



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten
Diarylimidazols (PGU 177) auf isolierte
Meerschweinchenorgane“

Verfasserin

Alma Sejdinović

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im Mai 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meinen Eltern, Nevresa und Muhamed Sejdinović, bedanken, die mich während des gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt haben. Auch in schwierigsten Zeiten haben sie mir die Kraft gegeben weiter zu machen. Ohne sie wäre dieser Weg noch schwieriger gewesen. Sie haben mir das Studium in Wien ermöglicht und ich bin ihnen sehr dankbar dafür.

Mama i tata, hvala vam za svu vasu podrsku!

Mein besonderer Dank gilt den Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für die exzellente Betreuung während meiner Diplomarbeit. Stets stand er mir mit seiner freundlichen und verständnisvollen Art zur Seite um mir ein bestmögliches Gelingen zu ermöglichen.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe um Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker aus dem Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung meiner Testsubstanz.

Die endlosen Stunden in der AKH-Bibliothek wären unerträglich gewesen, ohne meine tollen Kolleginnen und guten Freundinnen Milada Avdić und Özlem Cetinkaya. Ich bin froh, dass ihr immer für mich da ward. Ich bedanke mich herzlich für eure Unterstützung und hoffe, dass diese Freundschaft lebenslang dauert.

Mein größter Dank geht an meine Freundin Sandra Jakovljević für das geduldige Zuhören von unzähligen Pharmazie-Themen, obwohl sie nichts mit Pharmazie zu tun hat!

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das menschliche Herz	1
1.1.1	Lage, Form, Größe	1
1.1.2	Gliederung des Herzens	1
1.1.3	Erregungsprozesse im Herzen	2
1.2	Physiologie der glatten Muskulatur	4
1.3	Hypertonie und Antihypertonika	6
1.4	Schwefelwasserstoff (H₂S).....	10
2	ZIELSETZUNG	12
3	MATERIAL UND METHODIK	13
3.1	Verwendete Substanzen	13
3.1.1	Testsubstanz PGU 177	13
3.1.2	Verwendete Antagonisten	14
3.1.2.1	NO-L-Arginin.....	14
3.1.2.2	Glibenclamid	15
3.2	Verwendete Lösungen.....	16
3.2.1	Physiologische Elektrolytlösung	16
3.2.2	Kaliumchloridlösungen	17
3.2.3	Das Lösungsmittel für die Testsubstanz PGU 177	18
3.3	Versuchstiere	18
3.4	Entnahme und Präparation der Organe	19
3.4.1	Organentnahme	19
3.4.2	Präparation der Organe	20
3.4.2.1	Rechter Vorhof (Atrium dexter)	20
3.4.2.2	Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	20
3.4.2.3	Papillarmuskel (Musculus papillaris)	21
3.4.2.4	Darm (Terminales Ileum)	21
3.4.2.5	Aorta (Aorta descendens)	22
3.5	Versuchsanordnung und Apparaturen	23
3.5.1	Apparatur I	23
3.5.2	Apparatur II	26
3.5.3	Kraftwandler, Verstärker, Schreiber	27
3.5.4	Die Gasversorgung.....	28
3.5.5	Das Wasserbad.....	28

3.6	Versuchsabläufe.....	29
3.6.1	Rechter Vorhof (Atrium dexter).....	29
3.6.2	Lungenarterie (Arteria pulmonalis).....	30
3.6.3	Papillarmuskel (Musculus papillaris).....	30
3.6.4	Darm (Terminales Ileum).....	31
3.6.5	Aorta (Aorta descendens).....	31
3.6.6	Untersuchung des Wirkmechanismus von Testsubstanz PGU 177 in Kombination mit Antagonisten am terminalen Ileum.....	32
3.7	Auswertung.....	33
3.7.1	Rechter Vorhof.....	33
3.7.2	Papillarmuskel.....	33
3.7.3	Glatte Muskulatur (Lungenarterie, Darm, Aorta).....	33
3.8	Statistik	34
4	ERGEBNISSE.....	35
4.1	Wirkung von PGU 177 auf den rechten Vorhof	35
4.2	Wirkung von PGU 177 auf die Lungenarterie	38
4.3	Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel	41
4.4	Wirkung von PGU 177 auf den Darm	44
4.5	Wirkung von PGU 177 auf die Aorta	47
4.6	Untersuchung des Wirkmechanismus von Testsubstanz PGU 177 auf den Darm	50
4.6.1	Wirkung von PGU 177 in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm	50
4.6.2	Wirkung von PGU 177 in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm	53
5	DISKUSSION.....	56
6	ZUSAMMENFASSUNG	60
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	CURRICULUM VITAE	65

1 EINLEITUNG

1.1 Das menschliche Herz

1.1.1 Lage, Form, Größe

Das Herz liegt im vorderen unteren Teil des Mittelfellraums. Es ist beiderseits von den äußeren Pleurablättern der Lungenflügel begrenzt. Die untere Begrenzung ist das Zwerchfell, dem das Herz teilweise aufliegt, deswegen ändert es seine Lage mit den Bewegungen des Atmungsapparats. Es hat die Form eines Kegels, dessen Basis oben liegt und dessen Spitze schräg nach unten zeigt. Die Herzgröße entspricht ungefähr der Größe der geballten Faust des betreffenden Menschen und hat ein Gewicht von ca. 320 g bei einem erwachsenen Mann bzw. ca. 280 g bei einer erwachsenen Frau (Mutschler et al. 2001).

1.1.2 Gliederung des Herzens

Das Herz besteht aus zwei Teilen, das rechte und das linke Herz. Beide Teile bestehen aus jeweils zwei von unterschiedlich starken Muskelmassen umgeschlossenen Hohlräumen, einem kleineren Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel). Im oberen Abschnitt der beiden Herzteile sind jeweils der linke und der rechte Vorhof lokalisiert, die voneinander durch eine Scheidewand (Septum interatriale) getrennt werden. Die äußere Furche (Sulcus coronarius) trennt die Vorhöfe von den Kammern. Sie wird auf der Vorderseite durch den Ursprung von Aorta und Lungenarterie unterbrochen. In dieser Ebene befinden sich Atrioventrikularklappen, die als Ventile des Herzens fungieren und das Zurückfließen des Blutes in die Vorhöfe aus den Kammern verhindern. Im rechten Herzen sind es drei und im linken Herzen zwei Ventilkappen, die auch als Segelklappen bezeichnet werden. Die Klappen öffnen sich passiv durch Druckunterschiede zwischen Vorhof und Kammer. Bei der Druckentwicklung in der Kammer besteht die Gefahr des Durchschlagens der Klappen in den Vorhof. Die Innenwände der Kammer sind ausgekleidet mit den kegelförmigen Muskelvorsprüngen, sogenannten Papillarmuskeln, die über Sehnenfäden (Chordae tendineae) mit den Segelzipfeln verbunden sind. Durch Kontraktion der Papillarmuskeln werden die Sehnenfäden angespannt und dadurch das Durchschlagen der Klappen verhindert. Die Kammern sind voneinander durch die Kammerscheidewand (Septum interventriculare) getrennt, die von außen an je einer vorderen und hinteren Längsfurche (Sulcus interventricularis) erkennbar ist (Mutschler et al. 2001).

Sauerstoffarmes Blut wird über den großen Hohlvenen (V. cava) in den rechten Vorhof transportiert, von dort gelangt es in die rechte Kammer und wird dann über die Lungenarterie (Truncus pulmonalis) in die Lunge transportiert, wo der Gasaustausch stattfindet. Das sauerstoffreiche Blut wird aus der Lunge über vier Lungenvenen (Vv. pulmonales) in den linken Vorhof und dann weiter in die linke Kammer transportiert. Aus der linken Kammer wird das Blut in die Aorta und somit in den systemischen Kreislauf ausgeworfen. Die Blutströmung wird durch die rhythmische Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) der Herzmuskulatur bewirkt (Mutschler et al. 2001).

1.1.3 Erregungsprozesse im Herzen

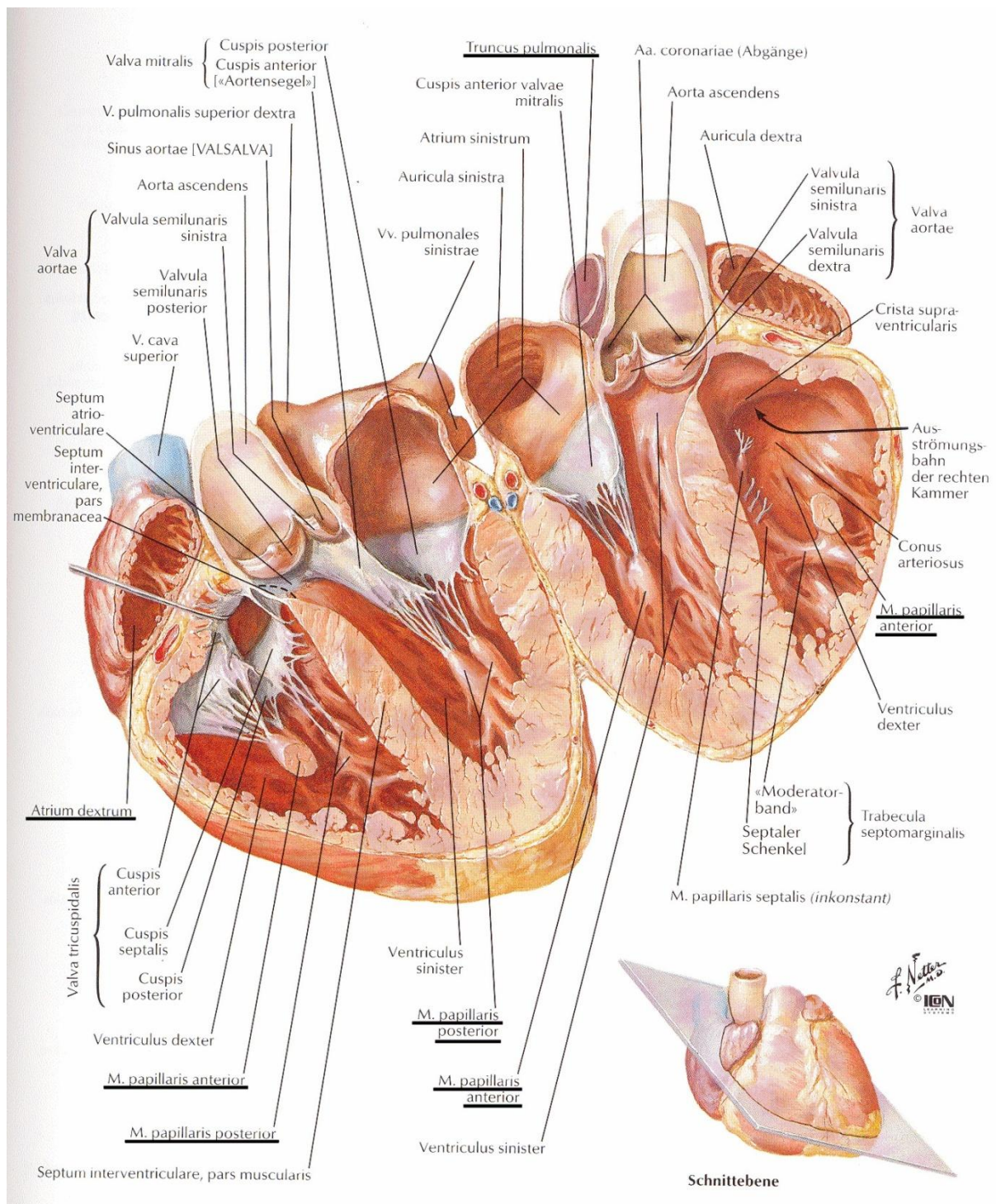
Das Herz fungiert als eine Art Pumpe, die die Blutzirkulation im Körper aufrecht erhält. Diese Aufgabe erfüllt das Herz durch die rhythmische Kontraktion und Erschlaffung der Vorhöfe und der Kammer. Die Kontraktionsphase wird als Systole und die Erschlaffungsphase als Diastole bezeichnet. Die Kontraktionen werden durch Erregungsausbreitung über die Herzmuskulatur gesteuert. Die Herzmuskelfasern können durch Aktionspotentiale gereizt werden, aber es gibt bestimmte Anteile der Herzmuskulatur, die spontan Erregungen bilden können. Im rechten Vorhof befinden sich Zellen, die befähigt sind, in bestimmten Zeitabständen spontan Erregungen zu bilden. Diese Erregung breitet sich dann über das Arbeitsmyocard beider Vorhöfe aus und greift dann auf den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) über. Vom AV-Knoten aus erreicht die Erregung das His-Bündel, das als einzige erregungsleitende Verbindung zwischen Atrium und Ventrikel fungiert. Der His-Bündel teilt sich in den linken und den rechten Kammerschenkel, die beiderseits zur Basis der Papillarmuskel ziehen. Der letzte Teil des Erregungsleitungssystems sind die Purkinje-Fasern. Die schnelle Erregungsausbreitung wird über gap junctions (Nexus) gewährleistet (Mutschler et al. 2001).

Die Myokardfasern haben ein Ruhepotential von ca. -90 mV. Durch eine lokale Reizung kommt es zur Veränderung des Membranpotentials. Falls die Schwelle von ca. -75 mV erreicht wird, öffnen sich die schnellen Na^+ -Kanäle und es kommt zu einem schnellen Na^+ Einstrom. Diese Kanäle werden schnell inaktiviert, was zu einer Teilrepolarisation führt. Bei einem Membranpotential von ca. -40 mV werden die langsamen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ geöffnet, wodurch Ca^{2+} Einstrom induziert wird. Darauf ist die charakteristische Plateauphase zurückzuführen. Sobald die Ca^{2+} Leitfähigkeit abgenommen hat, wird die Repolarisationsphase durch den vermehrten K^+ -Ausstrom eingeleitet und das

Membranpotential wird negativer bis zur vollständigen Repolarisation (Mutschler et al. 2001).

Die Kontraktion der Muskelfasern, auch als elektromechanische Kopplung bezeichnet, wird durch den Erregungsprozess ausgelöst. Der Regulator dieser Prozesse sind die Ca^{2+} -Ionen. Das Aktionspotential gelangt über das transversale Tubuli (T-System) in das Zellinnere. Transversale Tubuli steht im engen Kontakt mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (longitudinales System, L-System), in dem Ca^{2+} -Ionen gespeichert sind. Während der Plateauphase des Aktionspotentials kommt es zur Öffnung der langsamen, spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in der Membran des T-Systems und zu langsamem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Dadurch wird das sog. Ryanodin-Rezeptor stimuliert und es kommt zur Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums und zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt zur Kontraktion der Muskelfasern. Der Kontraktionsvorgang wird durch das Entleeren von Ca^{2+} -Speichern beendet. Veränderungen der Ionenkonzentration im Blutplasma und damit auch im Extrazellularraum können die Erregbarkeit der Schrittmacherzellen und die Kontraktilität des Herzens steigern oder mindern (Mutschler et al. 2001).

Abbildung 1: Querschnitt des menschlichen Herzens (Netter FH 2003)



1.2 Physiologie der glatten Muskulatur

Glatte Muskulatur befindet sich in inneren Organen (Magen-Darm-Trakt, Uterus, Gallenblase, Harnröhre), in Blutgefäßen, in der behaarten Haut und im Auge. Die Hauptaufgabe der glatten Muskulatur ist die Aufrechterhaltung einer Daueranspannung und langsame Spannungsänderungen, z.B. Aufrechterhaltung der Peristaltik im

Magen-Darm-Trakt. Die Kontraktion und Erschlaffung der glatten Muskulatur wird durch Sympathikus und Parasympathikus reguliert über die Freisetzung von Neurotransmittern Noradrenalin (Sympathikus) und Acetylcholin (Parasympathikus) aus den präsynaptischen Nervenenden des vegetativen Nervensystems bzw. des Darmnervensystems (Mutschler et al. 2001).

Die Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur wird durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Gang gesetzt. Im Gegensatz zu Quergestreifter- und Herzmuskulatur befindet sich im Zellinneren kein T-System. Die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (sarkoplasmatisches Retikulum) sind schwächer ausgebildet und für die Auslösung der Kontraktion ist die Bereitstellung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum besonders wichtig. Die möglichen Mechanismen für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind:

- a) elektromechanische Kopplung
- b) pharmakomechanische Kopplung
- c) mechanische Dehnung

Das Ruhemembranpotential der glatten Muskelzellen liegt bei ca. -70 mV . Der Ablauf der Aktionspotentiale ist spezifisch für den Zelltyp und das Organ. Durch die länger andauernden Depolarisationen oder durch Aktionspotentiale werden die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle von L-Typ geöffnet und es kommt zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum in das Zytoplasma (Mutschler et al. 2001).

Langsame, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ werden geöffnet, wenn das Membranpotential positiver als -40 mV ist. Sie kommen in der Zellmembran von Muskelzellen, in glatten Gefäßzellen, Herzmuskel sowie im Sinusknoten und AV-Knoten vor (Forth et al. 2009).

Durch die pharmakomechanische Kopplung kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ohne signifikante Änderung des Ruhemembranpotentials. Es kommt zur Aktivierung der rezeptorgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran oder zur Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum unter Beteiligung von Inositoltriphosphat (IP_3) als Signalmolekül. Als Mediatoren für die pharmakomechanische Kopplung dienen: Neurotransmitter (Noradrenalin, Acetylcholin), Hormone (Angiotensin II,

ADH, Adrenalin), lokale Mediatoren (Histamin, Serotonin, Bradykinin, Endothelin, NO) oder Arzneistoffe (Mutschler et al. 2001) (z.B. K^+ -Kanalöffner (Minoxidil) → Relaxation).

Durch Dehnung der glatten Muskulatur werden die Zellen stärker depolarisiert, wodurch die Aktionspotentiale frequentiert werden und somit wird auch die Kontraktionskraft erhöht (Mutschler et al. 2001).

Die Relaxation der glatten Muskulatur kommt zu Stande durch Erniedrigung der intrazellularen Ca^{2+} -Konzentration, indem Ca^{2+} -Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum über eine sarkoplasmatische ATPase wiederaufgenommen oder durch eine Membranständige ATPase in den Extrazellularraum transportiert werden. Die beiden ATPasen werden durch die Signalmoleküle $cAMP^1$ und $cGMP^2$ aktiviert. Durch die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren (→ Aktivierung der Adenylatcyclase) oder von Adenosinrezeptoren wird die $cAMP$ -Konzentration erhöht. Die $cGMP$ -Konzentration steigt bei der Aktivierung von Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid (NO). Ca^{2+} -Ionen können auch durch einen $3Na^+/Ca^{2+}$ Austauscher aus dem Zytoplasma entfernt werden (Mutschler et al. 2001).

1.3 Hypertonie und Antihypertonika

Bluthochdruck oder Hypertonie wird definiert als jede die Norm überschreitende, anhaltende Steigerung des arteriellen Blutdrucks. In der Tabelle 1 ist die Klassifikation von Blutdruckbereichen (in mm Hg) nach Empfehlung der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks angegeben (Mutschler et al. 2001).

Tabelle 1: Klassifikation von Blutdruckbereichen

Klassifikation	Systolisch (mm Hg)	Diastolisch (mm Hg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Hoch-Normal	130 – 139	85 – 89
Milde Hypertonie	140 – 159	90 – 99
Mittelschwere Hypertonie	160 – 179	100 – 109
Schwere Hypertonie	> 180	> 140

¹ $cAMP$ – cyclisches Adenosinmonophosphat

² $cGMP$ – cyclisches Guanosinmonophosphat

Der erhöhte Blutdruck kann durch erhöhtes Herzzeitvolumen, durch erhöhten peripheren Widerstand oder durch Erhöhung beider Parameter bedingt sein. Bei andauernd erhöhtem Gefäßwiderstand kommt es zur vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor) und zur Veränderung der Gefäßwand, wodurch die physiologische Dehnbarkeit der Gefäße beeinträchtigt wird. Zusätzlich kommt es zur weiteren Widerstandserhöhung. Hypertonie ist oft die Ursache der Arteriosklerose, wodurch es zu einem Schlaganfall, zur Entwicklung von koronarer Herzkrankheit, Herz- und Niereninsuffizienz kommen kann (Mutschler et al. 2001).

Nach klinischen und organopathologischen Gesichtspunkten gibt es zwei Hypertonieformen:

- a) Primäre/essentielle/idiopathische Hypertonie, bei der die Ursache unbekannt ist. Das ist die häufigste Hypertonieform (ca. 90%)
- b) Sekundäre Hypertonie, deren Ursache eine andere Erkrankung ist, z.B. Nierenstenose, chronische Glomerulonephritis, Aortensklerose, Tumore usw.

Mehrere Ursachen der essentiellen Hypertonie werden diskutiert, z.B. familiäre Belastung, Bewegungsarmut, Überernährung, häufige Stress-Situationen. Ein erhöhtes Sympathikustonus auf einer Seite und eine verminderte Bildung körpereigener vasodilatierender Substanzen (NO, Bradykinin, Prostaglandin E₂) auf der anderen Seite können zur Hypertonie führen (Mutschler et al. 2001).

Da die Ursache nicht bekannt ist, ist eine kausale Behandlung nicht möglich, sondern nur eine symptomatische medikamentöse Therapie. In mehreren placebokontrollierten Studien wurde nachgewiesen, dass die Lebenserwartung der Hypertoniker durch medikamentöse Behandlung erhöht werden kann, wobei das Sterblichkeits-Risiko durchschnittlich um 12 – 15 % reduziert werden konnte (Collins et al. 1994, Gueyffier et al. 1997).

Nicht-pharmakologische Maßnahmen zur Blutdrucksenkung:

- Einstellen des Rauchens
- Senkung des Alkoholkonsums auf < 30 g/Tag
- Einschränkung der Kochsalzzufuhr
- verstärkte körperliche Betätigung und Abbau von Stressfaktoren
- Gewichtsreduktion bei Übergewichtigen

Antihypertensiv wirkende Pharmaka

Zielblutdruck ist 140/90 mm Hg, falls keine zusätzliche Leiden, wie z.B. Herzinsuffizienz oder Diabetes, vorhanden sind. Die Medikamentendosis sollte möglichst niedrig sein, um die Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden und die Auswahl der Therapie sollte der Gesamtsituation des Patienten angepasst werden (Mutschler et al. 2001).

Mittel der ersten Wahl in der Therapie von Bluthochdruck sind:

Diuretika, besonders geeignet sind die Thiazid-Diuretika (z.B. Hydrochlorthiazid) und Analoga wegen ihrer längeren Wirkdauer. Sie können aber zur Verminderung der Glucosetoleranz bei Diabetikern führen und sollten deswegen besonders vorsichtig bei dieser Patientengruppe eingesetzt werden. Wenn keine ausreichende Wirkung erzielt werden konnte, können auch Schleifendiuretika (z.B. Furasemid) eingesetzt werden (Forth et al. 2009).

ACE-Hemmer, z.B. Captopril, Enalapril, Lisinopril usw. greifen in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein. Sie hemmen das aktive Zentrum des Angiotensin-Conversions-Enzyms, sodass Angiotensin I in Angiotensin II nicht umgewandelt werden kann. Dadurch kommt es zur Verminderung der Vasokonstriktion und zur geringeren Stimulation der Aldosteronproduktion, was zu einer verminderten Flüssigkeitsretention und Blutdruckabfall führt (Forth et al. 2009).

AT₁-Rezeptorblocker (Angiotensin-Rezeptor-Blocker), z.B. Losartan, Candesartan, Telmisartan, usw. blockieren das Angiotensin II-Rezeptor, sodass die vasokonstriktorische Wirkung des Angiotensin-II nicht zu Stande kommt. Sie sind in der Wirkung mit ACE-Hemmern vergleichbar und sind eine gute Alternative bei der Unverträglichkeit von ACE-Hemmern (Forth et al. 2009).

β-Adrenozeptorblocker (Metoprolol, Bisoprolol, Atenolol) werden sehr oft zur Blutdrucksenkung eingesetzt. Sie sind besonders geeignet für Patienten mit erhöhtem Sympathikustonus.

Der Wirkmechanismus von β-Blockern ist noch nicht genau geklärt. Es sind mehrere Angriffspunkte bekannt:

- a) Erniedrigung des Herzzeitvolumens
- b) Verminderung der Reninfreisetzung durch die Blockade von β_1 -Rezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Dadurch wird die Bildung von Angiotensin II und die Aldosteronfreisetzung herabgesetzt (Mutschler et al. 2001).

Calciumkanalblocker (Calciumantagonisten) sind Substanzen, die die langsamen, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ blockieren, wodurch der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zellinnere verringert wird. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (freie Ca^{2+} -Ionen) ist bestimmend für die Kontraktilität der glatten Gefäßmuskelzellen, deshalb wirken Calciumkanalblocker vasodilatierend und über die Herabsetzung des peripheren Widerstandes blutdrucksenkend. Von der chemischen Sicht aus kann man Calciumantagonisten in drei Gruppen einteilen:

- a) 1,4-Dihydropyridine (Nifedipin-Typ: Nifedipin, Nitrendipin, Amlodipin, usw.)
- b) Diphenylamine (Verapamil-Typ: Verapamil, Galopamil)
- c) Dibenzothiazepine (Diltiazem-Typ: Diltiazem)

Alle drei Gruppen wirken vasodilatierend. Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ und Diltiazem wirken zusätzlich am Sinusknoten und senken die Herzfrequenz (Mutschler et al. 2001).

Andere Antihypertensiva (Mutschler et al. 2001):

Reservemittel werden nur in Kombination mit anderen blutdrucksenkenden Mitteln gegeben, wenn mit der primären Therapie die erwünschte Blutdrucksenkung nicht erzielt werden konnte, da sie ungünstige Nebenwirkungen hervorrufen können.

Selektive α_1 -Rezeptorblocker (Doxazosin, Prazosin) sind wegen starken orthostatischen Nebenwirkungen kein Mittel der Wahl in der Therapie von Bluthochdruck.

Antisymphotonika (α_2 -Sympathomimetika bzw. Imidazolinrezeptor-Agonisten, sowie Reserpin)

Dihydralazin und **Hydralazin** werden als Kombinationspartner der schweren Formen eingesetzt, aber deren Wirkmechanismus ist nicht vollständig geklärt.

Nitroprussidnatrium wirkt vasodilatierend durch die rasche Freisetzung von NO und wird nur zur Therapie hypertensiver Notfälle eingesetzt.

Kaliumkanalöffner (Minoxidil) erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit ATP-abhängiger K^+ -Kanäle. Durch K^+ -Ausströme aus der Zelle kommt es zur Zunahme des Membran-Ruhepotentials und dadurch zur verminderten Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird vermindert, was zur Relaxation der glatten Muskulatur, vor allem in Arteriolen, führt.

1.4 Schwefelwasserstoff (H_2S)

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit mit anderen endogenen Gasmolekülen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Wang et al. 1997 a,b), hat man angenommen, dass H_2S eventuell eine Rolle im kardiovaskulären System spielt.

Schwefelwasserstoff (Hydrosulfid, H_2S) ist ein stechendes, toxisches Gas, das nach verfaulten Eiern riecht (Winder and Winder, 1933). H_2S wird auch im Körper durch Abbau von schwefelhaltiger Aminosäure L-Cystein produziert. Die Biosynthese wird durch zwei Enzyme, Cystathion- γ -Lyase (CSE) und Cystathion- β -Synthase (CBS), katalysiert (Stipanuk and Beck 1982; Griffith 1987; Erickson et al. 1990; Swaroop et al. 1992; Hosoki et al. 1997). CSE ist in verschiedenen Gefäßen des vaskulären Systems, sowie in der Leber, der Niere und in geringeren Konzentrationen im Gehirn exprimiert. CBS kommt in höheren Konzentrationen im Gehirn vor, sowie in der Leber und in der Niere (Abe and Kimura 1996), aber nicht in den Blutgefäßen (Hosoki et al. 1997; Kimura 2000; Zhao et al. 2001).

Schwefelwasserstoff wurde in der Therapie bei mehreren Erkrankungen eingesetzt, z.B. bei einer akuten Pankreatitis (Bhatia et al. 2005a), beim Down-Syndrom (Kamoun 2001), bei Hypertonie (Yan et al. 2004) und bei einem septischen Schock (Li et al. 2005).

Es wurden mehrere Studien durchgeführt, um die Wirkung und den Wirkmechanismus von H_2S aufzuklären. Die relaxierende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Aorta von Ratten wurde bei in vitro Versuchen festgestellt (Hosoki et al. 1997). Zhao et al. (2001) demonstrierten, dass es zu einer Vasodilatation durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen kommt.

Die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle kommen in den B-Zellen des Pankreas, in glatten Muskelzellen, im Skelett, im Gehirn und in der Leber vor (Ashcroft F. 1998; Terzic et al. 1995; Seino and Miki 2003).

Das sind Heterooctamere bestehend aus zwei Untereinheiten, einer porenbildenden Untereinheit, Kir6.x (Kir6.1 oder Kir6.2) und einer regulierenden Untereinheit, Sulfonylharnstoffrezeptor SUR (SUR1 oder SUR2) (Seino and Miki 2003).

Sie werden durch ATP³ und ADP⁴ gesteuert. Beim Anstieg von ATP im Zellinneren bindet sich das ATP an die porenbildende Kir-Untereinheit und verschließt den Kanal. Es kommt zum Anstieg von intrazellulärer K⁺-Konzentration und das Membranpotential wird positiver, was zur Aktivierung von spannungsabhängigen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen führt. ADP bindet sich an die regulierende-SUR-Untereinheit und führt zum Öffnen von Kanälen, d.h. beim Abfall von ADP werden die Kanäle geschlossen. Die Sulfonylharnstoffe, z.B. Glibenclamid, binden sich an die SUR-Untereinheit und verhindern das Andocken von ADP, so dass die Kanäle geschlossen bleiben (Forth et al. 2009).

Der Wirkmechanismus von H₂S ist nur zum Teil aufgeklärt. Es wird angenommen, dass es ein K_{ATP}-Aktivator ist, aber ein anderer Wirkmechanismus ist auch möglich. So wurde gezeigt, dass es eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrazellulären pH-Werts spielt, wodurch es ebenfalls zu einer Relaxation kommt (Lee et al. 2007). In Studien wurde demonstriert, dass der Effekt von H₂S auf den Gefäßtonus vom Sauerstoff abhängig ist (Koenitzer et al. 2007).

Da K_{ATP}-Kanäle in verschiedenen Organen im Körper vorkommen, sind sie ein wichtiger Eingriffspunkt mehrerer Wirkstoffe (z.B. orale Antidiabetika) und auch ein potentieller Angriffspunkt neuer Entwicklungen.

³ ATP: Adenosintriphosphat

⁴ ADP: Adenosindiphosphat

2 ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Wirkung von einer am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien neu synthetisierten Substanz, PGU 177, geprüft werden.

Für die Durchführung der Versuche wurden Meerschweinchen ausgesucht. Die Physiologie der Ionenkanäle bei diesen Tieren ähnelt der Struktur von menschlichen Kanälen und dadurch konnten die Ergebnisse auch für Menschen herangezogen werden.

Die Auswirkung der Substanz wurde an drei Präparaten der glatten Muskulatur, Aorta, Lungenarterie und Darm sowie an zwei Herzpräparaten, am rechtem Vorhof und am Papillarmuskel, getestet. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die Substanz zu einer Gefäßdilatation führt und wie dies die Chronotropie bzw. Inotropie der Herzmuskulatur beeinflusst. Die Experimente wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz durchgeführt. Für alle Präparate wurde die effektive Konzentration (EC_{50}) ermittelt.

Bei der Zersetzung von PGU 177 könnte Schwefelwasserstoff freigesetzt werden, der möglicherweise für die vasodilatierende Wirkung verantwortlich sein könnte. Es wurde versucht, den Wirkmechanismus der Substanz an den Darmpräparaten aufzuklären, indem der K_{ATP} -Kanal Blocker, Glibenclamid, und NO-Synthase-Hemmer, NO-L-Arginin, als Antagonisten eingesetzt wurden.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde immer nach vorgegebenen Arbeitsvorschriften gearbeitet.

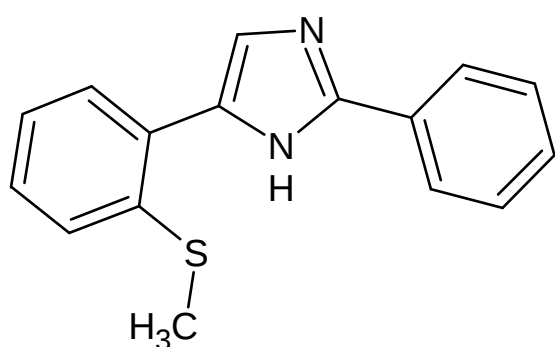
3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Verwendete Substanzen

3.1.1 Testsubstanz PGU 177

Die Testsubstanz PGU 177 wurde am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien synthetisiert und von Herrn Univ. Prof. Dr. Thomas Erker für die Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt.

Abbildung 2: Strukturformel von PGU 177



$$MG(C_{16}H_{14}N_2S) = 266,36$$

5-[2-(methylsulfonyl)phenyl]-2-phenyl-1H-imidazol

Für die Durchführung der Versuche wurde 100 µl Stammlösung der Substanz jeden Tag frisch zubereitet. Das verwendete Lösungsmittel war Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Substanzeinwaage war abhängig von der verwendeten Organbadgröße. Zur Verfügung standen zwei Organbäder, 8 ml und 25 ml. Am Ende jedes Versuchs musste die kumulative Konzentration im Gefäß 100 µmol/l betragen. Es wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

Tabelle 2: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Organbad Volumen in ml	Einwaage der Testsubstanz (100µmol/l)/Organbad
PGU 177	266,36	8	0,21 mg
		25	0,67 mg

Nachdem die Kontrollphase im Organbad erreicht wurde, konnte die Stammlösung mittels einer Finnmikropipette zugegeben werden. Die Stammlösung wurde in vier verschiedenen Konzentrationen, 3 µl, 7 µl, 20 µl und 70 µl, eingespritzt. Damit wurden die folgenden Konzentrationen im Organbad erreicht: 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und die gewünschte Endkonzentration von 100 µmol/l. Die Substanzzugabe erfolgte alle 45 Minuten.

Tabelle 3: Piperttierschema

Zugefügte Menge	Endkonzentration im Organbad
3 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

3.1.2 Verwendete Antagonisten

Für die Überprüfung des möglichen Wirkmechanismus der Substanz wurden jeweils 100 µl Antagonisten-Stammlösung eingespritzt, sodass die Endkonzentration im Organbad 100 µmol/l betrug. Die Stammlösung wurde hergestellt, indem man die vorgeschriebene Menge an Substanz in 100 µl Lösungsmittel löste.

In der Tabelle 4 sind die Antagonisten-Stammlösungen dargestellt.

Tabelle 4: Antagonisten Stammlösungen

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Einwaage der Testsubstanz (100µmol/l)/Organbad	Lösungsmittel (100µl)
NO-L Arginin	219,20	0,55 mg	60 mM KCl-Lösung
Glibenclamid	494,00	1,24 mg	DMSO

3.1.2.1 NO-L-Arginin

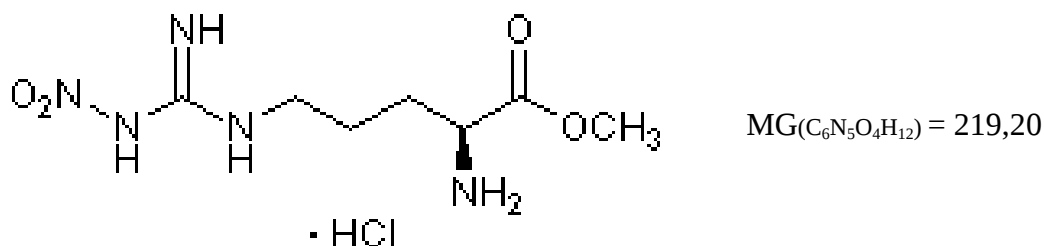
NO-L-Arginin ist ein kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthase (Ishii et al. 1990), eines Enzyms, das die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Es ist schon seit langem bekannt, dass Endothel die Fähigkeit besitzt, einen Stoff zu produzieren, der zur Gefäßerweiterung führt. Deswegen benannte man dies zuerst EDRF (Endothelium-derived relaxing faktor). Ende der 1980er-Jahre wurde festgestellt, dass EDRF

eigentlich das NO ist. NO stimuliert die lösliche Isoform der Guanylatcyclase (GC-S) in der glatten Gefäßmuskulatur und es kommt zu einer Bildung von cGMP⁵ aus GTP⁶. cGMP stimuliert die Wiederaufnahme von Ca²⁺-Ionen im sarkoplasmatischen Retikulum oder den Transport aus der Zelle, wodurch es zur Vasodilatation kommt. Außerdem hemmt es noch die Thrombocytenaggregation. Als Signalmoleül kommt es im Zentralnervensystem, im vegetativen peripheren Nervensystem und im Darmnervensystem vor. Die Immunzellen können große Mengen von NO produzieren, wodurch die cytotoxische Wirkung vermittelt wird (Forth et al. 2009).

Wenn die NO Synthase, z.B. durch NO-L-Arginin, gehemmt wird, wird kein NO biosynthetisiert und es kommt nicht zur Relaxation der glatten Muskulatur (Forth et al. 2009).

Die Nitrovasodilatoren (NO-Donoren) werden in der Therapie von koronaren Herz Krankheiten eingesetzt (Forth et al 2009).

Abbildung 3: Strukturformel von NO-L-Arginin



3.1.2.2 Glibenclamid

Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoff Derivat und wird als orales Antidiabetikum in der Therapie von Diabetes Mellitus Typ II eingesetzt. Sein Wirkmechanismus beruht auf der Blockade der ATP-abhängigen K⁺-Kanäle. Dabei kommt es zur Steigerung der K⁺-Konzentration im Zellinneren und Membranpotential wird positiver. Sobald die Schwelle von ca. -40mV erreicht wird, öffnen sich die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ und Calcium strömt in die Zelle hinein. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration stimuliert die Exozytose von Insulin (Forth et al. 2009).

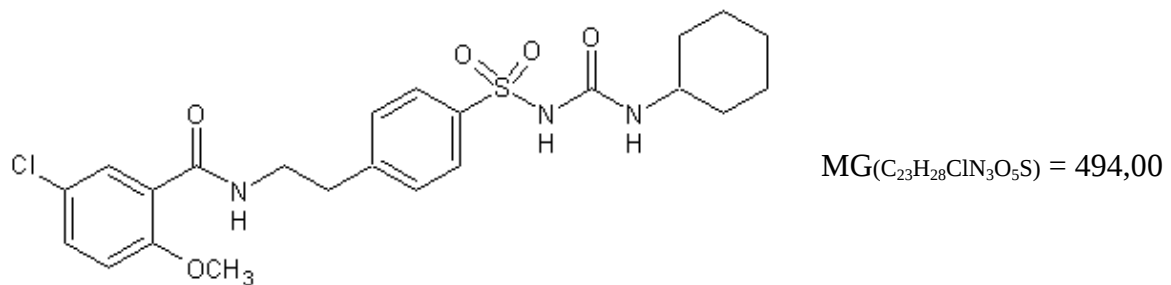
⁵ cGMP- cyclisches Guanosinmonophosphat

⁶ GTP- Guanosintriphosphat

Die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle kommen noch in glatten Muskelzellen, im Skelett, im Gehirn und in der Leber vor (Ashcroft F. 1998; Terzic et al. 1995; Seino and Miki 2003).

Da Glibenclamid ein Sulfonamid ist, kann es allergische Reaktionen auslösen. Weitere Nebenwirkungen sind v.a. gastrointestinale Beschwerden, schwere Hypoglykämien, in seltenen Fällen Leukopenie oder Thrombocytopenie (Mutschler et al. 2001).

Abbildung 4: Strukturformel von Glibenclamid



5-Chlor-N-(2-(4-(cyclohexylcarbamoylsulfamoyl)phenyl)ethyl)-2-methoxy-benzamid

3.2 Verwendete Lösungen

3.2.1 Physiologische Elektrolytlösung

Die physiologische Elektrolytlösung oder Tyrode wurde jeden Tag vor dem Versuchsbeginn frisch vorbereitet. Sie wurde nach Vorschriften von Reiter (1967) hergestellt und entsprach der modifizierten Krebs-Henseleit Lösung. Die Bestandteile der Lösung waren verschiedene Ionen und Glucose, die ein künstliches physiologisches Milieu darstellen sollten. Die Lösung wurde mit einem Gasgemisch, bestehend aus 95% O_2 und 5% CO_2 , allgemein Oxymix oder Carbogen genannt, begast, um die Organe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Die entnommenen Organe mussten während der Lagerung, Präparation und während der Versuche in der Tyrode aufbewahrt werden.

In der Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der Nährlösung dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	Konzentration (mmol/l)
NaCl	58,442	1000,25 g/5l	33,60	115,01
KCl	74,55	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,37	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,09	62,00 g/250ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,98	34 g/250ml	3,20	3,92
Glucose	180,16	Reinsubstanz	1,98	10

Zuerst wurden die vorgegebenen Mengen an Stocklösungen von NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und KH₂PO₄ in einen 2l Messkolben eingebracht. Danach wurde die entsprechende Menge an Glucose eingewogen und zugegeben. Die Lösung wurde dann mit destilliertem Wasser bis zu ca. dreiviertel des Kolbens ergänzt. Nachdem die Glucose vollständig gelöst war, begaste man die Lösung mit Oxymix für ca. 20 Minuten. Anschließend wurde die begaste Lösung mit CaCl₂ Stocklösung tropfenweise versetzt. Wichtig dabei war, dass dieser Vorgang sehr langsam und vorsichtig durchgeführt wurde, sonst hätte es passieren können, dass schwerlösliche Calciumsalze ausfallen, was zu einer Trübung der Tyrode führen und sie unbrauchbar machen würde. Zum Schluss wurde mit destilliertem Wasser bis zur 2l Marke aufgefüllt.

3.2.2 Kaliumchloridlösungen

Kaliumchloridlösungen wurden für die chemische Reizung der glatten Muskulatur benötigt. Das Ziel war es, die maximale Vorkontraktion der glatten Muskelzellen zu erzielen, sodass man dann die vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz testen konnte. Es wurden zwei Lösungen zubereitet und zwar eine 90 mmolare KCl-Lösung für die Aorta und Arteria pulmonalis Präparate und eine 60 mmolare KCl-Lösung für die Vorkontraktion des terminalen Ileums. Die vorgeschriebene Menge an KCl wurde in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der Tyrode bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kaliumchloridlösung

Das Präparat	KCl Einwaage(g) / 100ml Tyrode	Konzentration (mmol/l)
Aorta, Areteria pulmonalis	0,67	90
Terminales Ileum	0.45	60

3.2.3 Das Lösungsmittel für die Testsubstanz PGU 177

Die PGU 177 ist löslich in Dimethylsulfoxid, oder kurz DMSO. Abhängig vom verwendeten Organbad wurde die entsprechende Menge an Substanz in 100 µl DMSO gelöst. Das Lösungsmittel selbst hat einen Einfluss auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur und dieser Beitrag musste dann bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

3.3 Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche wurden Meerschweinchen vom TRIK-Stamm verwendet. Die Versuchstiere waren beiderlei Geschlechtes, zwischen vier und acht Wochen alt und ihr Gewicht betrug 300 bis 800 g.

Für die Substanzuntersuchungen wurden als Versuchstiere die Meerschweinchen ausgesucht, da die Ionenkanäle bei diesen Tieren in ihren physiologischen Charakteristika den Organkanälen von Menschen ähnlich sind. Dadurch konnte man gut reproduzierbare Informationen über die möglichen Wirkungen der Testsubstanz bei Menschen gewinnen.

An jeweiligen Versuchstag wurde jeweils ein nüchternes Versuchstier getötet und zwar durch einen schnellen, durch qualifiziertes Fachpersonal ausgeführten Genickschlag. Dadurch sollte ein schneller und schmerzfreier Tod gewährleistet werden. Anschließend wurden die Organe (Herz inklusiv Lunge, Darm und Aorta) entnommen.

3.4 Entnahme und Präparation der Organe

3.4.1 Organentnahme

Für die Organentnahme wurde das Sezierbesteck verwendet.

Abbildung 5: Sezierbesteck



Nachdem das Tier getötet wurde, konnten die Organe entnommen werden. Mit einer Schere wurde der Thorax vorsichtig ohne Verletzung der Organe geöffnet. Zuerst wurde das Herz inklusiv Lunge entfernt und in ein mit physiologischer Lösung gefülltes Becherglas gegeben. Schnelles Vorgehen war sehr wichtig, da es sonst zu Hypoxie bzw. Blutkoagulation in Herzgefäßen kommen könnte.

Anschließend wurde das terminale Ileum mit der Hand herausgeholt. Wir brauchten nur den terminalen Teil des Darms, deswegen wurde er mit einer Schere in der Nähe des Caecum abgeschnitten. Der jejunale Teil wurde dann mit einem Faden gebunden, der auch als Markierung für die nachfolgende Bearbeitung diente, sodass es nicht zur Verwechslung der Enden kommt. Der Darm wurde in der Tyrode-Lösung unter ständiger Begasung mit Oxymin für die Präparation aufbewahrt.

Abschließend wurde die Aorta entnommen. Der Thorax wurde noch weiter geöffnet und die Wirbelsäule durchgebogen. Zuerst wurde der obere Teil der Aorta abgeschnitten und sanft mit einer Pinzette gehalten. Mit einer Schere wurde dann entlang der Wirbelsäule geschnitten und die Aorta vom Fettgewebe abgetrennt. Es sollte vermieden werden, dass das Gewebe zu stark überdehnt oder sogar durchgestochen wird, weil solche Präparate für die Versuchsdurchführung unbrauchbar sind. Die ca. 3-5 cm lange Aorta wurde in der physiologischen Lösung unter ständiger Begasung für die weitere Verarbeitung aufbewahrt.

3.4.2 Präparation der Organe

Für die Präparation der Organe benutzten wir Schere, Federschere, Pinzetten, Präpariernadeln, Silberhäkchen, Petrischale und Korkboden, der mit einem Schlauch in der Petrischale befestigt wurde. Vor der Präparation wurde die Petrischale mit der begasten Nährlösung gefüllt. Zusätzlich verwendeten wir ein Mikroskop (Nikon SMZ-10A, Japan).

Abbildung 6: Präparierbesteck



3.4.2.1 Rechter Vorhof (*Atrium dexter*)

Das entnommene Herz wurde unter einem Mikroskop von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit, dabei wurden auch die Reste der Lunge entfernt. Anschließend wurde es mit zwei Präpariernadeln an der Basis und der Spitze auf den Korkboden in der mit begaster Nährlösung befüllten Petrischale befestigt. Jetzt konnte man sehr vorsichtig den Vorhof von der Kammer abtrennen. Die Zellen der Sinusknoten, wo die Erregung spontan gebildet wird, sind nicht differenziert und nicht genau lokalisierbar. Deswegen war es sehr wichtig, den Vorhof nicht zu verletzen oder zu überdehnen, da es zu einer Störung der spontanen Erregungsbildung kommen konnte, was zu verfälschten Ergebnissen führen würde. Um den Vorhof an die Versuchsanordnung anschließen zu können, mussten zwei Silberhäkchen an den beiden Enden mit einem Bindefaden vorsichtig befestigt werden. Der fertig präparierte Vorhof wurde in der begasten Nährlösung bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt.

3.4.2.2 Lungenarterie (*Arteria pulmonalis*)

Für die Versuche wurde das direkt von der rechten Kammer herausgehende Stück (der Truncus pulmonalis) der Lungenarterie verwendet. Das ca. 1 cm lange Stück wurde zuerst mittels einer Federschere herausgeschnitten und mit zwei Präpariernadeln auf die Korkunterlage befestigt, um vom eventuell gebliebenen Fettgewebe befreit zu werden.

Anschließend konnten zwei oder drei 2-3 mm breite, ringförmige Stücke herausgeschnitten werden und bis zur weiteren Verarbeitung in einem mit Tyrode aufgefüllten Becherglass stehen gelassen werden. Die fertigen Präparate wurden direkt, ohne Verwendung von Silberhäkchen, in die Apparatur II eingespannt.

3.4.2.3 Papillarmuskel (*Musculus papillaris*)

Nach dem Entfernen vom rechten Vorhof und der Lungenarterie war es möglich, mit einem Schnitt, ausgehend von der Lungenarterie, entlang des Septums bis zur Herzspitze die rechte Kammer zu öffnen. Die aufgeklappte Herzkammer wurde dann mit zwei Präpariernadeln auf den Korkboden in der mit Nährlösung gefüllten Petrischale befestigt. Nun konnte man mit einem Bindefaden auf den Ansatz der Papillarmuskelsehne ein Silberhäkchen platzieren und das Präparat herausholen. Es musste überprüft werden, ob eventuell Purkinje-Fasern mit dem Präparat herausgeschnitten worden sind. Sie hätten zur spontanen Erregungsbildung bei der Versuchsdurchführung geführt, was die Versuche negativ beeinflussen könnte. In der rechten Kammer sind drei und in der linken zwei Papillarmuskeln zu finden. Meistens wurden drei bis vier Präparate gemacht und in der begasten Nährlösung bis zum Versuchsbeginn gehalten.

3.4.2.4 Darm (*Terminales Ileum*)

Vor dem Versuchsbeginn musste zuerst ein Darmpräparat vorbereitet werden. Der isolierte Darm wurde in der ständig begasten Nährlösung aufbewahrt. Ein ca. 1 cm langes Darmstück wurde vom caecalen Ende abgeschnitten und mit zwei Präpariernadeln auf der Korkunterlage in der Petrischale befestigt, um das Einrollen des Darms zu verhindern. Man sollte schräge Schnitte machen, weil auf dieser Weise die Präparation einfacher ist. Das Überdehnen von Gewebe sollte vermieden werden, da es sehr zart und empfindlich ist und die Präparate könnten sehr leicht zerstört werden. Anschließend wurde mittels einer mit Nährlösung gefüllten Pasteurpipette das Darminnere vorsichtig durchgespült, sodass die Chymusreste entfernt wurden. Um das Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen, wurden zwei Silberhäkchen mittels Bindefaden an beiden Darmenden angebracht. Dabei wurden zwei verschiedenfarbige Fäden verwendet, um die beiden Darmenden nicht zu verwechseln. Beim Abbinden musste aufgepasst werden, dass immer eine Öffnung an beiden Seiten vorhanden war, damit die Nährlösung inklusive Testsubstanz durch den Darmlumen zirkulieren konnte. Auf dieser Weise angefertigte Präparate wurden in der begasten Nährlösung bis zum Versuchsbeginn stehen gelassen.

Abbildung 7: Originalabbildung eines Darmpräparats



3.4.2.5 Aorta (*Aorta descendens*)

Die isolierte Aorta wurde am Korkboden in einer mit Nährlösung gefüllten Petrischale mit zwei Präpariernadeln fixiert. Die Überdehnung der Gewebe sollte vermieden werden. Nun konnten die Reste von Fett- und Bindegewebe entfernt werden. Das koagulierte Blut wurde ebenfalls beseitigt. Anschließend wurde die ca. 3 cm lange Aorta in mehrere ca. 2 mm breite Stückchen geschnitten, die dann direkt in die Apparatur eingebracht werden konnten. Bis dahin wurden sie in einer mit Oxymix begasten Lösung aufbewahrt. Die perforierten Präparate waren unbrauchbar und wurden vorher entfernt.

Abbildung 8: Originalabbildung eines Aortapräparats



3.5 Versuchsanordnung und Apparaturen

Für die Durchführung der Versuche standen zwei Apparaturen zur Verfügung.

Die Apparatur I wurde für das Testen von Substanz an Papillarmuskeln verwendet und in die Apparatur II konnten die restlichen Präparaten (Vorhof, Aorta, Lungenarterie, Darm) eingespannt werden.

Das Präparat wurde direkt oder mit Hilfe von fixierten Silberhäkchen an einen Silberdraht angehängt und dadurch mit dem Kraftwandler in Kontakt gebracht. Der Kraftwandler umwandelte die mechanische Kraft in ein elektrisches Signal und gab es weiter zum Amplifier, wodurch das Signal verstärkt und auf einem Millimeterpapier durch einen Schreiber aufgezeichnet wurde.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, mussten die Versuchsbedingungen immer gleich gehalten werden, d.h. konstante Gaszufuhr, Temperatur, pH Wert und gleiche Handhabung mussten gewährleistet werden.

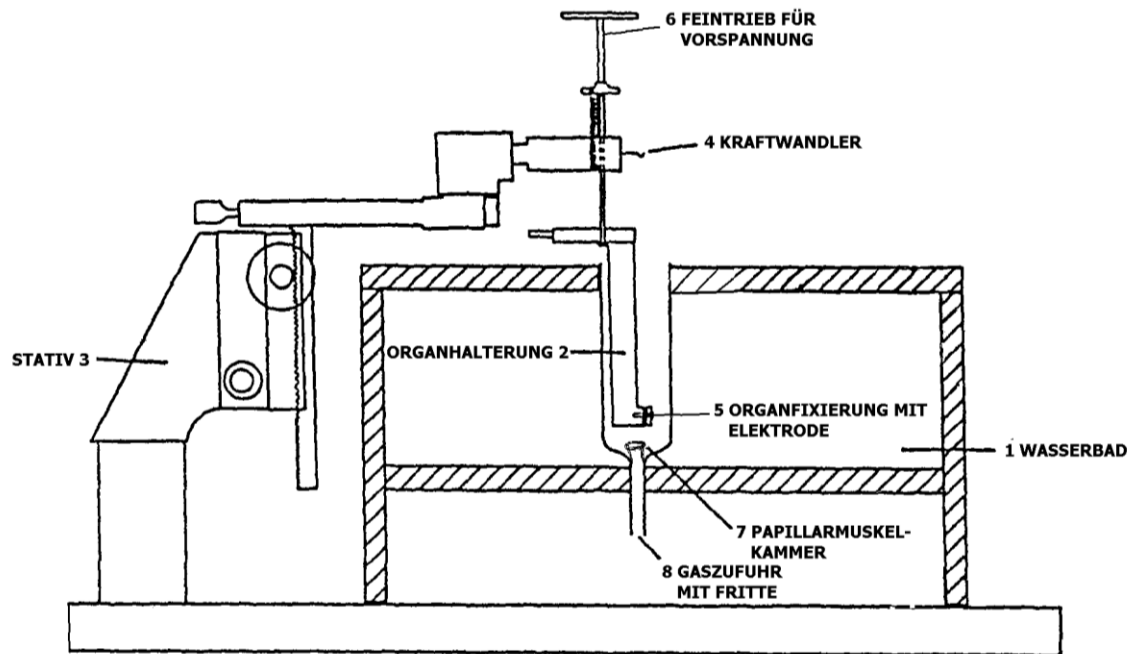
3.5.1 Apparatur I

Die Apparatur I wurde nur für die Papillarmuskelpreparate verwendet. Sie bestand aus einem mit Aqua bidestillata gefüllten Wasserbad, in das eine Präparatkammer mit Volumen von 27 ml hineinragte und einem Stativ, auf dem sich die Organhalterung befand.

Das Wasser im Wasserbad musste die konstante Temperatur von $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ aufweisen, um die optimalen Bedingungen darzustellen. Die Temperatur wurde durch ein Thermostat mit einer Heizspirale reguliert.

Die Organkammer wurde mit genau 25 ml Nährlösung gefüllt, welche durch das umgebende Wasser im Wasserbad erwärmt wurde. Die Tyrode musste mindestens 10 Minuten vor dem Versuchsbeginn aufgefüllt werden, um die gewünschte Temperatur zu erreichen. Auf dem frittierten Teil des Kammerbodens befand sich die Gaszufuhr, um das Organ mit ausreichend Sauerstoff, während des gesamten Versuchs, zu versorgen.

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Apparatur I

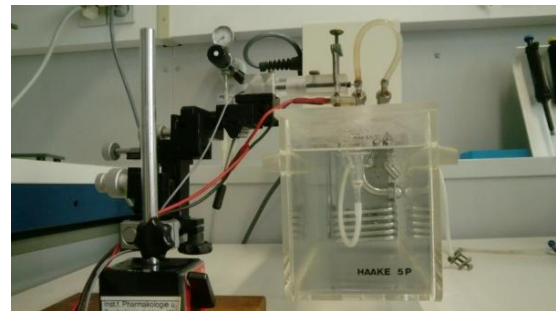


Der präparierte Papillarmuskel wurde dann mit Hilfe von fixiertem Silberhäkchen auf einen Silberdraht angehängt und dadurch mit dem Kraftwandler in Kontakt gebracht. Der frei hängende Muskel wurde zwischen einer Plexiglasscheibe und einer Plathinelektrode platziert, mit einer Feststellschraube in der Organhalterung befestigt und in das Organbad mit Hilfe des Stativs eingetaucht.

Im Gegensatz zum Vorhof weist der Papillarmuskel keine spontanen Erregungen auf, sondern muss elektrisch stimuliert werden. Diese Impulse wurden mittels eines Anapulse Stimulators (Model Isostim 301T, World Precision Instruments (WPI), Hamden (CT, USA)), erzeugt. Deshalb war es wichtig, dass das Präparat direkt auf der Elektrode anlag. Die elektrischen Impulse wurden durch einen Amplifier 100-fach verstärkt und mittels eines Schreibers auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die entsprechende Vorspannung mittels Feintriebs eingestellt.

Das Organbad wurde nach dem Versuchsende mittels einer Kunststoffkanone mit befestigtem Schlauch mit destilliertem Wasser ausgespült und für den nächsten Versuch vorbereitet.

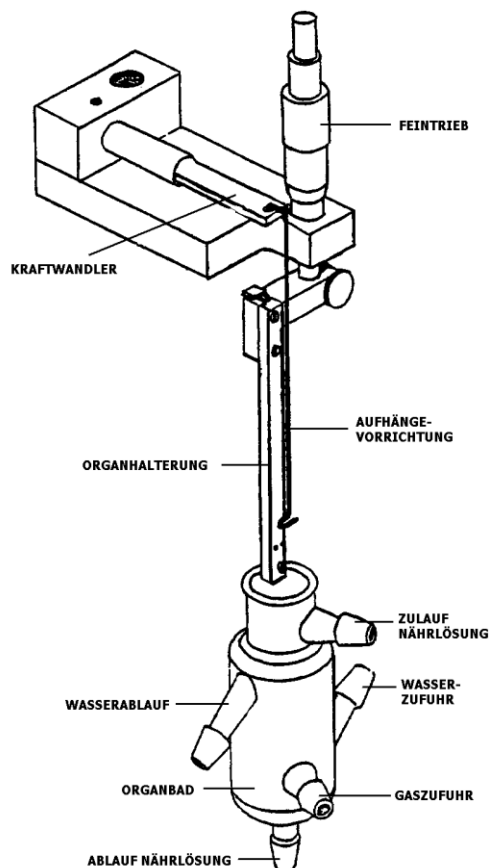
Abbildung 10: Originalabbildung der Apparatur I



3.5.2 Apparatur II

Die Apparatur II wurde für die Durchführung der Versuche an Vorhof, Aorta, Darm und Lungenarterie verwendet.

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Apparatur II

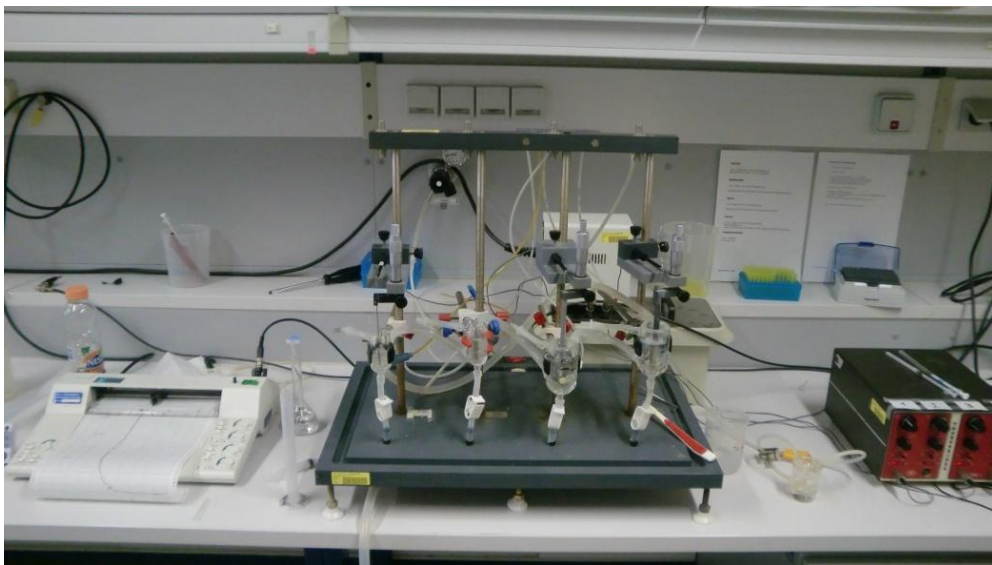


Die Apparatur II bestand aus einem doppelwandigen Organbad aus Glas und einem Stativ mit Organhalterung, Kraftwandler und Feintrieb. Das Wasser in der Wasserbadwanne wurde mittels eines Thermostats mit einer Heizspirale auf genau $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten. Dieses Wasser strömte durch das doppelwandige Glas der Organkammer und erwärmte die physiologische Nährlösung in der Kammer auf die vorgeschriebene Temperatur, wodurch die physiologischen Bedingungen imitiert wurden. Durch die Gaszufuhr wurde die Nährlösung während des gesamten Experiments mit Oxy mix begast. Das Organbad wurde je nach Größe mit genau 25 ml bzw. 8 ml mindestens 10 Minuten vor dem Versuchsbeginn gefüllt. Das Herauslassen der Lösung aus dem Organbad erfolgte durch einen Abflussschlauch, dessen Auf- und Zumachen mit einer Kunststoffklammer reguliert wurde.

Die präparierten Organe (Vorhof und Darm) wurden dann mit Hilfe von zwei während der Präparatvorbereitung platzierten Häkchen zwischen zwei Silberdrähten eingespannt, während die Präparate von Aorta und Lungenarterie direkt zwischen zwei Drähten eingefädelt wurden. Der eine Draht war an der Organhalterung befestigt und der andere hingte auf dem Kraftwandler. Durch den Silberdraht wurde eine Verbindung zwischen dem Organ und dem Kraftwandler gewährleistet. Nach dem Einspannen wurde die Organhalterung mittels Stativbewegung in die Nährlösung eingetaucht. Das Präparat musste die ganze Zeit in der begasten Lösung bleiben. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch das Anlegen von für jedes Präparat vorgeschriebener Vorspannung gewährleistet. Die elektrischen Signale vom Kraftwandler wurden zum Verstärker und dann zum Schreiber weitergeleitet.

Das Organbad wurde durch mehrmaliges Einfüllen und Herauslassen von destilliertem Wasser gereinigt.

Abbildung 12: Originalabbildung der Apparatur II

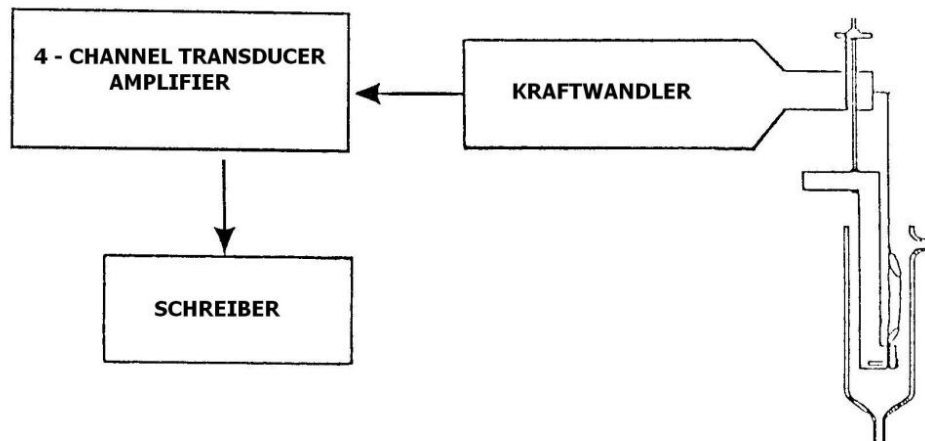


3.5.3 Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Der Kraftwandler ermöglichte das Messen von Kontraktionskraft, in dem er die mechanische Kraft in ein elektrisches Signal umwandelte. Im Kraftwandlergehäuse befanden sich Dehnungstreifen. Durch die Änderung der Kontraktionskraft der Organe kam es zur Änderung des Dehnungswiderstandes und dadurch zur proportionalen Änderung des Stromflusses. Durch die Kontraktion und Relaxation der Muskeln entstanden die elektrischen Signale, die dann zu einem Verstärker (Transbridge TM, 4-Channel Transducer Amplifier, von der Firma World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) weitergeleitet wurden. Die 100-fach verstärkten Signale konnten dann mit einem Schreiber mit automatischem

Papiervorschub (Recorder BD-112, Dual Channel, von der Firma Kipp & Zonen, Niederlande) auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet werden.

Abbildung 13: Schematische Darstellung des Kraftwandlers, Verstärker und Schreiber



3.5.4 Die Gasversorgung

Die ununterbrochene Gasversorgung war von größter Bedeutung für die Durchführung der Versuche. Die Begasung erfolgte mit einem Gasgemisch bestehend aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid namens Oxymix. Der Sinn war es, die Organe mit lebensnotwendigen Gasen zu versorgen, um die Hypoxie und das Absterben von Organen zu vermeiden und den physiologischen pH Wert von 7,2 bis 7,4 aufrechtzuerhalten.

Der Oxymix war in einer Sammelgasflasche gelagert und wurde zu den Ventilen in den Versuchsräumen geleitet und dann weiter über Schläuche zu Versuchsaapparaturen. Die Schläuche hatten am Ende eine Glasfritte, die die Feinerstäubung von Gas in der Lösung einrichtete. Dadurch konnte auch die Testsubstanz homogen verteilt werden. Die Schläuche waren zusätzlich mit Kunststoffschraubklammern ausgestattet, wodurch eine Feinregulation der Gaszufuhr möglich war.

3.5.5 Das Wasserbad

Um die optimalen Versuchsbedingungen zu gewährleisten, musste die Nährlösung in der Organkammer auf die vorgeschriebene Temperatur (Apparatur I-Papillarmuskelpräparate: $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und Apparatur II-alle andere Präparate: $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) erwärmt werden. Die mit Aqua bidestillata gefüllte Wasserbadwanne war mit einem Thermostat mit Heizspirale, die die eingetragene Temperatur konstant halten sollte, ausgestattet.

3.6 Versuchsabläufe

Um die reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es am wichtigsten, die Versuche nach vorgegebenen Vorschriften genau durchzuführen. Wie vorher schon erwähnt, sollten die physiologischen Bedingungen bei allen Versuchen gewährleistet werden, d.h. die Temperatur der Nährlösung in der Organkammer und die ununterbrochene Begasung. Die entnommenen und präparierten Organe wurden in die entsprechende Apparatur, möglichst ohne Überdehnung, eingespannt und in die je nach Organbadgröße, mit 25 ml bzw. mit 8 ml Nährlösung gefüllte und temperierte Organkammer eingetaucht. Um die maximale Kontraktion der Muskulatur zu erreichen, musste zuerst die für jedes Präparat vorgeschriebene Vorspannung angelegt werden. Aufgrund der Plastizität der Organe musste die eventuell veränderte Vorspannung während der Versuche mit Feintrieb nachjustiert werden. Die schnelle und vorsichtige Handhabung sowohl beim Einspannen als auch beim Austausch von Tyrode durch Kaliumchloridlösung (Aorta-, Lungenarterie- und Darmpräparate) war sehr wichtig, weil die Organe nur kurz außerhalb der Nährlösung sein sollten. Bei der Substanzzugabe sollten Silberdraht, Kraftwandler oder Organ mit der Fennemikropipette nicht berührt werden.

3.6.1 Rechter Vorhof (Atrium dexter)

Das vorbereitete Präparat wurde in die Apparatur II eingespannt und in die Nährlösung eingetaucht. Zuerst mussten der Schreiber und der Amplifier eingeschaltet werden. Am Schreiber wurde die Spannung auf 5 mV und die Papiervorschubgeschwindigkeit auf 5 mm/sec eingestellt. Mit dem Feintrieb des Amplifiers wurde dann auf den Nullpunkt am Schreiber nachjustiert. Nun konnte die Vorspannung von 10,4 mN mit dem Feintrieb angelegt werden und anschließend mit dem Zero-Drehrad wieder auf Nullpunkt zurückgestellt werden. Das Organ musste sich zuerst an die Bedingungen anpassen, bevor man mit den Messungen beginnen durfte. Bei den Vorhofpräparaten dauerte es ca. 30-45 Minuten. Die Messung wurde durchgeführt, indem die Schläge innerhalb von 12 sec, sprich 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier, durch Betätigung des Pen-Down-Knopfes auf dem Schreiber aufgezeichnet und gezählt wurden. Dieser Vorgang wurde alle 5 Minuten wiederholt, bis die Anzahl der Schläge bei den letzten drei Messungen unverändert geblieben war. Anschließend konnte die erste Testkonzentration eingespritzt werden. Die Messungen wurden nach vorher erklärtem Prinzip alle 5 Minuten durchgeführt. Die weitere Zugabe der Testsubstanz folgte alle 45 Minuten, bis die gewünschte Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ in der Organkammer erreicht wurde.

3.6.2 Lungenarterie (*Arteria pulmonalis*)

Die Lungenarterie wurde direkt zwischen zwei Silberdrähte eingefädelt und in die Tyrodelösung eingetaucht. Nach dem Einschalten des Schreibers (Spannung 5 mV; Speed 5 mm/min) und des Verstärkers konnte die Vorspannung von 9,81 mN mit dem Feintrieb aufgebracht werden. Der Schreiber wurde dann mit dem Zero-Drehrad auf den Nullpunkt nachjustiert. Die Anpassungsphase dauerte 20 Minuten. Die Aufzeichnung folgte durch das Drücken des Pen-Down-Knopfes am Schreiber. Danach wurde die Tyrode durch das Öffnen der Kunststoffklammer durch den Abflussschlauch ausgelassen. Die Klamme wurde wieder verschlossen und das Organbad mit genau 25 ml bzw. 8 ml einer 90 mmolaren Kaliumchloridlösung aufgefüllt. Durch die chemische Reizung kam es schnell zur Kontraktion der Muskulatur. Nach 45-60 Minuten wurde die Steady-state-Phase erreicht, wobei die Kurve einen konstanten Verlauf hatte. Erst dann durfte die erste Testkonzentration eingespritzt werden. Die weitere Substanzzugabe folgte alle 45 Minuten.

3.6.3 Papillarmuskel (*Musculus papillaris*)

Nach dem Einspannen des Präparats in die Apparatur I wurde es in die Nährlösung in der Organkammer eingetaucht. Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und die Papierschubgeschwindigkeit auf 5 mm/sec und die Spannung auf 2 mV eingestellt. Mit dem Feintrieb konnte die Vorspannung von 3,92 mN angebracht werden, um die maximale Kontraktion des Muskels zu gewährleisten. Aufgrund der Plastizität des Präparats sollte diese Vorspannung immer wieder während des Versuchs mit dem Feintrieb nachjustiert werden, um die maximale Kontraktionskraft aufrechtzuerhalten (Reiter M 1967). Der Papillarmuskel weist keine eigene Spontanaktivität auf und musste ununterbrochen mit einem Stimulator elektrisch stimuliert werden, wodurch die Kontraktion ausgelöst wurde. Die eventuell aufgetretene spontane Erregung war unerwünscht und bedeutete, dass die Purkinje-Fasern während der Präparation des Organs nicht vollständig entfernt wurden, diese sollten vor dem Fortfahren zuerst beseitigt werden. Die Erregung wurde durch die Rechteckimpulse von 3 ms⁻¹ Dauer bei einer Frequenz von 1 Hz erzeugt. Um die unkontrollierte Entleerung der Catecholaminspeicher und dadurch die Verfälschung von Ergebnissen zu verhindern, lag die Stromstärke ca. 10% über der Reizschwelle (Furchgott R. F. et al. 1959).

Nach einer Anpassungsphase von ca. 30 Minuten konnte die Kontrollphase anfangen. Durch die Betätigung des Pen-Down-Knopfes auf dem Schreiber wurden 6 Kontraktionspeaks auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet und gemessen. Mit der Substanzzugabe konnte man erst anfangen, wenn die Peakamplitude einen konstanten Wert über mindestens drei Messungen

hatte. Die Substanzzugabe folgte nach dem Pipettierschema (Tabelle 3) in Abständen von 45 Minuten. Vor der letzten Messung bei der jeweiligen Konzentration wurde der Speed auf dem Schreiber auf 10 mm/sec umgestellt, sodass die Amplitude in der Steady-state besser gemessen werden konnte.

3.6.4 Darm (Terminales Ileum)

Das präparierte Darmstück wurde mit der jejunalen Seite oben und mit der caecalen Seite unten zwischen zwei Silberdrähten in das Gerät II eingespannt und in die auf $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperierte Nährlösung eingetaucht. Die Überdehnung sollte dabei vermieden werden. Der Schreiber und der Amplifier wurden eingeschaltet und auf die Spannung von 5 mV und den Speed von 5 mm/min eingestellt, wobei der Schreiber auf den Nullpunkt mit der Stellschraube am Amplifier zurückgeführt wurde. Durch das Anlegen der Vorspannung von 4,92 mN mit dem Feintrieb, konnte die maximale Darmkontraktion ausgelöst werden. Der Schreiber wurde dann wieder auf den Nullpunkt mit dem Zero-Drehrad zurückgeführt, obwohl es sich während der Akklimatisierungsphase wieder wegen der Darmperistaltik verstellte und immer wieder nachkorrigiert werden musste. Nach 20 Minuten wurde die Aufzeichnung durch das Betätigen des Pen-Down-Knopfes gestartet. Die Tyrode wurde durch das Öffnen des Abflussschlauches herausgelassen und nach dem Abflussverschluss wieder mit 25 ml einer 60 mmolaren Lösung aufgefüllt. Darauf folgte die sofortige, schlagartige Darmkontraktion, die dann wieder bis auf ein Drittel zurückfiel und dann wieder langsam nach oben ging, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Auf dem Millimeterpapier sah dies wie eine S-förmige Schleife aus. Diese Phase dauerte ca. 60 Minuten. Erst danach konnte die Substanz kumulativ, ausgegangen von der niedrigsten Konzentration, eingespritzt werden, bis die gewünschte Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht wurde. Die Substanzzugabe folgte in Abständen von 45 Minuten.

3.6.5 Aorta (Aorta descendens)

Die ringförmige Aorta wurde direkt in die Apparatur II eingefädelt und in die Nährlösung eingetaucht. Anschließend mussten Geräte, Schreiber und Amplifier richtig eingestellt werden. Auf dem Schreiber mussten die Spannung von 10 mV und die Papiervorschubgeschwindigkeit von 5 mm/min eingehalten werden. Die Vorspannung von 19,6 mN wurde mit der Stellschraube aufgesetzt und wieder mit dem Zero-Drehrad auf den Nullpunkt am Millimeterpapier korrigiert. Nach einer 20 minütigen Anpassungsphase wurde die Spannung auf dem Schreiber auf 5 mV umgestellt, mit dem Zero-Drehrad auf den Nullpunkt nachjustiert und der Aufzeichnungsknopf betätigt. Die Nährlösung wurde

herausgelassen und durch 25 ml bzw. 8 ml einer 90 mmolaren Kaliumchloridlösung ausgetauscht. Die Kontraktion der Aorta folgte am Anfang sehr schnell und dann immer langsamer, bis die konstante Plateauphase erreicht wurde (nach ca. 45 Minuten). Danach wurde die Substanz nach vorgegebenem Pipettierschema (Tabelle 3) eingespritzt.

3.6.6 Untersuchung des Wirkmechanismus von Testsubstanz PGU 177 in Kombination mit Antagonisten am terminalen Ileum

Als Antagonisten wurden NO-L-Arginin und Glibenclamid verwendet.

Das Darmpräparat wurde zuerst in die Apparatur II zwischen zwei Silberdrähten eingespannt, sodass die jejunale Seite nach oben und caecale Seite nach unten gerichtet war und in die Nährlösung eingetaucht. Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und eingestellt (Spannung 5 mV, Speed 5 mm/min). Die Vorspannung von 4,92 mN konnte mit der Stellschraube angelegt werden. Der Nullpunkt musste immer wieder nachjustiert werden, da er sich durch Darmperistaltik verschiebt. Nach der Anpassungsphase von 20 Minuten konnte man die Nährlösung durch Öffnung des Abflussventils herauslassen und nach dem Verschließen die Organkammer wieder mit 25 ml einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung ergänzen. Nachdem die Plateauphase erreicht war, konnte die NO-L-Arginin- bzw. Glibenclamidstamlösung eingespritzt werden, wobei die Endkonzentration im Organbad 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug. Nach 45 Minuten wurden 20 μl Substanzstamlösung zugegeben und weitere 45 Minuten zum Wirken gelassen, wonach der Versuch beendet war.

3.7 Auswertung

Bei den Herzpräparaten wurden die Messungen in Abständen von 5 Minuten gemacht. Für die Auswertung benutze man aber nur die letzte Messung, d.h. nach 45-minütiger Substanzeinwirkung, für die jeweilige Konzentration. Bei den Präparaten der glatten Muskulatur wurden die Messungen am Ende der Kontrollphase durchgeführt und dann während der kumulativen Substanzzugabe jeweils in der Steady-state bzw. Gleichgewichtsphase (nach 45 minütiger Einwirkung) für die jeweilige Konzentration.

3.7.1 Rechter Vorhof

Im Sinusknoten werden die Erregungen spontan gebildet, aber dieser Vorgang kann durch Einwirkung einer Substanz beeinflusst werden. Die Testsubstanz wurde auf die chronotrope Wirkung untersucht. Chronotropie bedeutet Schlagfrequenz, d.h. Anzahl der Schläge pro Minute. In 5 minütigen Intervallen wurden die Schläge innerhalb von 12 sec auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet und gezählt. Diese Zahl wurde dann mit Faktor 5 multipliziert und die Sinusfrequenz (Schläge/min) wurde errechnet. Als Kontrollwert diente die konstante Schlagfrequenz vor der ersten Substanzzugabe. Dadurch konnte die Substanzwirkung auf die Chronotropie festgestellt werden.

3.7.2 Papillarmuskel

Durch die Versuchsreihen an Papillarmuskelpräparaten konnte die positiv oder negativ inotrope Wirkung der Substanz getestet werden. Inotropie bedeutet Kontraktionskraft des Muskels. Es wurden immer 6 Amplituden auf dem Millimeterpapier mit dem Schreiber aufgezeichnet und dann mit einem Lineal gemessen. Um die Kontraktionskraft in mN zu ermitteln, musste der Mittelwert aus 6 Amplituden (in cm) mit dem Faktor 0,98 bei der Spannung am Schreiber von 5 mV bzw. mit Faktor $0,98 \times 0,4$ bei der Spannung von 1 mV oder 2 mV multipliziert werden. Die Zunahme oder Abnahme von Kontraktionskraft durch Substanzeinwirkung konnte durch den Vergleich mit dem Kontrollwert bestimmt werden.

3.7.3 Glatte Muskulatur (Lungenarterie, Darm, Aorta)

Die glatte Muskulatur wurde zuerst durch die Zugabe von entsprechender Kalimchloridlösung maximal vorkontrahiert. Dadurch war die eventuelle dilatierende Wirkung der Substanz deutlich erkennbar gemacht. Vor jeder Substanzzugabe musste der Punkt an der Verlaufskurve markiert werden, sodass die Entfernung von der Nulllinie mit einem Lineal (in cm) gemessen werden konnte. Als letzter Wert wurde eine Markierung an der Kurve 45 Minuten nach der Zugabe der letzten Konzentration gemacht. Bei der

eingestellten Spannung von 5 mV am Schreiber wurden dann die gemessenen Abstände mit dem Faktor 0,98 multipliziert, um die Kontraktionskraft in mN zu erhalten. Die gewünschte Wirkung der Substanz war eine Abnahme der Kontraktionskraft bzw. die Relaxation der Gefäße.

3.8 Statistik

Als Lösungsmittel für die Testsubstanz PGU 177 wurde Dimethylsulfoxyd (DMSO) verwendet. DMSO könnte selbst eine Auswirkung auf die Präparate der glatten Muskulatur, d.h. alle Präparate ausgenommen Atrium dexter, ausüben, deswegen musste diese zuerst ermittelt und dann von den ausgewerteten Messdaten abgezogen werden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Die neu berechneten Daten wurden für die statistische Auswertung benutzt.

Die Kontraktionskraft (f_c) und die Sinusfrequenz (f) wurden in mN bzw. in Schläge/min und in Prozent (%) angeführt. Aus den Messwerten für die einzelnen Versuchsreihen konnten dann der arithmetische Mittelwert und dessen Standardfehler (SEM) für die jeweilige Konzentration ausgerechnet werden. Mit dem Programm „SIGMA Plot 9.0“ konnten die Daten auch graphisch dargestellt werden. Aus den Diagrammen war es möglich, die effektive Konzentration (EC_{50}) in $\mu\text{mol/l}$ abzulesen.

Die Messwerte wurden dann noch bezüglich ihrer Signifikanz beurteilt. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu ermitteln, wurde ein „Student-T-Test“ für gepaarte Beobachtungen durchgeführt. Die Werte mit Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$) wurden als signifikant bzw. sehr signifikant beurteilt, wobei die Werte mit Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) hochsignifikant waren. Die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $> 5\%$ ($P > 0,05$) waren nicht signifikant.

4 ERGEBNISSE

Um die Wirkung der Testsubstanz darzustellen dienten als Indikatoren die Schlagfrequenz (Schläge/min) und die Kontraktionskraft (mN). Die Ergebnisse sind auch in Prozenten (%) angegeben. Aus der graphischen Darstellung der Ergebnisse konnte die effektive Konzentration (EC_{50}) in $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Die EC_{50} ist diejenige Konzentration, bei der die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz nur noch 50 % des Ausgangswertes beträgt.

4.1 Wirkung von PGU 177 auf den rechten Vorhof

Um die Auswirkung der Testsubstanz auf die Bildung von spontanen Erregungen im rechten Vorhof festzustellen, wurden insgesamt vier Versuche durchgeführt. Nach der Anpassungsphase betrug die Schlagfrequenz $175 \pm 16,83$ Schläge/min. Dieser Wert wurde als Kontrollwert verwendet und die Änderung der Schlagfrequenz nach der kumulativen Substanzzugabe konnte damit verglichen werden. Die Substanz zeigte eine schwache negativ chronotrope Wirkung bei der niedrigsten Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$. Diese Wirkung wurde durch die weitere Zugabe der Testsubstanz immer deutlicher. Bei der Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ war die Frequenz um $38,13 \pm 6,99$ % kleiner als in der Kontrollphase. Bei der höchsten Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ war ein Herzstillstand, d.h. keine Erregungsbildung in den Sinusknoten, bei drei von vier Versuchen detektierbar. Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) hatte keinen Einfluss auf die Schlagfrequenz und seine Wirkung musste bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

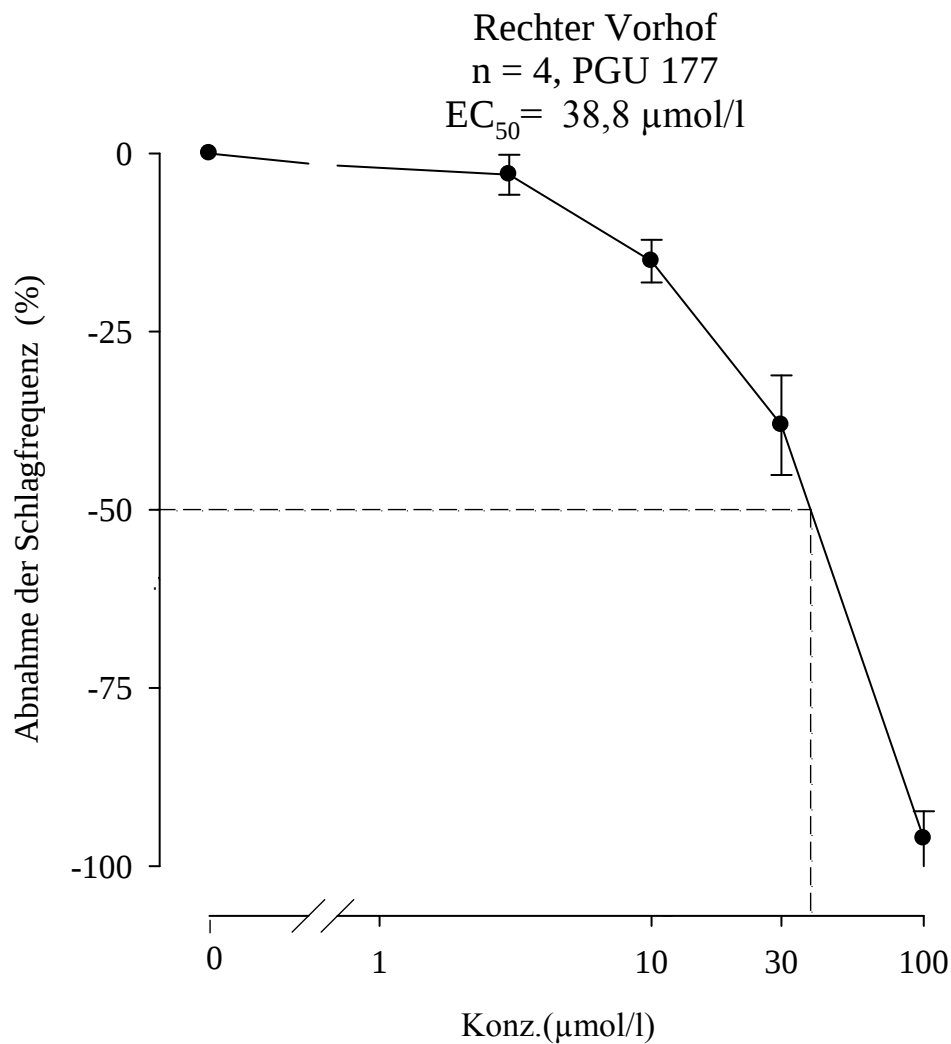
In der Tabelle 7 sind die Messwerte aus vier Versuchen in Form von arithmetischen Mittelwerten (f) in Schläge/min und in Prozent sowie deren Standardfehler (SEM) für die jeweilige Konzentration angeführt.

Tabelle 7: Wirkung von PGU 177 auf den rechten Vorhof

PGU 177 ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$175 \pm 16,83$	0 ± 0	4	-
3	$170 \pm 17,91$	$-2,99 \pm 2,81$	4	n. s.
10	$150 \pm 18,37$	$-15,11 \pm 3,00$	4	0,05
30	$111,25 \pm 20,14$	$-38,13 \pm 6,99$	4	0,05
100	$7,5 \pm 7,5$	$-96,15 \pm 3,85$	4	0,001

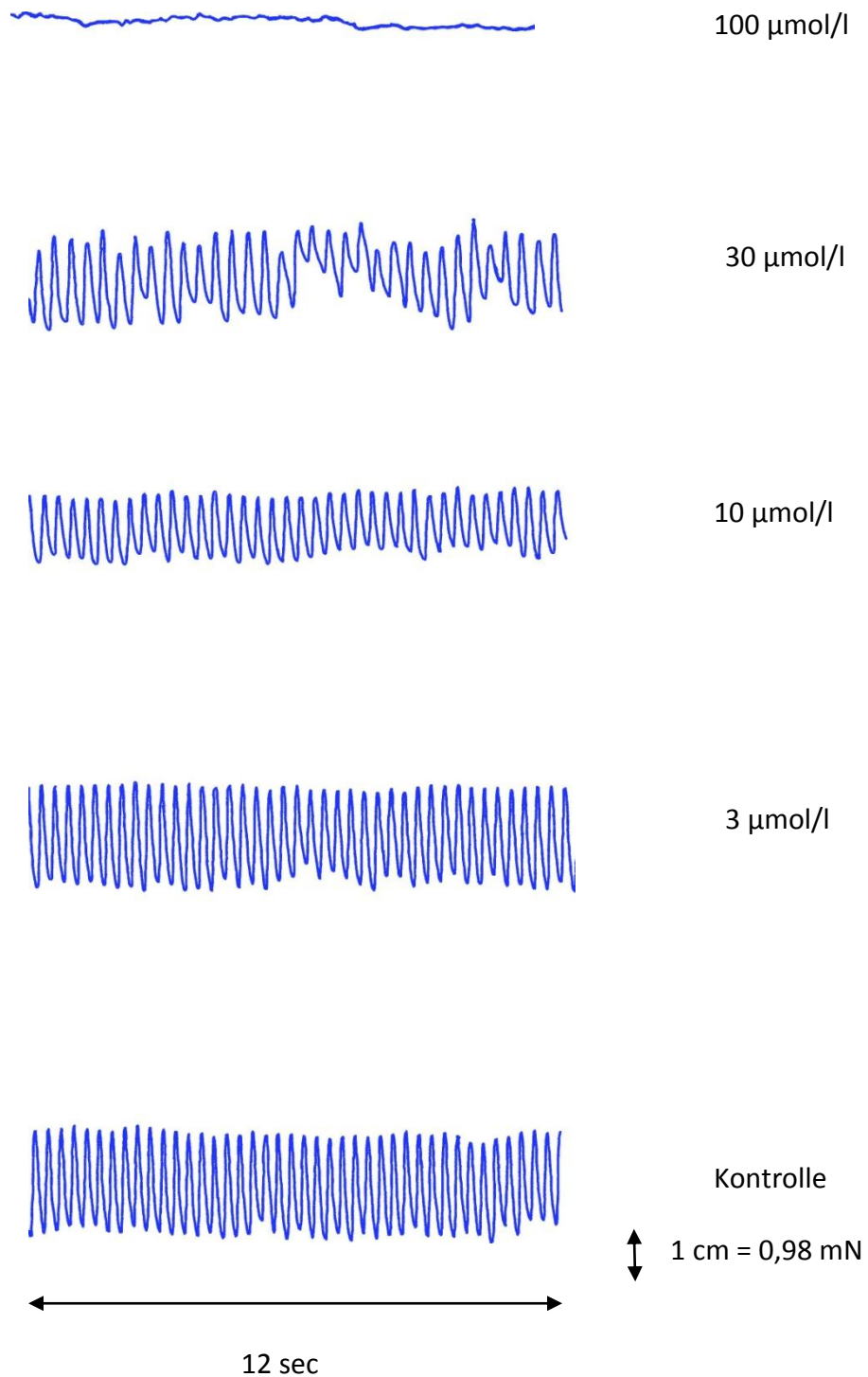
Die Konzentration-Wirkungskurve zeigt die Änderung der Schlagfrequenz in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration in der Organkammer. Aus dem Diagramm konnte die effektive Konzentration (EC_{50}) ermittelt werden. Bei der Konzentration von 38,8 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Schlagfrequenz nur noch 50% des Kontrollwertes.

Abbildung 14: Konzentration-Wirkungskurve von PGU 177 am rechten Vorhof



Auf der X-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, auf der Y-Achse die Schlagfrequenz in %. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz bei der entsprechenden Konzentration (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) und die Balken deren Standardfehler dar. Die strichlierten Linien kennzeichnen die EC_{50} .

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 177 auf den rechten Vorhof



Aus der Abbildung ist sichtbar, dass die Testsubstanz eine negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof ausübt. Bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte ein Herzstillstand festgestellt werden.

4.2 Wirkung von PGU 177 auf die Lungenarterie

Um die relaxierende Wirkung der Testsubstanz auf die Lungenarterie zu prüfen, wurden vier Versuche durchgeführt. Am Ende der Anpassungsphase wurde die maximale Kontraktion der Muskulatur von $14,60 \pm 0,68$ mN erreicht und als Kontrollwert eingesetzt. Durch die Substanzzugabe war keine signifikante Dilatation bei der Konzentration bis zu 30 $\mu\text{mol/l}$ sichtbar. Erst bei einer Konzentration ab 30 $\mu\text{mol/l}$ war die dilatierende Wirkung stärker und bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft $2,37 \pm 0,56$ mN bzw. ist um $82,88 \pm 2,56$ % des Kontrollwertes abgefallen.

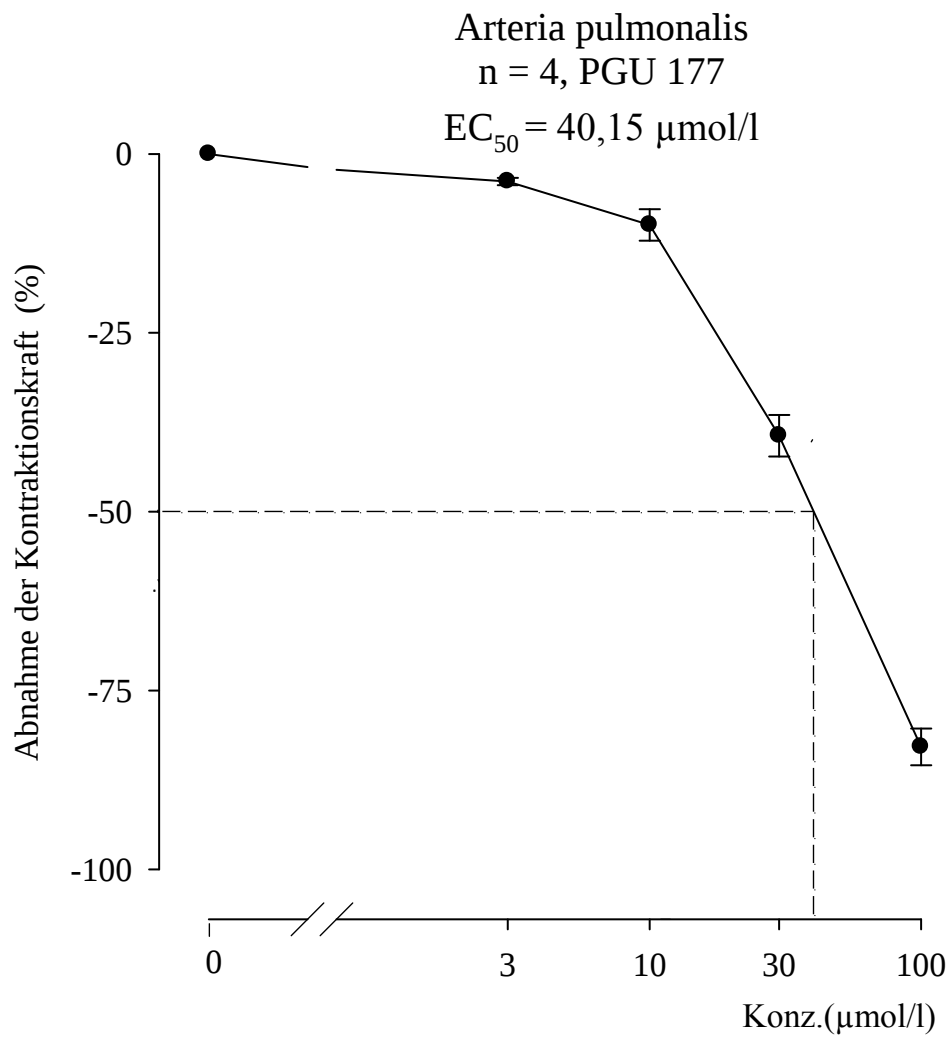
In der Tabelle 8 sind Messwerte aus vier Versuchen als arithmetische Mittelwerte ($\bar{f}_c$) in mN und in Prozent für die jeweilige Konzentration sowie deren Standardfehler (SEM) gelistet.

Tabelle 8: Wirkung von PGU 177 auf die Lungenarterie

PGU 177 ($\mu\text{mol/l}$)	$\bar{f}_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$\bar{f}_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$14,60 \pm 0,68$	0 ± 0	4	-
3	$14,04 \pm 0,63$	$-3,85 \pm 0,50$	4	n. s.
10	$13,15 \pm 0,69$	$-9,93 \pm 2,20$	4	n. s.
30	$8,89 \pm 0,75$	$-39,39 \pm 2,90$	4	0,05
100	$2,37 \pm 0,56$	$-82,88 \pm 2,56$	4	0,001

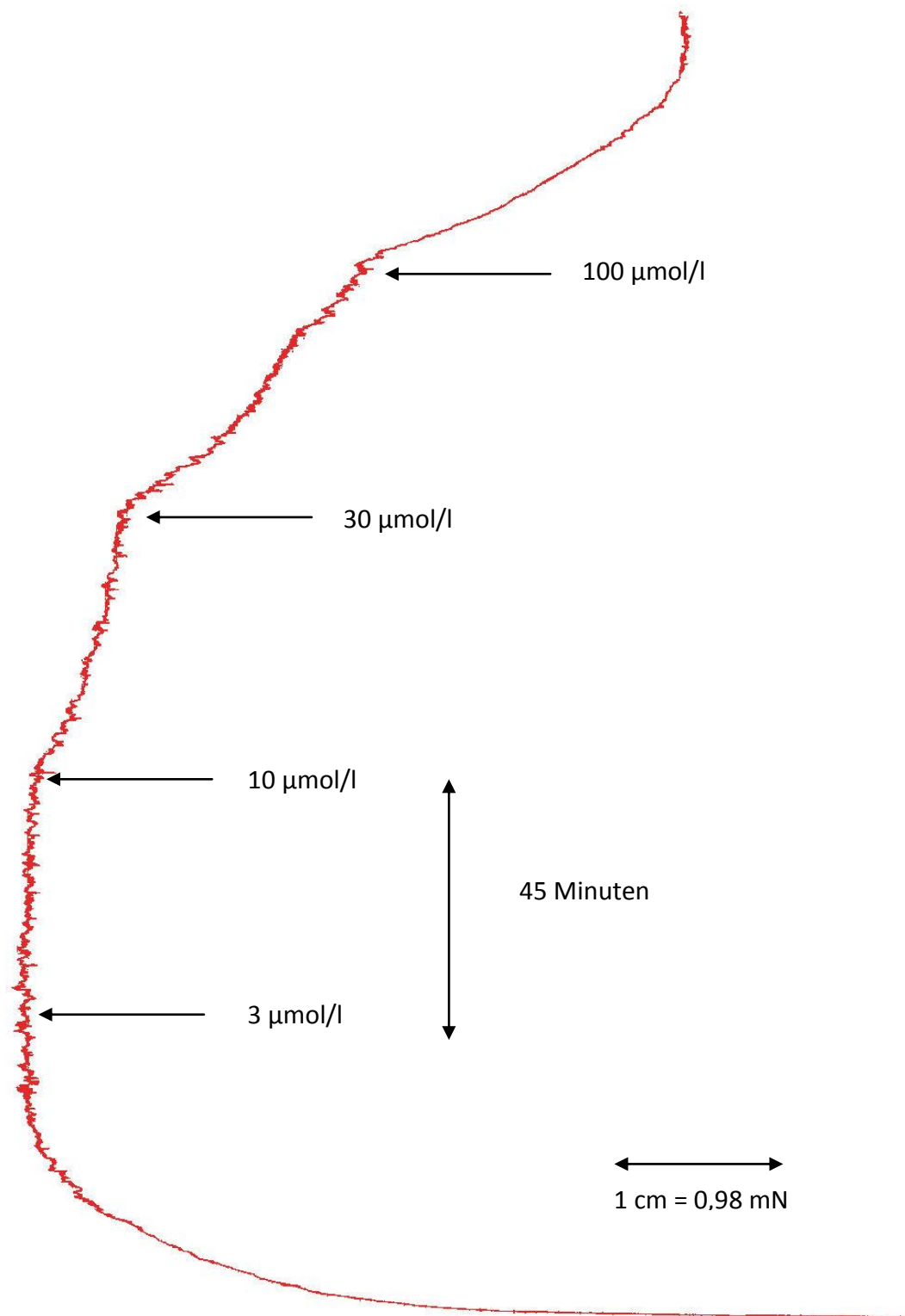
Nachdem die Werte graphisch dargestellt wurden, konnte aus dem Diagramm die effektive Konzentration (EC_{50}) von 40,15 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

Abbildung 16: Konzentration-Wirkungskurve von PGU 177 auf die Lungenarterie



Auf der X-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, auf der Y-Achse die Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei der entsprechenden Konzentration (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) und die Balken deren Standardfehler dar. Die strichlierten Linien kennzeichnen die EC_{50} .

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von PGU 177 auf die Lungenarterie



Die Kurve stellt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von Substanzkonzentration im Organbad dar. Erst ab der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Relaxation.

4.3 Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel

Auf den Papillarmuskelpräparaten wurde die Testsubstanz auf ihre inotrope Wirkung geprüft. Dabei wurden vier Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert betrug $1,10 \pm 0,10$ mN. Durch die kumulative Substanzzugabe kam es zu einer fast linearen Abnahme der Kontraktionskraft. Bei der Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ betrug diese Abnahme $16,67 \pm 2,42$ % und wurde immer größer. Bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft noch $0,51 \pm 0,05$ mN bzw. $-54,05 \pm 0,00$ % des Kontrollwertes.

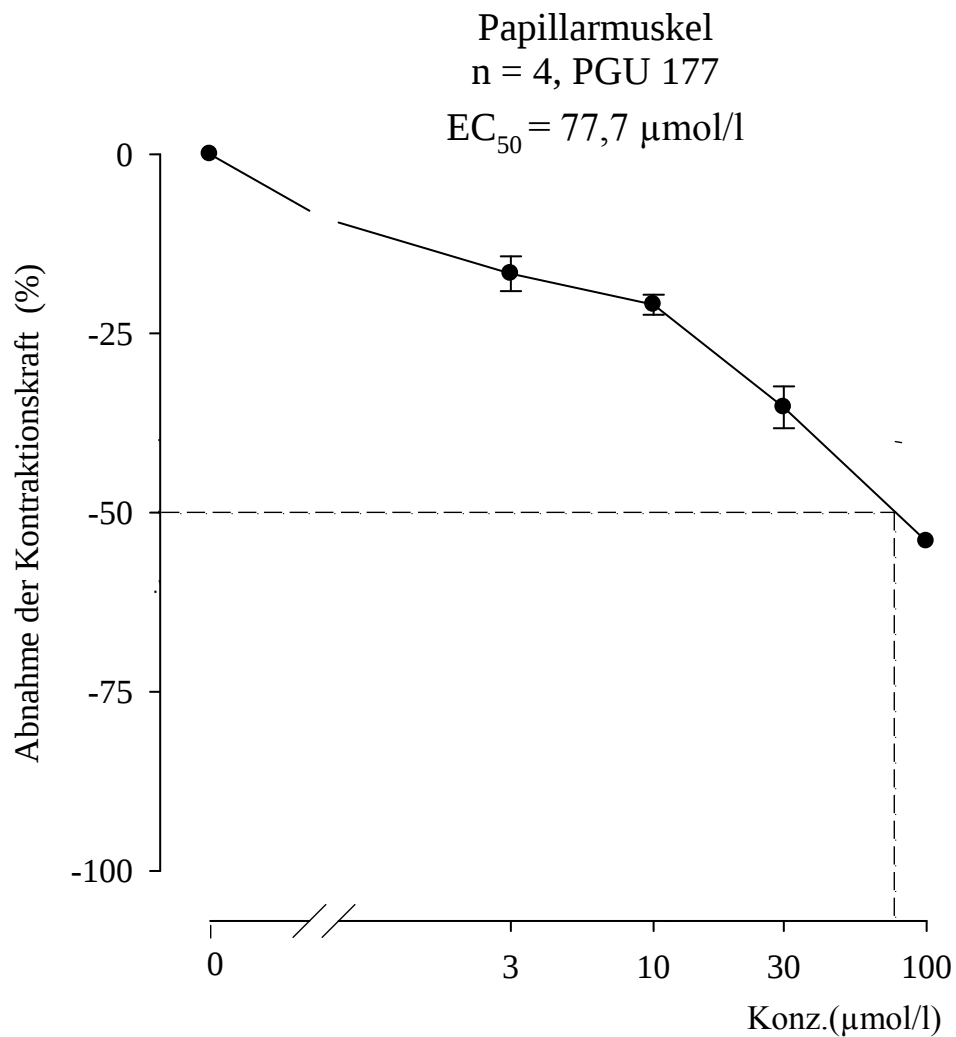
In der Tabelle 9 werden die arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardabweichung (SEM) bei der jeweiligen Konzentration sowohl in mN als auch in Prozent tabellarisch dargestellt.

Tabelle 9: Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel

PGU 177 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$1,10 \pm 0,10$	0 ± 0	4	-
3	$0,92 \pm 0,07$	$-16,67 \pm 2,42$	4	0,05
10	$0,87 \pm 0,08$	$-20,99 \pm 1,40$	4	0,05
30	$0,72 \pm 0,07$	$-35,32 \pm 2,92$	4	0,05
100	$0,51 \pm 0,05$	$-54,05 \pm 0,00$	4	0,01

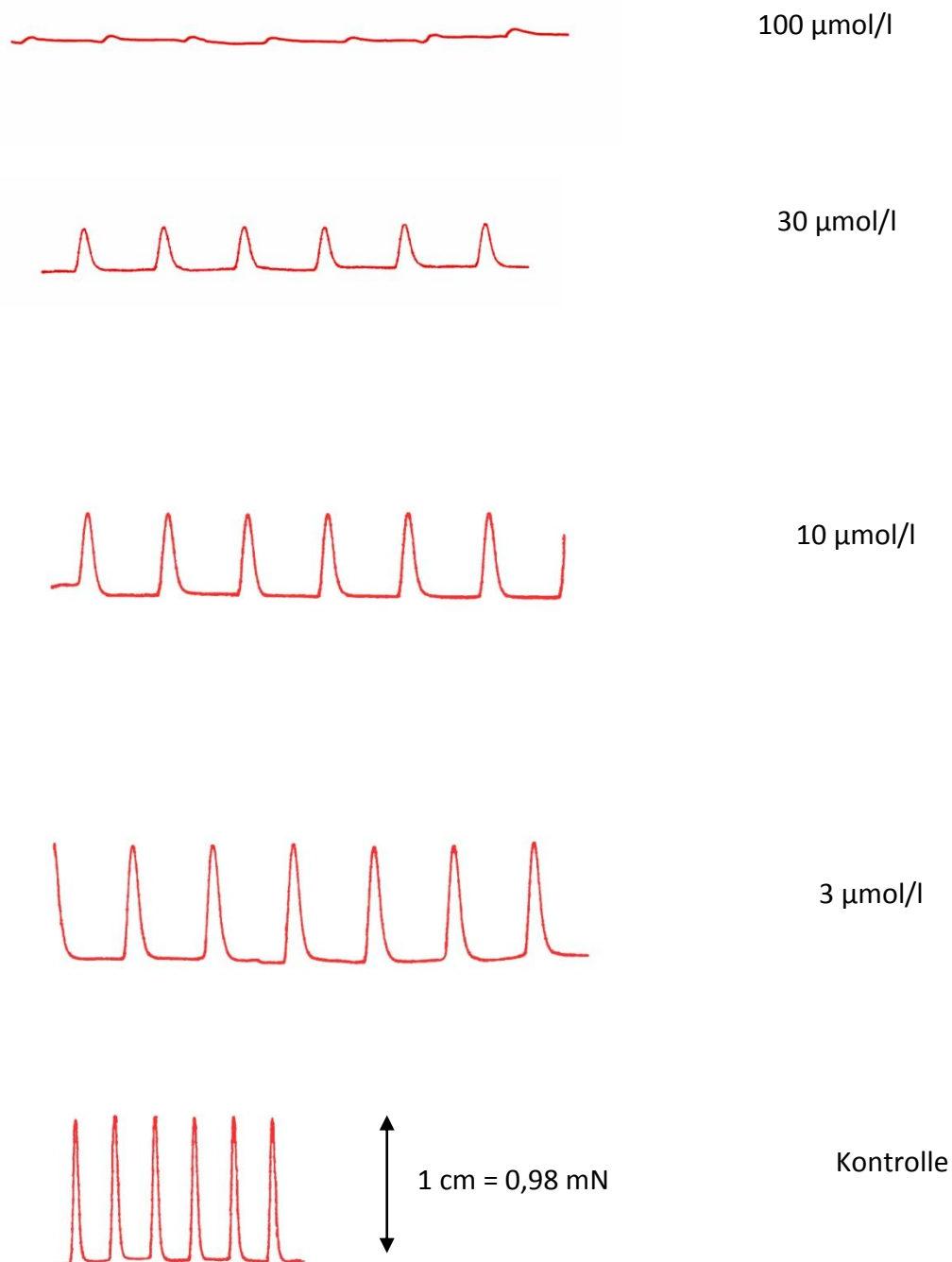
Aus dem „Sigma Plot 9.0“ Diagramm konnte die effektive Konzentration (EC_{50}) ermittelt werden. EC_{50} betrug $77,7 \mu\text{mol/l}$.

Abbildung 18: Konzentration-Wirkungskurve von PGU 177 auf den Papillarmuskel



Auf der X-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, auf der Y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei der entsprechenden Konzentration (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) und die Balken deren Standardfehler dar. Die strichlierten Linien kennzeichnen die EC_{50} .

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der Wirkung von PGU 177 auf den Papillarmuskel



Die Kontraktionen des Papillarmuskels wurden als Peaks am Schreiber registriert. Die Kontraktionskraft entsprach der Länge der Peakamplitude, die durch kumulative Substanzzugabe immer kürzer wurde. Der negative inotrope Effekt der Testsubstanz auf den Papillarmuskel konnte somit demonstriert werden.

4.4 Wirkung von PGU 177 auf den Darm

Die Testsubstanz PGU 177 wurde auf die spasmolytische Aktivität auf der Darmmuskulatur getestet. Dabei wurden vier Versuche durchgeführt. Die maximale Darmkontraktion von $14,06 \pm 0,67$ mN wurde durch chemische Reizung mit einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung erreicht und als Kontrollwert angesehen. Durch die Substanzzugabe in der niedrigsten Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ konnte die relaxierende Wirkung festgestellt werden, die durch weitere Substanzzugabe deutlicher wurde und bei der Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ $9,77 \pm 0,62$ mN betrug. Bei der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ war die Kontraktion auf $4,25 \pm 0,99$ mN abgefallen. Bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktion nur noch $-80,65 \pm 0,00$ % des Kontrollwertes bzw. $2,72 \pm 0,13$ mN. Bei den Konzentrationen ab 30 $\mu\text{mol/l}$ konnten die Messwerte als hochsignifikant angesehen werden, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 %.

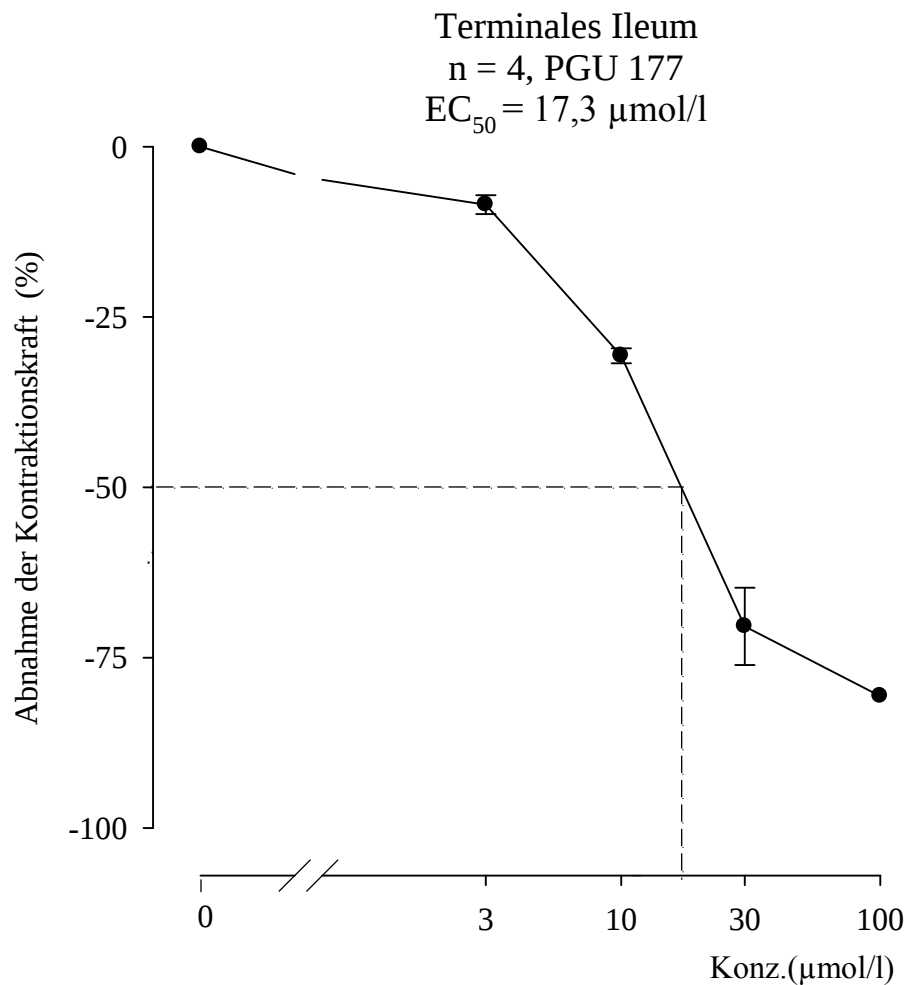
In der Tabelle 10 werden die Mittelwerte (f_c) in mN und in Prozent bei der entsprechenden Konzentration sowohl ihre Standardfehler (SEM) angezeigt.

Tabelle 10: Wirkung von PGU 177 auf den Darm

PGU 177 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$14,06 \pm 0,67$	0 ± 0	4	-
3	$12,88 \pm 0,71$	$-8,52 \pm 1,38$	4	n. s.
10	$9,77 \pm 0,62$	$-30,69 \pm 1,10$	4	0,05
30	$4,25 \pm 0,99$	$-70,40 \pm 5,67$	4	0,001
100	$2,72 \pm 0,13$	$-80,65 \pm 0,00$	4	0,001

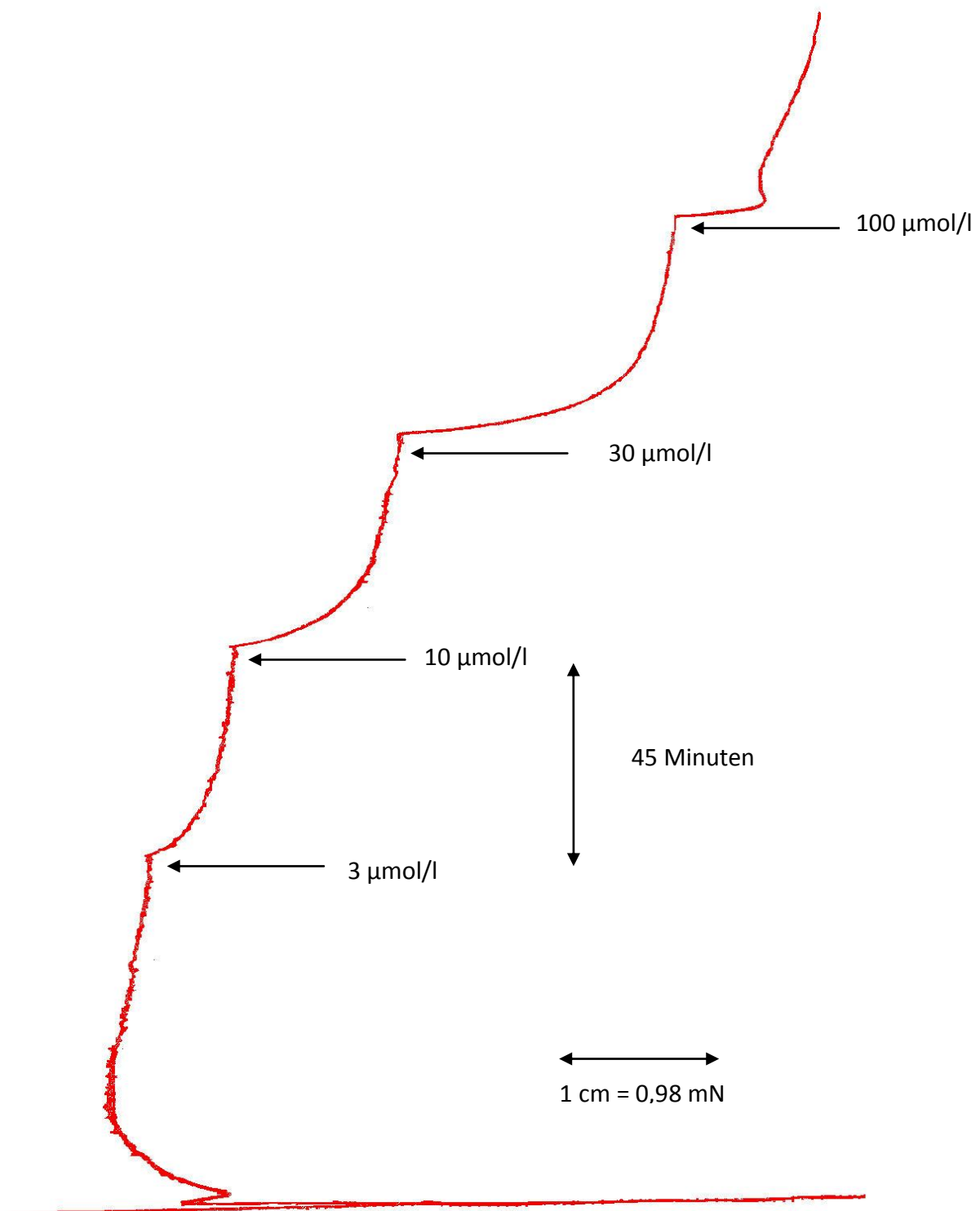
Mit Hilfe von „Sigma Plot 9.0“ wurden die Messwerte auch graphisch dargestellt. Aus der Konzentration-Wirkungskurve konnte die effektive Konzentration (EC_{50}) ermittelt werden. Um die 50%-ige Abnahme der Kontraktionskraft zu erreichen, wurde die Substanzkonzentration von 17,3 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad benötigt.

Abbildung 20: Konzentration-Wirkungskurve von PGU 177 auf das terminale Ileum



Auf der X-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, auf der Y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei der entsprechenden Konzentration (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) und die Balken deren Standardfehler dar. Die strichlierten Linien kennzeichnen die EC_{50} .

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von PGU 177 auf das terminale Ileum



Die Kurve zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration in der Organkammer. Nach der Substanzzugabe kam es zu einer sofortigen Spasmolyse der Darmmuskulatur. Am Ende des Versuchs konnte eine vollständige Dilatation registriert werden.

4.5 Wirkung von PGU 177 auf die Aorta

Die dilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Aorta war eine der geprüften Wirkungen der Substanz PGU 177. Dabei wurden fünf Versuche durchgeführt. Nach dem Erreichen der maximalen Kontraktion von $10,35 \pm 1,55$ mN, die als Kontrollwert eingesetzt wurde, wurde die Testsubstanz kumulativ nach dem Pipettierschema (Tabelle 3) eingespritzt. Die Abnahme der Kontraktionskraft war nicht signifikant. Bei der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft $8,39 \pm 1,59$ mN bzw. $-19,35 \pm 6,63$ % des Kontrollwertes. Bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich die Kontraktionskraft von $5,65 \pm 0,86$ mN, was $-45,34 \pm 4,76$ % des Ausgangswertes ausmachte.

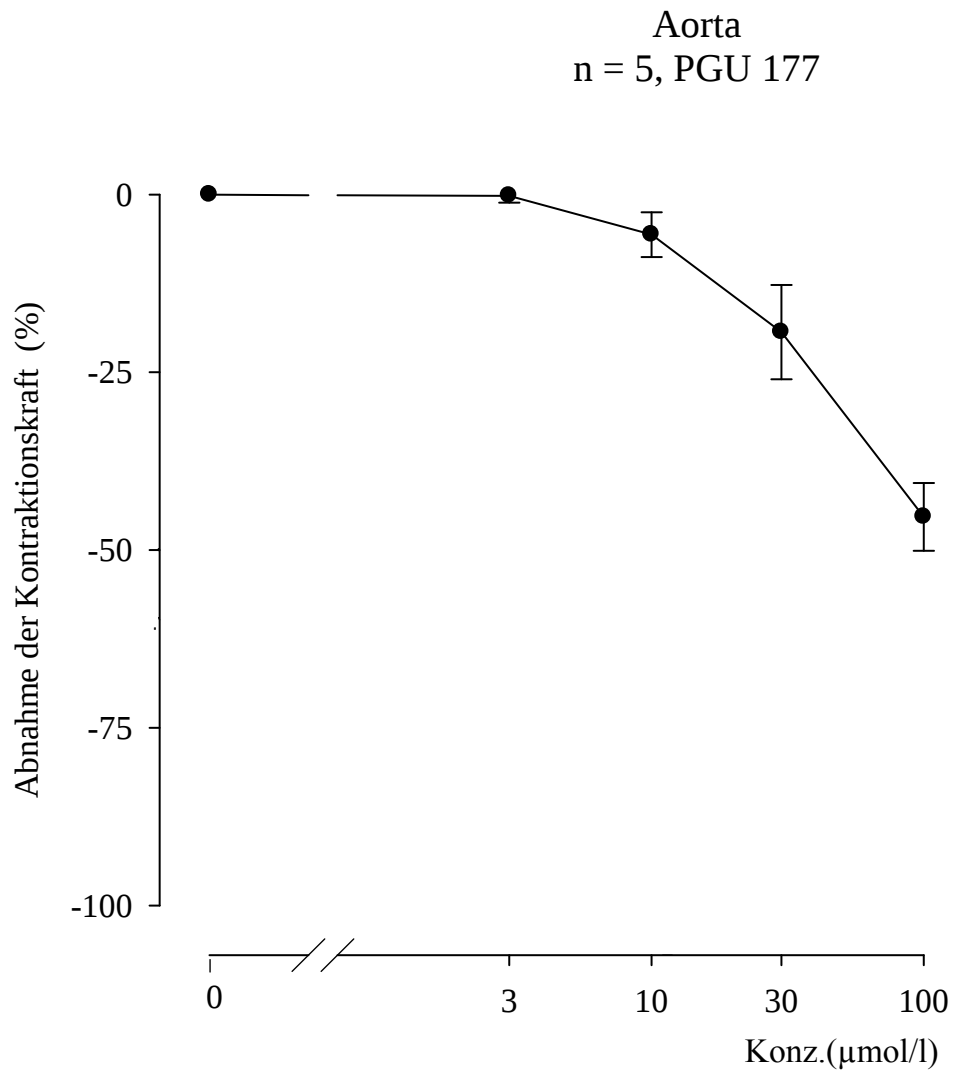
Die Tabelle 11 zeigt die Mittelwerte (fc) und deren Standardabweichungen (SEM) bei der vorgeschriebenen Konzentrationen in mN und in Prozent.

Tabelle 11: Wirkung von PGU 177 auf die Aorta

PGU 177 ($\mu\text{mol/l}$)	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$10,35 \pm 1,55$	0 ± 0	5	-
3	$10,31 \pm 1,54$	$-0,19 \pm 0,94$	5	n. s.
10	$9,76 \pm 1,53$	$-5,64 \pm 3,14$	5	n. s.
30	$8,39 \pm 1,59$	$-19,35 \pm 6,63$	5	0,05
100	$5,65 \pm 0,86$	$-45,34 \pm 4,76$	5	0,01

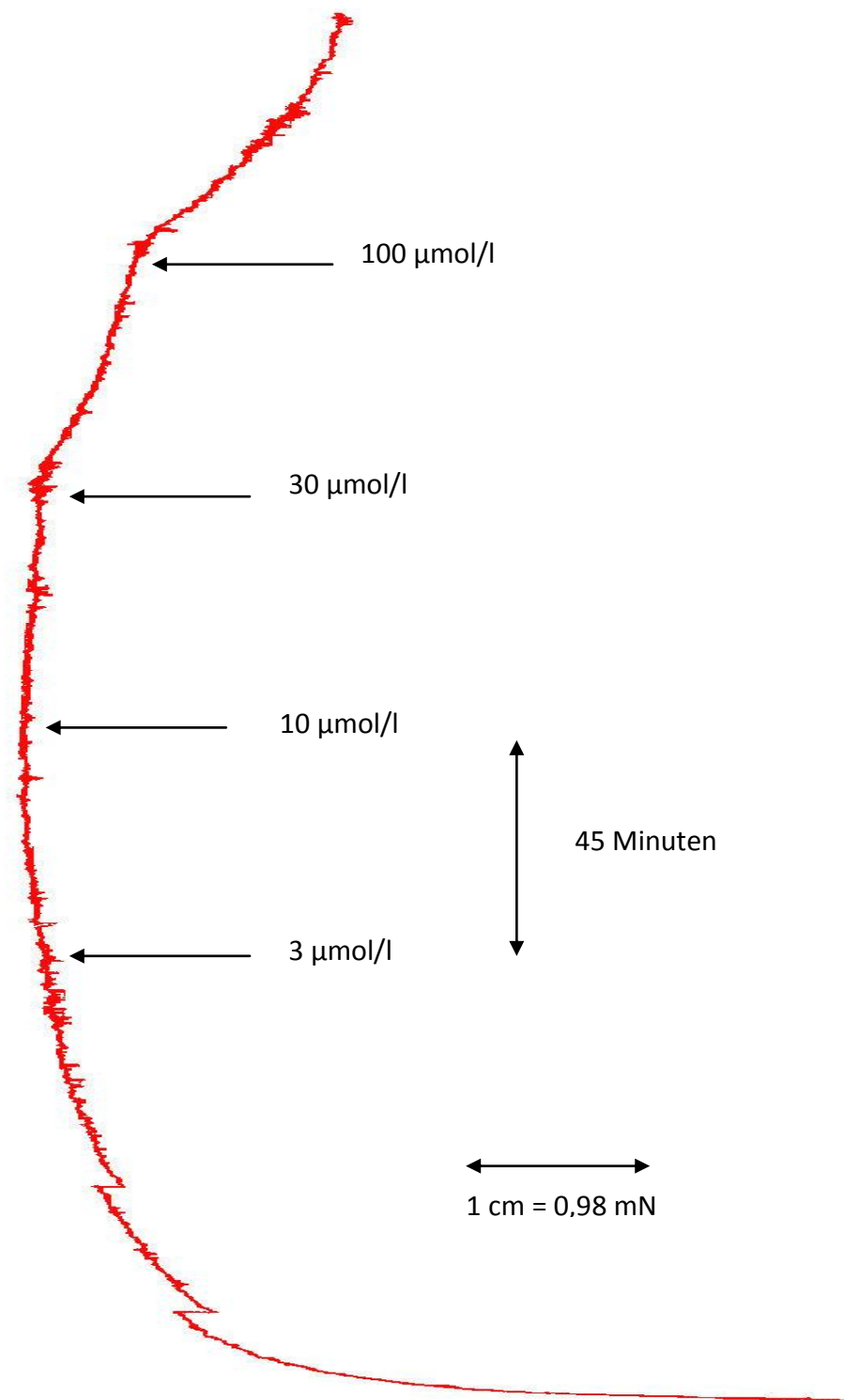
Die Messwerte wurden auch im Programm „Sigma Plot 9.0“ eingetragen und somit konnten sie auch graphisch dargestellt werden. Die dilatierende Wirkung war nicht ausreichend, um die effektive Konzentration (EC_{50}) ermitteln zu können, d.h. dass die Konzentration über 100 $\mu\text{mol/l}$ betragen sollte, um die 50%-ige Kontraktionsabnahme zu erzielen.

Abbildung 22: Konzentration-Wirkungskurve von PGU 177 auf die Aorta



Auf der X-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, auf der Y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft bei der entsprechenden Konzentration (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) und die Balken deren Standardfehler dar. Die effektive Konzentration (EC_{50}) konnte nicht ermittelt werden.

Abbildung 153: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von PGU 177 auf die Aorta



Die Kurve zeigt die Änderung der Kontraktionskraft der Aorta in Abhängigkeit von Substanzkonzentration im Organbad. Durch die kumulative Substanzzugabe kam es zu einer schwachen Dilatation der Aorta erst ab einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$.

4.6 Untersuchung des Wirkmechanismus von Testsubstanz PGU 177 auf den Darm

Der Testsubstanz PGU 177 erwies die stärkste relaxierende Wirkung auf die glatte Darmmuskulatur, deshalb war es sinnvoll auf den Darmpräparaten den möglichen Wirkmechanismus mit Hilfe von Antagonisten NO-L-Arginin und Glibenclamid zu untersuchen.

4.6.1 Wirkung von PGU 177 in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm

Die Darmmuskulatur wurde zuerst mit Hilfe von 60 mmolarer Kaliumchloridlösung maximal vokontrahiert. Der Kontrollwert betrug $8,07 \pm 2,13$ mN. Anschließend wurde 100 μ l einer 100 μ M Lösung von NO-L-Arginin zugefügt. Die schwache dilatierende Wirkung konnte festgestellt werden und die Kontraktionskraft fiel auf $7,78 \pm 2,02$ mN, was nicht signifikant war. Nach der Zugabe von Testsubstanz betrug die Kontraktionskraft $2,51 \pm 1,26$ mN, d.h. die Kontraktionskraft ist um ca. 30 % kleiner geworden. Dabei wurden drei Versuche durchgeführt.

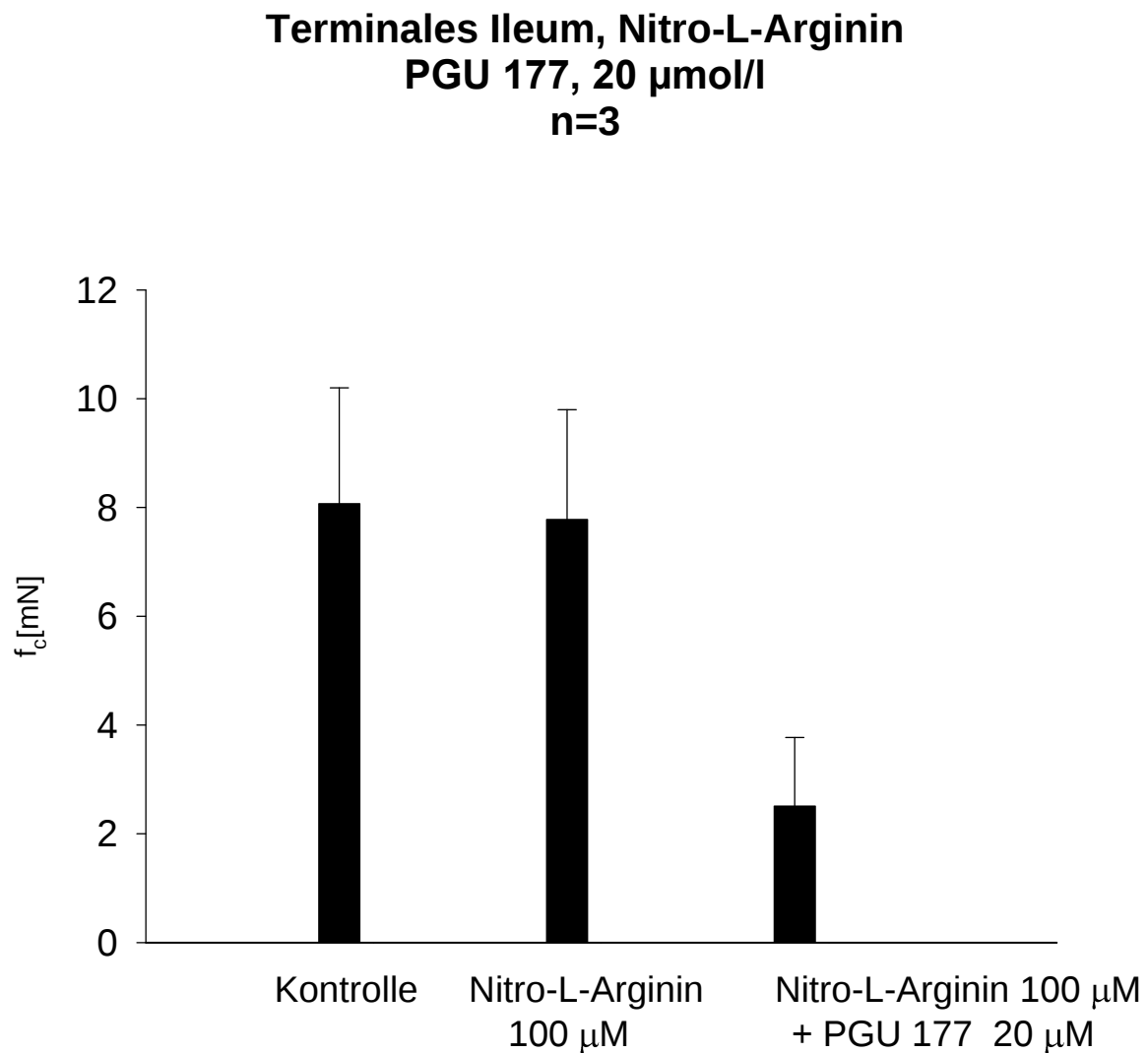
In der Tabelle 12 sind die arithmetischen Mittelwerte (f_c) in mN sowohl deren Standardfehler (SEM) für die vorgeschriebene Konzentration und Substanz bzw. Kombination dargestellt.

Tabelle 12: Wirkung von PGU 177 in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm

Konzentration (μ mol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$8,07 \pm 2,13$	3	-
100 μ M NO-L-Arginin	$7,78 \pm 2,02$	3	-
+ 20 μ M PGU 177	$2,51 \pm 1,26$	3	0,05

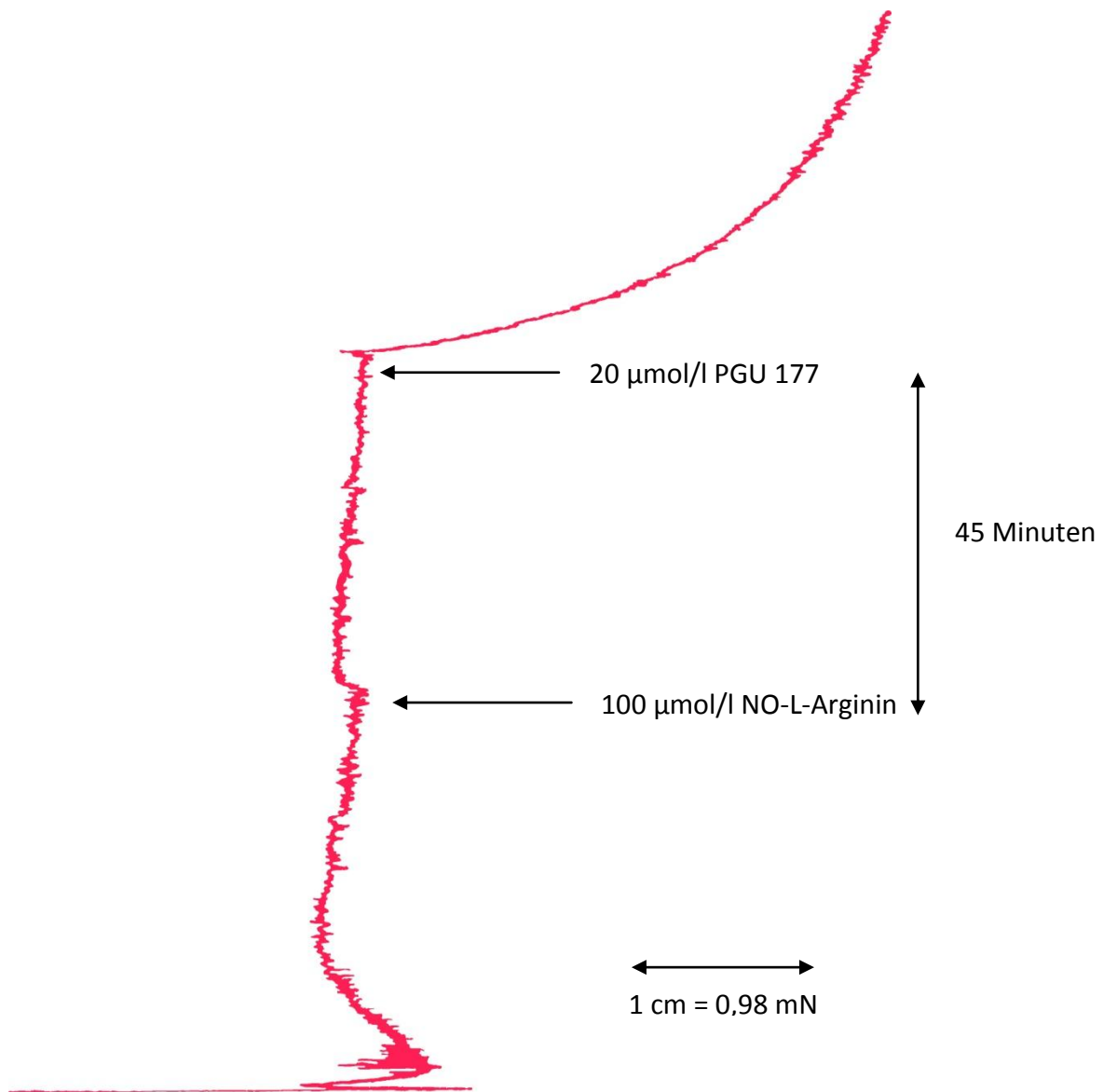
Mit Hilfe von Balkendiagrammen konnten die Messwerte auch graphisch dargestellt werden. Das Diagramm zeigt die Änderung der Kontraktionskraft (f_c) in mN in Abhängigkeit von zugefügten Substanzen bei der vorgegebenen Konzentration (100 μ mol/l NO-L-Arginin und Kombination von Antagonisten mit 20 μ mol/l PGU 177).

Abbildung 24: Graphische Darstellung der Wirkung von NO-L-Arginin und die Wirkung in Kombination mit PGU 177



Die Balken zeigen die arithmetischen Mittelwerte des Kontrollwertes, dann die Kontraktionskraft nach der Zugabe von 100 μl NO-L-Arginin und die Kontraktionskraft nach der anschließenden Zugabe von 20 μl PGU 177-Stammlösung. Deren Standardfehler wurden als Linien über den Balken dargestellt.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von PGU 177 in Kombination mit NO-L-Arginin



Die Wirkungskurve zeigt keine Veränderung der Kontraktionskraft der Darmmuskulatur bei der Zugabe von 100 µmol/l NO-L-Arginin. Durch die Zugabe von 20 µmol/l PGU 177 kam es zu einer starken Spasmolyse.

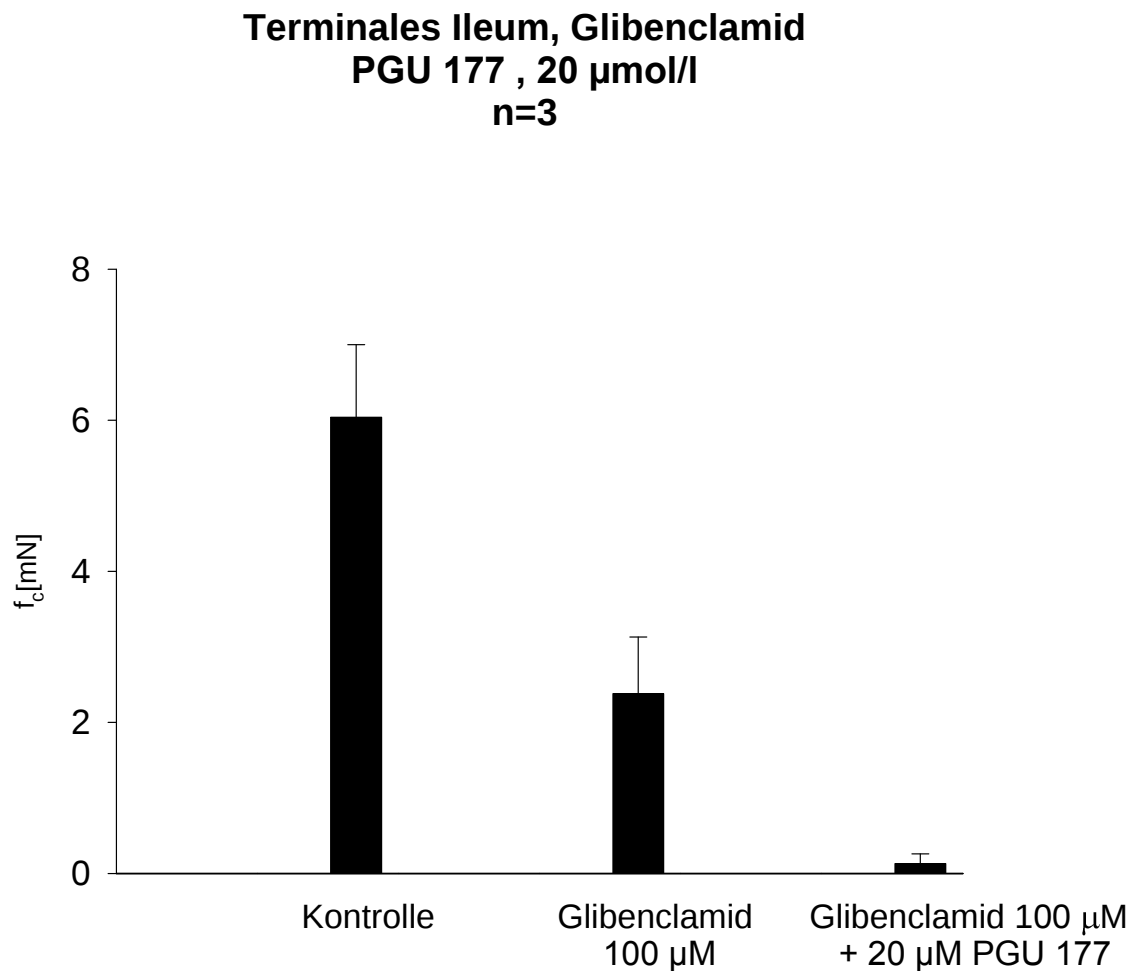
4.6.2 Wirkung von PGU 177 in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm

Die maximale Vorkontraktion der Darmmuskulatur von $6,04 \pm 0,96$ mN wurde durch Zugabe einer 60 mmolaren Kalimchloridlösung erreicht. Anschließend wurde der Antagonist, Glibenclamid, zugegeben, sodass seine Konzentration im Organbad $100 \mu\text{mol/l}$ betrug. In der Steady-state-Phase betrug die Kontraktionskraft $2,38 \pm 0,75$ mN. Danach wurde die Testsubstanz zugegeben. Die Kontraktionskraft nahm weiter ab und betrug am Ende $0,13 \pm 0,13$ mN, was einer fast 100-prozentigen Relaxation entspricht. Glibenclamid ist in DMSO löslich, dessen Auswirkung bei der Interpretation der Ergebnisse nicht berücksichtigt wurde.

Tabelle 13: Wirkung von PGU 177 in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm

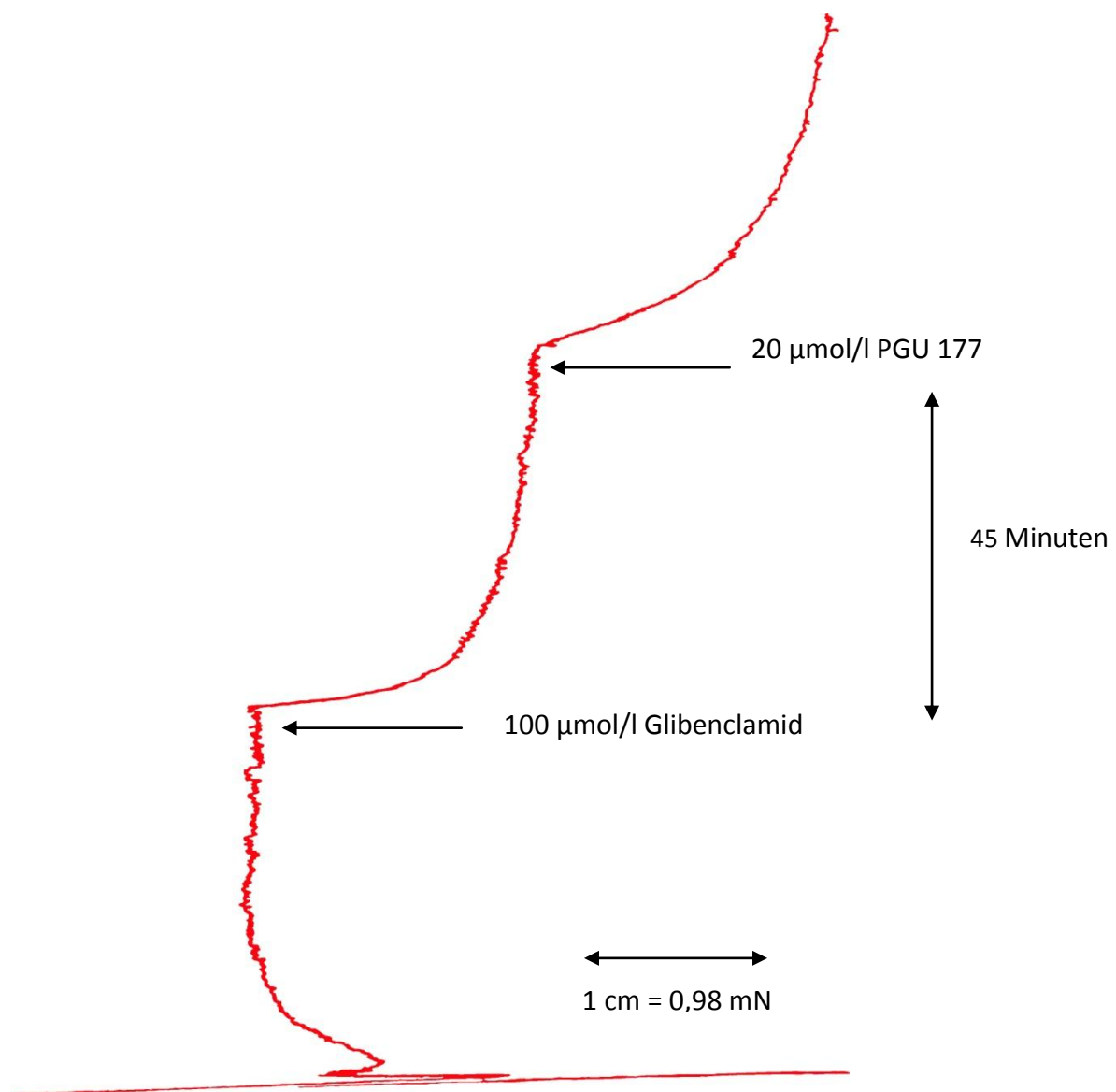
Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$6,04 \pm 0,96$	3	-
100 μM Glibenclamid	$2,38 \pm 0,75$	3	-
+ 20 μM PGU 177	$0,13 \pm 0,13$	3	0,05

Abbildung 26: Graphische Darstellung der Wirkung von Glibenclamid und seine Wirkung in Kombination mit PGU 177



Die Balken zeigen die arithmetischen Mittelwerte des Kontrollwertes, dann die Kontraktionskraft nach der Zugabe von 100 μl Glibenclamid und die Kontraktionskraft nach der anschließenden Zugabe von 20 μl PGU 177-Stammlösung. Deren Standardfehler wurden als Linien über den Balken dargestellt.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von PGU 177 in Kombination mit Glibenclamid



Die Wirkungskurve zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft der Darmmuskelzellen unter Einwirkung von Glibenclamid. Nach 45-minütiger Einwirkphase wurde die Testsubstanz zugesetzt, was zu noch stärkeren Spasmolyse führte. Eine vollständige Dilatation konnte aufgezeichnet werden.

5 DISKUSSION

Etwa 25% aller Todesfälle sind direkt oder indirekt auf eine Hypertonie zurückzuführen (Mutschler et al. 2001). Das ist ein Grund, warum die Forscher ständig versuchen, neue Substanzen für die Behandlung von Hypertonie zu entwickeln.

Diese Diplomarbeit wurde mit der Hypothese „Bei der Zersetzung von Substanz PGU 177 wird H_2S freigesetzt und ist für die Wirkung der Substanz verantwortlich“ begonnen. Die Wirkung von PGU 177 auf die Herzmuskelzellen und auf die glatte Muskulatur sollte ermittelt werden.

Die erwartete Wirkung auf die Herzmuskelpräparate war ein negativ chronotroper und negativ inotroper Effekt. Diese Erwartungen wurden in den Versuchen bestätigt. Mehrere ältere Studien demonstrierten die protektive Wirkung von H_2S auf das Herz von Ratten. Nach Anwendung von NaHS sank die Mortalitätsrate durch Myocardinfarkt von 35 % auf 27,5 % (Zhu et al. 2006).

In der Tabelle 14 befinden sich die arithmetischen Mittelwerte der Schlagfrequenz (f) für den rechten Vorhof und der Kontraktionskraft (fc) für den Papillarmuskel in Prozent, sowie deren Standardfehler (SEM) bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Die effektive Konzentration (EC_{50}) in $\mu\text{mol/l}$ ist ebenfalls gelistet.

Tabelle 14: Wirkung von PGU 177 auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	f/fc $\pm$ SEM (%) 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Rechter Vorhof	-96,15 $\pm$ 3,85	38,8
Papillarmuskel	-54,05 $\pm$ 0,00	77,7

Die Substanz zeigte eine ausgeprägte negativ chronotrope Wirkung, die bei der niedrigsten Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ schwach war, aber immer stärker wurde. Ein Herzstillstand konnte bei drei von vier Präparaten festgestellt werden. Die Abnahme der Schlagfrequenz betrug 96,15 $\pm$ 3,85 % des Kontrollwertes von 175 $\pm$ 16,83 Schläge/min. Die Messwerte für die Konzentrationen ab 10 $\mu\text{mol/l}$ konnten als signifikant beurteilt werden. Die effektive Konzentration war relativ niedrig und lag bei 38,8 $\mu\text{mol/l}$.

Die Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels wurde ebenfalls bestätigt, aber wenn man dies mit der Wirkung auf den rechten Vorhof vergleicht, war es deutlich geringer. Die effektive Konzentration (EC_{50}) von $77,7 \mu\text{mol/l}$ konnte ermittelt werden und ist doppelt so hoch, wie die beim rechten Vorhof. Zwischen 3 und $10 \mu\text{mol/l}$ änderte sich die Kontraktionskraft nur unwesentlich. Bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug sie $-54,05 \pm 0,00 \%$. Das Lösungsmittel (DMSO) hatte einen starken negativen Effekt auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels. Eine negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz konnte damit demonstriert werden.

Um die vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Substanz auf die Präparate der glatten Muskulatur zu zeigen, wurden mehrere Versuchsreihen auf der Lungenarterie, dem Darm und der Aorta durchgeführt. Die Präparate wurden mit Kaliumchloridlösung vorkontrahiert, um die maximale Kontraktionskraft zu entwickeln. Vor der Auswertung der Ergebnisse musste der Einfluss des Lösungsmittels (DMSO) abgezogen werden.

In der Tabelle 15 werden die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft (fc) in mN und in Prozent dargestellt, sowie deren Standardfehler (SEM) bei der Endkonzentration $100 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 15: Wirkung von PGU 177 auf glatte Muskulatur

Organpräparat	Kontrollwert (mN)	fc $\pm$ SEM (mN) 100 $\mu\text{mol/l}$	fc $\pm$ SEM (%) 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Arteria pulmonalis	$14,60 \pm 0,68$	$2,37 \pm 0,56$	$-82,88 \pm 2,56$	40,15
Terminales Ileum	$14,06 \pm 0,67$	$2,72 \pm 0,13$	$-80,65 \pm 0,00$	17,30
Aorta	$10,35 \pm 1,55$	$5,65 \pm 0,86$	$-45,34 \pm 4,76$	$> 100,00$

Aus der Tabelle ist erkennbar, dass die Substanz PGU 177 eine vasodilatierende Wirkung hat. Auf die Lungenarterie und dem Darm war diese Wirkung stark und bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ nahm er um $82,88 \pm 2,56 \%$, bzw. um $80,65 \pm 0,00 \%$ ab.

Bei den Lungenarterienpräparaten war die Abnahme der Kontraktionskraft am Anfang relativ schwach. Erst ab der Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ nahm sie steil zu. Die effektive Konzentration lag bei $40,15 \mu\text{mol/l}$.

Bei den Darmpräparaten wurde eine sofortige Spasmolyse sichtbar, die immer stärker wurde, was aus dem Kurvenverlauf (Abbildung 20) erkennbar ist. Deswegen konnte bei Darmpräparaten auch eine niedrigere effektive Konzentration (EC_{50}) von $17,3 \mu\text{mol/l}$ festgestellt werden. Ab der Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ konnten die Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als signifikant und ab der Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ als hochsignifikant angesehen werden.

Bei den Aortapräparaten wurde eine relaxierende Wirkung erwartet. Es gibt mehrere Studien die diesen Effekt bestätigen. H_2S sollte in vitro auf die Aorta von Ratten vasodilatierend wirken (Hosoki et al. 1997). Zhao et al. (2001) prüften den Einfluss von H_2S auf die mit verschiedenen Konzentration an Kaliumchloridlösung vorkontrahierten Aortapräparaten und demonstrierten ebenfalls diesen Effekt. Die Testsubstanz PGU 177 führte zur Vasodilatation der Aortaringe, aber dieser Effekt war viel schwächer als bei den anderen Präparaten. Die Kontraktionskraft bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug nur $-45,34 \pm 4,76 \%$ des Kontrollwertes. Die effektive Konzentration konnte nicht festgestellt werden, da sie über $100 \mu\text{mol/l}$ lag. Die mögliche Ursache für die schwächere Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta könnten die physiologischen Charakteristika der verwendeten Aortapräparate sein.

Der Wirkmechanismus der Testsubstanz wurde ebenfalls untersucht. Da die niedrigste effektive Konzentration (EC_{50}) am Darm ($17,3 \mu\text{mol/l}$) war, haben wir die Versuche an diesen Präparaten durchgeführt. Dafür haben wir die potentielle Antagonisten NO-L-Arginin und Glibenclamid eingesetzt. Die vasodilatierende Wirkung von H_2S kommt durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen zu Stande (Zhao et al. 2001). Kubo et al. (2007) zeigten, dass der Glibenclamid die durch H_2S induzierte Kontraktion oder Relaxation der Aortaringe von Mäusen nicht aufheben konnte und bei Ratten hatte dies nur partiellen Effekt.

Glibenclamid wurde in einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Nach 45 Minuten wurde die Substanz zugesetzt. Es wurde eine fast vollständige Relaxation der Gefäße registriert. Die Substanz konnte die durch Glibenclamid induzierte Blockade der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle aufheben, was die Ergebnisse älteren Studien unterstützt. Das bedeutet, dass die relaxierende Wirkung der Testsubstanz nicht durch eine Öffnung der ATP-abhängigen K^+ -Kanälen zustande kommt.

Durch die Zugabe von $100 \mu\text{mol/l}$ einer NO-L-Arginin-Lösung ist es zu keiner Veränderung der Kontraktionskraft gekommen. NO-L-Arginin blockierte die NO-Synthase, aber durch den

Zusatz von Testsubstanz wurde diese Blockade aufgehoben und es ist zu einer Dilatation (ca. 30 %) gekommen. Daraus kann man schließen, dass die Substanz PGU 177 auch keinen Effekt auf die NO-Synthase ausübt.

Zur Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus wären deshalb noch weitere Untersuchungen erforderlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In Rahmen meiner Diplomarbeit wurde eine neu synthetisierte Substanz, PGU 177, an den isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Es wurden drei Präparate der glatten Muskulatur isoliert, nämlich die Lungenarterie, der Darm und die Aorta, sowie zwei Herzpräparate, der rechte Vorhof und der Papillarmuskel.

Am Versuchstag wurden die Organe entnommen und entsprechend präpariert. Sie mussten die ganze Zeit in der frisch zubereiteten physiologischen Nährlösung, die mit Oxy-mix ständig begast wurde, aufbewahrt werden, um die Hypoxie und Schädigung der Zellen zu vermeiden. Für die Durchführung der Versuche standen zwei Apparaturen zur Verfügung. Für den Papillarmuskel verwendete man die Apparatur I und für die restlichen Präparate die Apparatur II.

Die Substanz zeigte eine negativ chronotrope Wirkung, indem die Schlagfrequenz bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ um $96,15 \pm 3,85 \%$ des Kontrollwertes gesenkt wurde. Die effektive Konzentration (EC_{50}) betrug 38,8 $\mu\text{mol/l}$. Die Kontraktilität des Papillarmuskels wurde ebenfalls negativ beeinflusst. Die Kontraktionskraft betrug noch $-54,05 \pm 0,00$ des Ausgangswertes bei der Endkonzentration. Die effektive Konzentration (EC_{50}) von 77,7 $\mu\text{mol/l}$ konnte ermittelt werden.

Die erwartete dilatierende bzw. spasmolytische Auswirkung auf die glatte Muskulatur konnte bestätigt werden. Diese Wirkung war bei der Lungenarterie und beim Darm bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ annähernd gleich und die Kontraktionskraft (f_c) lag bei ca. -80% des Kontrollwertes. Wobei die effektive EC_{50} -Kontraktion deutlich niedriger bei Darmpräparaten war und 17,3 $\mu\text{mol/l}$ betrug. Bei der Lungenarterie ergab sich eine EC_{50} -Konzentration von 40,15 $\mu\text{mol/l}$. Die relaxierende Wirkung bei den Aortapräparaten war nicht so stark ausgeprägt wie erwartet. Bei der Endkonzentration kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um $45,34 \pm 4,76 \%$ des Ausgangswertes.

Bei der Zersetzung von PGU 177 wird Schwefelwasserstoff (H_2S) freigesetzt. Viele ältere in vitro Studien demonstrierten, dass H_2S einen relaxierenden Effekt auf die glatten Muskelzellen hat. Wir wollten herausfinden, auf welche Weise das H_2S wirkt.

Die niedrigste EC_{50} -Konzentration konnte beim Darm demonstriert werden. Deshalb versuchten wir, den möglichen Wirkmechanismus auf Darmpräparaten aufzuklären. Dafür wurde ein K_{ATP} -Kanallocker, Glibenclamid, und ein NO-Synthase-Hemmer, NO-L-Arginin,

eingesetzt. Trotz der Blockade von NO-Synthase und ATP-abhängigen K^+ -Kanälen ist es zu einer weiteren Relaxation der Darmmuskulatur gekommen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Substanz wahrscheinlich nicht durch eine Aktivierung von ATP-abhängigen- K^+ -Kanälen und auch nicht über eine Induzierung von endothelialen NO-Synthase ihren relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur ausübt. Um den Wirkmechanismus der Testsubstanz PGU 177 wären deshalb weitere Untersuchungen erforderlich.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abe K and Kimura H (1996) The possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066 – 1071.

Ashcroft F (1998) Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11: 97 – 118.

Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK (2005a) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacology* 145: 141 – 144.

Collins R, MacMahon S (1994) Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *Br Med Bull* 50: 272 – 98.

Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM (1990) Sequence of cDNA for rat cystathionine gamma-lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J* 269: 335 – 340.

Forth W, Henschler d, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2009, 10. Auflage) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer.

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

Griffith OW (1987) Mammalian sulfur amino acid metabolism. *Methods in enzymology* 143: 366 – 367.

Gueyffier F, Boissel JP, Boutitie F, Pocock S, Coope J, Cutler J, Ekblom T, Fagard R, Friedman L, Perry m, Prineas R, Schron E (1997) Effect of antihypertensive drug treatment on cardiovascular outcomes in women and men. A meta-analysis of individual patient data from randomized, controlled trials. The INDANA Investigators. *Ann Intern Med* 126(10): 761–767.

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.

Ishii K, Chang B, Kerwin JF Jr, Huang Z, Murad F (1990) N-Nitro-L-Arginine: A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur J Pharmacology* 176: 219 – 223.

Kamoun P (2001) Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical Hypotheses* 57: 389 – 392.

Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster jr JR, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *American J Physiol. Heart Circ Physiol.* 292: H1953 – H1960.

Kubo S, Kurowawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A (2007) Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* 241: 92 – 97.

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

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto – Tellez M, Moore PK (2005) Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB J* 19: 1196 – 1198

Mutschler E, Geisslinger G, Heyo K, Kroemer K, Ruth P, Schärfer-Korting M (2008, 9.Auflage) *Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

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

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

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81: 133-176.

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.

Swaroop M, Bradely K, Ohura T, Tahara T, Roper MD, Rosenberg LE, Kraus JP (1992) Rat cystathionine β -Synthase. *J Biol Chem* 267: 11455 – 11461.

Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y (1995) Cardiac ATP-sensitive K^+ channels: regulation by intracellular nucleotides and K^+ -opening drugs. *Am J Physiol* 269: C525 – C545.

Wang R, Wang ZZ, Wu L (1997a) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 121: 927-934.

Wang R, Wu L, Wang ZZ (1997b) The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 434: 285-291.

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

Yan H, Du J, Tang C (2004) The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem and Biophys Res Commun* 313: 22 – 27.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous $KATP$ channel opener. *The EMBO Journal* Vol. 20 No. 21: PP 6008-6016.

Zhu ZY, Huang H, Tan CS, Whiteman M, Lu J and Moore PK, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Shan (2006) Hydrogen sulphide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats, *J Appl Physiol* 102:261-268.

8 CURRICULUM VITAE

Name

Alma Sejdinović

Persönliche Daten

Geburtsdatum und Ort: 25.08.1986 in Tuzla, Bosnien und Herzegowina
Staatsangehörigkeit: Bosnien und Herzegowina
Familienstand: ledig
Adresse: Forsthausgasse 16/2/7302
1200 Wien
Eltern: Nevresa und Muhamed Sejdinović

Schulbildung

1993-2001 Grundschole in Lukavac (Bosnien)
2001-2003 „Gymnasium Lukavac“
2003-2004 Studentenaustauschjahr,
Lakes High School, Tacoma/Seattle, USA
2004-2005 “Gymnasium Lukavac”
2005-2006 Vorstudienlehrgang, Deutschkurs
Okt. 2006 Beginn des Pharmaziestudiums an der
Universität Wien

Sprachen

Bosnisch (Muttersprache), Deutsch, Englisch

Berufliche Erfahrungen

Feb. 2011-Feb. 2012 Floridus Apotheke, Mag. pharm. Ryslavy,
1210 Wien