitratester) wodurch die zusätzliche Vasodilatation ausgelöst wird. Deshalb wird Nicorandil in der Therapie der koronaren Herzkrankheiten angewandt (Aktories et al. 2009).

1.4.2. Kaliumkanalinhibitoren

Unter die K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren fallen Sulfonylharnstoffe wie **Glimepirid**, **Glibenclamid** und **Gliclacid** und Glinide wie **Repaglinid** und **Nateglinid**, die eine Hemmung der Aktivität der K_{ATP} -Kanäle durch Bindung an SUR erreichen. Dies wird bei Diabetes mellitus (Typ II) therapeutisch ausgenutzt und eingesetzt, und zwar als orale Antidiabetika.

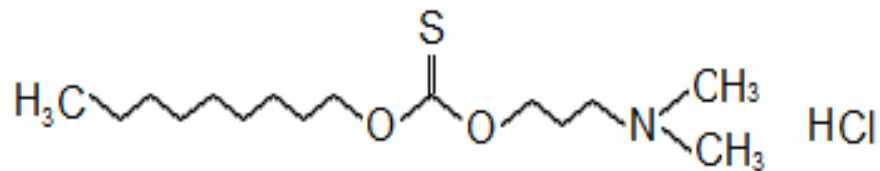
Nach Bindung des K_{ATP} -Kanal-Inhibitors an SUR mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembran und Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle der pankreatischen β -Zellen wird die Insulinfreisetzung mit Glucoseaufnahme in die Zellen ausgelöst, was dann weiter zur Abnahme des Blutzuckerspiegels führt (Aktories et al. 2009, Mutschler et al. 2001).

2. Material und Methodik

2.1. Testsubstanz MAH 29

Wie schon erwähnt wurden die Testsubstanzen am Department für pharmazeutische/Medizinische Chemie von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert und für die Untersuchungen dem Department für Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung gestellt.

Abbildung 2: Chemische Struktur von MAH 29 HCl



MAH 29 HCl

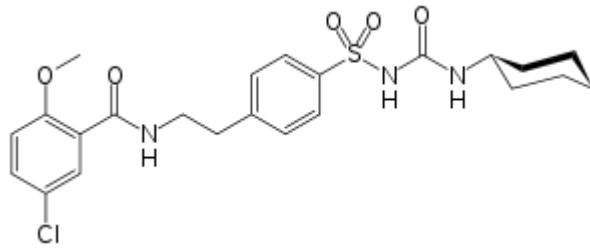
MG: 325,94 g/mol

Nomenklatur: Nonyl [3-(dimethylamino)propoxy] methanthioat

2.2. Glibenclamid

Mit Glibenclamid wurde dann im zweiten Teil der Diplomarbeit der Wirkmechanismus geprüft.

Abbildung 3: Glibenclamid-Strukturformel



MG: 494,00 g/mol

Glibenclamid ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe Sulfonylharnstoffe, und wird pharmakologisch als orales Antidiabetikum angewandt.

Da Glibenclamid ATP-abhängige Kaliumkanäle blockiert, wird es vor der Gabe der Testsubstanz MAH 29 verabreicht, um einen möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanz nachzuweisen.

2.3. Lösungsmittel und Pipettierschema

Da die Testsubstanz MAH 29 leicht und rasch in Wasser löslich ist, wurde als Lösungsmittel Aqua bidestillata verwendet.

Zur besseren Haltbarkeit wird die Stammlösung der Testsubstanz immer kurz vor Versuchsbeginn frisch bereitet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Aufgrund unterschiedlicher Volumina der Organbäder (8ml und 25 ml), in dem die Versuche durchgeführt werden, werden die Einwaagen ausgerechnet, die Substanzmenge in einer kleinen Glasphiole eingewogen und in 100 µl Aqua bidestillata gelöst.

Tabelle 1: Verwendete Einwaagen

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz (100 µl/l)
MAH 29	325,94 g/mol	8 ml	0,26 mg
		25 ml	0,82 mg

Erst wenn die Konzentrationskurve des zu untersuchenden Organs ein konstantes Niveau erreicht hat, wurden die Stammlösungen im zeitlichen Intervall von 45 Minuten in das Organbad vorsichtig mit Hilfe der Mikropipetten, beginnend mit 3 µl dann 7, 20 und zum Schluß 70 µl, eingespritzt.

Am Millimeterpapier des Schreibers wurden die genauen Zeitpunkte markiert und dann ausgewertet.

2.4. Versuchstiere

Aufgrund des Ionenkanalaufbaues, der in vieler Hinsicht dem Menschen ähnelt, wurden als Versuchstiere Meerschweinchen verwendet, und zwar die Meerschweinchen des "TRIK"-Stammes im Alter von ca. vier bis sechs Wochen mit einem Körpergewicht von ca. 300-600 Gramm.

Meerschweinchen bekamen bis zum Zeitpunkt der Schlachtung entsprechende und regelmäßige Futter- und Pflegeversorgung, wobei an jedem Versuchstag nur ein Versuchstier benötigt wurde.

Um den Versuchstieren einen schmerzlosen Tod zu ermöglichen, wurde das Meerschweinchen durch einen gezielten und schnellen Genickschlag getötet. Dann erfolgte die vorsichtige Öffnung des Thorax und Abdomens, mit nachfolgender Entnahme des noch immer schlagenden Herzens, welches sich hinter dem Brustbein befindet, sowie des Darmstücks, das an einem Ende mit einem Faden abgebunden wurde. Letztendlich wurde die Aorta vorsichtig herausgeschnitten.

Die entfernten Organe wurden in eine Nährlösung (Tyrode) gegeben und mit Oxymix begast.

Abbildung 4: Meerschweinchen



2.5. Herstellung der Tyrode (Physiologische Elektolytlösung)

Um das Leben der isolierten Organen zu ermöglichen, wurde die Tyrode (physiologische Nährlösung) an jedem Versuchstag in einem 2 Liter Messkolben frisch zubereitet. Neben

der physiologischen Nährlösung wurden die isolierten Organe mit einem Gasgemisch (Oxymix) aus 95% O₂ und 5% CO₂ begast.

Die genaue Zusammensetzung des Nährmediums wurde nach der Vorschrift von Reiter (1967) bereitet und ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molekular- gewicht	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,442 g/mol	1000,25 g/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	-

Es wurden zuerst die Stammlösungen von NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und die KH₂PO₄ in einem 2 Liter Messkolben vermischt. Dann wurde die Glucose, die als Reinsubstanz vorliegt, dazugegeben und mit Aqua bidestillata wurde die Messkolben bis auf $\frac{3}{4}$ des Volumens angefüllt. Bevor man die Tyrodelösung für ca. 20 Minuten mit Oxy mix begast, wurde die Lösung mehrmals geschüttelt, bis die Zusammensetzung homogen wurde. Nach 10-minütiger Begasung mit Oxy mix, dass aus 95% O₂ und 5% CO₂ besteht, wurde das CaCl₂ vorsichtig und tropfenweise mit der automatischen Messpipette dazugegeben, um das Ausfallen von schwerlöslichen Calcium-Salze, sowie eine erkennbare Trübung der Lösung zu verhindern. Danach wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit Aqua bidestilata aufgefüllt und durchgemischt.

Die frisch vorbereitete physiologische Nährlösung wurde für die Aufbewahrung der Organpräparate, zur Versuchsdurchführung am Vorhof und am Papillarmuskel als auch zur Herstellung der Kaliumchloridlösungen, die zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate (terminales Ileum, Aorta, Arteria pulmonalis) dienen, verwendet.

2.6. Kaliumchloridlösungen zur Vorkontraktion isolierter Organpräparate

Um einen konstanten Tonus des kontraktilen Gewebes einzustellen sowie die Voraussetzungen zur Untersuchungen der Vasodilatation im vaskulären System bzw. der Spasmolyse am Darm zu ermöglichen, musste die Vorkontraktion der glatten Muskulatur durch Zugabe einer Kaliumchloridlösung durchgeführt werden.

Demgegenüber ist der rechte Vorhof das einzige Präparat, das man nicht vorkontrahieren musste, da es ein spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten (SA-Knoten) besitzt.

Die quergestreifte Muskulatur des Papillarmuskels weist kein spontanes Erregungsbildungssystem auf, wurde aber nicht durch Kaliumchloridlösung vorkontahiert sondern im physiologischen Nährmedium elektrisch gereizt.

Eine 60 mmolare Kaliumchloridlösung wurde für das terminale Ileum und eine 90 mmolare Lösung für Aorta- und Arteria pulmonalis verwendet, wobei die entsprechende Menge des Kaliumchlorids, das wie Glucose als Reinsubstanz vorliegt, in einem 100 ml Messkolben in Nährlösung aufgelöst wurde. Entsprechende Menge des Kaliumchlorids ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 3: Kaliumchloridlösungen für Vorkontraktion

Organpräparat	Kaliumchlorid-Einwaage (in g)	Volumen der Nährlösung (in ml)
terminales Ileum	0,45	100
Aorta	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100

2.7. Durchführungen der Versuche

Es wurden fünf unterschiedliche Organe aus Meerschweinchen isoliert, an denen dann die Wirkung sowie die Wirkstärke getestet wurde; wobei jeweils 4 bis 5 Untersuchungen durchgeführt werden mussten. Folgende Organe wurden isoliert:

- Aorta
- Atrium dextrum cordis
- Arteria pulmonalis
- Musculus papillaris
- Ileum terminale

Abbildung 5: Anatomie eines Meerschweinchens

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

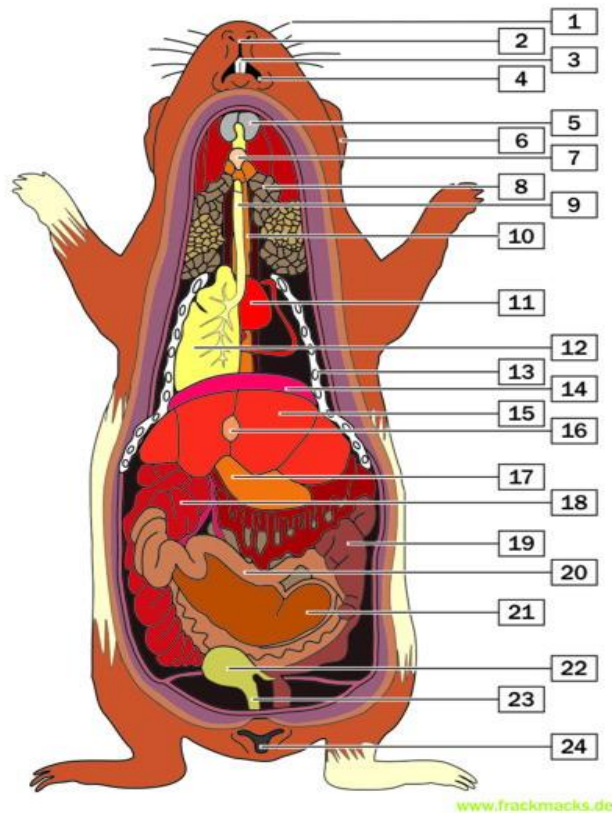
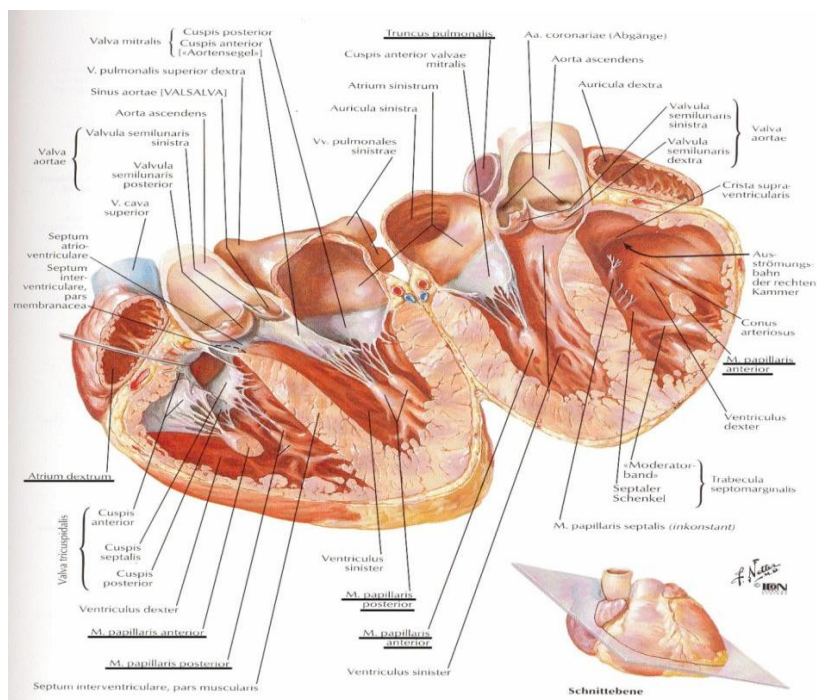


Abbildung 6: Anatomie des Herzens



2.7.1. Isolierung und Präparation der Tierorgane

2.7.1.1. Verwendete Materialien

Isolierte Organe wurden in eine mit Tyrode befüllte Petrieschale überführt. Auf der Korkscheibe, die mit einem Gummischlauch fixiert wurde, wurden die Organe präpariert.

Um eine genaue Präparation zu erzielen, wurden auch Stereomikroskop sowie Pinzetten, Spitzscheren, Federscheren und Pasteurpipetten verwendet.

Abbildung 7: Stereomikroskop und weitere Materialien



2.7.1.2. Atrium cordis dexter (Rechter Vorhof)

Das isolierte Herz wurde in ein mit Tyrode gefülltes Becherglas überführt, und von dort schnell und vorsichtig in eine Petrischale am Korkboden mit Hilfe von zwei Präpariernadeln befestigt. Nach der Befestigung wurden die Fett- und Lungengewebe sowie das Perikard entfernt damit man die Organe, an denen die Versuche durchgeführt werden, isolieren konnte. Als erstes wurde der rechte Vorhof herausgeschnitten, wobei man sehr vorsichtig sein musste, dass die Funktion des primären Schrittmachers nicht geschädigt wird. Der isolierte Vorhof wurde dann mit Hilfe von zwei Fäden und je einem Silberhäkchen an der Spitze angebunden. Das fertige Präparat wurde im Organbad eingebracht und mit der "Spitze nach unten" eingespannt.

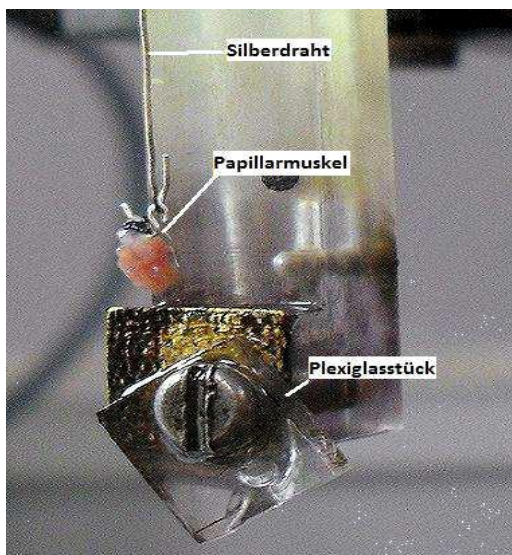
Abbildung 8: Atrium dextrum cordis eingespannt in der Apparatur



2.7.1.3. Musculus papillaris (Papillarmuskel)

In den beiden Herzkammern, in dem sich die Papillarmuskeln befinden, wurden auch die Purkinjefasern und zwar vollständig entfernt, da die Fasern durch ihre spontane Aktivität den Versuchsablauf am Papillarmuskel beeinträchtigen können. Muskeln wurden dann vorsichtig und ohne Überdehnung abgeschnitten und mit einem Faden, an dem ein Silberhäkchen angebracht wurde, angebunden und wieder im Organbad eingespannt.

Abbildung 9: Präparierter Musculus papillaris



2.7.1.4. Arteria pulmonalis (Lungenarterie)

Die Lungenarterie wurde auch wie die Aorta, ohne Faden und ohne Häkchen, direkt in der Apparatur eingespannt.

Das Herz des Meerschweinchen besitzt zwei Lungenarterien (eine linke und eine rechte Lungenarterie), die aus dem Truncus pulmonalis stammen. Nach der Abtrennung, wurden die Lungenarterien vom Fett- und Muskelgewebe befreit und gleich ohne Faden und ohne Häkchen direkt in der Apparatur eingespannt.

2.7.1.5. Aorta descendens (absteigender Teil der Aorta)

Die Aorta, die sich entlang der Wirbelsäule befindet, wurde vorsichtig herausgeschnitten und in einer mit Nährlösung befüllten Petrischale fixiert und präpariert. Wie bei den Lungenarterien wurden das Fett- und Muskelgewebe entfernt und dann wurde die "gereinigte" Aorta mit Hilfe der Federschäre in kleinere Stückchen geschnitten und direkt in die Apparatur eingespannt.

Abbildung 10: Fertig präparierte Aortaringe



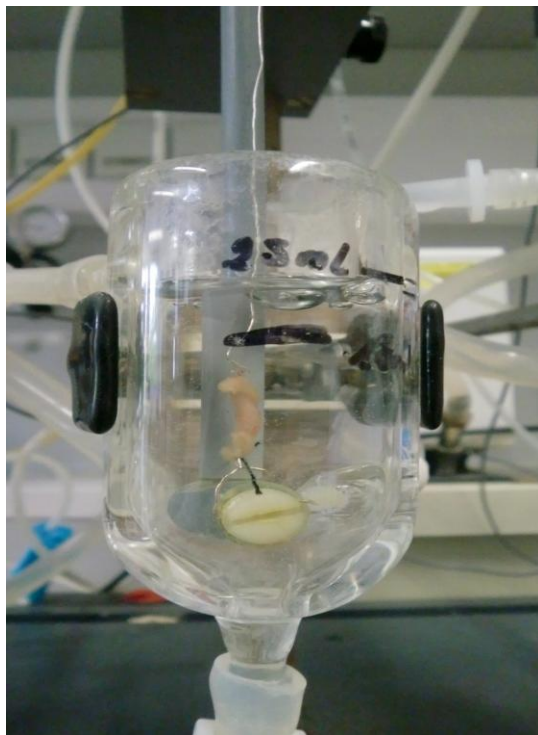
2.7.1.6. Terminales Ileum (Darm)

Es wurde nur der terminale Abschnitt des Dünndarmes zur Untersuchung verwendet, welcher ein Übergang vom Dünndarm zum Dickdarm darstellt.

Wenn das terminale Ileum erkannt wurde, wurde ein ca. 20 cm langes Stück herausgezogen, mit einem Faden angebunden und abgetrennt. Der Darm wurde dann, falls er nicht für die Versuche gebraucht wurde, in der Nährlösung mit Oxy mix aufbewahrt und begast.

Das terminale Ileum wurde in einer Petrischale in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Die beiden Enden wurden schräg präpariert und an einen Silberdrahthäkchen angebunden.

Abbildung 11: Darmpräparat im Organbad



2.8. Versuchsanordnung und Apparaturen

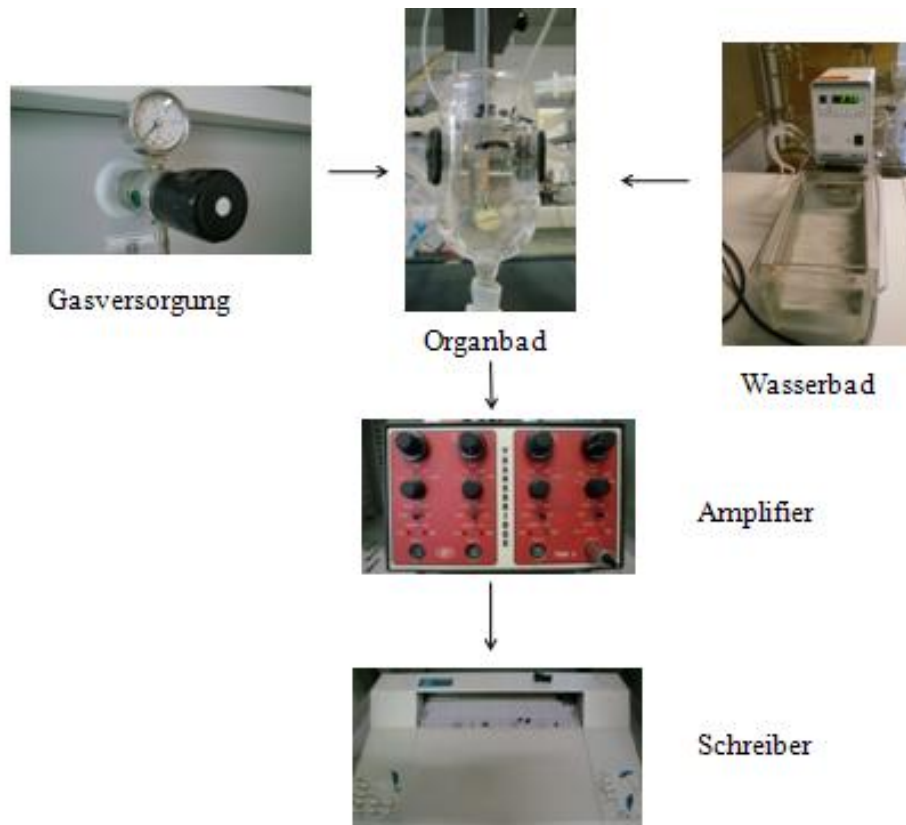
Um die Versuche durchführen zu können, musste man die optimalen und physiologischen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, O₂-Versorgung sowie entsprechende Nährmedium) für die Organpräparate gewährleisten.

Die Versuche erfolgten auf zwei verschiedenen Apparaturen. Die Papillarmuskeln wurden nur in die Apparatur A eingespannt, und Apparatur B wurde für die restlichen vier Organe (Vorhof, Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum) verwendet.

Die isolierten Organe wurden im Organbad mit Hilfe von einem Silberdraht an die Apparatur angespannt. Am oberen Teil des Silberdrahtes befindet sich ein Kraftwandler, der über dem Verstärker an dem Schreiber gebunden ist.

Der Kraftwandler diente dazu, die mechanischen Veränderungen (in Form einer Kontraktion oder einer Spasmolyse) in elektrische Signale umzuwandeln. Die verstärkten elektrischen Signale wurden dann zum Schreiber geleitet und am Millimeterpapier aufgezeichnet.

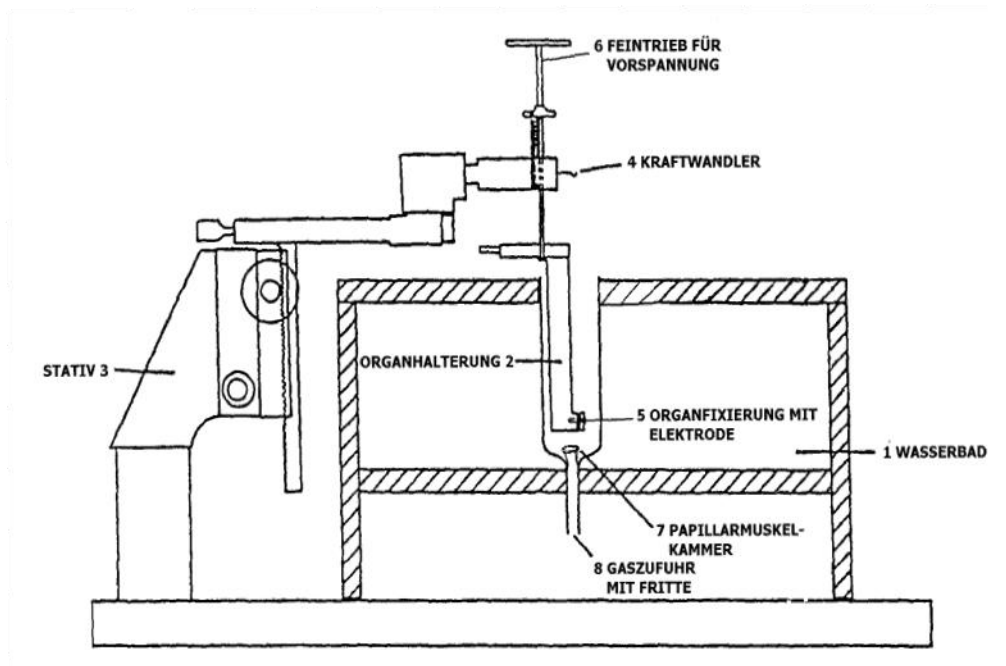
Abbildung 12: Versuchsanordnung



2.8.1. Apparatur A

Wie schon erwähnt wurde die Apparatur A ausschließlich für den Musculus papillaris verwendet.

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Apparatur A



Im Unterschied zu Apparatur B war das Organbad (7) bei Apparatur A direkt in das Wasserbad (1) eingetaucht. Das Thermostat diente dazu, eine konstante Temperatur des Wasserbades sowie mit Tyrode (25 ml) befülltes Organbades von 35°C zu erhalten.

Da der Papillarmuskel auch mit Gas (Oxymix) während des Versuches versorgt werden musste, wurde dies durch eine Glasfritte (8) im unteren Teil des Organbades geschafft.

Und nun kann der präparierte Muskel auf einem Silberdraht an der Organhalterung (2) angehängt werden und dann zwischen einer Plexiglasplatte und einer Elektrode (5) fixiert werden. Der Muskel ist indirekt, und zwar über Silberdraht, mit dem Kraftwandler (4) verbunden.

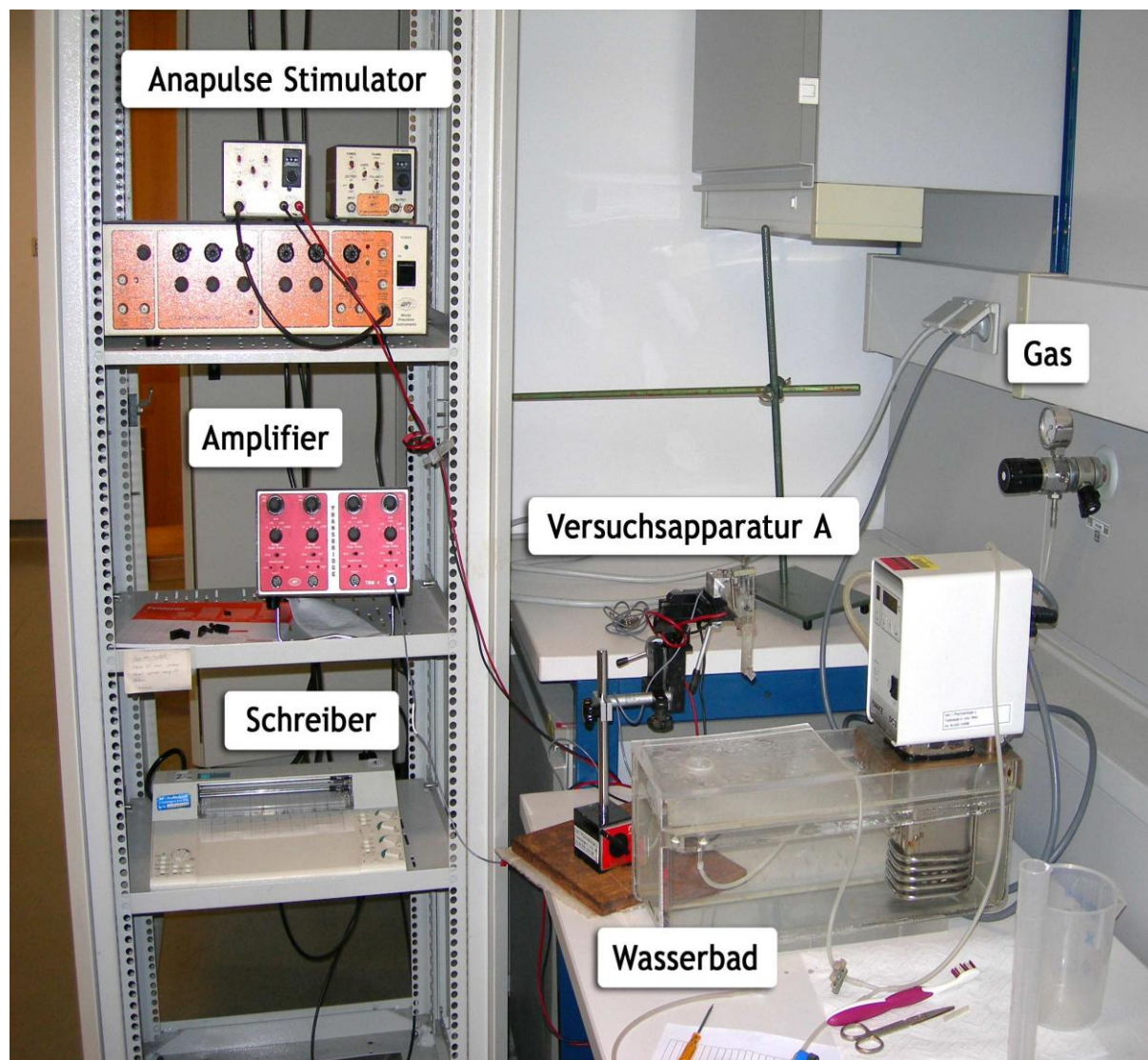
Die Organhalterung mit dem fixierten Papillarmuskel wurde nun in die Papillarmuskelkammer eingetaucht und zwar so dass das Präparat sich vollständig in der begasten Nährlösung befindet.

Über den Feintrieb (6) konnte man die Vorspannung anlegen, damit die alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Wie schon erwähnt, da der Papillarmuskel nicht in der Lage ist, sich spontan zu kontrahieren, wurde er elektrisch gereizt und zwar über einen Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA).

Die mechanischen Veränderungen am Papillarmuskel wurden dann über Kraftwandler und Verstärker bis zum Schreiber geleitet.

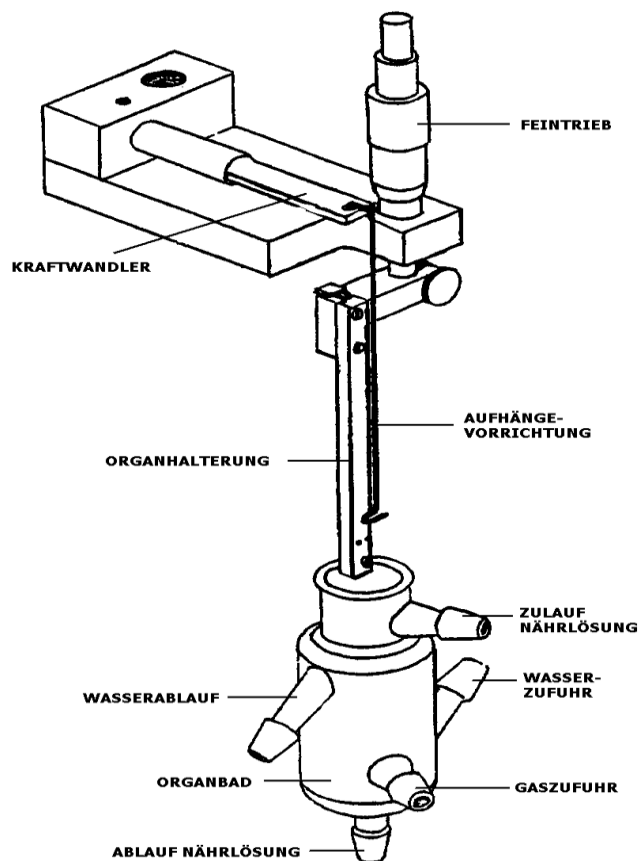
Abbildung 14: Originale Abbildung der Apparatur A



2.8.2. Apparatur B

Die Apparatur B wurde für die Aorta, Lungenarterie, Vorhof und den Darm verwendet.

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Apparatur B

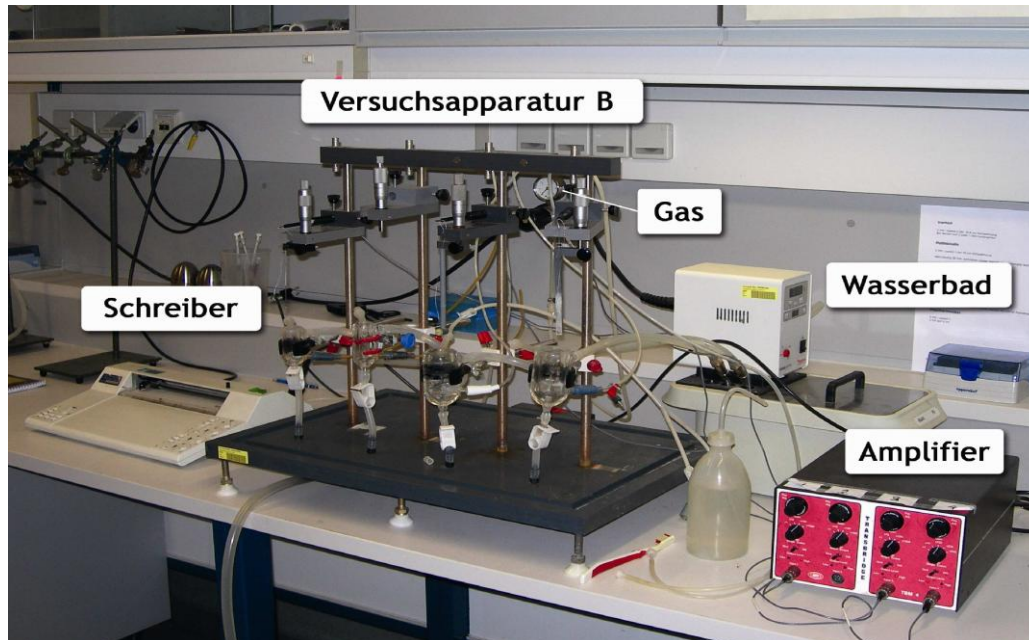


Im Unterschied zu der Apparatur A war hier das Organbad nicht direkt in das Wasserbad eingetaucht, sondern besitzt eine doppelseitige Wand in dem das angewärmte Wasser (37°C im Gegensatz zu 35°C bei der Apparatur A) konstant zirkulierte.

Im unteren Teil des Organbades befindet sich keine Glasfritte mit der Gasversorgung wie bei der Apparatur A, sondern ein Schlauch über welcher den Abfluss des Organbades gesteuert wird. Die Gasversorgung erfolgte über einen seitlich angebrachten Schlauchs.

Mit Hilfe eines Feintriebes wurde die entsprechende Vorspannung eingestellt.

Abbildung 16: Originale Abbildung der Apparatur B



Von Silberdraht über Kraftwandler und Verstärker wurden wieder die mechanische Veränderungen bis hin zum Schreiber geleitet und registriert.

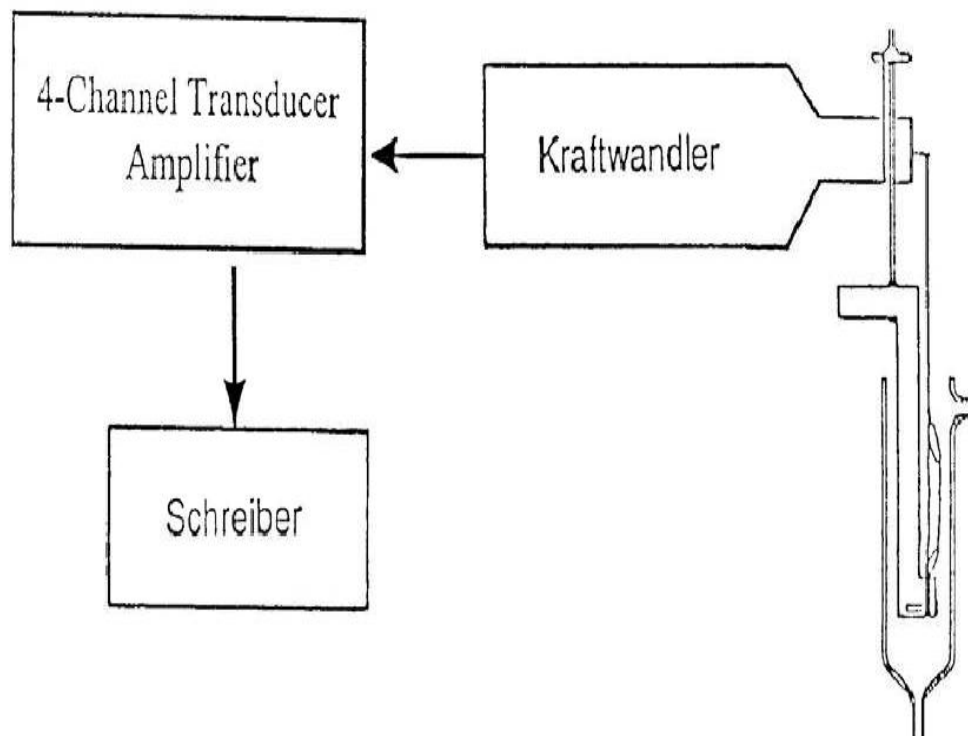
2.8.3. Kraftwandler, Verstärker und Schreibgerät

Mechanische Veränderungen (entweder eine Kontraktion oder eine Spasmolyse) am untersuchten Organ wurden in elektrische Impulse umgewandelt, und zwar mit Hilfe eines Kraftwandlers, was ein wichtigster Schritt während des Versuches darstellt, damit die Versuche überhaupt messbar werden konnten.

Erzeugte elektrische Signale wurden mit einem Amplifier (4-Chanel Transducer Amplifier, WPI) verstärkt.

Die Impulse wurden mittels Schreibgerät (Flatbed Recorder BD 112, Fa Kipp & Zonen, Niederlande) auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet ("Record on"- und "Pen down"-Funktion).

Abbildung 17: Schema der Signalgewinnung



2.8.4. Gasversorgung mit Oxymix

Oxymix, ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, versorgt die isolierten Organe und Organpräparate mit notwendigem Sauerstoff, ermöglicht die Erhaltung des physiologischen pH-Wertes von 7,2 - 7,4 und begünstigt auch Homogenisierung der eingespritzten Testsubstanzen im Organbad.

Von einer zentralen Gasflasche über ein Schlauchsystem erreicht das Gas die Apparaturen, an den auch die Schraubenklemmen sich befinden, die dazu dienen, Intensität der Gasversorgung zu steuern.

2.9. Versuchsablauf

Damit die Ergebnisse durch Verunreinigungen nicht beeinträchtigt werden, musste man immer an einer gründlich gereinigte Apparaturen arbeiten.

Die Organbäder wurden immer am Ende des Versuchstages mit einer 0,1 N Salzsäure gründlich gereinigt und dann mit Aqua bidestillata 2-3 Mal durchgespült. Dann aber auch am nächsten Tag, vor der Versuchen, wurden die Organbäder zuerst mit Aqua bidestillata und dann mit Tyrode durchgespült. Danach konnten die Versuche erfolgen.

2.9.1. Versuchsablauf - Atrium cordis dexter

Der Weg der Isolierung bis hin zur Vorhofpräparierung wurde schon in Kapitel 2.7.1.2. besprochen. Das Präparat sollte man möglichst schnell an die Apparatur B (Kapitel 2.8.2.) einspannen. Das Präparat durfte nicht zu fest (Überdehnungen vermeiden, da die Gefahr von Organschädigung besteht) aber auch nicht zu locker an den Silberdraht hängen, wobei auch der Silberdraht die Wände des Gefäßes nicht berühren sollte.

Wenn die angegebenen Voraussetzungen erfüllt wurden, wurde das Präparat in das oxygenierte Organbad (37°C) eingetaucht.

Der Schreiber, der mit einer Spannung vom 5 mV und einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec arbeiten sollte, wurde eingeschaltet. Nachdem der Verstärker auch eingeschaltet wurde und Schreiber auf die Nullposition gestellt wurde, wurde die Vorspannung mit dem Feintrieb von 10,4 mN erzeugt. Die Herzschläge konnte man schon am Schreiber beobachten.

Nach eine Anpassungsphase von ca. 20-30 Minuten konnte man schon mit einer 45-minütigen Kontrollphase beginnen, wobei die Frequenz von 12 Sekunden (entspricht

sechs Kästchen auf dem Millimeterpapier) alle 5 Minuten am Millimeterpapier registriert wurde ("Record on"- und "Pen down"-Tasten wurden gedrückt).

Erst wenn die letzten 2-3 Messungen der Schlagfrequenz konstant wurden, wurde die Testsubstanz nach dem Pipettierschema (Kapitel 2.3.) in einem 45-minütigen Abstand in das Organbad hineinpipettiert und die Schläge alle 5 Minuten am Millimeterpapier registriert.

Der Versuch konnte beendet werden, entweder wenn die letzte Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde oder wenn die Vorhof keine Schläge mehr erzeugen konnte.

Zur Auswertung wurde die aufgezählte Schlaganzahl mit dem Faktor 5 multipliziert, was eigentlich die Schlagfrequenz pro 60 Sekunden darstellte.

2.9.2. Versuchsablauf - Terminales Ileum

Das Darmpräparat wurde wie auch der rechte Vorhof an die Apparatur B (Kapitel 2.8.2.) eingespannt. Isolierte und präparierte Darmpräparate (Kapitel 2.7.1.6.) wurden zuerst an den Silberdraht angehängt und in das mit Oxy mix begaste Organbad eingetaucht. Danach wurden der Schreiber (der auf 5 mV und Geschwindigkeit von 1 mm/sec gestellt wurde) sowie der Verstärker eingeschaltet. Bevor man eine Vorspannung von 4,9 mN mit Hilfe von dem Feintrieb einstellte, sollte der Schreiber auf den Nullpunkt zurückgestellt werden.

Die Anpassungsphase dauerte bei dem Darm 20 Minuten, nachdem die Tasten "Pen down" und "Record on" gedrückt wurden und so die Schreiberspitzte auf das Millimeterpapier (Nullposition) aufgesetzt wurde.

Die Tyrode wurde abgelassen und die frisch zubereitete KCl-Lösung (Kapitel 2.6. - Tabelle 3) wieder aufgefüllt, der eine Vorkontraktion des Darmpräparates hervorrufen sollte; was durch einen nach links drehenden Ausschlag des Schreibers gekennzeichnet wurde. Sobald die Darmkontraktion einer konstanter Niveau erreichte, konnte schon in

einem 45-minütigen Abstand die Testsubstanz nach Pipettierschema (Kapitel 2.3.) eingespritzt werden.

2.9.3. Versuchsablauf - Aorta descendens

Wie schon besprochen, konnten die Aortastücke direkt an die Apparatur B eingehängt werden und in das mit Oxymix begaste Organbad eingetaucht werden.

Der Schreiber, der mit einer Spannung von 10 mV sowie mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/sec eingestellt wurde, wurde aktiviert. Mit dem Feintrieb legte man eine Vorspannung von 19,4 mN an. Nach der beendeten Anpassungsphase von 20 Minuten, wurde die Spannung auf 5 mV (entspricht 9,81 mN) umgestellt, Schreiber auf den Nullpunkt gestellt, Tasten "Record on" und "Pen down" gleichzeitig gedrückt damit die Schreiberspitze wieder auf das Millimeterpapier (Nullposition) aufgesetzt wurde. Danach wurde die Tyrode abgelassen und die KCl-Lösung (Kapitel 2.6. - Tabelle 3) hinzugefügt.

Wie beim Darmpräparat musste man abwarten bis die Kontraktion ein konstantes Niveau (Plateauphase) erreichte, damit die Analysesubstanz in einem 45-minütigen Abstand (Kapitel 2.3.) eingespritzt wurde.

2.9.4. Versuchsablauf - Arteria pulmonalis

Der Versuch ablaufte genauso wie bei der Aorta (Kapitel 2.9.3.), wobei die Spannung auf dem Schreiber die ganze Zeit auf 5 mV (entspricht 9,81 mN) und nicht 10 mV (entspricht 19,6 mN) wie bei der Aorta, eingestellt wurde.

2.9.5. Versuchsablauf - Musculus papillaris

Im Unterschied zu den anderen vier Organen wurden die Papillarmuskeln in die Apparatur A (wie schon in Kapitel 2.8.1. beschrieben wurde) eingespannt, in das mit Oxygase begaste Organbad (35°C) eingetaucht. Der Schreiber wurde mit einer Spannung von 5 mV (2 oder 1 mV bei Bedarf) sowie mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec eingestellt und die Spitze des Schreibers auf die Nulllinie gebracht. Die Vorspannung, die 3,92 mN betrug, wurde wieder mit einem Feintrieb erzeugt.

Da der Papillarmuskel keine Spontanaktivität zeigt, musste der Muskel mit dem Accupulser gereizt werden, so dass dem Muskel ein Stromimpuls pro Sekunde gegeben wurde. Die Reizstärke wurde, und zwar über eine Isolation Unit, so lange erhöht bis die Schwellenstromstärke erreicht wurde und der Muskel zu schlagen anfang.

Um eine kontinuierliche Muskelkontraktion zu erreichen, wurde die Reizstärke noch um 10% erhöht, die aber im weiteren Versuchsverlauf hinunter reguliert werden konnte, um eine Entleerung der Katecholaminspeicher zu vermeiden.

Die Anpassungsphase sollte 45 Minuten dauern und nachfolgende Kontrollmessungen wurden so durchgeführt, dass der Schreiber in Abständen von 5 Minuten auf das Millimeterpapier gesetzt wurde und immer sechs Amplituden pro Messung aufgezeichnet wurden.

Erst wenn die Amplitudengröße eine ausreichende sowie konstante Größe erreichte, konnte man schon mit der Substanzgabe (nach der Schema die in Kapitel 2.3. beschrieben wurde) beginnen.

2.10. Auswertung der Ergebnisse

2.10.1. Auswertung - Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Eine mögliche vasodilatierende Wirkung wurde bei den Versuchen mit Aorta und Arteria pulmonalis untersucht und beim Darm wurde eine spasmolytische Wirkung getestet. Die Ergebnisse von oben genannten Versuchen wurden auf gleiche Weise ermittelt.

Die Organe wurden zuerst, wie schon besprochen (Kapitel 2.6.), mit KCl-Lösung maximal kontrahiert und wenn die Kontraktionskurve die Plateauphase erreicht hatte, wurde die Analysesubstanz (MAH 29) nach dem bereits bekannten Pipettierschema (Kapitel 2.3.) dazugegeben.

Danach wurden die Abstände zwischen der Nulllinie und den markierten Stellen an der Kurve mit einem Lineal gemessen und mit einem Eichungsfaktor, in Abhängigkeit der eingesetzte elektrische Spannung (mV-Werte), multipliziert.

Als Referenzwert diente der Wert, der sich in der Plateauphase und zwar vor Applikation der ersten Konzentration, eingestellt hatte und betrug immer 100%. Auf gleiche Weise wurde die Abnahme/Zunahme der Kontraktionskraft zu den jeweiligen Konzentrationen der Analysesubstanz prozentuell berechnet.

Letztendlich wurde daraus eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, aus der der EC_{50} -Wert herausgelesen werden konnte.

2.10.2. Auswertung - Atrium cordis dexter

Am rechten Vorhof wurde die Wirkung der Analysesubstanz auf die Chronotropie (Schlagfrequenz) überprüft, wobei die Testsubstanz entweder einen positiv oder negativ chronotropen Effekt hervorrufen konnte. Dabei wurden die Herzschläge über 12 Sekunden, was sechs Kästchen zu je 1 Zentimeter Länge am Millimeterpapier entsprach, in einem 5-Minutentakt mittels Schreiber am Millimeterpapier aufgezeichnet und gezählt.

Aufgezeichnete Herzschläge wurden dann mit 5 multipliziert, wodurch man die Herzfrequenz erhielt. Dasselbe wurde dann mit der Testsubstanz gemacht.

Die Einflüsse der applizierten Analysesubstanz wurden mittels Referenzwertes (entspricht 100%) prozentuell berechnet und anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt.

2.10.3. Auswertung - Musculus papillaris

Eine mögliche Erhöhung bzw. Verminderung der Kontraktionskraft (Inotropie) wurde bei der Papillarmuskelnpräparaten durch Zugabe der Testsubstanz beobachtet.

Die aufgezeichnete Amplituden wurden mit einem Lineal in Zentimeter abgemessen und in Abhängigkeit von der eingestellten elektrischen Spannung mit dem Eichfaktor (wie bei der Aorta, Lungenarterie oder dem Darm - Kapitel 2.10.1.) multipliziert.

Wieder wurden die prozentuelle Berechnungen zu jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanz in Abhängigkeit vom Kontrollwert berechnet und eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

2.10.4. Statistik

Unter Verwendung des Programms "Sigma Plot 9.0" wurden die ausgewerteten Resultate der Versuchsserien statistisch beurteilt.

Der arithmetische Mittelwert (f_c) sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurden berechnet und in der Konzentrations-Wirkungskurve eingetragen, wobei die Abszisse die injizierte Testsubstanz-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und die Ordinate die Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz in % darstellte.

Bei stark wirksamen Substanzen konnte die EC_{50} -Wert ermittelt werden, die die effektive Konzentration darstellt, bei der zu einer 50%igen Änderung des Referenzwertes kommt.

Letztendlich wurde die Signifikanztest ("Student-t-Test") durchgeführt, der die Aussagekraft der ermittelten Messergebnisse beschreibt, wobei die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($P < 0,05$) als signifikant und unter 1% ($P < 0,01$) bzw. unter 0,1% ($P < 0,001$) als hochsignifikant bewertet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Wirkungen der Testsubstanz MAH 29 HCl auf die isolierten Meerschweinchenorganpräparate

3.1.1. MAH 29 HCl - Wirkung auf die Aorta

Die vasodilatierende Wirkung von Testsubstanz MAH 29 wurde an vier isolierten Aortaringen untersucht, und aus den erhaltenen Ergebnissen wurden die arithmetische Mittelwerte sowie der entsprechende Standardfehler ausgerechnet.

Erhaltene Ergebnisse sind in der folgende Tabelle zusammengefasst, in welcher man eine Abnahme der Kontraktionskraft sehen kann:

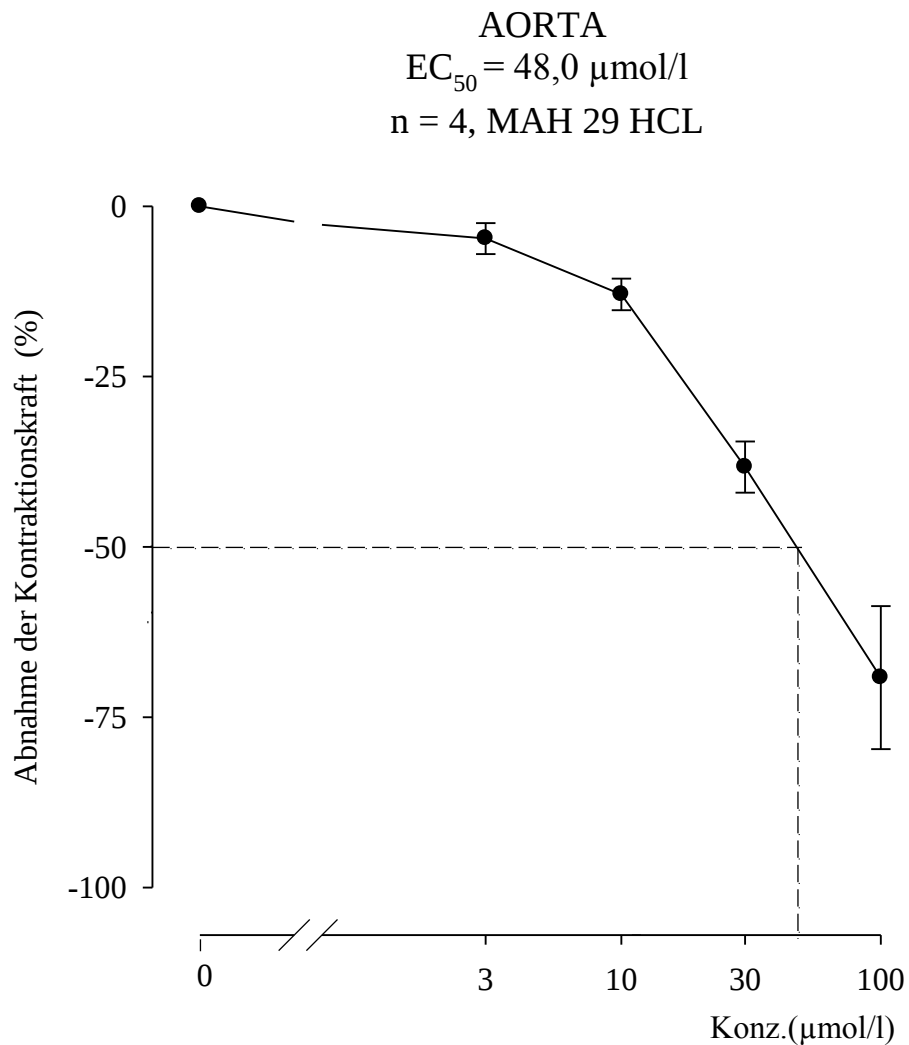
Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl an der Aorta

MAH 29 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,63 \pm 1,82$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$8,26 \pm 1,80$	$-4,73 \pm 2,28$	4	n.s.
10	$7,59 \pm 1,75$	$-12,94 \pm 2,32$	4	0,05
30	$5,41 \pm 1,40$	$-38,29 \pm 3,76$	4	0,01
100	$2,82 \pm 1,34$	$-69,18 \pm 10,50$	4	0,001

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

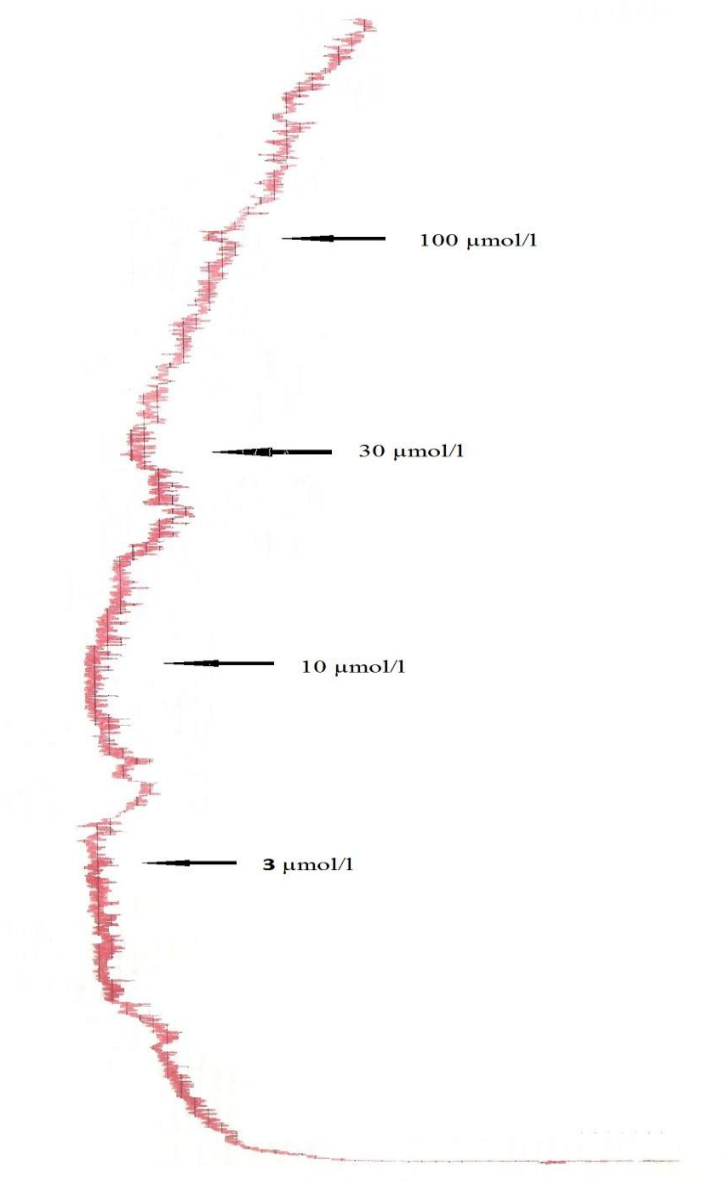
Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 29 HCl an der Aorta descendes



Die verwendeten Konzentrationen werden an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent an der y-Achse eingetragen, wobei die senkrechten Balken die Standardfehler darstellen.

Eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft könnte man an der Abbildung 18 bereits ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ sehen, wobei eine EC_{50} erreicht wird und zwar bei $48 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl an der Aorta descendes



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Versuchsverlaufs an der Aorta unter Einfluss von MAH 29. Die Substanz wurde nach erreichende Plateauphase kumulativ in die Organzelle in einem 45-minütigen Abstand zugegeben.

Wie man schon sehen könnte, nimmt die Kontraktionskraft kontinuierlich ab durch die zunehmende Substanzgabe.

3.1.2. MAH 29 HCl - Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Die mögliche vasodilatierende Wirkung von Testsubstanz MAH 29 wurde an vier isolierten Lungenarterien beobachtet.

Wieder wurden der arithmetische Mittelwert (f_c) sowie der entsprechende Standardfehler (SEM) ausgerechnet, die dann in der folgende Tabelle zusammengefasst sind:

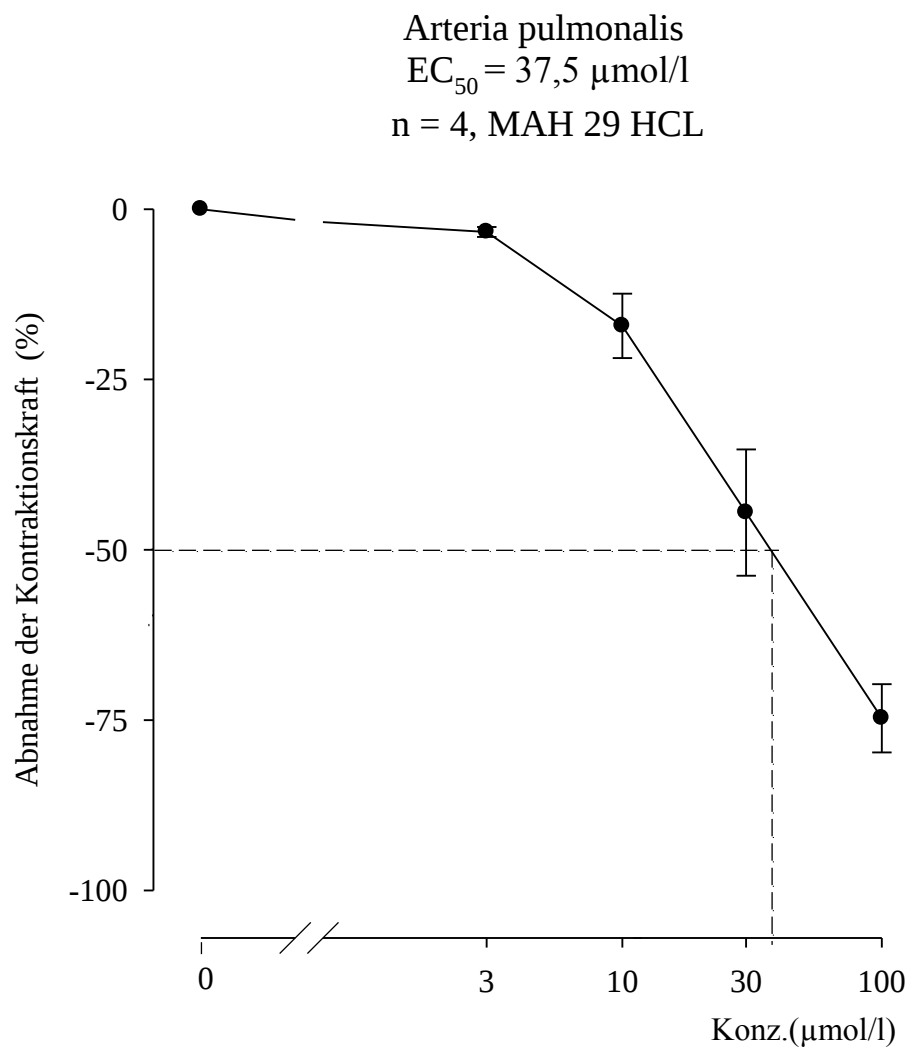
Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl an der Arteria pulmonalis

MAH 29 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsan- zahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$12,45 \pm 1,25$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$12,05 \pm 1,3$	$-3,34 \pm 0,73$	4	n.s.
10	$10,48 \pm 1,63$	$-17,14 \pm 4,73$	4	0,05
30	$7,18 \pm 1,76$	$-44,55 \pm 9,28$	4	0,01
100	$3,28 \pm 0,91$	$-74,73 \pm 5,01$	4	0,001

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

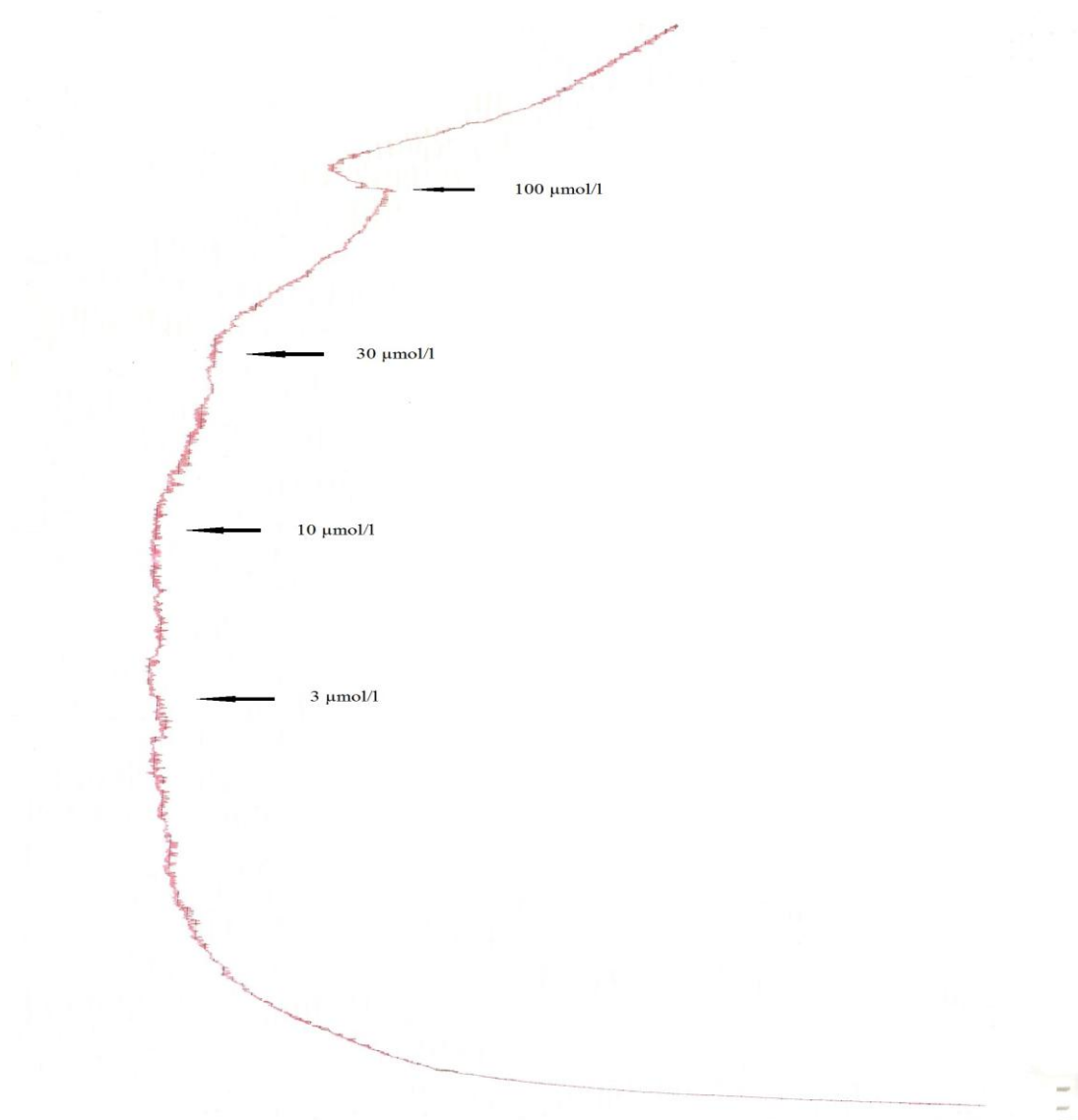
- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwerte

Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 29 HCl an der Arteria pulmonalis



Die verwendeten Konzentrationen werden wieder an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent an der y-Achse eingetragen, wobei die senkrechten Balken die Standardfehler darstellen.

Abbildung 21: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl an der Arteria pulmonalis



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Versuchsverlaufs an der Lungenarterie unter Einfluss von MAH 29, an der man sehen könnte, dass die Kontraktionskraft kontinuierlich mit der steigenden Substanzgabe abnimmt.

3.1.3. MAH 29 HCl - Wirkung auf das terminale Ileum

Die potentielle spasmolytische Wirkung von Testsubstanz MAH 29 wurde an vier isolierten Darmpräparaten untersucht. Der arithmetische Mittelwert (f_c) sowie der zugehörige Standardfehler (SEM) wurden ausgerechnet und in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

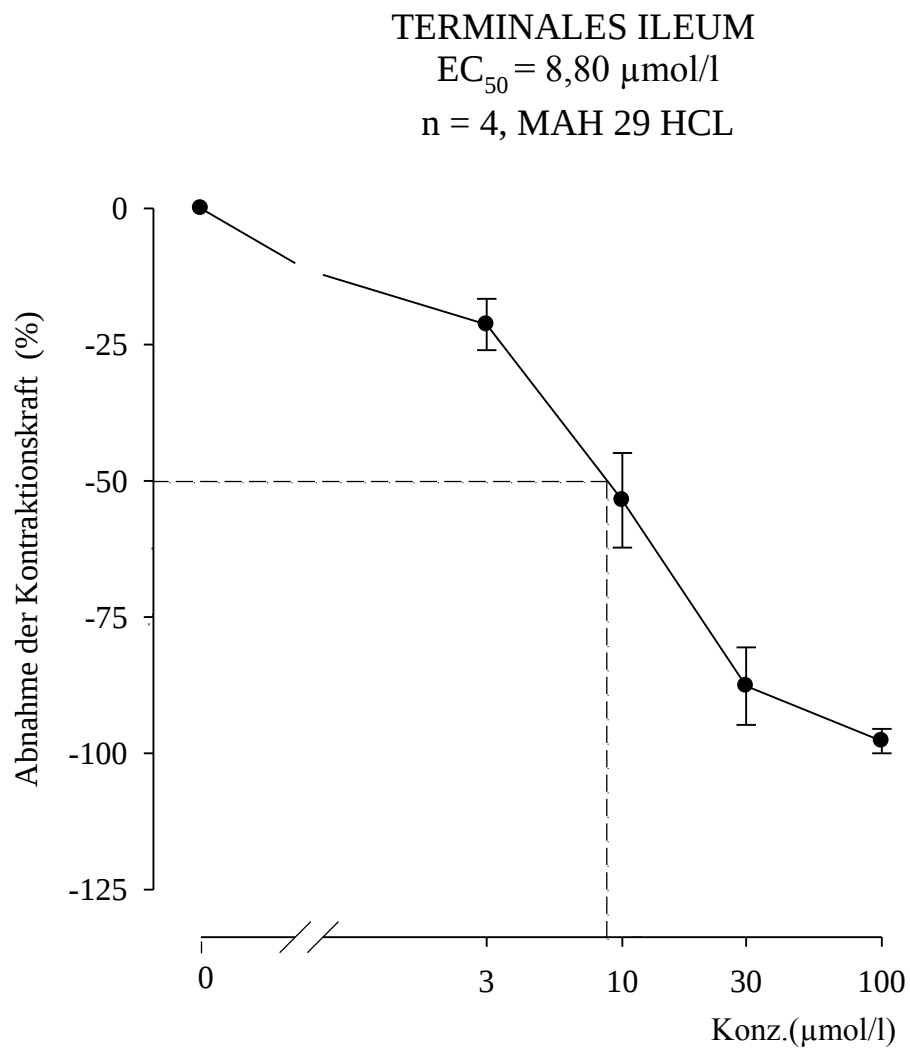
Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl am Dünndarm

MAH 29 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,63 \pm 1,89$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
3	$8,57 \pm 1,80$	$-21,32 \pm 4,71$	4	0,05
10	$5,41 \pm 1,66$	$-53,57 \pm 8,67$	4	0,01
30	$1,69 \pm 0,98$	$-87,67 \pm 7,12$	4	0,001
100	$0,32 \pm 0,32$	$-97,76 \pm 2,24$	4	0,001

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

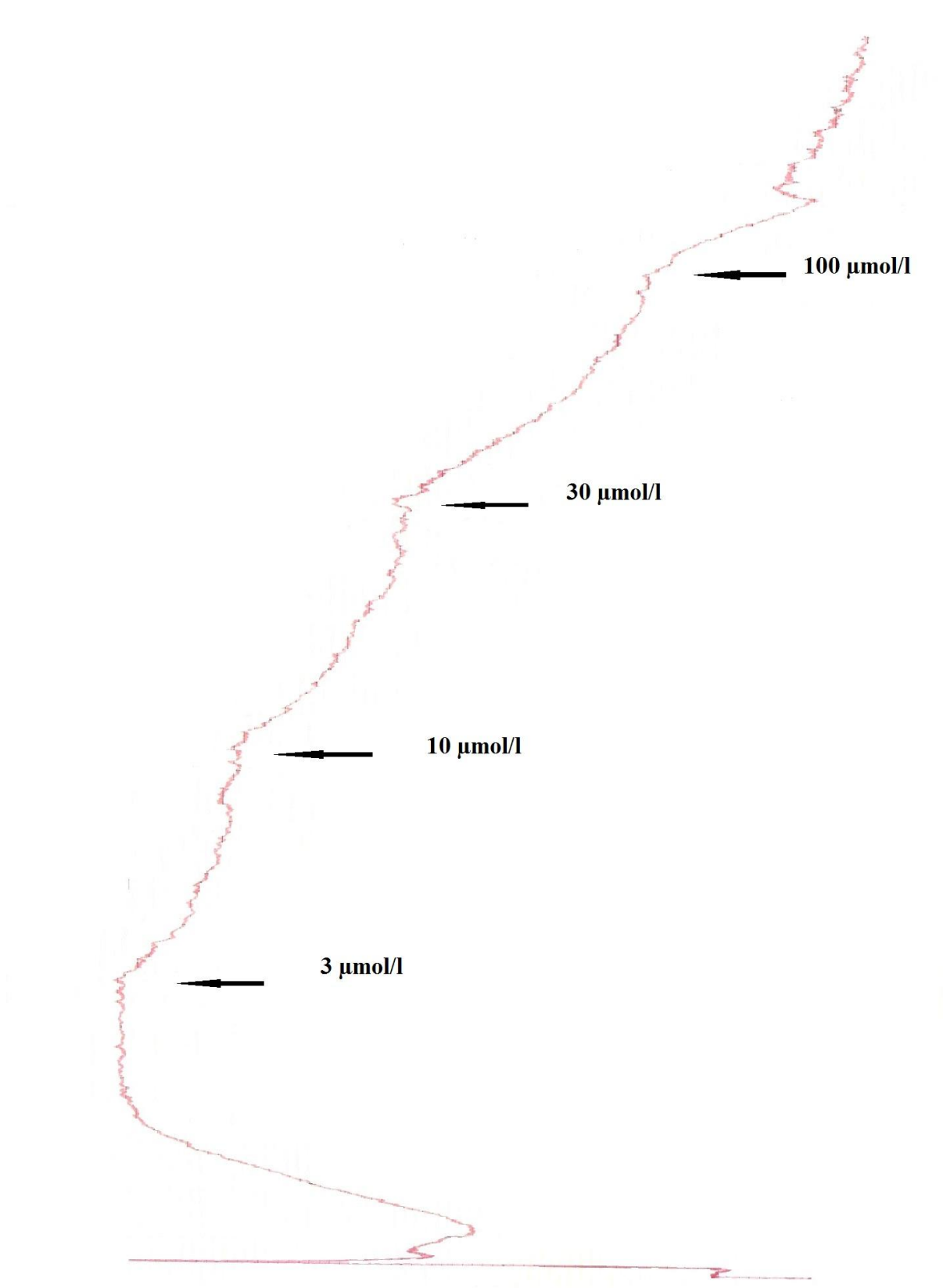
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 29 HCl am Dünndarm



Die verwendeten Konzentrationen werden an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent an der y-Achse eingetragen, wobei die senkrechten Balken die Standardfehler darstellen.

Eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft sieht man an der Abbildung 13, wobei die Testsubstanz einen EC_{50} -Wert schon ab $8,80 \mu\text{mol/l}$ erreicht. Das heißt, dass MAH 29 eine starke spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum ausübt.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl an dem terminalen Ileum



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Versuchsverlaufs am terminalen Ileum.

3.1.4. MAH 29 HCl - Wirkung auf das Atrium cordis dexter

Die Chronotropie wurde an isolierten rechten Vorhof untersucht. Dafür wurden drei Vorhofpräparate gebraucht deren Ergebnisse in der folgenden Tabelle angegeben sind:

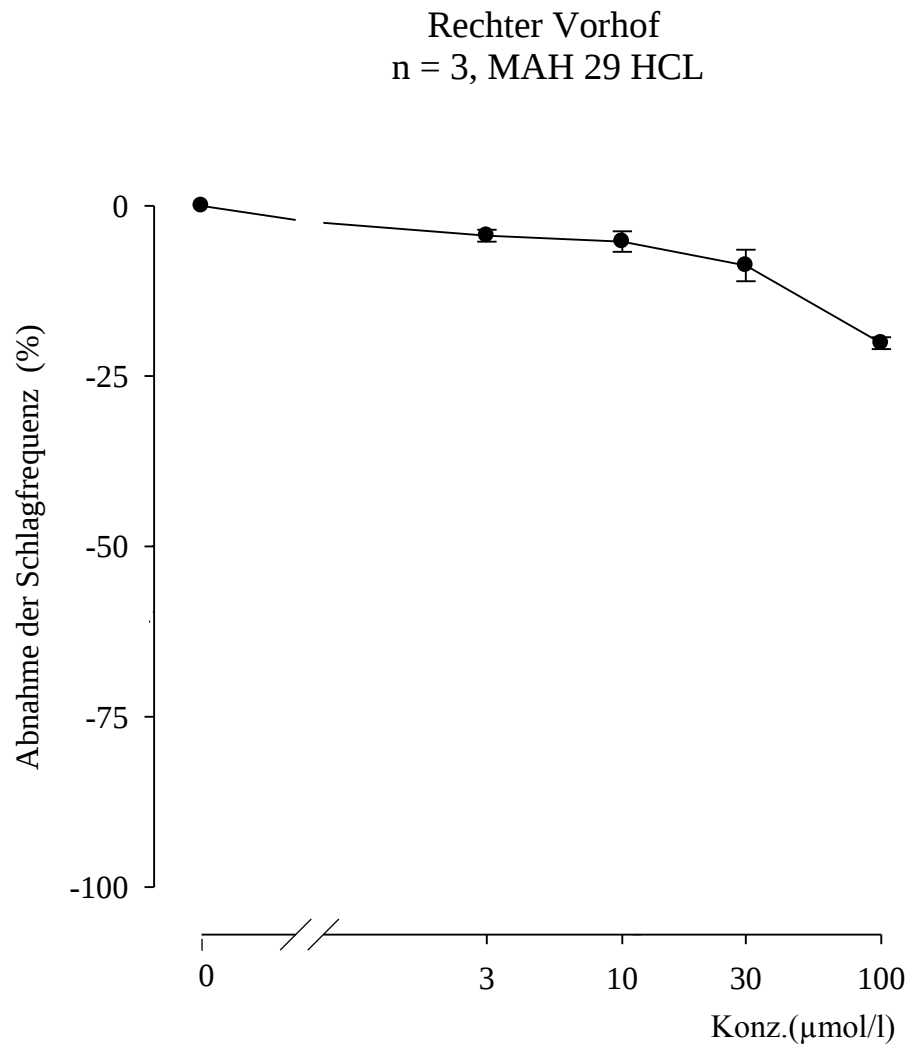
Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl auf dem rechten Vorhof

MAH 29 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (mN)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr Scheinlichkeit (P)
Kontrolle	190,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3	-
3	181,67 $\pm$ 1,67	-4,39 $\pm$ 0,87	3	n.s.
10	180,00 $\pm$ 2,89	-5,26 $\pm$ 1,51	3	n.s.
30	173,33 $\pm$ 4,41	-8,77 $\pm$ 2,32	3	n.s.
100	151,67 $\pm$ 1,67	-20,17 $\pm$ 0,88	3	0,05

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

- f = Schlagfrequenz
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

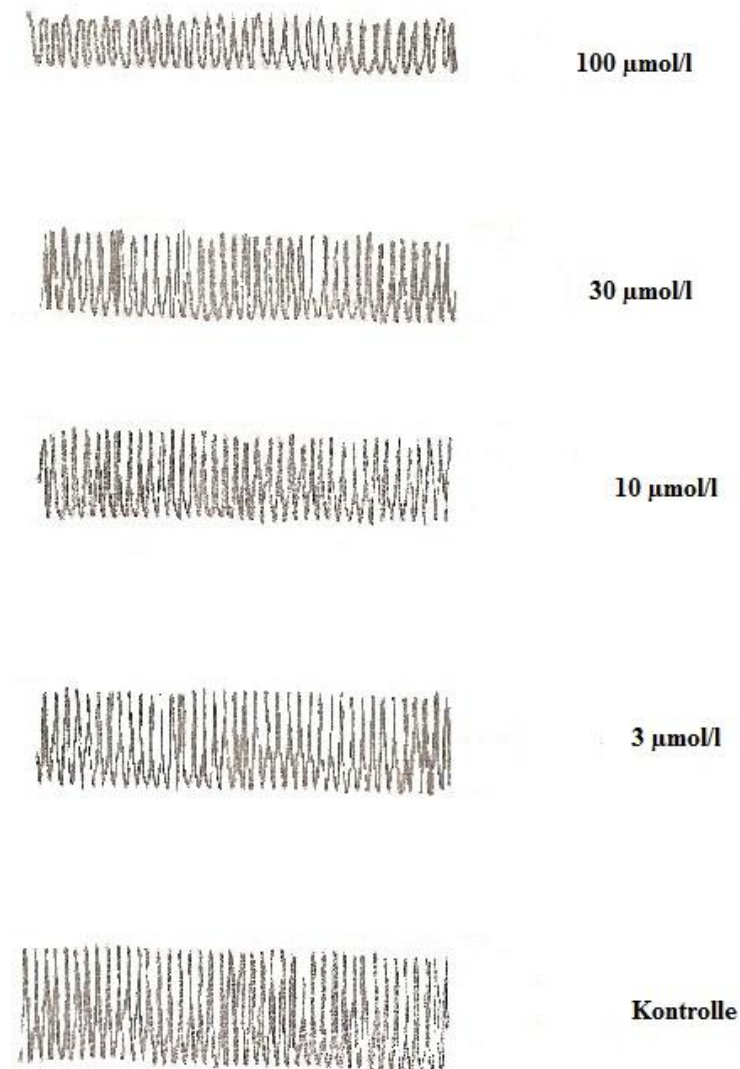
Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 29 HCl am Atrium cordis dexter



Die verwendeten Konzentrationen werden an der x-Achse in µmol/l und die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent an der y-Achse angegeben, wobei die senkrechten Balken die Standardfehler darstellen.

An der Abbildung 24 sieht man eine ziemlich schwache Wirkung am rechten Vorhof, d.h. dass die Substanz einen schwachen negativ chronotropen Effekt zeigte.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl am Atrium cordis dexter



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Versuchsverlaufs am Atrium cordis dexter.

3.1.5. MAH 29 HCl - Wirkung auf den Musculus papillaris

Eine mögliche Abnahme der Inotropie wurde an fünf isolierten und präparierten Papillarmuskeln des Meerschweinchens untersucht.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

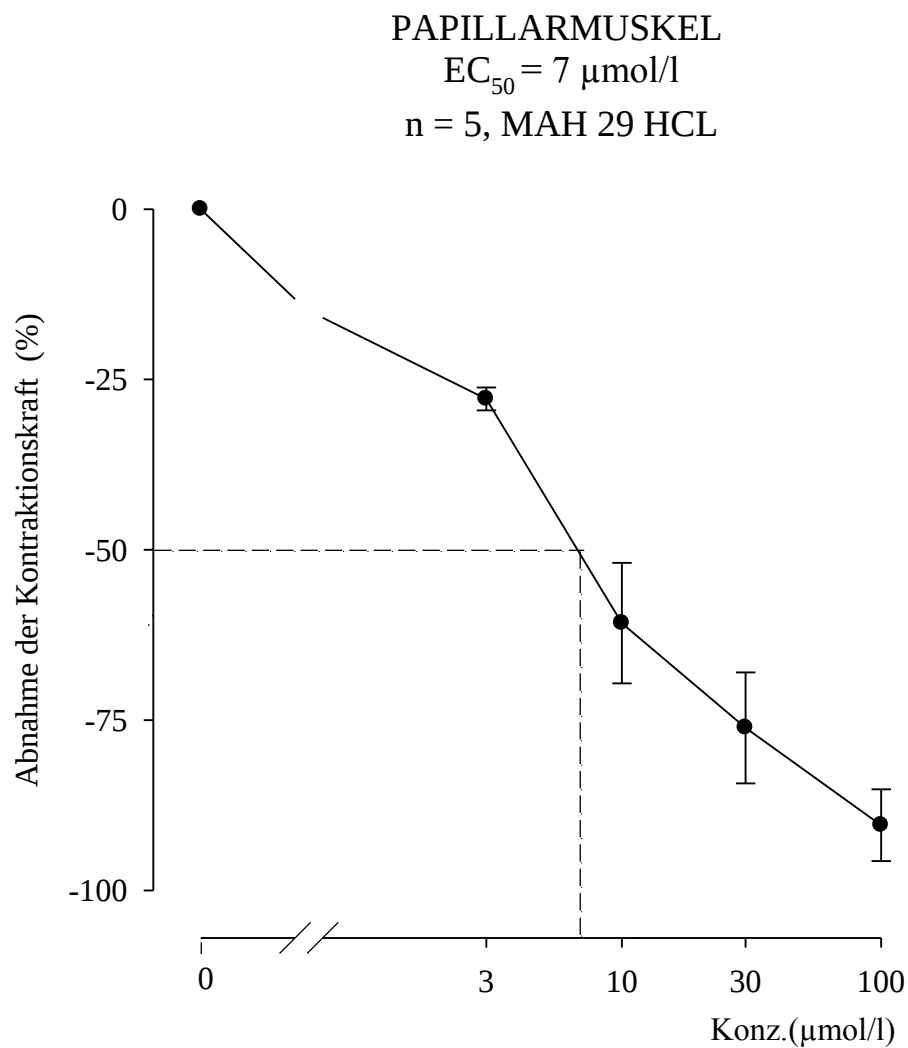
Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl am Papillarmuskel

MAH 29 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,06 \pm 0,11$	$0,00 \pm 0,00$	5	-
3	$0,76 \pm 0,07$	$-27,86 \pm 1,69$	5	0,05
10	$0,39 \pm 0,07$	$-60,77 \pm 8,85$	5	0,01
30	$0,23 \pm 0,06$	$-76,14 \pm 8,14$	5	0,01
100	$0,08 \pm 0,04$	$-90,44 \pm 5,26$	5	0,001

Bedeutung der Abkürzungen un der Tabelle:

- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

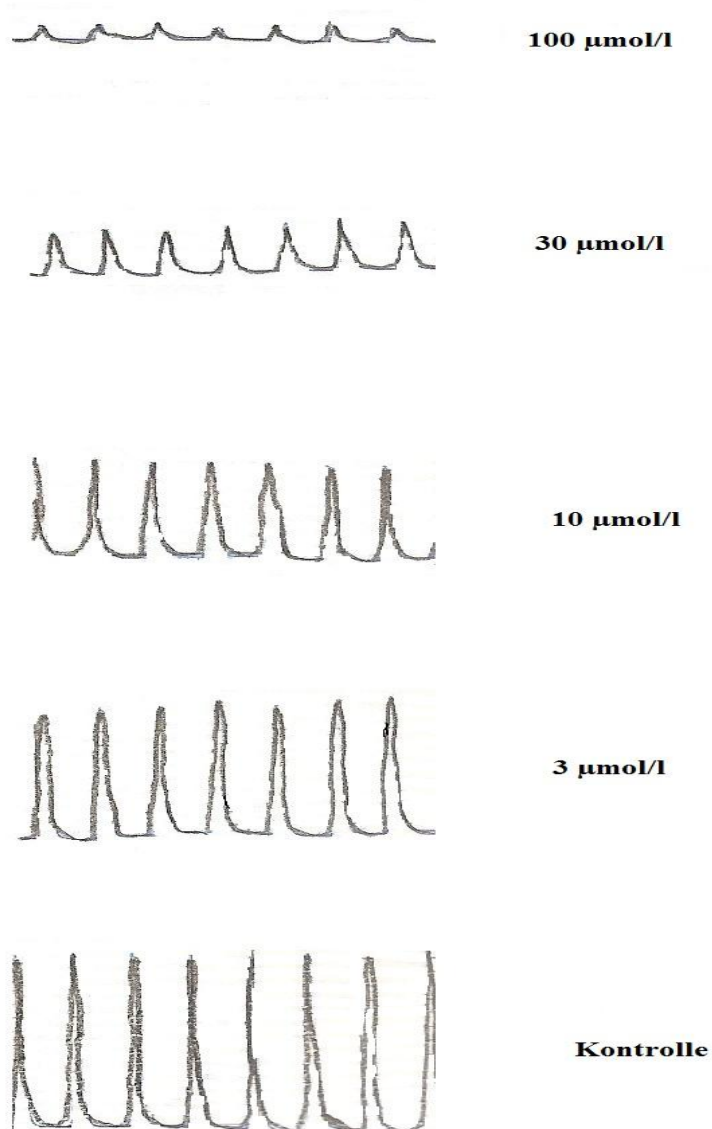
Abbildung 26: Kontraktions-Wirkungskurve von MAH 29 HCl am Musculus papillaris



Die verwendete Konzentrationen werden an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent an der y-Achse angegeben. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar.

Im Gegensatz zu dem rechten Vorhof haben wir am Papillarmuskel einen starken negativ inotropen Effekt, wobei die Testsubstanz einen EC_{50} -Wert schon bei $7 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl am Musculus papillaris



Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung des Versuchsverlaufs am Papillarmuskel.

3.2. Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Testsubstanz MAH 29 HCl die stärkste Wirkung am terminalen Ileum ($EC_{50} = 8,8 \mu\text{mol/l}$) erzielt wurde. Deshalb wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum untersucht.

Isolierung und die Präparation des Darms, dessen Einspannung an der Apparatur B sowie der Versuchsablauf wurden schon im Kapiteln 2.6., 2.7.1.6., 2.8.2. und 2.9. beschrieben.

Die Untersuchung des Wirkmechanismus erfolgte mit Glibenclamid (Kapitel 2.2.) in zwei verschiedenen Konzentrationen, um die ATP-abhängige Kaliumkanäle zu blockieren. Nach 45 Minuten wurde MAH 29 HCl hinzugefügt und die Wirkung beobachtet.

3.2.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid

Der mögliche Wirkmechanismus, wie schon im Kapitel 3.2. beschrieben, wurde als erstes mit 30 µmol/l Glibenclamid, das in DMSO gelöst wurde, untersucht. Dafür wurden drei Darmpräparate verwendet und die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben:

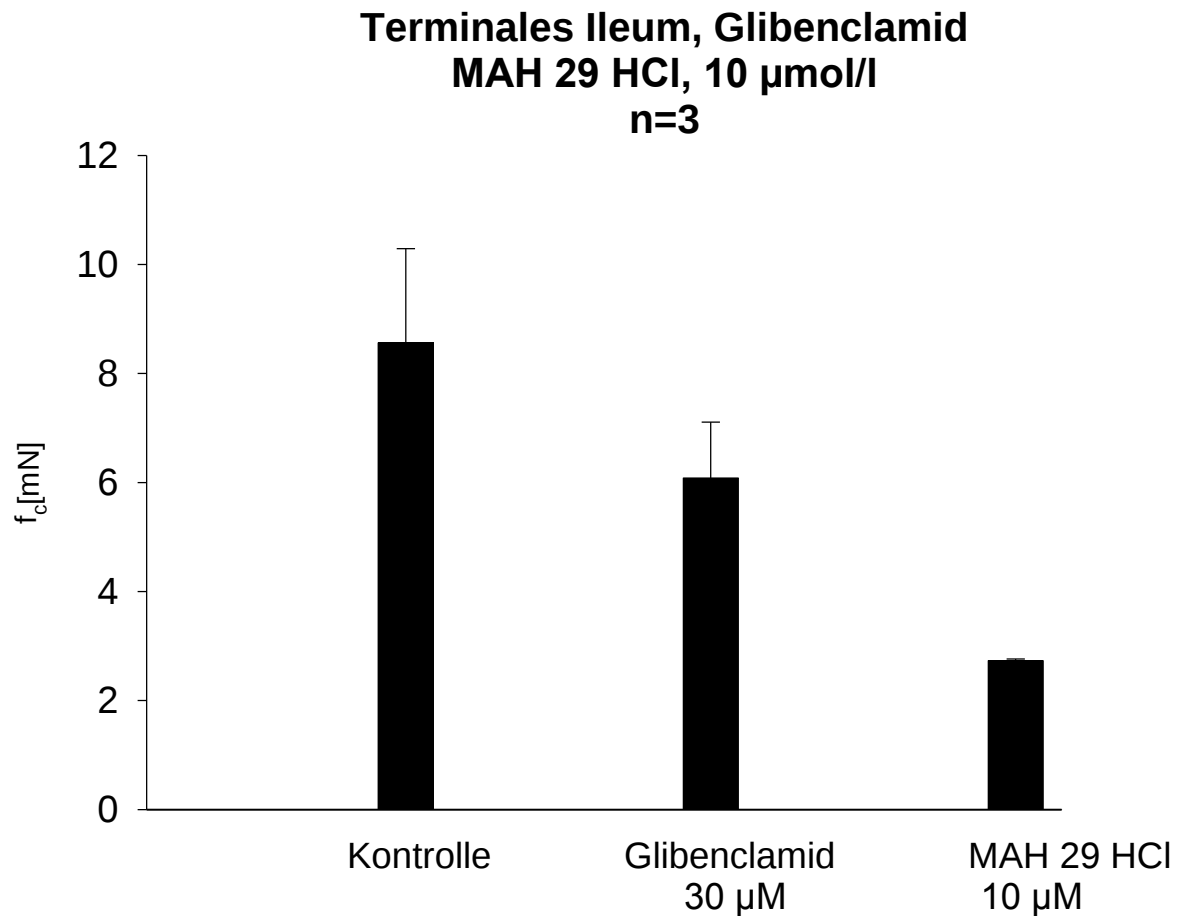
Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl mit 30 µmol/l Glibenclamid am terminalen Ileum

Glibenclamid	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	$8,56 \pm 1,73$	3	-
30 µmol/l	$6,08 \pm 1,03$	3	-
10 µmol/l MAH 29 HCl	$1,73 \pm 0,03$	3	0,05

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

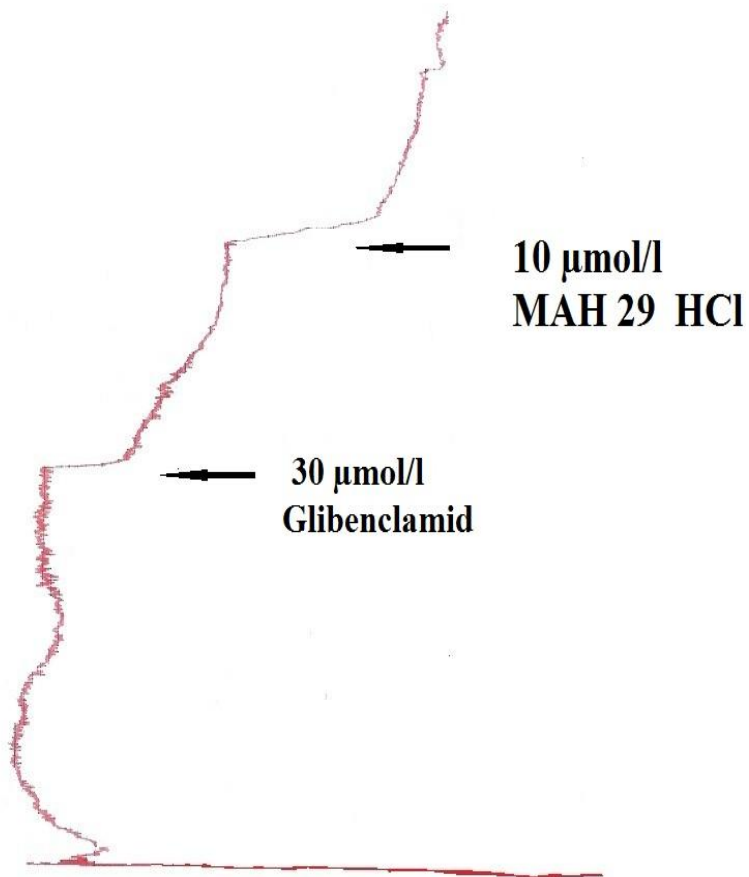
- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 28: Balkendiagramm von MAH 29 HCl am terminalen Ileum mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die verwendete Konzentrationen werden in $\mu\text{mol/l}$ an der x-Achse und die Kontraktionskraft in mN an der y-Achse angegeben. Die senkrechte Balken stellen den Mittelwert dar, und die Standardfehler werden durch strichförmigen Verlängerungen gekennzeichnet.

Abbildung 29: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl-Wirkung am terminalen Ileum unter Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die Abbildung zeigt die originale Aufzeichnung des Versuchsverlaufs an dem terminalen Ileum unter Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und nachfolgende Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH 29 HCl.

3.2.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid

Im Sinne der Wirkmechanismus-Untersuchung wurden neben dem Versuch mit 30 µmol/l Glibenclamid am terminalen Ileum auch nachfolgende Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid wieder am terminalen Ileum durchgeführt.

In der Tabelle 10 sind die gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst.

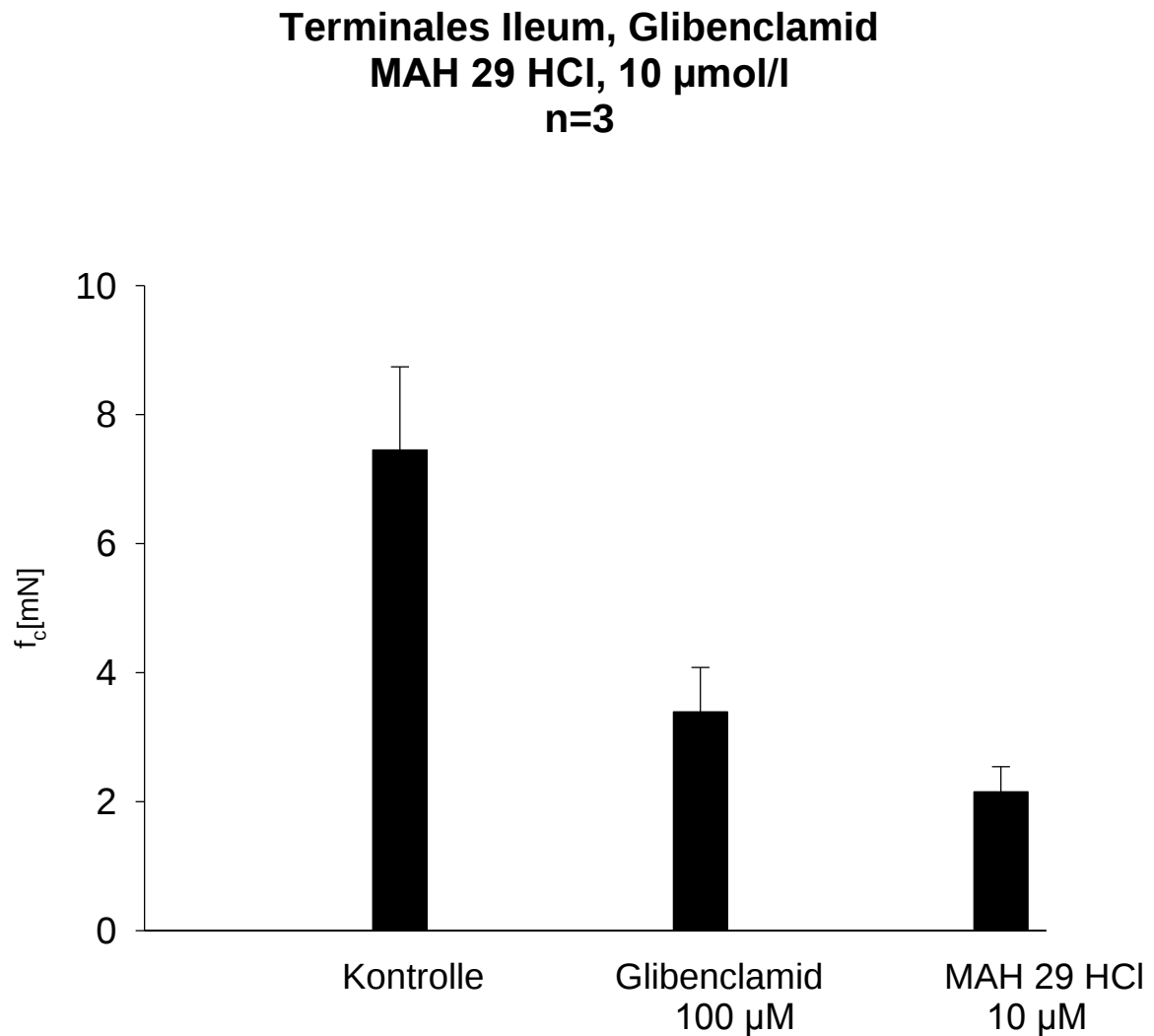
Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche von MAH 29 HCl mit 100 µmol/l Glibenclamid am terminalen Ileum

Glibenclamid	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	$7,45 \pm 1,29$	3	-
100 µmol/l	$3,39 \pm 0,69$	3	-
10 µmol/l MAH 29 HCl	$2,15 \pm 0,39$	3	n.s.

Bedeutung der Abkürzungen in der Tabelle:

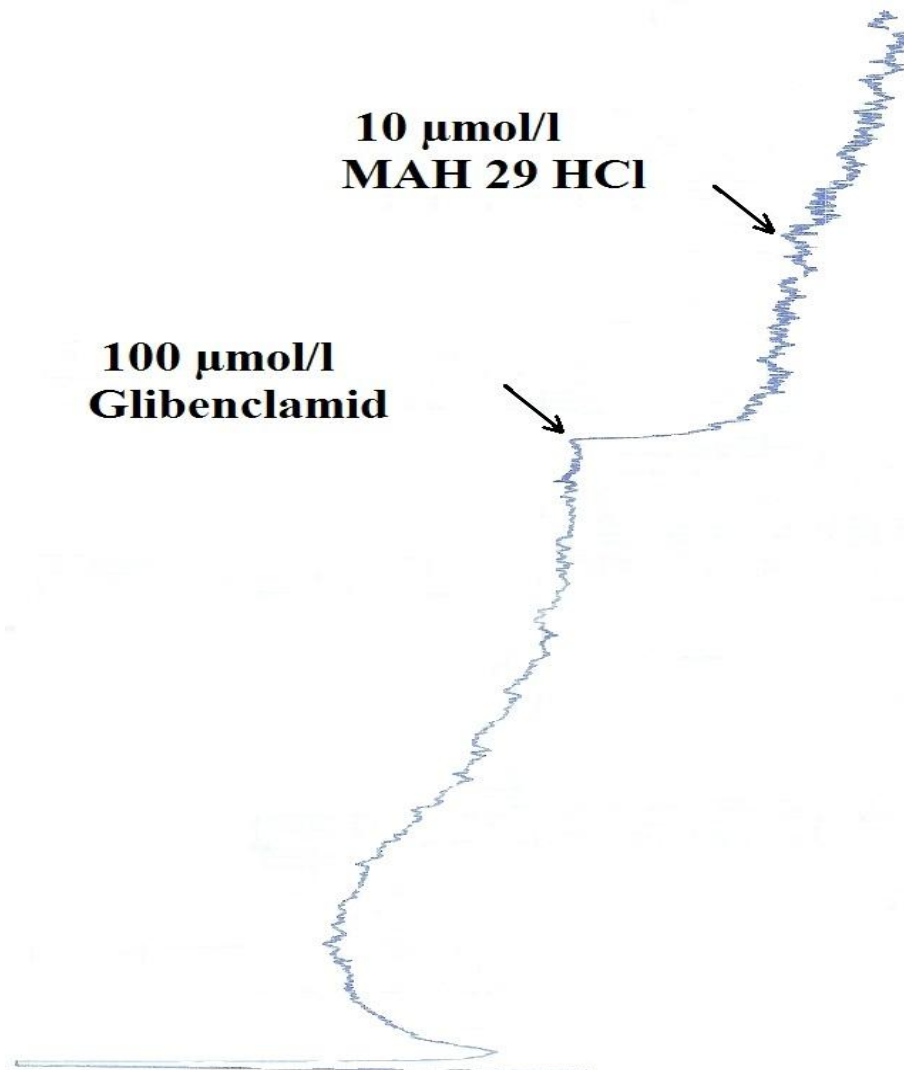
- f_c = Kontraktionskraft
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 30: Balkendiagramm von MAH 29 HCl am terminalen Ileum mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die verwendeten Konzentrationen werden in $\mu\text{mol/l}$ an der x-Achse und die Konzentrationskraft in mN an der y-Achse eingetragen. Die senkrechte Balken stellen den Mittelwert dar, und die Standardfehler ist durch strichförmige Verlängerungen gekennzeichnet.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung von MAH 29 HCl-Wirkung am terminalen Ileum unter Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die Abbildung zeigt die originale Aufzeichnung des Versuchsverlaufs am terminalen Ileum unter Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid mit nachfolgende Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH 29 HCl und in einem Abstand von 45 Minuten.

4. Diskussion

4.1. Allgemein

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde die Wirkung sowie der mögliche Wirkmechanismus der Testsubstanz an fünf isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht. Die verwendeten Organen waren: Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum, Musculus papillaris und Atrium cordis dexter; und die Substanz MAH 29, die am Department für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert wurde.

Die oben genannten Organe, an denen die Versuche durchgeführt wurden, besitzen eine glatte Muskulatur mit Ausnahme von Vorhof und Papillarmuskel, welche eine quergestreifte Muskulatur besitzen.

In den vorangegangenen Kapiteln wurden schon die Versuche, deren Ablauf sowie die Ergebnisse detailliert beschrieben, und auf den kommenden Seiten werden die Ergebnisse der Versuchsserie näher erläutert.

4.2. Wirkung der Testsubstanz MAH 29 HCl an der glatten Muskulatur

Zu den glattemuskulären Organen, die verwendet wurden, gehören Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum. Damit man die Versuche an den glattemuskulären Organen überhaupt durchführen konnte, musste man diese vorher chemisch mit einer KCl-Lösung (Kapitel 2.6.) maximal vorkontrahieren. Diese erfolgte mit einer 60 mmolaren KCl-Lösung bei den Versuchen am terminalen Ileum, wobei die Aorta und die Arteria pulmonalis mit einer 90 mmolaren KCl-Lösung vorkontrahiert wurden.

Sobald die Organe die Plateauphase erreicht hatten, wurde die Testsubstanz hinzugefügt um die mögliche Dilatation (Blutgefäße) bzw. Spasmolyse (Darmmuskulatur) zu untersuchen.

Die folgende Tabelle stellt der Wirkung von Testsubstanz an der glatten Muskulatur dar:

Tabelle 11: Wirkungen von MAH 29 HCl im Bereich der glatten Muskulatur

Organpräparat	MAH 29 HCl $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei Endkonzentration	EC₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	-69,18 $\pm$ 10,50	48
Arteria pulmonalis	-74,73 $\pm$ 5,01	37,5
Darm	-97,76 $\pm$ 2,24	8,80

Wie man schon in der Tabelle 11 sehen könnte, verursachte die Testsubstanz eine starke Wirkung auf die glatte Muskulatur, und es konnte in allen drei Fällen ein EC₅₀-Wert ermittelt werden, wobei der Effekt am terminalen Ileum am stärksten ausgeprägt wurde.

Wie schon erwähnt, wurde der stärkste Effekt am terminalen Ileum festgestellt. Der Kontrollwert vor der Substanzgabe betrug 10,63 $\pm$ 1,89 mN, was eigentlich 100% entspricht. Durch die Zunahme der Substanzkonzentration nimmt die Kontraktionskraft stetig ab, wobei der Endwert bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ 0,32 $\pm$ 0,32 mN bzw. -97,76 $\pm$ 2,24 % betrug. Die EC₅₀ wurde schon bei 8,80 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Eine etwas schwächere Wirkung im Vergleich zu dem terminalen Ileum wurde bei der Arteria pulmonalis ermittelt. Der Kontrollwert betrug 12,45 $\pm$ 1,25 mN, der nach der Gabe der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ bis zum 3,28 $\pm$ 0,91 mN bzw. -74,73 $\pm$ 5,01 % abfiel. EC₅₀ wurde auch erreicht und betrug 37,5 $\mu\text{mol/l}$.

Noch schwächere Wirkung wurde an der Aorta festgestellt. Eine Abnahme der Kontraktionskraft wurde vom Kontrollwert 8,63 $\pm$ 1,82 mN bzw. 100% bis zur Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ festgestellt und betrug 2,82 $\pm$ 1,34 mN bzw. -69,18 $\pm$ 10,50 %. Ein EC₅₀-Wert von 48 $\mu\text{mol/l}$ wurde erreicht.

4.3. Wirkung der Testsubstanz MAH 29 HCl an der quergestreiften Muskulatur

Als quergestreifte Organe wurden Papillarmuskeln und rechte Vorhöfe verwendet. Die Ergebnisse der Wirkung von Testsubstanz MAH 29 an der quergestreiften Muskulatur sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 12: Wirkungen von MAH 29 HCl an der quergestreiften Muskulatur

Organpräparat	MAH 29 HCl $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei Endkonzentration	EC₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Atrium cordis dexter	$-20,17 \pm 0,88$	> 100
Musculus papillaris	$-90,44 \pm 5,26$	7

Die Testsubstanz MAH 29 zeigte aber eine sehr schwache Wirkung am rechten Vorhof, wobei der EC₅₀-Wert überhaupt nicht erreicht wurde. Vom Kontrollwert $190,00 \pm 0,00$ mN bzw. 100% hat die gesamte Kontraktionskraft um $-20,17 \pm 0,88 \%$ bzw. $151,67 \pm 1,67$ mN abgenommen, wobei die Testsubstanz eine schwach negativ chronotrope Wirkung zeigte.

Am Papillarmuskel, der im physiologischen Nährmedium elektrisch gereizt wurde (Kapitel 2.8.1., 2.9.5.), hatte die Testsubstanz eine stark negativ inotrope Wirkung. Schon bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ nahm die Kontraktionskraft um $-27,86 \pm 1,69 \%$ ab, bei $100 \mu\text{mol/l}$ um $-90,44 \pm 5,26 \%$ bzw. $0,08 \pm 0,04$. Der EC₅₀-Wert wurde erreicht und betrug $7 \mu\text{mol/l}$.

4.4. Versuche mit MAH 29 und Glibenclamid

Wie schon in Kapitel 2.2. sowie 3.2. beschrieben wurde, wurde Glibenclamid zur Untersuchung des Wirkmechanismus verwendet.

Aufgrund der Ergebnisse wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum und zwar mit zwei verschiedenen Glibenclamid-Konzentrationen durchgeführt.

Man geht davon aus, dass die Testsubstanz MAH 29 die ATP-abhängige Kaliumkanäle öffnen soll, und deshalb wurde der Kaliumkanalblocker (Glibenclamid) vor der Substanzgabe hinzugefügt um zu feststellen, ob es zu einer signifikanten Spasmolyse kommt.

Eine Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verursachte eine schwache Veränderung der Kontraktionskraft des Darmes (von $8,56 \pm 1,73 \text{ mN}$ auf $6,08 \pm 1,03 \text{ mN}$), wobei eine deutliche Spasmolyse des Darmes durch Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH 29 erkennbar wurde (Kontraktionskraft wurde bis $1,73 \pm 0,03 \text{ mN}$ abgenommen).

Demgegenüber eine Konzentration des Antagonisten von 100 $\mu\text{mol/l}$ verursachte eine stärkere Veränderung der Kontraktionskraft (von $7,45 \pm 1,29 \text{ mN}$ auf $3,39 \pm 0,69 \text{ mN}$), die dann durch Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ MAH 29 nur auf $2,15 \pm 0,39 \text{ mN}$ abgefallen wurde.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die spasmolytische Wirkung zumindest teilweise durch eine Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zustande kommen könnte.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die neu synthetisierte Testsubstanz MAH 29 pharmakologisch untersucht, wobei fünf isolierte Organe von Meerschweinchen verwendet wurden: die Aorta, die Pulmonalarterie, der Papillarmuskel, der rechte Vorhof und das terminale Ileum.

Die Testsubstanz MAH 29 wurde, in 4 verschiedenen Konzentrationen getestet und zwar in 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$; wobei pro Organ mindestens 4 Versuche gemacht wurden.

Dabei wurden die Änderungen der Kontraktionskraft an der Aorta, der Pulmonalarterie und dem terminalen Ileum beobachtet. Eine mögliche positiv oder negativ inotrope Wirkung von MAH 29 wurde am Papillarmuskel untersucht und beim Vorhof konnte man die Chronotropie beobachten.

Auf die glattmuskulären Organe (Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum) verursachte die Testsubstanz eine starke Wirkung (Vasodilatation bzw. Spasmolyse), wobei der EC_{50} -Wert bei allen drei Organen erreicht wurde (Aorta = 48 $\mu\text{mol/l}$, Arteria pulmonalis = 37,5 $\mu\text{mol/l}$ und terminales Ileum = 8,80 $\mu\text{mol/l}$)

Am rechten Vorhof zeigte die Testsubstanz MAH 29 eine sehr schwache Wirkung. Ein EC_{50} -Wert wurde aber nicht erreicht.

Im Gegensatz zum rechten Vorhof zeigte die Testsubstanz MAH 29 am Papillarmuskel eine stark negativ inotrope Wirkung. Der EC_{50} -Wert von 7 $\mu\text{mol/l}$ wurde erreicht.

Letztendlich wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum und zwar mit zwei verschiedenen Glibenclamid-Konzentrationen beobachtet. Damit blockierte man die ATP-abhängigen Kaliumkanäle was zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen führt und zur Konstriktion. Somit könnte man die Wirkung von Testsubstanz MAH 29 durch die Öffnung von ATP-sensitive Kaliumkanäle erklären.

6. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer, 10.Auflage, 451, 472 - 474, 616 - 617, 624 - 626, 1031

Ashcroft FM (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. J Clin Invest 115: 2047 - 2058

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R (2004) Hydrogen sulfide - induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 287, H2316 - H2323

Clement JP IV, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Anguilar - Bryan L, Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. Neuron 18: 827 - 838

Gasser R, Gasser S, Hammerl R, Hecking C (Journal fur Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology 2003; 10 (Supplementum C) 3 - 5)

Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, Terzic A (2005) Cardiac K_{ATP} channels in health and disease. J Mol Cell Cardiol 38: 937 - 943

Moore PK, Bhatia M, Mochhala S (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future?, Trends Pharmacol. Sci: 24, 609 - 611

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer - Korting M (2001), Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie 8. Auflage Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 143, 352 - 357, 415, 524, 582, 770 - 771

Nelson DL, Cox MM, (2009) Lehninger Biochemie 4. Auflage, Springer Verlag Berlin - Heidelberg: 1217 - 1218

Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscles, Am J Physiol 268: C 799 - C 822

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K channels. Prog Biophys Mol Biol 81: 133 - 176

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

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Emina Polimac
Geburtstag:	08. September 1983
Geburtsort:	Priboj
Staatsangehörigkeit:	serbisch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

2006 - 2012	Universität Wien - Österreich, Pharmazie
2005 - 2006	Österreichische Orient-Gesellschaft, Deutschkurs
2002 - 2005	Medizinische Universität Sarajevo - BiH, Pharmazie
1998 - 2002	Matematisches Gymnasium Priboj, Serbien
1990 - 1998	Volksschule Priboj, Serbien

Berufliche Erfahrung

November 2011 - laufend	Marien - Apotheke, Wien 1060
-------------------------	------------------------------